

На правах рукописи

ЮШИНА Инна Алексеевна

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ХЕМОКИНОВ ПРИ
ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Белгород – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" Минобрнауки РФ

Научный руководитель: **Чурносов Михаил Иванович**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Полоников Алексей Валерьевич

доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО "Курский государственный медицинский университет" Минздравсоцразвития РФ, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии

Щипков Валерий Петрович

доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО "Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ, и.о. заведующего кафедрой биологии и общей генетики

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития РФ

Защита диссертации состоится «___» _____ 2012 года в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАО ВПО "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО "Белгородский государственный национальный исследовательский университет"

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хронический гломерулонефрит (ХГН) является мультифакториальным прогрессирующим заболеванием почек в результате которого развивается длительный воспалительный процесс, текущий волнообразно, что приводит в итоге к склерозу, гиалинозу, запустеванию клубочков, развитию хронической почечной недостаточности. [Кутырина, 2002, Syrjanen et al., 2002; Картамышева и др., 2004]. Хроническая почечная недостаточность — острейшая социально-экономическая проблема. Важность проблемы хронической почечной недостаточности с медицинской, социальной и организационной точек зрения обусловлена высокой летальностью, инвалидизацией и сложностью технического обеспечения современных методов лечения этой патологии [Ермоленко, 2006]. В настоящее время в мире жизнь более 1 млн больных продолжается благодаря замещающей терапии и 2/3 из них проводят хронический гемодиализ. В развитых странах число больных, находящихся на хроническом гемодиализе, составляет 600-1100 на 1 млн населения. Необходимо отметить, что подавляющее число пациентов с данной патологией являются лицами трудоспособного возраста [Тареева, 2000; Rabelink, 2000].

Хронический гломерулонефрит является генетически детерминированным иммуновоспалительным заболеванием [Шулутко, 2003], важное значение в развитии которого, как свидетельствуют данные литературы, играют хемокины [Vielhauer et al., 2004; Eis et al., 2004; Anders et al., 2010]. Хемокины это пептидные низкомолекулярные иммуномодуляторы обладающие свойствами хемоаттрактантов [Зак и др., 2006; Попова и др., 2006]. Они контролируют миграцию различных видов лейкоцитов, имеющих к ним рецепторы из кровяного русла в ткани, очаги воспаления, аутоиммунного процесса, участвуют в активации и дифференциации лейкоцитов, ангиогенезе, фиброгенезе [Schneider et al., 1999; Ukkonen et al., 2007; Chow et al., 2007; Nishioka et al., 2007].

Исследованию молекулярно-генетических основ хронического гломерулонефрита посвящено значительное количество работ как зарубежных [Patrakka et al., 2002; Syrjanen et al., 2002; Kim 2003; Acharya et al., 2005; Zhu, 2005; Chin et al., 2005] так и отечественных [Камышова, 2004; Калиев и др., 2004; Петросян и др., 2006; Шестаков, 2006; Некипелова и др., 2006; Шарнова и др., 2007; Калмыкова, 2009; Литовкина, 2011] авторов. Однако, следует отметить, что значение генетических факторов хемокинов при формировании хронического гломерулонефрита к настоящему времени изучено не достаточно. Исследования роли полиморфных маркеров генов хемокинов в отношении хронического гломерулонефрита в нашей стране не проведены.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт №П384 «Разработка молекулярно-генетических

основ мультифакториальной патологии человека (на модели генов цитокинов»).

Цель исследования:

Изучить полиморфизмы генов хемокинов и рассмотреть их клиническое значение при хроническом гломерулонефрите.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить распределение генетических полиморфизмов хемокинов (+1931A/T MIP1 β , A/G I-TAC (rs4512021), -403A/G RANTES, C/G MCP1(rs2857657), -801G/A SDF1) у больных хроническим гломерулонефритом и в популяционном контроле.

2. Исследовать особенности гуморального иммунитета у больных ХГН и определить роль молекулярно-генетических маркеров в его формировании.

3. Проанализировать взаимосвязи генов-кандидатов с клиническим течением ХГН.

4. Рассмотреть влияние генетических факторов на характер прогрессирования ХГН.

5. Оценить ассоциации генетических полиморфизмов с эффективностью терапии ХГН.

Научная новизна. Впервые изучен генетический полиморфизм хемокинов – регулятора активности нормальной экспрессии и секреции Т-клеток (-403A/G RANTES), моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (C/G MCP1, rs2857657), макрофагального воспалительного протеина 1 β (+1931A/T MIP1 β), интерферон индуцибельного α хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC, rs4512021), фактора стромальных клеток (-801G/A SDF1) у больных хроническим гломерулонефритом русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России.

Впервые определены генетические маркеры хемокинов, связанные с особенностями гуморального иммунитета у больных хроническим гломерулонефритом. Установлены молекулярно-генетические факторы неблагоприятного клинического течения хронического гломерулонефрита. Показаны связи генов-кандидатов с развитием терминальной стадии хронической почечной недостаточности. Выявлены ассоциации генетических полиморфизмов хемокинов с эффективностью лечения ХГН.

Научно-практическое значение. Полученные результаты вносят вклад в расшифровку молекулярно-генетических механизмов формирования хронического гломерулонефрита. Для выявления пациентов группы риска с неблагоприятным прогнозом клинического течения хронического гломерулонефрита (непрерывно-рецидивирующее течение заболевания, высокий уровень артериального давления, сниженная клубочковая фильтрация и повышенный уровень креатинина) рекомендуется проведение молекулярно-генетического тестирования полиморфизмов моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 и интерферон-индуцибельного α хемоаттрактанта Т-клеток. В качестве маркера развития терминальной

стадии хронической почечной недостаточности может использоваться A/G I-TAC (rs4512021). Для определения индивидуальной стратегии терапии хронического гломерулонефрита рекомендуется применять генетический маркер +1931A/T MIP1 β . Результаты исследования используются в учебном процессе при преподавании медицинской генетики в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярно-генетические маркеры хемокинов ассоциированы с клиническим течением хронического гломерулонефрита.
2. Гены – кандидаты связаны с особенностями гуморального иммунитета при хроническом гломерулонефрите.
3. Генетическими детерминантами терминальной стадии хронической почечной недостаточности являются G I-TAC и GG I-TAC (rs 4512021).
4. Эффективность монотерапии цитостатиками зависит от генетического полиморфизма +1931 A/T MIP1 β .

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: межрегиональной (с международным участием) научно – практической конференции « Социальная экология в изменяющейся России: проблемы и перспективы» (Белгород, 2007), VIII международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке: Концепции болезней цивилизации» (Москва, 2007), XV Российском национальном конгрессе «Человек и Лекарство» (Москва, 2008), 43-й Всероссийской научной конференции с международным участием студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной, клинической медицины и фармации» (Тюмень, 2009), 63-й итоговой научной конференции молодых учёных с международным участием (Ростов-на-Дону, 2009), IX Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых учёных по медицине (Тула, 2010), V Международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2010), IV Международной научной конференции молодых учёных – медиков (Курск, 2010), VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2011)

Личный вклад автора. Все использованные в работе данные получены при непосредственном участии автора: на этапах постановки цели и задач, разработки методов и их выполнения, проведения исследования, обработки, анализе и обобщения полученных результатов, апробации результатов исследования, подготовки публикаций по выполненной работе, написания и оформления рукописи.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 в журналах из списка ВАК. Получен патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы. Материалы диссертации изложены на 135 страницах машинописного текста и содержат 28 таблиц и 28 рисунков. Библиографический указатель содержит 212 наименования, из которых 144 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Медико-биологическая характеристика обследованных больных

Группу исследования составили 700 человек: 238 больных хроническим гломерулонефритом и 462 человека популяционного контроля. В нее включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой. Среди больных ХГН мужчин было 127 человек (53,4%), женщин – 111 (46,6%). В популяционной выборке (n=462) распределение по полу было следующим: мужчины – 250 человек (54,1%), женщины – 212 (45,9%). Средний возраст больных составил $39,58 \pm 14,58$ лет (варьировал от 15 до 76 лет), в популяционной выборке – $42,20 \pm 6,28$ лет (варьировал от 18 до 79 лет). ($p > 0,05$).

Клинико-лабораторное обследование и формирование выборки больных проводилось на базе отделения нефрологии Белгородской областной клинической больницы. Среди 238 больных ХГН детально изучены клинические характеристики хронического гломерулонефрита в дебюте и течении заболевания, оценен характер прогрессирования ХГН и эффективность его терапии.

Всем больным ХГН и индивидуумам популяционного контроля проведено молекулярно-генетическое типирование полиморфных маркеров хемокинов: однонуклеотидные полиморфизмы регулятора активности нормальной экспрессии Т-клеток (-403G/A RANTES), фактора стимулятора роста предшественников β -клеток (-801 G/A SDF1), моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (C/G MCP1, rs2857657), интерферон индуцибельного α -хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC, rs4512021), макрофагального воспалительного протеина 1 β (+1931A/T MIP1 β).

Генотипирование осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Молекулярно-генетические методы

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 4-5 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (pH=8.0).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew, 1984]. Анализ всех локусов (-403G/A RANTES, -801 G/A SDF1, C/G MCP1 (rs2857657), A/G I-

ТАС (rs4512021), +1931A/T MIP1 β) проводился методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) синтеза ДНК с использованием ДНК полимеразы *Thermus aquaticus* производства «Силекс - М», олигонуклеотидных праймеров и зондов синтезированных фирмой «Синтол» (табл. 1). Генотипирование осуществлялось на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time с использованием метода дискриминации аллелей (метод Tag Man зондов).

Таблица 1

Структура праймеров и зондов, использованных для генотипирования ДНК-маркеров методами ПЦР

Полиморфизм	Структура праймеров, зондов	Литература
-403 G/A RANTES	F: 5'- CTG AGT CAC TGA GTC TTC AAA GTT CC -3' R: 5'- TCC AGA GGA CCC TCC TCA ATA A -3' 5'-FAM- AAA GGA GGT AAG ATC TGT AAT - RTQ1-3' 5'-ROX- AAA GGA GAT AAG ATC TGT AAT G - BHQ2-3'	[Yazdanpanah et.al., 2007]
A /G I-TAC (rs4512021)	F: 5' – CAA AGA CCT AAG GGA ACT AGG TGA TAG – 3' R: 5' – GTG TCT TCC CAA TGT GTG TTC CT – 3' 5'-FAM- ATG ACT CTG GCT AGT C - RTQ1-3' 5'-ROX- AGC ATG ACT CCG GCT A - BHQ2-3'	[Prasad et.al., 2006]
C/G MCP1 (rs285765)	F: 5'- GTA TAG GCA GAA GCA CTG GGA TTT A -3' R: 5'- CAG AAA AGA GTC ATG AGG AAA AAG CA -3' 5'-FAM- ATG AGC TCT TTG TCT TCT - RTQ1-3' 5'-ROX- ATG AGC TCT TTC TCT TCT - BHQ2-3'	[Jalilian et.al, 2008]
+1931 A/T MIP1 β	F: 5'- CAA GGG TTT TAA CAC CCT TAT GAA C -3' R: 5'- CCA AGC AGG CCT ACA AGC TT -3' 5'-FAM- TTT CCT TAA CTG TGA AAC T - RTQ1-3' 5'-ROX- TTT CCT TAA CAG TGA AAC T - BHQ2-3'	[Ardigo et. al., 2005]
-801 G/A SDF1	F: 5'- AGC TTT GGT CCT GAG AGT CC -3' R: 5'- CAG TCA ACC TGG GCA AAG CC -3' 5'-FAM- TGG GAG CCG GGT CTG CCT CT - RTQ1-3' 5'-ROX- ACA TGG GAG CCA GGT CTG CCT CTT-BHQ2-3'	[Yazdanpanah et.al., 2007]

Статистические методы

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программного пакета «STATISTICA 6.0». Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [Животовский, 1983]. Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использовали критерий χ^2 [Вейр, 1995].

Ассоциации молекулярно-генетических маркеров с формированием ХГН, а также с качественными признаками, характеризующими его клинические особенности оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 2x2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и отношением шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (95%CI) [Schlesselman, 1982]. При проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони, минимизирующей вероятность ложноположительных результатов (ошибки 1-го рода) [Реброва, 2006]. При изучении связей генетических полиморфизмов с клинически значимыми количественными признаками ХГН оценивали характер

распределения исследуемых признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении признака для его описания использовали среднее арифметическое значение и ошибку среднего арифметического значения, а для сравнительного анализа – критерий Стьюдента. При несоответствии закону нормального распределения для описания признака применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа – критерий Манна-Уитни [Реброва, 2006].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение роли полиморфных маркеров генов хемокинов в возникновении и клиническом течении хронического гломерулонефрита

При исследовании распределения частот генотипов среди больных ХГН и в популяционном контроле выявлено, что для всех рассматриваемых локусов выполняется равновесие Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Уровень аллельного разнообразия по исследованным полиморфизмам варьировал от $H_0 = 0,27$ (для локуса C/G MCP1 (rs2857657)) до $H_0 = 0,49$ (для локуса A/G I-TAC, rs4512021) в популяционной выборке и от $H_0 = 0,27$ (-801G/A SDF1) до $H_0 = 0,46$ (A/G I-TAC, rs4512021) среди больных ХГН.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных локусов хемокинов между больными ХГН и популяционным контролем не выявил достоверных отличий (табл. 2). Эти данные могут свидетельствовать о том, что рассмотренные нами хемокины не являются этиологическими факторами хронического гломерулонефрита, что полностью согласуется с современными представлениями о функциональной роли данных хемокинов. Являясь хемотаксическими факторами, контролируя миграцию различных видов лейкоцитов из кровяного русла в ткани [Зак и др., 2002, Попова, 2006], они играют важную роль в развитии воспалительных процессов и, следовательно, будут иметь важное значение не в этиологии, а в патогенезе хронического гломерулонефрита. Исследование ассоциаций генетических полиморфизмов хемокинов с клиническими признаками хронического гломерулонефрита, проведенное в настоящей работе, выявило важную роль молекулярно-генетических маркеров хемокинов в патогенезе ХГН.

Установлено, что полиморфный генетический маркер -403 G/A RANTES связан с развитием нефротического синдрома в дебюте ХГН: его распространенность у пациентов с этим синдромом составила 91,84%, что превышает данные популяционного контроля (82,12%, OR=2,45 95%CI 1,12-5,57, $\chi^2 = 5,24$, $p = 0,02$). Согласно литературным данным повышение продукции регулятора активности экспрессии и секреции Т-клеток (RANTES) в почечных канальцах и мезенхимальных элементах почек обуславливает активизацию миграции в воспаленные участки почек большого количества лейкоцитов, преимущественно моноцитов, макрофагов, которые секретируют широкий спектр провоспалительных цитокинов [Попова и др., 2006; Chow et al., 2007; Prasad et al., 2007].

Таблица 2

Распределение полиморфных маркеров генов хемокинов среди больных ХГН и в популяционном контроле (%)

Локусы	Аллели, генотипы	Больные ХГН (n=238)		Контрольная группа (n=462)		OR (95% CI)	χ^2 , p
		n	%	n	%		
+1931A/T MIP1β	+1931T	125	27,78	246	27,27	0,97 (0,75-1,27)	$\chi^2=0,02$; p=0,90
	+1931A	325	72,22	656	72,73		
	+1931TT	14	6,22	31	6,87	0,90 (0,45-1,79)	$\chi^2=0,02$; p=0,87
	+1931AT	97	43,12	184	40,80	1,10 (0,79-1,54)	$\chi^2=0,24$; p=0,62
	+1931AA	114	50,66	236	52,33	0,93 (0,67-1,30)	$\chi^2=0,10$; p=0,74
	H ₀ (H _e)	0,43 (0,40)		0,41 (0,40)			
A/G I-TAC (rs4512021)	A	223	60,93	501	56,04	1,22 (0,95-1,59)	$\chi^2=2,34$; p=0,13
	G	143	39,07	393	43,96		
	AA	69	37,70	142	31,77	1,30 (0,89-1,89)	$\chi^2=1,79$; p=0,18
	AG	85	46,45	217	48,55	0,92 (0,64-1,31)	$\chi^2=0,15$; p=0,69
	GG	29	15,85	88	19,69	0,77 (0,47-1,24)	$\chi^2=1,02$; p=0,31
	H ₀ (H _e)	0,46 (0,47)		0,49 (0,49)			
403G/A RANTES	-403G	305	82,88	698	82,12	1,05(0,75-1,48)	$\chi^2=0,05$; p=0,81
	-403A	63	17,12	152	17,88		
	-403GG	125	67,93	286	67,29	1,03 (0,68-1,50)	$\chi^2=0,06$; p=1,00
	-403GA	55	29,89	126	29,65	1,01 (0,68-1,50)	$\chi^2=0,01$; p=1,00
	-403AA	4	2,18	13	3,06	0,70 (0,19-2,36)	$\chi^2=0,12$; p=0,73
	H ₀ (H _e)	0,30 (0,28)		0,30 (0,29)			
C/G MCP-1 (rs2857657)	C	370	81,14	760	84,44	0,79 (0,58-1,08)	$\chi^2=2,15$; p=0,14
	G	86	18,86	140	15,56		
	CC	152	66,67	320	71,11	0,81 (0,57-1,16)	$\chi^2=1,21$; p=0,27
	CG	66	28,94	120	26,67	1,12 (0,77-1,62)	$\chi^2=0,29$; p=0,59
	GG	10	4,39	10	2,22	2,00 (0,77-5,32)	$\chi^2=1,77$; p=0,18
	H ₀ (H _e)	0,29 (0,30)		0,27 (0,26)			
-801G/A SDF1	-801G	375	82,96	759	82,86	1,01 (0,74-1,38)	$\chi^2=0,00$; p=1,00
	-801 A	77	17,04	157	17,14		
	-801GG	157	69,47	313	68,34	1,05 (0,74-1,51)	$\chi^2=0,45$; p=0,83
	-801GA	61	26,99	133	29,04	0,90 (0,62-1,31)	$\chi^2=0,22$; p=0,64
	-801AA	8	3,54	12	2,62	1,36 (0,50-3,64)	$\chi^2=0,19$; p=0,68
	H ₀ (H _e)	0,27 (0,28)		0,29 (0,30)			

Примечание: H₀ – наблюдаемая гетерозиготность; H_E - ожидаемая гетерозиготность;

Выявлена ассоциация молекулярно-генетического маркера -801G/A SDF1 с развитием гематурического синдрома, а генетического полиморфизма A/G I-TAC (rs 4512021) с возникновением тяжелой артериальной гипертензии в течении хронического гломерулонефрита. У больных с гематурической формой ХГН распространенность аллеля -801A SDF(27,78%) достоверно превышает аналогичный показатель контрольной группы (17,14%, OR=1,85 95%CI 1,04-3,30, $\chi^2=4,44$, p=0,04). Среди пациентов с ХГН, имеющих тяжелую форму артериальной гипертензии (артериальное давление более 160/110 мм.рт.ст.), частота аллеля А I-TAC (68,78%) является наибольшей по сравнению с популяционным контролем (56,04%, OR=1,65 95%CI 1,02-2,69 $\chi^2=4,13$, p=0,04).

С характером течения хронического гломерулонефрита и уровнем диастолического артериального давления связан полиморфный locus C/G MCP1 (rs 2857657). У пациентов с непрерывно - рецидивирующим течением ХГН частота аллеля G MCP1 (rs 2857657) равняется 24,69% и статистически достоверно превышает соответствующий показатель как среди больных ХГН с частотой обострения один раз в год и реже (16,54%, $\chi^2=3,77$, p=0,05) так и среди индивидуумов контрольной группы (15,56%, OR=1,78 95% CI 1,16-2,70, $\chi^2=7,50$, p=0,007) (рис. 1).

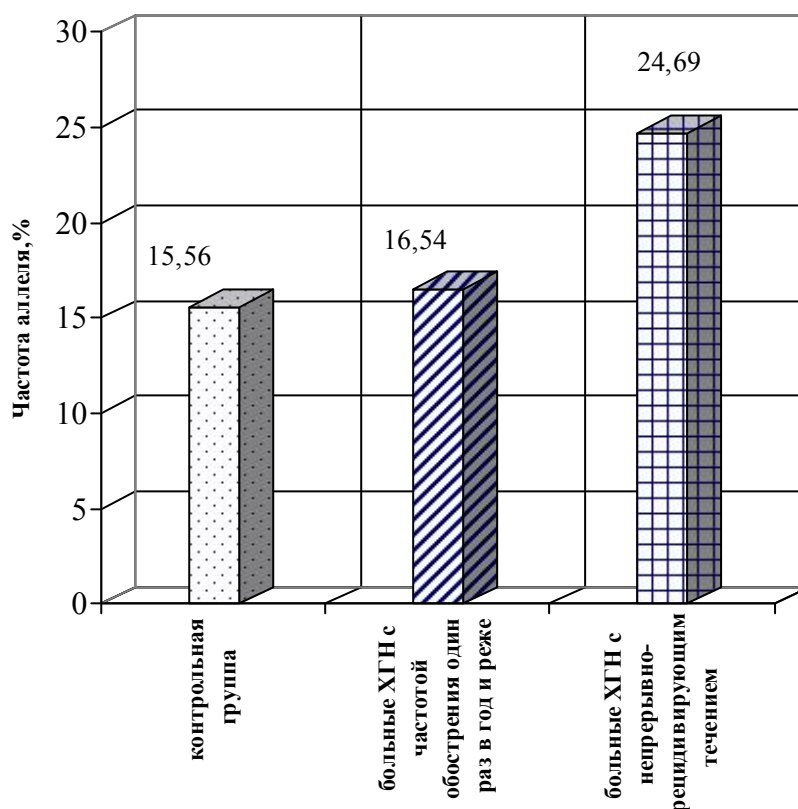


Рис.1. Частота аллеля G MCP1 (rs 2857657) среди групп больных ХГН в зависимости от частоты обострения заболевания и в контрольной группе, %

Установлено, что у больных ХГН с генетическими маркерами GG и CG MCP1 уровень диастолического артериального давления (медиана составила 100,00 мм. рт.ст. нижний процентиль -80,0 мм.рт.ст., верхний процентиль— 110,00 мм. рт. ст.) был достоверно выше соответствующего показателя пациентов с генотипом CC MCP1 (медиана 100,00 мм. рт. ст., интерпроцентильный размах 70,0- 110,00 мм. рт. ст., $p=0,01$) (рис. 2).

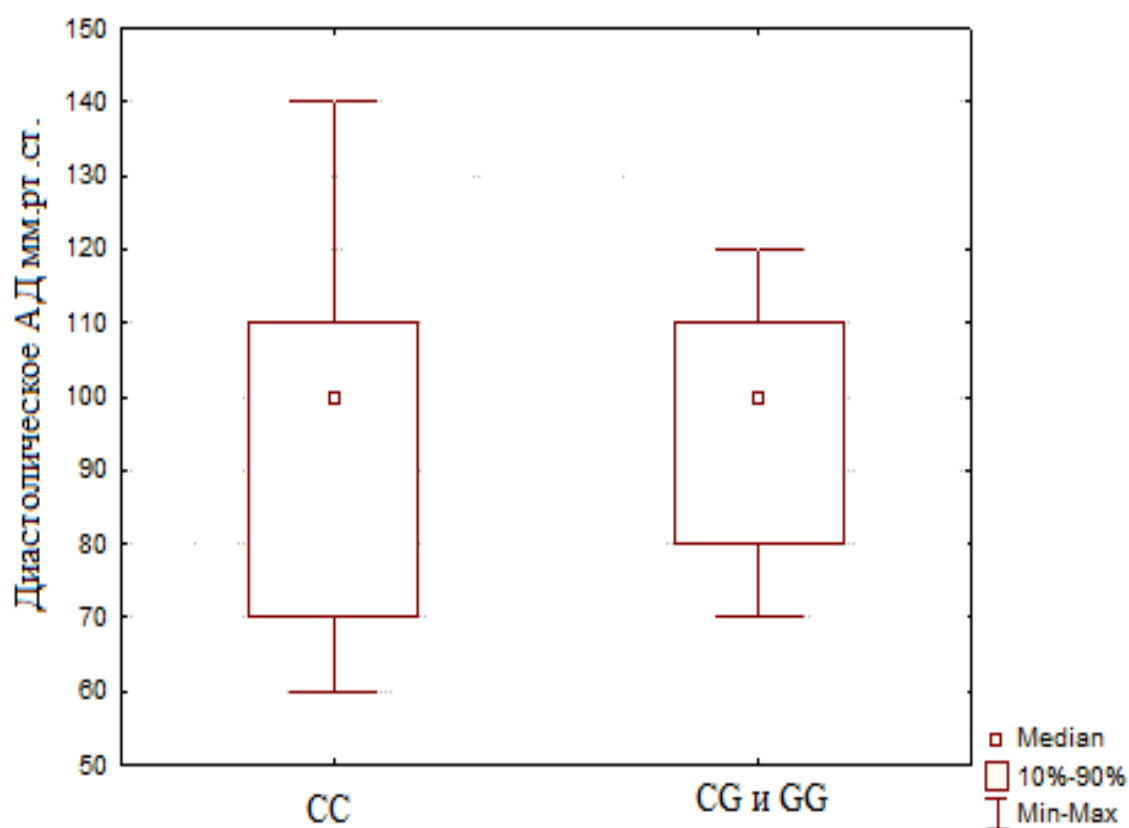


Рис.2. Ассоциации генетического полиморфизма C/G MCP1 (rs 2857657) с уровнем диастолического артериального давления у больных хроническим гломерулонефритом

В основе выявленных ассоциаций генетического полиморфизма C/G MCP1 с клиническими особенностями хронического гломерулонефрита могут лежать следующие медико-биологические механизмы. Моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 (MCP1), секретируемый в больших количествах в тубулярных и мезенхимальных клетках почек в очаге поражения, является главным триггером, направляющим поток моноцитов /макрофагов и их адгезию в этот орган, которые затем активно продуцируют комплекс провоспалительных цитокинов, вызывающих в конечном итоге склероз гломерул и фиброз интерстициальной ткани [Stasikowska et al., 2007; Zhang et al., 2007; Anders et al., 2010].

2. Молекулярно-генетические маркеры и особенности гуморального иммунитета у больных ХГН

Сравнительное изучение показателей гуморального иммунитета у больных ХГН (n=164) и индивидуумов контрольной группы (n=62) выявило более высокие концентрации иммуноглобулина А и иммуноглобулина G у пациентов с хроническим гломерулонефритом ($3,75 \pm 0,14$ г/л и $18,85 \pm 0,56$ г/л, соответственно) по сравнению с контрольной группой ($2,98 \pm 0,15$ г/л и $12,42 \pm 0,73$ г/л, соответственно $p < 0,001$). О значительных нарушениях в системе гуморального иммунитета при хроническом гломерулонефрите свидетельствуют и материалы работ [Syrtjanen et al., 2002; Chin, 2005].

При анализе концентрации иммуноглобулинов у больных ХГН, в зависимости от наличия и выраженности ХПН установлено что, во-первых, больные ХГН без ХПН отличаются от контрольной группы лишь по высокому содержанию IgG ($20,28 \pm 0,85$ г/л против $12,42 \pm 0,74$ г/л в контроле, $p < 0,001$). Во - вторых, больные ХГН с ХПН существенно отличаются от контрольной группы по уровню рассмотренных иммуноглобулинов: концентрация IgA ($3,96 \pm 0,18$ г/л) и IgG ($16,94 \pm 0,69$ г/л) выше, а содержание IgM ($2,43 \pm 0,11$ г/л) ниже, чем в контроле.

Выявлены связи генетических полиморфизмов +1931 А/Т MIP1 β и -801G/A SDF1 с уровнем иммуноглобулинов у больных ХГН. У индивидуумов с генотипом +1931 ТТ MIP1 β концентрация иммуноглобулина G составила $22,02 \pm 2,02$ г/л и была достоверно выше аналогичного показателя среди пациентов с генотипами +1931 АА и +1931 АТ MIP1 β ($18,53 \pm 0,59$ г/л, $p = 0,05$).

Определены различия в характере ассоциаций молекулярно-генетических маркеров хемокинов с концентрациями иммуноглобулинов у больных с разной степенью активности процесса (стадии ремиссии и обострения) и у пациентов в зависимости от наличия ХПН. У больных с обострением хронического гломерулонефрита высокий уровень IgA ($4,99 \pm 0,67$ г/л) наблюдается у индивидуумов с генотипами – 801АА и -801GA SDF1 по сравнению с пациентами с генотипом - 801 GG SDF1 ($2,95 \pm 0,27$ г/л, $p = 0,01$). Выявлены связи генетического полиморфизма +1931А/Т MIP1 β с концентрацией IgG в группе больных без ХПН: у индивидуумов с генотипом +1931ТТ MIP1 β концентрация иммуноглобулина G составила $25,58 \pm 1,62$ г/л и была в 1,3 раза выше соответствующего показателя среди больных с генетическими маркерами +1931АА и +1931АТ MIP1 β ($19,86 \pm 0,89$ г/л, $p = 0,02$).

3. Ассоциации генетических полиморфизмов хемокинов с характером прогрессирования ХГН

Проведен анализ ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с показателями, характеризующими эффективность функционирования гломерулярного аппарата почек у больных ХГН - клубочковая фильтрация и уровень креатинина [Мосина и др., 2004]. Установлено, что пациенты с ХГН

с генотипами AA и AG I-TAC (rs4512021) имеют значительно меньший показатель клубочковой фильтрации (медиана 74,0 мл/мин, нижний квартиль 14,0 мл/мин, верхний квартиль 104,0 мл/мин) (рис. 3) и более высокий уровень креатинина (медиана 119,0 мкмоль/л, нижний квартиль 94,4 мкмоль/л, верхний квартиль 541,0 мкмоль/л) по сравнению с индивидуумами с генотипом GG I-TAC (медиана 92,0 мл/мин, интерквартильный размах -74,0 - 108,0 мл/мин, $p=0,05$ и медиана 101,0 мкмоль/л, интерквартильный интервал – 87,0 – 181,0 мл/мин, $p=0,05$, соответственно).

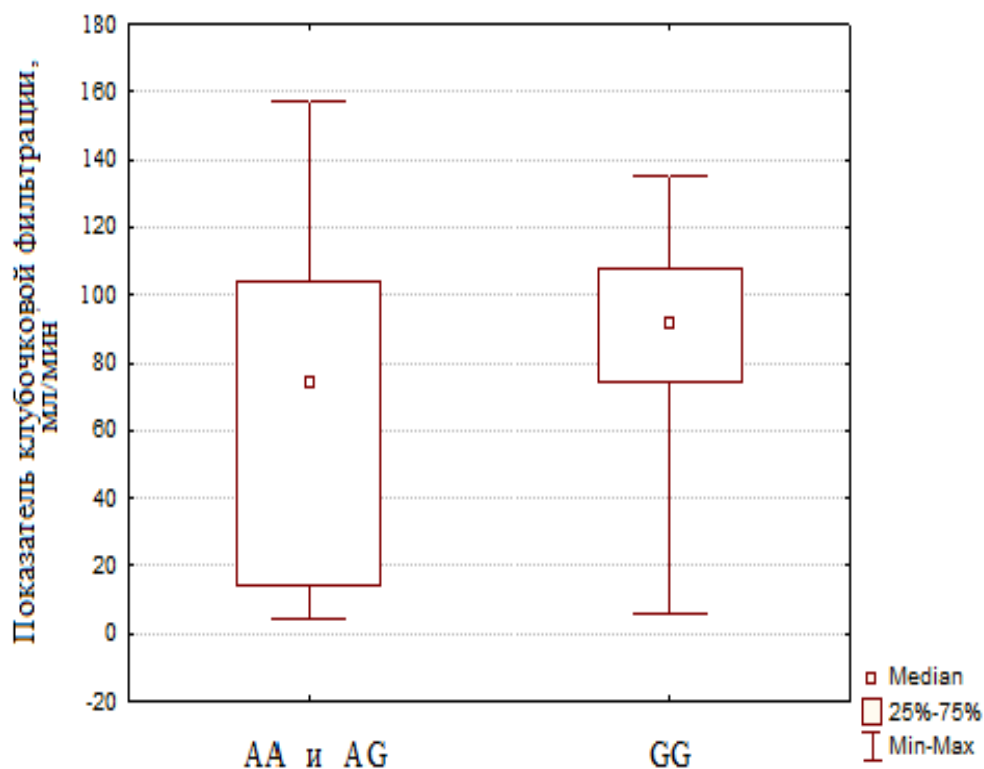


Рис. 3. Ассоциации генетического полиморфизма A/G I - TAC (rs4512021) с показателем клубочковой фильтрации у больных ХГН

Различия в распределении аллелей и генотипов по локусу A/G I-TAC (rs4512021) определены нами и при сравнении больных достигших терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ТХПН) ($n=71$) с популяционным контролем. Получено, что среди пациентов с ТХПН концентрация генотипа GG I-TAC (rs 4512021) составляет 5,08%, что практически в 4 раза меньше соответствующего показателя в контрольной группе (19,69%, $OR=0,22$, 95%CI 0,14-0,75, $\chi^2=6,57$, $p=0,01$, $p_{cor}=0,03$) (рис. 4). Аналогичной направленности данные получены и по частотам аллелей локуса A/G I-TAC: среди больных с ТХПН частота аллеля G I-TAC равняется 32,20%, тогда как в контрольной группе распространенность этого маркера составляет 43,96% ($OR=0,61$, 95%CI% 1,08-2,54, $\chi^2=5,42$, $p=0,02$). Следует

отметить, что интерферон индуцибельный α -хемоаттрактант Т-клеток (I-TAC) являясь хемотаксическим фактором для Т-лимфоцитов и активируя Th1CD4 Т-клетки, натуральные киллеры, моноциты в очаге поражения в организме (почки) [Cole et al., 1998], оказывает провоспалительное действие, обуславливая развитие значительных нарушений в гломерулярном аппарате и приводя к формированию терминальной стадии хронической почечной недостаточности [Тареева, 2000].

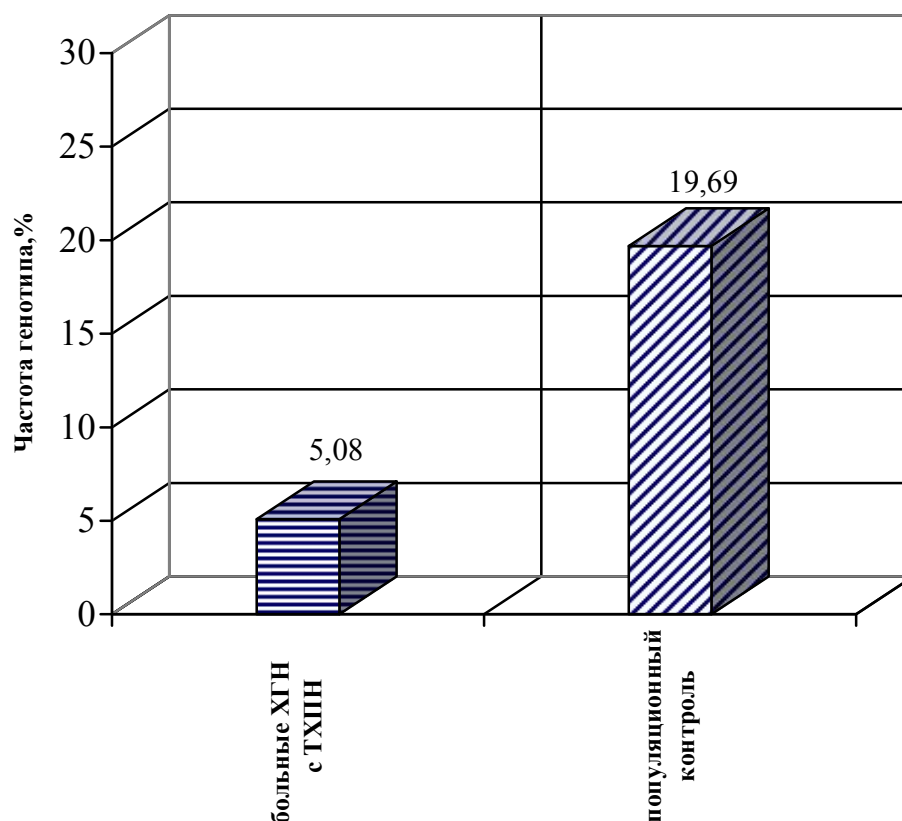


Рис. 4. Распределение генотипа GG I-TAC (rs 4512021) среди больных хроническим гломерулонефритом с ТХПН и в популяционном контроле (%).

4. Гены-кандидаты и эффективность терапии хронического гломерулонефрита

Установлены ассоциации молекулярно-генетического маркера +1931 А/Т МР1 β с эффективностью терапии ХГН в группе пациентов получавших монотерапию цитостатиками (n=49) (рис. 5). Среди больных с отсутствием положительного эффекта от лечения цитостатиками (n=12) частота аллеля +1931Т МР1 β составила 8,33%, что более чем в 4 раза меньше аналогичного показателя у больных с положительным результатом от лечения цитостатиками (35,14%, $\chi^2=5,13$, p=0,02).

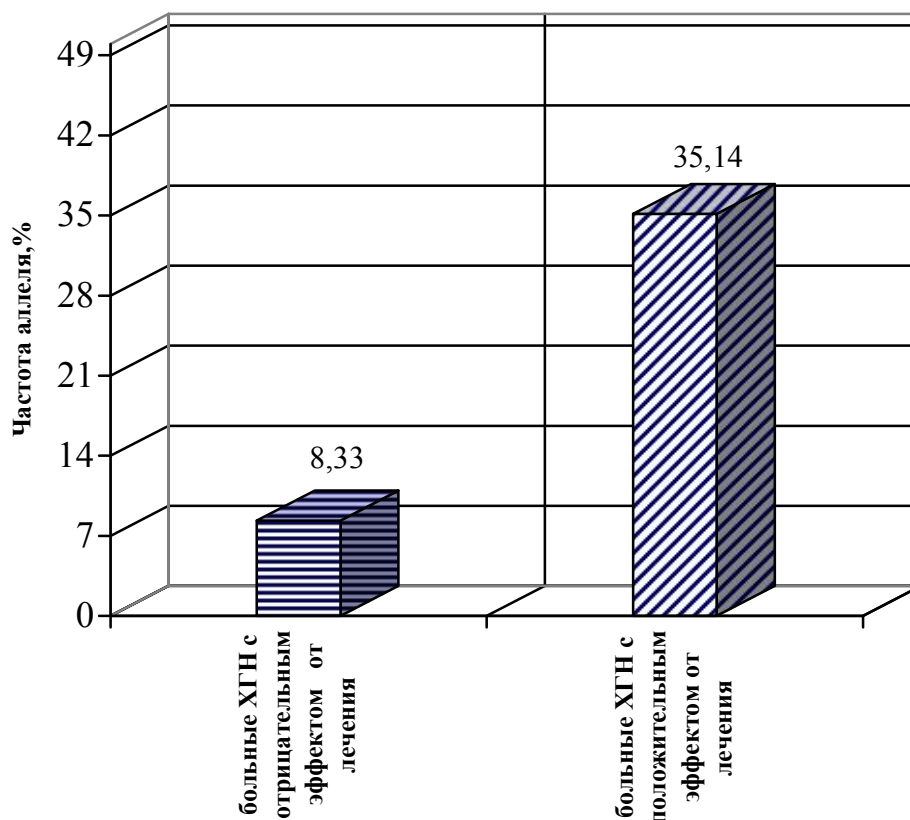


Рис. 5. Частота аллеля +1931Т MIP1β среди больных ХГН, получавших монотерапию цитостатиками, с различной эффективностью лечения

ВЫВОДЫ

1. Полиморфные генетические маркеры хемокинов +1931А/Т MIP1β, А/Г I-TAC (rs4512021), -403G/A RANTES, С/Г MCP1(rs2857657), -801G/A SDF1 ассоциированы с клиническими характеристиками, уровнем иммуноглобулинов при хроническом гломерулонефрите, характером его прогрессирования и эффективностью терапии.

2. Концентрации иммуноглобулинов классов А и G у больных ХГН в 1,3 -1,5 раза превышают показатели контрольной группы ($p < 0,001$) и взаимосвязаны с развитием хронической почечной недостаточности. Маркером повышенного уровня IgG при хроническом гломерулонефрите является +1931ТТ MIP1β, а высокие концентрации IgA в период обострения ассоциированы с - 801AA, - 801GA SDF1.

3. Молекулярно-генетическим маркером непрерывно-рецидивирующего течения хронического гломерулонефрита служит G MCP1 (rs2857657), развитие нефротического синдрома в дебюте заболевания связано с -403G RANTES (OR=2,45), гематурический синдром в течении хронического гломерулонефрита маркирует аллель -801A SDF1(OR=1,86). Факторами риска формирования высокого уровня диастолического артериального давления являются GG и AG MCP1, развитие тяжёлой артериальной гипертензии связано с А I-TAC (rs4512021).

4. Сниженная клубочковая фильтрация и повышенный уровень креатинина ассоциированы с генотипами AA и AG I-TAC (rs4512021), а протективными факторами развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности при хроническом гломерулонефрите являются G I-TAC(OR=0,61) и GG I-TAC(OR=0,22).

5. Частота аллеля +1931T MIP1 β у пациентов, имеющих положительный эффект при монотерапии цитостатиками, составляет 35,14% и в 4,2 раза превышает распространенность этого маркера у больных с отсутствием эффекта от лечения (8,33%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В нефрологических стационарах необходимо выявлять группы пациентов с неблагоприятным прогнозом течения хронического гломерулонефрита (непрерывно-рецидивирующее течение заболевания, высокий уровень артериального давления, сниженная клубочковая фильтрация, повышенный уровень креатинина) на основе молекулярно-генетического тестирования моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (C/G в интроне 1 MCP1), интерферон индуцибельного α хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC, rs4512021).

2. При обследовании пациентов с хроническим гломерулонефритом в качестве маркера развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности рекомендуется использовать генетический полиморфизм A/G I-TAC (rs4512021).

3. Больным с хроническим гломерулонефритом, имеющим молекулярно-генетический маркер +1931T MIP1 β , рекомендуется назначать монотерапию цитостатиками.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Юшина, И. А.** Особенности гуморального иммунитета у больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина, М. И. Чурносков, Е. В. Некипелова // Социальная экология в изменяющейся России: проблемы и перспективы : материалы межрегион. (с междунар. участием) науч.-практ. конф., Белгород, 5-7 окт. 2007 г. : в 2 ч. / Рос. гуманитар. науч. фонд, адм. Белгор. обл., БелГУ ; редкол.: В. В. Бахарев [и др.]. – Белгород, 2007. – Ч. 1. – С. 427-431.

2. Некипелова, Е. В. Анализ гуморального иммунитета у больных хроническим гломерулонефритом / Е. В. Некипелова, М. И. Чурносков, **И. А. Юшина** // Вестник новых медицинских технологий. – Тула, 2007. – Т. XIV, № 4. – С. 112-114.

3. **Юшина, И. А.** Анализ некоторых клинико-лабораторных показателей у больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина, М.

И. Чурносов, Е. В. Некипелова // Здоровье и образование в XXI веке. Концепции болезней цивилизации : науч. тр. VIII междунар. конгр., Москва, 14-17 нояб. 2007 г. / РУДН, Сообщ. молодых врачей и организаторов здравоохранения, Проблем. комиссия «Хронобиология и хрономедицина» РАМН [и др.]. – М., 2007. – С. 716.

4. Оценка роли генетических и иммунологических факторов в формировании хронической почечной недостаточности на фоне хронического гломерулонефрита / **И. А. Юшина**, Е. В. Калмыкова, Е. В. Некипелова [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 2. – С. 117-125.

5. **Юшина, И. А.** Особенности клинико-лабораторных показателей у больных хроническим гломерулонефритом в различных клинических группах / И. А. Юшина, М. И. Чурносов, Е. В. Некипелова // Человек и лекарство : XV рос. нац. конгр., Москва, 14-18 апр. 2008 г. : сб. материалов конгр. : тез. докл. / РАН, РАМН, Общерос. обществ. фонд «Здоровье человека». – М., 2008. – С. 376.

6. Некоторые результаты молекулярно-генетического и иммунологического исследования больных с почечной патологией / **И. А. Юшина**, Е. В. Калмыкова, Е. В. Некипелова [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2008. – № 6, вып. 6. – С. 55-65.

7. Молекулярно-генетические маркеры цитокинов: популяционная распространенность и связь с мультифакториальной патологией / Е. В. Калмыкова, Т. С. Тикунова, **И. А. Юшина** [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Сер. Медицина. – 2009. – № 4. – Р. 617-618.

8. **Юшина, И. А.** Анализ клинико-лабораторных показателей в зависимости от клинических вариантов у больных ХГН / И. А. Юшина, Е. В. Некипелова, М. И. Чурносов // 63-я итоговая научная конференция молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета с международным участием, посвященная 70-летию СНО (МНО), Ростов-на-Дону, 24 апр. 2009 г. : аннот. докл. и материалов дня науки РостГМУ / РостГМУ ; редкол.: А. А. Сависько [и др.]. – Ростов н/Д, 2009. – С. 81.

9. **Юшина, И. А.** Сравнительный анализ некоторых гомеостатических функций почек у больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина, Е. В. Некипелова // Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной, клинической медицины и фармации : материалы 43-й всерос. науч. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых / ТюмГМА ; гл. ред. И. В. Медведева, отв. за вып. И. Е. Задумина. – Тюмень, 2009. – С. 112.

10. **Юшина, И. А.** Распределение генотипических полиморфных маркеров хемокина CXCL8 у больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина, Е. В. Некипелова, М. И. Чурносов // Материалы IV международной научной конференции молодых ученых-медиков, Курск, 25-26 февр. 2010 г. : в 3 т. / КГМУ, ВГМА, Центр.-Чернозем. центр РАМН [и др.] ; под ред. В. А. Лазаренко. – Курск, 2010. – Т. 3. – С. 443-445.

11. **Юшина, И. А.** Материалы о распределении молекулярно-генетического полиморфизма +G/A 801SDF1 у больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина, Е. В. Некипелова, М. И. Чурносков // Медицинская генетика. – 2010. – Спец. вып. – С. 202. – (Материалы VI съезда Рос. о-ва мед. генетиков, Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.).

12. **Юшина, И. А.** Некоторые результаты молекулярно-генетического исследования больных хроническим гломерулонефритом / И. А. Юшина // Вестник новых медицинских технологий. – Тула, 2010. – Т. 17, № 2 (прил.). – С. 134-135. – (IX всероссийская университетская научно-практическая конференция молодых ученых по медицине, Тула, 14 мая 2010 г. : сб. материалов / ТулГУ [и др.]).

13. Эффективность терапии больных хроническим гломерулонефритом и полиморфизм гена MIP-1 β / **И. А. Юшина**, Е. В. Некипелова, И. С. Полякова [и др.] // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии : II всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Курск, 17-19 мая 2011 г. : сб. материалов / КГМУ, адм. Курской обл., Центр.-Чернозем. центр РАМН [и др.] ; отв. ред. В. П. Иванов. – Курск, 2011. – С. 379-380.

Патент на изобретение

1. Способ дифференциальной диагностики форм хронического гломерулонефрита с хронической почечной недостаточностью и без почечной недостаточности : пат. 2364326 Рос. Федерация : МПК А61В5/00, G01N33/53 / М. И. Чурносков, Е. В. Некипелова, **И. А. Юшина** ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Белгор. гос. ун-т». – № 2008124597/14 ; заявл. 16.06.2008 ; опубл. 20.08.2009.