

Идентификация локуса, ассоциированного с диабетической нефропатией при сахарном диабете типа 1

К.В. Савостьянов¹, Д.А. Чистяков¹, М.В. Шестакова²,
О.Е. Воронько¹, Л.А. Чугунова², М.Ш. Шамхалова²,
И.И. Дедов², В.В. Носиков¹

¹ Государственный научный центр РФ «ГосНИИ генетика»
(дир. — член-корр. РАН В.Г. Дебабов),

² ГУ Эндокринологический научный центр
(дир. — акад. РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва,
ММА им. И.М. Сеченова
(ректор — акад. РАН и РАМН М.А. Пальцев)

Диабетическая нефропатия (ДН) относится к «поздним» микрососудистым осложнениям диабета, которые развиваются спустя годы после проявления основного заболевания. ДН является гетерогенной и этиологически многофакторной ангиопатией. Убедительным указанием на присутствие генетических факторов в развитии ДН явилось наблюдение случаев семейного накопления ДН и ее сцепленности с другими ангиопатиями, имеющими генетические факторы риска [4]. Кроме того, многие больные в течение десятилетий переносят возникающие при диабете метаболические нарушения без развития ДН, что в сочетании с популяционными и семейными данными позволяет говорить о наличии значительного генетического компонента в патогенезе ДН. Вполне правомочным является использование подхода, основанного на изучении ассоциации полиморфных маркеров генома человека с ДН.

Согласно гемодинамической концепции развития ДН, которая наиболее полно объясняет ранние события в становлении патологии, важную роль в формировании внутриклубочковой гипертензии (ее стойкая форма ведет к структурным изменениям в базальной мембране эндотелия почечных микрососудов и т.д.) играет дисбаланс в действии сосудосуживающих и сосудорасширяющих агентов. Большое значение в патогенезе нефропатии могут иметь гены систем регуляции тонуса сосудов. Прежде всего это ренин — ангиотензиновая система (РАС), сужающая сосуды, и система окиси азота (NO), оказывающая релаксирующее воздействие.

Многочисленные ассоциативные исследования в разных популяциях подтверждают важную роль генов РАС в формировании предрасположенности к ДН, особенно это касается аллеля *D* и генотипа *DD* полиморфного маркера *I/D* гена фермента, превращающего ангиотензин I (АСЕ), которые ассоциированы с повышенным риском развития данного осложнения [10]. По всей видимости, именно ген АСЕ является наиболее важным генетическим маркером ДН среди генов РАС, поскольку его продукт играет ключевую роль в общем и внутрипочечном синтезе сосудосуживающего пептида ангиотензина II [6, 8]. Так как генотип *DD* коррелирует с повышенным уровнем ангиотензинпревращающего фермента в плазме, понятна предрасполагающая роль это-

го генотипа на ранних стадиях развития нефропатии (формирование внутриклубочковой гипертензии под действием высокого содержания ангиотензина II в почечных микрососудах) [7].

Проведение геномного поиска позволило обнаружить в человеческом геноме несколько областей предрасположенности к ДН на хромосомах 3, 7, 9, 12 и 20, тем самым наглядно подтверждая версию о полигенном характере данной ангиопатии [3]. Однако необходимы дальнейшие исследования по установлению четкой ассоциации этих областей с конкретными генами.

Сравнение полученных нами данных с публикациями других исследователей выявляет значительную противоречивость результатов. Особенно это касается работ, посвященных ассоциации генов *ACE*, *AGT*, *ALR2* и *MTHFR* с заболеванием [1, 2]. Эта противоречивость и была одной из причин того, что в лаборатории Кролевского [9] (США) был проведен анализ сцепления с ДН участков хромосом, содержащих гены *ACE*, *AGT*, и *AT2R1*, с использованием дискордантных семей из европейской популяции США. Анализ показал, что области генома, содержащие гены *ACE* и *AGT*, не сцеплены с ДН при СД типа 1, но указал на наличие сильного сцепления с ДН участка хромосомы 3 (q21-q25) размером 20 сМ, содержащей ген *AT₂R1* [9].

Для изучения ассоциации с ДН области хромосомы 3, расположенной около гена *AT₂R1*, мы использовали группу полиморфных микросателлитов *D3S1512*, *D3S2326* и *D3S1744* и обследовали 2 группы больных СД типа 1 с наличием и отсутствием ДН (табл. 1).

Объем и методы исследования

Для идентификации аллелей полиморфных маркеров использовали геномную ДНК, выделенную из крови 92 больных СД типа 1 с наличием (n=36) ДН, средний возраст 22,3±4,5 года (соотношение м/ж — 18/21) и отсутствием (n=56) ДН, средний возраст 37,9±9,4 года (соотношение м/ж — 28/34). Чтобы снизить маскирующее влияние негенетических факторов риска, при формировании групп пациентов использовали принцип крайних

Таблица 1

Общая характеристика групп больных сахарным диабетом типа 1 с наличием (ДН+) и отсутствием (ДН-) фенотипов		
Параметр	ДН+ (n = 39)	ДН- (n = 62)
Пол, м/ж	18/21	28/34
Возраст, лет	22.3±4.5	37.9±9.4
Возраст начала СД типа 1, лет	10.1±4.3	10.4±5.4
Длительность СД типа 1, лет	12.2±2.1	27.5±7.2
Уровень НbA _{1c} , %	11.8±2.2	11.2±2.6
Скорость экскреции белка, мг/сут	1371±1115	26.1±14.8
Систолическое давление, мм рт. ст.	130.5±21.5	121.3±14.4
Диастолическое давление, мм рт. ст.	87.4±17.2	75.7±8.7

(«полярных») фенотипов и неперекрывающиеся критерии отбора. В группу «ДН+» вошли больные с длительностью диабета не более 15 лет и клинической протеинурией (альбуминурия свыше 300 мг/сут). Группу «ДН-» составили пациенты с альбуминурией менее 200 мг/сут. болеющие СД 1 типа на протяжении 20 лет и более (см. табл. 1).

Термостабильная ДНК-полимераза Taq получена от фирмы «Ферментас» (Вильнюс, Литва), протеиназа К – от фирмы «Мерск» (Германия). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен ОАО «Синтол» (Москва). Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных посредством экстракции фенолом-хлороформом после инкубации с протениназой К в 0.1% растворе SDS [11].

Последовательности праймеров рассчитаны с использованием программы «Олиго» на основании известных нуклеотидных последовательностей. ДНК амплифицировали методом ПЦР на термоциклерах РНС-2 («Techne», Великобритания) и «Терцик» (Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 1, 0.2 ммоль каждого dNTP, по 10 пикомолей каждого из праймеров, 100–200 нг геномной ДНК и 1.0 ед. ДНК-полимеразы Taq. Буфер 1 содержал 67 ммоль Трис-НСl (рН 8.8), 16.6 ммоль сульфата аммония и 0.1% твин-20. Концентрация хлорида магния зависела от амплифицируемого локуса.

На начальной стадии ПЦР денатурировали ДНК при 94°C в течение 3 мин, на конечной стадии проводили синтез второй цепи при 72°C в течение 7 мин. В промежутке между данными стадиями осуществляли 25–35 циклов ПЦР в зависимости от маркера и количества исходной ДНК по трехступенчатой программе, включающей денатурацию ДНК (94°C/1 мин), отжиг праймеров в течение 1 мин и синтез второй цепи (72°C/1 мин). Условия ПЦР и последовательности праймеров для амплификации исследованных локусов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Условия ПЦР и последовательности праймеров для амплификации полиморфных маркеров				
Полиморфный маркер	Прямой и обратный праймеры (5'→3')	Буфер	MgCl ₂ ммоль	Отжиг, °C
D3S1744	tttaagcgggaaggaagtgtg ctggcccatctctctat	1 (+10% ДМСО)	1.0	55
D3S2326	gaattacaggcgatgagcca acgatagtttgggtggctta	1 (+10% ДМСО)	2.0	50
D3S1512	tcagttcaggagagagactc ctgtattatagccctggta	1 (+10% ДМСО)	1.0	55

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 12% полиакриламидном геле, который затем окрашивали нитратом серебра [5].

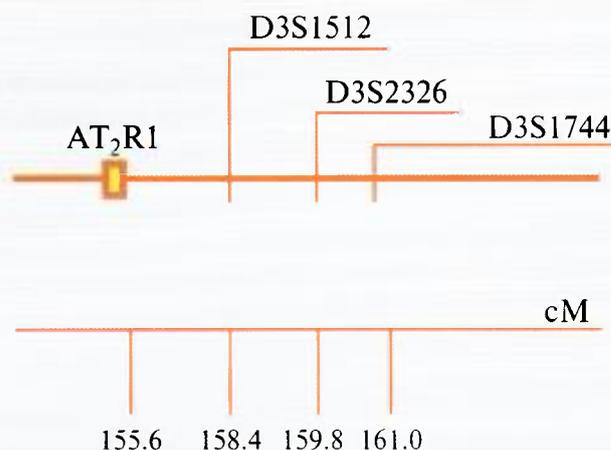
Достоверность различий в частотах аллелей и генотипов исследованных маркеров между группами ДН- и ДН+ определяли с помощью точного критерия Фишера, на который накладывалась поправка Бонферрони, учитывающая число аллелей и генотипов. Достоверными считали различия при $p < 0.05$. Для оценки роли генетического маркера (аллеля или генотипа) в развитии диабетической нефропатии рассчитывали значения относительного риска (OR). OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR > 1 как фактор повышенного риска и OR < 1 как фактор пониженного риска развития патологии.

Результаты и их обсуждение

Ген *AT₂R1* расположен в области 3q21-q25 в 155.6 сМ от конца плеча q хромосомы 3, а использованные нами маркеры *D3S1512*, *D3S2326* и *D3S1744* находятся на расстоянии 158.4, 159.8 и 161.0 сМ от этого же конца, соответственно (см. рисунок).

В случае маркера *D3S1744* было обнаружено 7 аллелей, включающих от 25 до 31 повтора. Достоверных различий по частотам аллелей между группами «ДН+» и «ДН-» не выявлено. Видимо, данный маркер не ассоциирован с ДН при СД типа 1.

В случае маркера *D3S2326* было обнаружено 4 аллеля, включающих от 24 до 27 повторов. В группе пациентов «ДН+» достоверно повышена частота аллеля 27 по сравнению с группой больных «ДН-». Аллель 27 обладает наибольшим значением OR (2.96). Следовательно, данный аллель можно рассматривать как своеобразный маркер повышенного риска развития ДН. У больных достоверно снижено содержание аллеля 26, характеризующегося минимальным значением OR (0.42), что формально свидетельствует о его предохраняющей роли по отношению к раннему развитию аутоиммунной патологии.



Расположение трех полиморфных маркеров хромосомной области 3q21-q25 относительно гена *AT₂R1*.

Таблица 3

Распределение частот аллелей полиморфных микросателлитных маркеров, расположенных в хромосомной области 3q21-q25, у больных СД типа 1 с наличием (ДН+) и отсутствием (ДН-)

Аллель	Частота		Значение критерия Фишера с учетом поправки Бонферрони	OR
	ДН+ (n=39)	ДН- (n=62)		
D3S1744 – 161.0 сМ от конца q				
25	0.051	0.016	> 0.05	
26	0.077	0.073	> 0.05	
27	0.103	0.137	> 0.05	
28	0.141	0.177	> 0.05	
29	0.295	0.274	> 0.05	
30	0.205	0.218	> 0.05	
31	0.128	0.105	> 0.05	
D3S2326 – 159.8 от конца q				
24	0.115	0.080	> 0.05	
25	0.385	0.444	> 0.05	
26	0.141	0.315	0.02418	0.41
27	0.359	0.161	0.00660	2.96
D3S1512 – 158.4 сМ от конца q				
9	0.051	0.040	> 0.05	
10	0.154	0.145	> 0.05	
11	0.231	0.355	> 0.05	
12	0.346	0.137	0.0054	
13	0.051	0.113	> 0.05	3.39
14	0.065	0.057	> 0.05	
15	0.026	0.032	> 0.05	
16	0.038	0.081	> 0.05	
17	0	0.024	> 0.05	
18	0.038	0.008	> 0.05	
19	0	0.008	> 0.05	

В случае маркера *D3S1512* обнаружено 11 аллелей, включающих от 9 до 19 повторов. Сравнительный анализ выявил достоверные различия в частотах аллеля 12 в группах «ДН+» и «ДН-». В группе больных «ДН+» содержание данного аллеля (34.6%) было существенно выше по сравнению с группой «ДН-» (13.7%) (табл. 3). Аллель 12 ($OR=3.39$) может служить маркером риска развития ДН.

Таким образом, для двух из трех изученных нами маркеров показана ассоциация с ДН. Следует отметить, что ассоциированы с ДН именно те маркеры, которые находятся ближе к гену *AT₂R1*. По всей ви-

димости, ген, предрасполагающий к развитию ДН, расположен очень близко от гена *AT₂R1*. Полученные нами данные позволяют уверенно говорить о том, что и в русской популяции Москвы в хромосомной области 3q21-q25 находится локус, предрасполагающий к развитию ДН у больных СД типа 1.

Среди ряда моделей, объясняющих роль и взаимодействие генетических и негенетических (метаболических) факторов в развитии сосудистых осложнений, в частности, ДН, на наш взгляд, наиболее правомочен «смешанный» вариант, предполагающий, что некоторые гены, в том числе, возможно, один «главный» ген, могут интерферировать с метаболическими факторами риска и инициировать развитие ДН, тогда как другие гены модулируют ее прогрессию. По всей видимости, к последним относится и ген *ACE*. Это предположение позволяет объяснить противоречивость результатов об ассоциации его с ДН, полученных разными исследователями. Модель хорошо согласуется с представлениями о клинической гетерогенности и этиологической многофакторности ДН и, по-видимому, может быть приложима и к другим сосудистым осложнениям СД. В пользу этой модели (и о полигенном характере ДН) говорит и тот факт, что, несмотря на выявление все новых и новых полиморфных маркеров диабетических ангиопатий, до сих пор не удалось обнаружить «главный» ген предрасположенности или устойчивости ни к одной из них. Опираясь на наши данные и данные семейного анализа сцепления в США, можно предположить, что в хромосомной области 3q21-q25 располагается именно этот самый «главный» ген. Положительные результаты, полученные разными методами анализа на двух неродственных популяциях, значительно увеличивают значимость полученных результатов.

Таким образом в хромосомной области 3q21-q25 обнаружен локус, ассоциированный с диабетической нефропатией у больных СД типа 1 в русской популяции г. Москвы.

Данное исследование финансировалось Федеральной программой РФ «Сахарный диабет» и подпрограммой «Геном человека» Государственной научно-технической программы РФ.

Литература

1. Воронько О. Е., Чистяков Д. А., Шестакова М. В. и др. // Сахарный диабет. – 1999. – No. 2. – С. 2-3.
2. Демуров Л. М., Чистяков Д. А., Чугунова Л. А. и др. // Мол. биол. – 1997. – Т. 31. – No. 1. – С. 59-62.
3. Chowdhury T.A., Dyer P.H., Kumar S. et. al. // Clin. Sci. – 1999. – Vol. 96. – P. 221-230.
4. Chowdhury T. A., Kumar S., Barnett A. H. et. al. // Diabet. Med. 1995. – Vol. 12. – P. 1059-1067.
5. De Roux N., Shields D. C., Misrahi M., Ratanachaiyavong S., McGregor A. M., Milgrom E. // J. Nephrol. – 1999. – Vol. 10. – P. 19-27
6. Fujisawa T., Ikegami H., Kawaguchi Y. et. al. // Diabetologia. – 1998. – Vol. 41. – P. 47-53.
7. Marre M., Bernadet P., Gallois Y. et. al. // Diabetes. – 1994. – Vol. 43. – P. 384-388.
8. Marre M., Bouhanick B., Berrut G. et. al. // Hypertension. – 1999. – Vol. 33. – P. 775-780.
9. Moczulski D. K., Rogus J. J., Antonellis A. et. al. // Diabetes. – 1998. – Vol. 47. – P. 1164-1169.
10. Orisio S. // J. Nephrol. – 1999. – Vol. 12. – P. 9-17.
11. Sunthornthepvarakul T., Hayashi Y., Refetoff S. // Thyroid. – 1994. – Vol. 4. – No. 2. – P. 147-149.