

УДК 575,17

## ОЦЕНКА СВЯЗЕЙ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

О.Н. НОВАКОВА\*, Е.В. НЕКИПЕЛОВА, И.А. ЮШИНА, Т.И. ЯКУНЧЕНКО, Н.И. ЖЕРНАКОВА,  
О.А. ЕФРЕМОВА, М.И. ЧУРНОСОВ

E-mail: litovkina@bsu.edu.ru

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
Министерства образования и науки Российской Федерации

*Изучены взаимосвязи генетических полиморфизмов хемокинов (+1931A/T CCL4, A/G CXCL11 (rs4512021), -403A/G CCL5, C/G CCL2 (rs2857657), -801G/A CXCL12) с количественными патогенетически значимыми признаками хронического гломерулонефрита: уровень креатинина и показатель клубочковой фильтрации. Группу исследования составили 700 человек, из них 238 больных хроническим гломерулонефритом и 462 индивидуума контрольной группы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ изучаемых полиморфизмов осуществляли методом детекции Taq-Man зондов с помощью real-time ПЦР. Установлено, что генетический полиморфизм A/G CXCL11 (rs4512021) ассоциирован со снижением почечной функции у больных хроническим гломерулонефритом. Генотипы AA и AG CXCL11 взаимосвязаны с более низким показателем клубочковой фильтрации ( $p=0,047$ ) и высоким уровнем креатинина ( $p=0,05$ )*

**Ключевые слова:** хронический гломерулонефрит, генетический полиморфизм, хемокины, хроническая почечная недостаточность.

## EVALUATION OF CIRCUITS OF CANDIDATE GENES WITH DEVELOPMENT OF CHRONIC RENAL FAILURE

O.N. NOVAKOVA, E.V. NEKIPELOVA, I.A. YUSHINA, T.I. YAKUNCHENKO, N.I. ZHERNAKOVA,  
O.A. EFREMOVA, M.I. CHURNOSOV

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University» of  
the Ministry of Education and Science of the Russian Federation

*The interrelations of genetic polymorphisms of chemokines (+1931A/TCCL4, A/G CXCL11 (rs4512021), -403A/G CCL5, C/G CCL2 (rs2857657), -801G/A CXCL12) with quantitative pathogenetically significant signs of chronic glomerulonephritis: creatinine level and the glomerular filtration rate. The study group consisted of 700 people, including 238 patients with chronic glomerulonephritis and 462 controls. The material for the study was DNA samples isolated from whole venous blood by the phenol-chloroform extraction method. The analysis of the studied polymorphisms was carried out by the method of detection of Taq-Man probes by means of real-time PCR. It was established that the genetic polymorphism A/G CXCL11 (rs4512021) is associated with a decrease in renal function in patients with chronic glomerulonephritis. Genotypes AA and AG CXCL11 are interrelated with a lower glomerular filtration rate ( $p=0,047$ ) and a high level of creatinine ( $p=0,05$ ).*

**Key words:** chronic glomerulonephritis, genetic polymorphism, chemokines, chronic renal failure.

doi:10.18522/2218-2268-2017-3-38-42

### Введение

Хронический гломерулонефрит (ХГН) остается одной из актуальных проблем современного здравоохранения в России и в мире [Крюкова

и соавт., 2012; Litovkina et al., 2014]. Хронический гломерулонефрит – это длительное (более года), медленно прогрессирующее заболевание, протекающее с иммуно-опосредованным диффузным поражением почек, приводящее к склерозу клубочков и утрате функции почек, развитию хронической почечной недостаточности (ХПН) [Крюкова и соавт., 2012; Novakova et al.,

© Новакова О.Н., Некипелова Е.В., Юшина И.А.,  
Якунченко Т.И., Жернакова Н.И., Ефремова О.А.,  
Чурносков М.И., 2017.

2016]. Несмотря на относительно невысокую распространенность ХГН в популяции, прогрессирующее течение заболевания является причиной того, что больные ХГН составляют основной контингент отделений нефрологии, гемодиализа и трансплантации почки [Сигитова, Архипов, 2012]. Прогрессирование нефрита и развитие почечной недостаточности зависит от активности процесса, не всегда клинически выявляемой. Поэтому диагноз ХГН нередко впервые устанавливается на терминальной стадии хронической болезни почек. Следует отметить, что среди заболеваний почек, приводящих к развитию ХПН, лидирующие позиции в России занимает хронический гломерулонефрит [Стахурлова, 2004]. Морфологическим субстратом ХПН является гибель функциональной паренхимы (более 70 %), замещение ее недействительной соединительной тканью (нефросклероз), что сопровождается нарушением клубочковых и канальцевых функций почек. Снижается скорость клубочковой фильтрации (КФ), нарушается выведение почками из организма продуктов метаболизма белков, жиров и углеводов, повышается концентрация в крови креатинина, мочевины и других веществ, развиваются симптомы интоксикации организма продуктами азотистого обмена [Журавская и соавт., 2009].

В настоящее время активно изучается вовлеченность генетической компоненты в формирование, развитие и прогрессирование почечных патологий, в том числе и хронического гломерулонефрита [Piotrowski et al., 2010; Litovkina et al., 2012; Bagci et al., 2015]. Как свидетельствуют данные литературы [Anders et al., 2010], важное значение в развитии патологий почек, в том числе и ХГН, отводится хемокинам. Хемокины 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. Данные процессы в конечном итоге неизменно могут привести к нарушению функции почек, склерозированию её ткани [Хван, 2013]. В некоторых источниках особо подчёркивалась роль моноцитарного хемотаксического протеину-1 (CCL2) и CCL5 – фактора, регулирующего активацию нормальной Т-клеточной экспрессии и секреции в патогенезе ХГН [Peterson et al., 2004; Stasikowska, Wagrowska-Danilewicz, 2007]. В связи с этим гены хемокинов могут быть рассмотрены в качестве кандидатных генов ХГН

[Chow F.Y. et al., 2007]. Анализируя имеющиеся литературные данные, можно отметить, что значение генетических факторов хемокинов в развитии хронического гломерулонефрита к настоящему времени изучено не достаточно, результаты проводимых научных исследований представлены в основном в зарубежных источниках [Piotrowski et al., 2010; Bagci et al., 2015], а в России такие работы очень фрагментарны и малочисленны.

Цель исследования – изучение ассоциации генетических полиморфизмов хемокинов (+1931A/T *CCL4*, A/G *CXCL11* (rs4512021), -403A/G *CCL5*, C/G *CCL2* (rs2857657), -801G/A *CXCL12*) с показателями клубочковой фильтрации и уровнем креатинина у больных хроническим гломерулонефритом.

### Материалы и методы

В исследовании принимали участие 238 больных хроническим гломерулонефритом и 462 индивидуума контрольной группы. В выборки больных и контроля включались лица русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не состоящие в родстве между собой. Исследуемые группы больных ХГН и контроля сопоставимы по полу, возрастным характеристикам, месту рождения и национальности. Пациенты включались в соответствующую группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования. Клинико-лабораторное обследование пациентов проводилось на базе отделения нефрологии Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Все пациенты подписали информированное согласие о включении в исследование и использовании полученных данных. Исследование проводилось с соблюдением этических норм, изложенных в WAME (The World Association of Medical Editors). В контрольную группу включались индивидуумы без заболеваний почек и артериальной гипертензии.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции, взятой из локтевой вены пробанда [Miller et al., 1988]. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с использовани-

ем стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов. Последующий анализ полиморфизмов проводился методом детекции Taq-Man зондов с помощью real-time ПЦР.

Расчет фенотипических и генных частот проводили стандартными методами. Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность. Вычисления производили в таблицах сопряженности  $2 \times 2$ , статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 8,0». Сравнение исследуемых групп больных по уровням креатинина и показателям клубочковой фильтрации проводили с помощью критерия Манна–Уитни, для описания использовали медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75) [Риброва, 2006].

### Результаты и их обсуждение

В данном исследовании проведено молекулярно-генетическое типирование локусов хемокинов: макрофагального воспалительного протеина  $1\beta$  (+1931A/T *CCL4*), регулятора активности нормальной экспрессии Т-клеток (-403G/A *CCL5*), фактора стимулятора роста предшественников  $\beta$ -клеток (-801G/A *CXCL12*), моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (C/G *CCL2*, rs2857657), интерферон индуцибельного  $\alpha$  хемоаттрактанта Т-клеток (A/G *CXCL11*, rs4512021).

Основные характеристики исследуемых групп больных хроническим гломерулонефритом и контрольной группы представлены в табл. 1. Группа контроля полностью сопоставима с выборкой больных ХГН по данным характеристикам ( $p > 0,05$ ).

Таблица 1

#### Основные характеристики больных хроническим гломерулонефритом и контрольной группы

Показатели	Больные ХГН	Популяционный контроль
Общее количество	238	462
Мужчины	127 (53,4 %)	249 (53,9 %)
Женщины	111 (46,6 %)	213 (46,1 %)
Средний возраст, лет	39,58±14,58	42,20±6,28
Масса, кг	63,4±2,1	67,4±1,7
Рост, см	165,4±3,4	168,6±2,7

В ходе анализа полученных результатов выявлено, что для исследуемых локусов у больных ХГН и у лиц контрольной группы эмпирическое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Результаты изучения связей генетических маркеров хемокинов с показателями клубочковой фильтрации и уровнем креатинина представлены в табл. 2 и на рис. 1 и 2. Установлены значимые ассоциации этих характеристик только с одним генетическим полиморфизмом A/G *CXCL11* (rs4512021). Получено, что больные ХГН с генотипами AA и AG *CXCL11* имеют значительно меньший показатель клубочковой фильтрации (медиана – 74,0 мл/мин, нижний квартиль – 14,0 мл/мин, верхний квартиль – 104,0 мл/мин) и более высокий уровень креатинина (медиана – 119,0 мкмоль/л, нижний квартиль – 94,4 мкмоль/л, верхний квартиль – 41,0 мкмоль/л) по сравнению с индивидуумами с генотипом GG (медиана – 92,0 мл/мин, интерквартильный размах – 74,0–108,0 мл/мин,  $p = 0,047$  и медиана 101,0 мкмоль/л, интерквартильный интервал – 87,0–181,0 мл/мин,  $p = 0,05$ , соответственно).

Выявленную взаимосвязь данных генетических вариантов с показателями КФ и уровнем креатинина у больных ХГН можно пояснить, исходя из следующих позиций. Известно, что определенные аллельные варианты генов (как правило, это «мутантные» аллели) обуславливают повышенную продукцию соответствующих цитокинов (хемокинов), что клинически будет проявляться и более выраженными их медико-биологическими эффектами. Генетический полиморфизм rs4512021, локализованный в интроне гена *CXCL11*, имеет существенное значение в регуляции экспрессии (выявлен его значимый экспрессионный потенциал в 55 различных тканях и органах, в том числе и почках). Известно, что интерферон индуцибельный  $\alpha$ -хемоаттрактант Т-клеток является важнейшим хемотаксическим фактором для Т-лимфоцитов, активирует Th1 CD4 Т-клетки, NK клетки, моноциты в очаге воспаления [Teramoto et. al., 2008], что может играть важную роль в поддержании хронического воспалительного процесса в почке, обуславливая снижение её функции, в том числе и клубочковой фильтрации, повышение уровня креатинина, а также с возможным исходом в ХПН.

Таблица 2

## Показатели клубочковой фильтрации и уровня креатинина у больных хроническим гломерулонефритом в зависимости от генетических полиморфизмов хемокинов

Полиморфизм		Показатель клубочковой фильтрации, мл/мин			Уровень креатинина, мкмоль/л		
Локус	Генотип	n	Me	Q25-Q75	n	Me	Q25-Q75
<b>+1931A/T CCL4</b>	+1931AA	114	82,0	30,6–105,0	114	110,5	(92,5–313,0)
	+1931AT и +1931TT	111	74,7	12,8–105,6	111	119,0	(93,2–685,0)
	p	>0,05			>0,05		
<b>-403G/A CCL5</b>	-403AA	4	43,0	28,40–68,6	4	180,0	135,5–416,5
	-403GG и -403GA	180	81,0	16,0–106,5	180	110,0	91,65–528,5
	p	>0,05			>0,05		
<b>C/G CCL2 (rs 2857657)</b>	GG	10	72,5	15,00–99,8	10	95,0	71,00–54,0
	CC и CG	218	81,0	20,5–105,0	218	112,5	94,0–401,0
	p	>0,05			>0,05		
<b>-801G/A CXCL12</b>	-801AA	8	96,5	50,5–113,5	8	102,0	98,0–329,0
	-801GG и -801GA	218	81,0	20,5–105,0	218	112,0	92,5–401,0
	p	>0,05			>0,05		

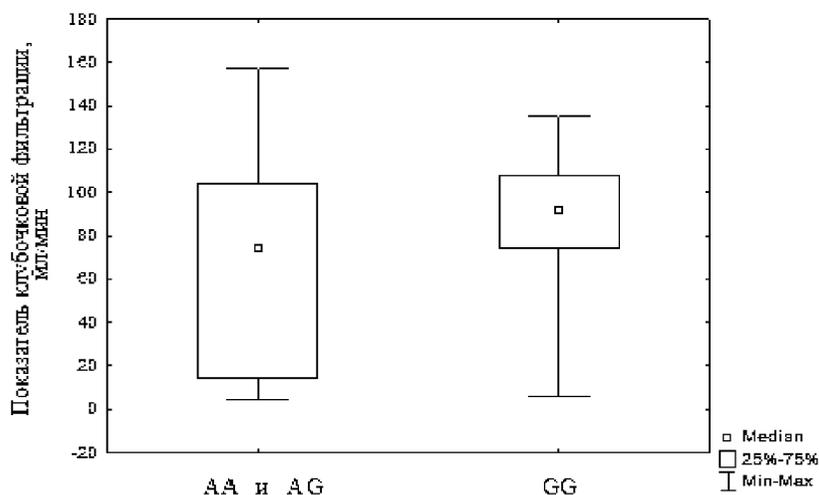


Рис. 1. Ассоциации генетического полиморфизма A/G CXCL12 (rs4512021) с показателями клубочковой фильтрации у больных хроническим гломерулонефритом

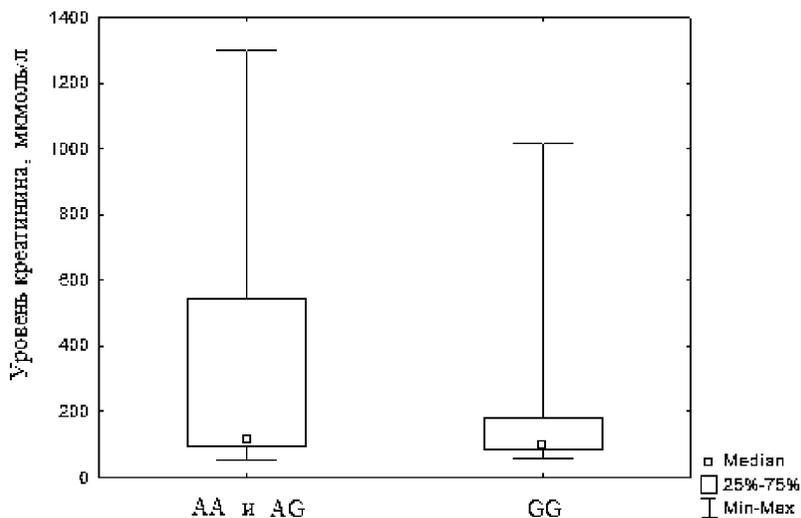


Рис. 2. Уровень креатинина у больных хроническим гломерулонефритом в зависимости от генетического полиморфизма A/G CXCL12 (rs 4512021)

## Выводы

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о том, что генетический полиморфизм A/G *CXCL11*(rs4512021) ассоциирован с почечной функцией. Факторами риска снижения функции почек являются генотипы AA и AG *CXCL11*, данные молекулярно генетические маркеры взаимосвязаны с более низким показателем клубочковой фильтрации ( $p=0,047$ ) и высоким уровнем креатинина ( $p=0,05$ ).

## Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

Журавская ИМ, Петров ВН, Иванова ОП. Хроническая почечная недостаточность. Мед. сестра. 2009; 1: 10–12.

Крюкова НИ, Кочетков СГ, Киселёва ГИ, Губарева ИВ, Тетянец СС, Байбурсян ЕД, Германова ОА, Титова ЮФ. Заболевание почек у лиц старших возрастных групп: науч.-метод. пособие. Самара: ГБОУ ВПО «Самарский гос. мед. ун-т». 2012.

Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ. STATISTICA. М.: Медиасфера. 2006.

Сигитова ОН, Архипов ЕВ. Эпидемиология хронического гломерулонефрита у взрослого населения. Вести. современной клин. мед. 2012; 5(4): 19–22.

Стахурлова ЛИ. Особенности гломерулонефрита в структуре и прогрессировании хронической почечной недостаточности (ХПН) у детей Воронежского региона. Вести. ВГУ. 2004; 1: 189–194.

Хван МА. Медиаторы воспаления при остром повреждении почек (Обзор литературы). Нефрология и диализ. 2013;15(2):106–115.

Anders HJ, Sayyed SA, Vielhauer V. Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation. Nephron. Exp. Nephrol. 2010;114(2):33–38. PMID:19887844

Bagci B, Bagci G, Candan F, Ozdemir O, Sezgin I. The protective effect of MCP-1 -2518 A>G promoter polymorphism in Turkish chronic renal failure patients requiring long-term hemodialysis. Int Urol Nephrol. 2015;47(3):551–6. PMID:25655256.

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. Diabetologia. 2007;50(2):471–480. PMID:17160673.

Litovkina O, Nekipelova E, Dvornyk V, Polonikov A, Efremova O, Zhernakova N, Reshetnikov E, Churnosov M. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis. Gene. 2014;546(1):112–6. PMID:24727057.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research. 1988;16(3):1215–1221.

Novakova O, Nekipelova E, Yakunchenko T, Krikun E, Zhernakova N., Efremova O. Clinical and Genetic Research of Chronic Glomerulonephritis. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(6):3222–3227.

Peterson KE, Errett JS, Wei T. MCP-1 and CCR2 Contribute to Non-Lymphocyte-Mediated Brain Disease Induced by Fr98 Polytopic Retrovirus Infection in Mice: Role for Astrocytes in Retroviral Neuropathogenesis. J. Virol. 2004;78(12):6449–6458.

Piotrowski P, Lianeri M, Gasik R, Roszak A, Olesińska M, Jagodziński PP. Monocyte chemoattractant protein-1 -2518 A/G single nucleotide polymorphism might be associated with renal disease and thrombocytopenia of SLE. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:130265. PMID:20414371.

Stasikowska O, Wagrowska-Danilewicz M. Chemokines and chemokine receptors in glomerulonephritis and renal allograft rejection. Med. Sci. Monit. 2007;13(2):31–36. PMID:17261994.

Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwai T, Iwao H, Okamura M et al. Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis. J Pharmacol Sci. 2008;106(1):56–67. PMID:18187931.