

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА Val762Ala ГЕНА ADPRT1 С ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Е.С. Камышова¹, М.Ю. Швецов¹, А.Е. Шестаков², И.М. Кутырина¹, В.В. Носиков³

¹ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

²Клинико-диагностическая лаборатория «ФимедЛаб», Москва

³ГНЦ РФ «ГосНИИгенетика», Москва

При изучении полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1, кодирующего поли(АДФ-рибоза)полимеразу-1, обнаружена ассоциация этого маркера с возникновением, течением и прогрессированием хронического гломерулонефрита. У носителей аллеля Val и генотипа Val/Val риск возникновения хронического гломерулонефрита повышен, а у носителей аллеля Ala и генотипа Ala/Ala – понижен.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, ген ADPRT1, полиморфный маркер Val762Ala, генетическая предрасположенность.

POLYMORPHISM OF CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS ASSOCIATION WITH ADPRT1 GENE Val762Ala

E.S. Kamysheva¹, M.Yu. Shvetsov¹, A.E. Shestakov², I.M. Kutyryna¹, V.V. Nosikov³

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

²Clinicodiagnostic Laboratory FimedLab, Moscow

³State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms GNIIGENETIKA, Moscow

Association of polymorphic ADPRT1 gene Val762Ala marker, encoding poly(ADP-ribose)polymerase-1, with the development, course and progress of chronic glomerulonephritis was revealed during investigation. The risk of the chronic glomerulonephritis development is higher in patients-carriers of Val-allele and Val/Val-genotype and lower in those with Ala-allele and Ala/Ala-genotype.

Key words: chronic glomerulonephritis, ADPRT1, Val762Ala polymorphism, genetic susceptibility.

Хронический гломерулонефрит (ХГН) занимает особое место в структуре хронических болезней почек как одна из основных причин терминальной почечной недостаточности и связанных с ней инвалидизации и смертности. Это многофакторное полигенное заболевание, возникновение и прогрессирование которого определяются рядом иммунных (обусловленных реакциями гуморального и/или клеточного иммунитета, медиаторами тканевого повреждения и т.д.) и неиммунных (в том числе связанных с гемодинамическими, коагулологическими и обменными нарушениями, дисфункцией эндотелия и др.) механизмов. Разнообразие его клинических проявлений, существенные различия в скорости снижения функции почек при одинаковой выраженности факторов риска позволяют обсуждать значение генетических факторов в формировании предрасположенности к ХГН и определении особенностей его течения.

В настоящее время для выявления генетических факторов, определяющих развитие полигенных заболеваний, широко используют метод поиска генов-кан-

дидатов, продукты которых вовлечены в различные звенья патогенеза того или иного патологического процесса. Так, уже установлена ассоциация полиморфных маркеров генов компонентов вазоактивных гормональных систем (ренин-ангиотензин-альдостероновой и оксида азота) с особенностями клинической картины и прогрессированием ХГН [10, 13, 14, 21], продемонстрировано значение носительства «профиброгенных» аллелей генов системы гемостаза в развитии нефропатии [1].

Особое внимание исследователей привлекает изучение ассоциаций полиморфных маркеров генов, продукты которых участвуют в регуляции процессов пролиферации и гибели клеток, в том числе в результате оксидативного стресса. Острый воспалительный ответ на образование иммунных комплексов в клубочках приводит к продукции лейкоцитами и клетками почечной паренхимы медиаторов воспаления, которые являются мощными стимулами для образования активных форм кислорода [7, 8]. Активные формы кислорода, в свою очередь, индуцируют обширное

повреждение ДНК, которое активирует ферменты, участвующие в её репарации, одним из которых является поли(АДФ-рибоза)полимераза (ПАРП) – фермент, катализирующий процесс полиАДФ-рибозилирования связанных с ДНК белков [2, 5].

В физиологических условиях ПАРП способствует выживанию клеток, обеспечивая сохранность передаваемой делящимися клетками генетической информации, поскольку играет важную роль в процессах репликации [4], транскрипции [14] и репарации [5]. В патологических условиях гиперактивация ПАРП может приводить к существенному снижению содержания внутриклеточного НАД⁺ и АТФ, замедлению скорости гликолиза и митохондриального дыхания и, как следствие, – к дисфункции и некротической гибели клетки. Результаты ряда работ свидетельствуют о том, что повышение активности ПАРП является важным механизмом тканевого повреждения при целом ряде состояний, связанных с оксидативным стрессом, включая поражение миокарда при реперфузии [24], трансплантации сердца [20], сердечной недостаточности [16] и др., а также играет патогенетическую роль в развитии диабетической нефропатии, нейропатии и ретинопатии [11, 15, 19].

Поскольку за синтез до 90% поли(АДФ)рибозы в клетке отвечает ПАРП-1 (одна из нескольких изоформ фермента) [3], наиболее перспективным представляется изучение ассоциации с ХГН гена ADPRT1, кодирующего фермент данного типа. Ген ADPRT1 локализован на хромосоме 1q41-1q42. В нем и его фланкирующих областях обнаружен ряд полиморфных участков, в том числе однонуклеотидный полиморфизм Т/С, которому соответствует аминокислотный полиморфизм Val/Ala в положении 762 полипептидной цепи.

Нами изучены ассоциации полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 с возникновением, течением и прогрессированием ХГН.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование включили 70 больных ХГН (мужчин и женщин – по 35), чей возраст на момент первого обследования в клинике составил от 15 до 69 лет. Клинические особенности ХГН оценивали на основании данных анамнеза и по архивному материалу клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева (Университетская клиническая больница №3 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова).

Активность ХГН анализировали на разных стадиях заболевания (в дебюте, во время первого и последнего обследований, а также на момент биопсии почки) по следующим критериям. В 1-ю группу – с минимальной активностью ХГН – относили больных с протеинурией (ПУ), составляющей менее 1 г/сут, эритроцитурией (ЭУ) < 30 в поле зрения, нормальным уровнем

креатинина; 2-я группа состояла из больных с умеренно активным гломерулонефритом (ГН) (ПУ – от 1 до 3 г/сут, сохранная функция почек); в 3-ю группу (высокая активность ГН) были включены пациенты с ПУ ≥ 3 г/сут или с нефротическим синдромом (НС) и сохранной функцией почек; 4-ю группу, характеризующуюся очень высокой активностью нефрита, составили больные с ПУ ≥ 3 г/сут, НС либо ПУ – 1-3 г/сут и ЭУ ≥ 30 в поле зрения в сочетании с нарушением функции почек в рамках активности; 5-я группа включала пациентов с нефритом в неактивной стадии с выраженным снижением фильтрационной функции.

Клинические варианты ХГН на момент первого обследования в клинике распределялись следующим образом: латентный тип был диагностирован у 43% больных, гематурический – у 11%, нефротический – у 23%, гипертонический – у 6%, и у 17% больных был поставлен диагноз ХГН смешанного типа.

У 53 пациентов диагноз ХГН был подтвержден морфологически: мезангиопролиферативный ГН выявлен у 29 больных, мезангиокапиллярный – у 4, мембранозный – у 6, минимальные изменения – у 2, фокально-сегментарный гломерулосклероз – у 6, фибропластический ГН – у 4 и нефросклероз – у 2 больных. Средний возраст больных на момент биопсии составлял 29,8 ± 11,2 года; длительность ХГН – в среднем 6,2 ± 7,0.

При анализе течения ХГН учитывали следующие факторы: выраженность АГ на протяжении заболевания – отсутствие АГ, умеренная АГ (АД 140/90-159/99 мм рт. ст.) или тяжелая (АД ≥ 160/100 мм рт. ст.) на фоне антигипертензивной терапии; персистирование ПУ ≥ 3 г/сут в течение 6 и более месяцев, а также сочетание АГ и длительно персистирующей ПУ, проведение иммуносупрессивной терапии и ответ на лечение (положительным ответом считали наступление полной или частичной ремиссии через 6-12 месяцев после начала лечения). Иммуносупрессивная терапия проводилась у 43 больных с активными формами нефрита: большинство пациентов получали стандартную иммуносупрессию. Её эффективность оценивали по общепринятым критериям. При изучении скорости прогрессирования ХГН в качестве конечной точки наблюдения рассматривали удвоение исходного уровня креатинина в крови.

Генетическую предрасположенность к развитию ХГН оценивали путем сравнения распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 у больных ХГН и в контрольной группе, состоящей из 69 человек в возрасте от 27 до 78 лет (в среднем – 50,1 ± 16,5 года) без хронических заболеваний почек.

Идентификацию аллелей полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анали-

зом длин рестриктазных фрагментов. Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего полиморфную последовательность Val762Ala гена ADPRT1, использовали следующие праймеры: PARP F+762 5'- ttc ttt tgc tcc tcc agg cca acg -3' и PARP R+762 5'- ttg ctg cta tca tca gac cct ccc -3'. Аллели полиморфного маркера Val762Ala выявляли, расщепляя фрагмент ДНК рестриктазой Tail (Fermentas). При расщеплении фрагмента, содержащего аллель Т (Val), образуются продукты размером 75 и 25 пар нуклеотидов, в то время как фрагмент ДНК, содержащий аллель С (Ala), остается нерасщепленным. Продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра.

При статистической обработке данных достоверность различий частот встречаемости аллелей и генотипов локуса Val762Ala гена ADPRT1 в группах определяли с помощью критерия Фишера. Для описания относительного риска развития заболевания рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (95% ДИ). Для протяженных переменных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение (mean±SD) или медиану, 25-й и 75-й квар-

тили – Me (25; 75%) в зависимости от соответствия данных нормальному распределению. Достоверность различий оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни. Проверяли статистическую значимость различий частотных показателей с использованием критерия χ^2 по Пирсону. Достоверными считались различия при $p < 0,05$, а $0,05 \leq p < 0,1$ рассматривали как тенденцию к различию. Почечную выживаемость оценивали методом Каплана–Мейера с учетом времени от начала заболевания (соответствует моменту появления мочевого синдрома) до удвоения исходного уровня креатинина. Кривые выживаемости разных групп больных сравнивали с помощью теста log-rank. Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ SPSS 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе больных ХГН и в контрольной распределение аллелей и генотипов подчинялось равновесию Харди–Вейнберга. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 в этих группах представлены в таблице.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 в группах больных хроническим гломерулонефритом и здоровых доноров

Генетический маркер	Частота аллелей и генотипов		p	ОШ	95% ДИ
	больные ХГН (n=70)	контроль (n=70)			
Аллель Ala	0,207	0,509	<0,001	0,255	0,153-0,429
Аллель Val	0,793	0,491	<0,001	3,90	2,350-6,555
Генотип Ala/Ala	0,014	0,316	<0,001	0,032	0,004-0,243
Генотип Ala/Val	0,386	0,386	>0,05	–	–
Генотип Val/Val	0,600	0,298	<0,001	3,500	1,780-6,883

Достоверные различия частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 свидетельствуют о его ассоциации с развитием ХГН, при этом носительство аллеля Val и генотипа Val/Val является фактором риска развития патологии (ОШ>1), а носительство аллеля Ala и генотипа Ala/Ala коррелирует со сниженным риском развития ХГН (ОШ<1).

Для дальнейшего анализа больные ХГН были разделены на две группы: группу Ala (n=28), в которую из-за малого числа гомозигот Ala/Ala объединили больных с генотипами Val/Ala и Ala/Ala, и группу Val/Val (n=42).

У носителей аллеля Ala ХГН диагностировали в более раннем возрасте по сравнению с гомозиготами Val/Val: 22,8±11,2 и 26,1±13,2 года соответственно (p=0,049). Кроме того, в группе Ala процент больных, у которых ХГН дебютировал до 20 лет, был выше, чем в группе Val/Val (57,1 и 36,8% соответственно, p=0,07). Ассоциации полиморфного маркера Val762Ala гена

ADPRT1 с особенностями клинической картины в дебюте ХГН при первом и последнем обследовании в клинике, а также на момент биопсии почки не обнаружены.

Морфологическое исследование биоптата почки было выполнено у 45,3% больных в группе Ala и у 54,7% в группе Val/Val. Возраст больных и длительность ХГН на момент биопсии были сопоставимы. Статистически значимые различия в распределении морфологических вариантов ХГН, частоте выявления фибропластической трансформации и тубулоинтерстициального компонента отсутствовали, однако у носителей аллеля Ala по сравнению с больными с генотипом Val/Val наблюдалась тенденция к более частой встречаемости артериолосклероза (60,9 и 34,8% соответственно, p=0,07).

Показатели, характеризующие течение ХГН, в исследуемых группах существенно не различались: в группах Ala и Val/Val частота развития АГ на протяжении заболевания составляла 88,9 и 76,3% соответ-

ственно, персистирующая ПУ \geq 3 г/сут наблюдалась в 69,6 и 55,6% случаев. Достоверные различия в частоте проведения иммуносупрессивной терапии, ее типах, ответе на неё также отсутствовали.

Из 70 больных ХГН 13 достигли конечной точки наблюдения – удвоения исходного уровня креатинина, однако почечная выживаемость в группах Ala и Val/Val достоверно не различалась (метод Каплана–Мейера, $p \geq 0,05$).

Обнаруженные в нашей работе достоверные различия в характере распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 у больных ХГН и в контрольной группе позволяют говорить о наличии ассоциации этого маркера с предрасположенностью к развитию ХГН. В мировой литературе связь данного полиморфного маркера с первичным поражением почек не изучалась, немногочисленные исследования были посвящены в основном анализу ассоциации с онкологическими заболеваниями, в том числе раком предстательной железы [12], мочевого пузыря [6], легких [23], органов желудочно-кишечного тракта [9, 22] и т.д. В одной работе [17] авторы исследовали значение нескольких полиморфных маркеров (в том числе и маркера Val762Ala) гена ADPRT1 у больных диабетической нефропатией в стадии хронической почечной недостаточности, однако достоверной ассоциации не было обнаружено.

Поскольку ранее ассоциация полиморфного маркера Val762Ala гена ADPRT1 с клиническими и морфологическими особенностями ХГН не изучалась, выявленные нами ассоциации между возрастом начала ХГН и более частой встречаемостью артериолосклероза в биоптате требуют уточнения в последующих исследованиях, равно как и механизмы влияния ПАРП-1 на генетическую предрасположенность к развитию ХГН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва Л.А., Козловская Н.Л., Шкарупо В.В. и др. Влияние генетической формы тромбофилии на клинко-морфологические проявления и характер течения хронического гломерулонефрита // Нефрол. диал. 2010. №1. С.25-33.
2. Новожилова А.П., Плужников Н.Н., Новиков В.С. Механизмы клеточной гибели // Программированная клеточная смерть / под ред. В.С. Новикова. СПб.: Наука, 1996. С.9-29.
3. Суханова М.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 – регулятор белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах, возникающих при генотоксическом воздействии // Молекул. биол. 2004. Т.38. С.5834-5847.
4. Cesarone C.F., Scarabelli L., Scovassi I. et al. Changes in activity and mRNA levels of poly(ADP-ribose) polymerase during rat liver regeneration // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V.1087. P.241-246.
5. Dantzer F., Schreiber V., Niedergant C. et al. Involvement of poly(ADP-ribose)polymerase in base excision repair // Biochimie. 1999. V.81. P.69-75.
6. Figueroa J.D., Malats N., Real F.X. et al. Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk // Hum. Genet. 2007. V.121. P.233-242.
7. Grande J.P. Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring // Lupus. 1998. No.7. P.604-610.
8. Gwinner W., Grone H.J. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis // Nephrol. Dial. Transplant. 2000. V.15. P.1127-1132.
9. Hao B., Wang H., Zhou K. et al. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma // Cancer Res. 2004. V.64. P.4378-4384.
10. Hunley T.E., Julian B.A., Phillips J.A. et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy // Kidney Int. 1996. V.49. P.571-577.
11. Li F., Szaby C., Pacher P., Southan G.J. et al. Evaluation of orally active poly(ADP ribose) polymerase inhibitor in streptocin-diabetic rat model of early peripheral neuropathy // Diabetologia. 2004. V.47. P.710-717.
12. Lockett K.L., Hall M.C., Xu J. et al. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function // Cancer Res. 2004. V.64. P.6344-6348.
13. Lovati E., Richard A., Frey B. et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease // Kidney Int. 2001. V.60. P.46-54.
14. Meisterernst M., Stelzer G., Roeder R.G. Poly(ADP-ribose)polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. 1997. V.94. P.2261-2265.
15. Minchenko A.G., Stevens M.J., White L. et al. Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP ribose) polymerase activation // FASEB J. 2003. V.17. P.1514-1516.
16. Pacher P., Liaudet L., Bai P. et al. Activation of poly (ADP ribose) polymerase contributes to the development of doxorubicin-induced heart failure // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. V.300. P.862-867.
17. Prasad P., Tiwari A.K., Kumar K.M. et al. Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes // BMC Med. Genet. 2010. V.11. P.52.
18. Song J., Narita I., Goto S. et al. Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy // J. Med. Genet. 2003. V.40. P.372-376.

19. Szaby E., Kern T.S., Virag L. et al. Evidence for poly(ADP ribose) polymerase activation in the diabetic retina // *FASEB J.* 2001. V.15. P.A942.
20. Szaby G., Bahrle S., Stumpf N. et al. Poly(ADP ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation // *Circ. Res.* 2002. V.90. P.100-106.
21. Wang Y., Kikuchi S., Suzuki H. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects on the progression of renal failure in non-diabetic renal disease // *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999. V.14. P.2898-2902.
22. Zhang Q., Li Y., Li X. et al. PARP-1 Val762Ala polymorphism, CagA+ H. pylori infection and risk for gastric cancer in Han Chinese population // *Mol. Biol. Rep.* 2009. V.36. P.1461-1467.
23. Zhang X., Miao X., Liang G. et al. Polymorphisms in DNA base excision repair genes ADPRT and XRCC1 and risk of lung cancer // *Cancer Res.* 2005. V.65. P.722-726.
24. Zingarelli B., Salzman A.L., Szaby C. Genetic disruption of poly(ADP ribose)synthetase inhibits the expression of P-selectine and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia-reperfusion injury // *Circ. Res.* 1998. V.83. P.85-94.