

Риск развития хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа детерминирован полиморфизмом генов *NOS3*, *APOB*, *KCNJ11*, *TCF7L2*

Железнякова А.В.¹, Лебедева Н.О.¹, Викулова О.К.^{1,3}, Носиков В.В.², Шамхалова М.Ш.¹, Шестакова М.В.^{1,3}

¹ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор — академик РАН И.И. Дедов)

²Государственный научный центр РФ ФГУП «ГосНИИ Генетика», Москва
(директор — к.б.н. Бебуров М.Ю.)

³ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва
(ректор — член-корр. РАН П.В. Глыбочко)

Генетическая предрасположенность является одним из важных факторов развития хронических диабетических осложнений.

Цель. Изучить ассоциацию полиморфных маркеров (ПМ) комплекса генов-кандидатов, кодирующих основные медиаторы поражения почек, с развитием хронической болезни почек (ХБП) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2).

Материалы и методы. В исследование включено 435 пациентов с СД2 по принципу «случай—контроль». Первая группа (n=253) формировалась при помощи неперекрывающихся критериев отбора: пациенты с ХБП при длительности СД2 менее 5 лет («ХБП+», n=78) и пациенты без ХБП с СД2 более 10 лет («ХБП-», n=175). В этой группе исследовали ПМ I/D гена *ACE*, ecNOS4a/4b гена *NOS3*, I/D гена *APOB*, e2/e3/e4 гена *APOE*. Во 2-й группе (n=182) пациенты были распределены на подгруппы «ХБП+» и «ХБП-» (n=38/144) вне зависимости от длительности СД, исследовали ПМ pro12ala гена *PPARG2*, rs5219 гена *KCNJ11*, rs12255372 гена *TCF7L2*, rs13266634 гена *SLC30A8*. Статистический анализ распределения частот аллелей и генотипов проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия χ^2 , $p < 0,05$.

Результаты. Достоверную ассоциацию с развитием осложнения показали 4 гена. Ген *NOS3* (эндотелиальной синтетазы оксида азота): носительство аллеля 4a и генотипа 4a/4a гена *NOS3* повышают риск развития ХБП в 2 раза ($OR=2,26/9,88$ соответственно), аллель 4b и генотип 4b/4b гена *NOS3* являются защитными ($OR=0,44/0,45$ соответственно). Ген *APOB* (аполипопротеин В): носительство генотипа DD гена *APOB* имеет протективное значение ($OR=0,20$, 95% ДИ 0,05–0,88). Ген *TCF7L2* (транскрипционного фактора 7, подобного фактору 2): носительство генотипа TT предрасполагает к развитию ХБП ($OR=3,03$, 95% ДИ 1,07–8,58). Ген *KCNJ11* (субъединицы Kir6.2 АТФ-зависимого калиевого канала): носительство генотипа AA повышает риск развития ХБП ($OR=2,25$, 95% ДИ 1,02–4,97), носительство аллеля G защищает от развития ХБП ($OR=0,57$, 95% ДИ 0,34–0,96).

Заключение. В результате исследования установлено, что развитие ХБП при СД2 генетически детерминировано. Выявлена достоверная ассоциация риска ХБП с генами, кодирующими факторы эндотелия (*NOS3*), факторы липидного обмена (*APOB*) и факторы секреции инсулина (*KCNJ11*, *TCF7L2*), продукты экспрессии которых участвуют в основных патогенетических механизмах поражения почек при СД.

Ключевые слова: сахарный диабет; хроническая болезнь почек; генетическая предрасположенность; *NOS3*; *APOB*; *TCF7L2*; *KCNJ11*

Risk of chronic kidney disease in type 2 diabetes determined by polymorphisms in *NOS3*, *APOB*, *KCNJ11*, *TCF7L2* genes as compound effect of risk genotypes combination

Zheleznyakova A.V.¹, Lebedeva N.O.¹, Vikulova O.K.^{1,3}, Nosikov V.V.², Shamkhalova M.S.¹, Shestakova M.V.^{1,3}

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

²National Research Center "GosNII Genetika", Moscow, Russian Federation

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Genetic susceptibility plays an important role in the risk of developing chronic complications in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Aims. In this study, we evaluated the possible association of the polymorphic variants that encode key renal damage mediators (endothelial dysfunction, lipid metabolism and insulin secretion/sensitivity) with the risk of chronic kidney disease (CKD) in patients with T2DM.

Materials and Methods. We enrolled 435 patients with T2DM using case-control study design. In 253 patients, we used non-overlapping criteria to form groups with/without CKD (defined as $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) according to the duration of T2DM (≤ 5 years/ ≥ 10 years) (n=75 and 178, respectively) and analysed the following 4 polymorphic markers: I/D in *ACE*, ecNOS4a/4b in *NOS3*, I/D in *APOB* and e2/e3/e4 in *APOE* genes. We then divided 182 patients in groups with/without CKD (n=38 and 144, respectively) regardless of the duration of diabetes and studied

pro12ala in PPARG2, rs5219 in KCNJ11, rs12255372 in TCF7L2 and rs13266634 in SLC30A8 genes. Statistical analysis was performed using the χ^2 test, and data were expressed as odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs). Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance.

Results. Four genes were found to have a significant association with CKD occurrence. For the eNOS3 the allele 4a and 4a/4a genotype was associated with a twofold CKD risk (OR=2.2/9.88) and the allele 4b and 4b/4b polymorphism were protective regarding CKD development (OR=0.44/0.45). For APOB I/D, the genotype DD was associated with lower risk of CKD [OR for DD=0.2 (95% CI: 0.05–0.88)]. In the second group, genotype TT of TCF7L2 predisposed to CKD (OR=3.03, 95% CI: 1.07–8.58). For KCNJ11 group genotype AA predisposed to CKD (OR=2.25, 95% CI: 1.02–4.97) compared to the allele G (OR=0.57, 95% CI: 0.34–0.96).

Conclusions. In conclusion, our findings indicate a significant role of functional genetic variants associated with genes of endothelial factors (NOS3), lipid metabolism (APOB), and insulin secretion factors (KCNJ11, TCF7L2) in modulating the risk of CKD and their significant involvement in the mechanism of kidney damage in patients with T2DM.

Keywords: diabetes mellitus; genes; CKD; NOS3; APOB; TCF7L2; KCNJ11

DOI: 10.14341/DM2014323-30

Хроническая болезнь почек (ХБП) является патологией, по темпам роста распространенности приобретающей характер неинфекционной эпидемии, наряду с такими заболеваниями, как сахарный диабет (СД) и ожирение. ХБП развивается у 13–15% лиц в общей популяции и гораздо чаще — до 40–50% — в группах риска, к которым относятся пациенты с СД 2 типа (СД2) [1]. По прогнозам Международной диабетической федерации, количество больных СД в мире к 2030 г. увеличится до 552 млн человек, из них 90% — пациенты с СД2. Тяжесть СД2 обусловлена генерализованным поражением сосудистой системы с развитием множественных микрососудистых (нефропатия, ретинопатия) и макрососудистых осложнений (ишемическая болезнь сердца (ИБС), периферический атеросклероз). Частота и темпы развития сосудистых осложнений, помимо модифицируемых факторов (гипергликемии, артериальной гипертензии (АГ), дислипидемии), зависят от индивидуальных генетических особенностей, характеризующих большую или меньшую чувствительность индивидуума к повреждающему действию патологических факторов при СД.

Диабетическая нефропатия (ДН) — одно из наиболее грозных осложнений СД, ведущее к прогрессивному снижению фильтрационной функции почек, итогом которого является развитие хронической почечной недостаточности (уремии). Классическим признаком ДН является повышение экскреции белка с мочой — микроальбуминурии (МАУ), а далее протеинурии (ПУ). Особенностью изучения почечных осложнений у пациентов с СД2 является гетерогенность патологии почек при этом типе заболевания, что практически не позволяет дифференцировать классическую ДН, основанную на определении экскреции белка, как при СД 1 типа (СД1) [2]. В настоящее время с целью диагностики почечной патологии введен термин ХБП, который представляет собой обобщающее наднозологическое понятие и позволяет оценить наличие и тяжесть поражения почек вне зависимости от причины повреждения. Под ХБП понимают наличие одного или более лабораторных, структурных или функциональных признаков повреждения почек длительностью ≥ 3 месяцев или изолированное снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) < 60 мл/мин/1,73 м². В нашем исследовании мы ориентировались на общепризнанную в мире классификацию

ХБП и определяли ее наличие как стабильное (более 3 месяцев) снижение СКФ < 60 мл/мин/1,73 м² [3].

Ведущей причиной развития всех сосудистых осложнений СД, в том числе ХБП, является хроническая гипергликемия. Однако у части пациентов поражение почек развивается и быстро прогрессирует, несмотря на удовлетворительный гликемический контроль, что указывает на влияние негликемических механизмов. Показана взаимосвязь уровня протеинурии, степени АГ и выраженности гломерулярного склероза [4]. В 1989 г. появились первые работы о возможности семейного наследования диабетической патологии почек [5]. Выделение данной категории больных позволило предположить значимое участие генетических факторов в развитии ДН и ХБП.

ХБП является второй, после сердечно-сосудистой патологии, причиной смертности больных с СД2. Контроль уровня гликемии и АД с использованием препаратов, блокирующих ренин-ангиотензиновую систему (РАС), могут замедлить прогрессирование, но не предупредить развитие патологии. Изучение генетической предрасположенности к ХБП представляет особую значимость именно с позиций прогнозирования и формирования групп риска на доклиническом этапе, когда патологические изменения потенциально обратимы.

Современная стратегия исследования генетической предрасположенности к такой многофакторной патологии, как сосудистые осложнения СД, основана на изучении полиморфных маркеров генов-кандидатов — генов, продукты экспрессии которых участвуют в патогенезе данного заболевания. Полиморфный маркер (ПМ) гена — это вариабельный (изменяющийся) участок ДНК, связанный с неким фенотипическим признаком (например, АГ). Под ассоциацией генетического маркера с заболеванием понимают достоверные различия в распределении частот аллеля или парного набора аллелей (генотипа) у лиц с наличием и отсутствием патологии.

Целью нашей работы было изучить распределение частот аллелей и генотипов комплекса полиморфных маркеров генов-кандидатов почечной патологии (I/D гена ACE, eNOS4a/4b гена NOS3, I/D гена APOB, $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена APOE, pro12ala гена PPARG2, rs5219 гена KCNJ11, rs12255372 гена TCF7L2 и rs13266634 гена SLC30A8) у пациентов с СД2 с наличием и отсутствием ХБП, и оценить информативность

Таблица 1

Последовательности праймеров и особенности амплификации полиморфных участков генов ACE, NOS3, APOB, APOE, KCNJ11, TCF7L2, PPARG2, SLC30A8			
Полиморфный маркер	Прямой и обратный праймеры (5'–3')	MgCl ₂ , mM	Отжиг, °C
KCNJ11 rs5219	TGCAGTTGCCTTTCTTGGACACAA GGTGGGGAGTTATCTCAGAAGTGAGGC	1	62
TCF7L2 rs12255372	CAGTTTACACATAAGGATGT CCTGAGTGATTATCAGAATA	2	48
PPARG2 pro12ala	TGCCCCAAATAAGCTTTC GCAATGCATTAGGCACTA	1	58
SLC30A8 rs13266634	CAAACGTGGCTTCTCTGA GTGAGTGAGTGATCGTAAA	2	58
NOS3 (ecNOS34a/4b)	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	1,5	53
APOB (I/D)	CAGCTGGCGATGGACCCGCCGA ACCGGCCCTGGCGCCCGCCAGCA	1,0	70
APOE (ε2/ε3/ε4)	ACGCGGGCACGGCTGTCCAA TCGCGGATGGCGCTGAGGC	2,0	66
ACE (I/D)	CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	1,5	62

их исследования в качестве маркеров прогнозирования поражения почек при СД2.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 435 пациента с СД2 русской популяции, включенных по принципу «случай–контроль». Выборка была этнически однородна. Первая группа (n=253) формировалась при помощи неперекрывающихся критериев отбора: пациенты с ХБП при длительности СД2 менее 5 лет («ХБП+», n=78) и пациенты без ХБП с СД2 более 10 лет («ХБП–», n=175). В этой группе исследовали ПМ I/D гена ACE, ecNOS4a/4b гена NOS3, I/D гена APOB, ε2/ε3/ε4 гена APOE. Во 2-й группе (n=182) пациенты были распределены на подгруппы «ХБП+» и «ХБП–» (n=38 и n=144) вне зависимости от длительности СД, исследовали ПМ pro12ala гена PPARG2, rs5219 гена KCNJ11, rs12255372 гена TCF7L2, rs13266634 гена SLC30A8. Такой подход к созданию групп с использованием «полярных» фенотипов применялся в связи с тем, что ХБП, особенно при СД2, является многофакторным заболеванием, чтобы снизить маскирующее влияние негенетических факторов риска, из которых длительность воздействия гипергликемии яв-

ляется одним из наиболее значимых. Наличие ХБП определяли как стойкое снижение СКФ <60 мл/мин/1,73 м², рассчитанной по стандартной формуле MDRD.

Все пациенты дали информированное согласие, проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ Эндокринологический научный центр.

Идентификация аллелей проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных посредством экстракции фенолом-хлороформом после инкубации образцов крови с протеиназой К в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Использовали термостабильную ДНК-полимеразу Taq производства ЗАО «Диалат» (г. Москва). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). Амплификацию с известными условиями работы праймеров проводили с помощью ПЦР «в реальном времени» и на термоцикле. Температуру отжига праймеров варьировали в зависимости от амплифицируемого локуса. Условия ПЦР и последовательности праймеров для амплификации исследованных локусов приведены в табл. 1.

Амплифицированные аллели полиморфных локусов идентифицировали после электрофоретического разделения в 12% полиакриламидном или 2% агарозном геле,

Таблица 2

Общая характеристика групп с наличием и отсутствием ХБП						
	Группа 1 (n=253)			Группа 2 (n=182)		
Клинические параметры	«ХБП+» (n=78)	«ХБП–» (n=175)	p	«ХБП+» (n=38)	«ХБП–» (n=144)	p
Пол (м/ж)	35/43	39/136	p<0,05	12/26	60/84	Н/Д
Возраст, лет	62,8±8,5	58,8±7,87	Н/Д	64,6±8,3	57,7±8,1	Н/Д
Длительность СД2, лет	5±0,6	12,5±2,7	дизайн	15,5±9,65	10,8±6,3	p<0,05
HbA _{1c} , %	7,8±1,8	8,6±1,9	p<0,05	8,0±1,92	9,1±1,92	p<0,05
Холестерин, ммоль/л	5,5±1,8	5,2±3,1	Н/Д	5,5±1,26	5,4±1,42	Н/Д
Триглицериды, ммоль/л	2,7±1,8	1,9±1,2	p<0,05	2,0±0,89	2,2±1,9	Н/Д
САД, мм рт.ст.	147±20,4	144±18,4	Н/Д	146,7±15,9	137,1±16	p<0,05
ДАД, мм рт.ст.	79,4±12,4	88,9±11,2	p<0,05	81,8±10,8	81±10,2	Н/Д
ИМТ, кг/м ²	30,6±5,3	32±6,7	Н/Д	32,7±7,66	31,6±6,1	Н/Д
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	20,1±20,2	96,1±21,9	дизайн	40±19,1	87,3±17,9	дизайн
Ретинопатия, %	85	37	p<0,05	74	51	p<0,05
МАУ, мг/л	3173±4797	36,5±69,68	p<0,05	103,5±44,9	17,5±49,7	p<0,05

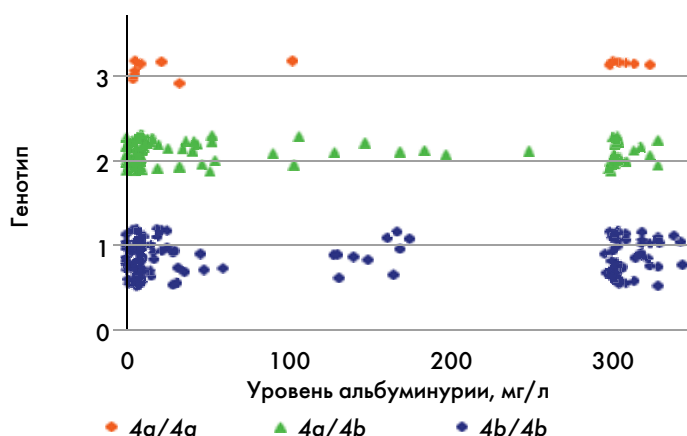


Рис. 1. Распределение генотипов NOS3 в зависимости от уровня альбуминурии.

который затем окрашивали бромистым этидием. Наблюдаемое распределение генотипов проверяли на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

Статистический анализ распределения частот аллелей и генотипов проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия хи-квадрат (χ^2). Клинические параметры оценивали при помощи критерия Стьюдента, методом χ^2 с поправкой Йейтса. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Риск развития ХБП рассчитан по Клопперу-Пирсону.

Результаты

Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 2. Все пациенты были сопоставимы по возрасту, полу, ИМТ. В группах «ХБП+» по сравнению с пациентами без ХБП отмечался достоверно более низкий HbA_{1c} , что, по всей видимости, отражает возможность частого развития гипогликемий при снижении фильтрации, нежели лучший контроль углеводного обмена. У пациентов с ХБП отмечался более высокий уровень альбуминурии, триглицеридов и САД (основных негликемических факторов риска прогрессирования ХБП) и большая частота ретинопатии как следствие сочетанного поражения органов-мишеней.

Распределение частот генотипов в выборке «ХБП+» по всем полиморфизмам соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Достоверную ассоциацию с развитием ХБП показали маркеры 4 генов.

Маркер *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* (эндотелиальной синтетазы оксида азота): аллель 4a и генотип 4a/4a достоверно чаще встречались в группе пациентов «ХБП+», оказывая предрасполагающее влияние на риск развития ХБП: OR=2,26, ДИ 95% 1,45–3,54; OR=9,88, ДИ 95% 2,05–47,72 соответственно, аллель 4b и генотип 4b/4b, напротив, имели протективное значение: OR=0,44, ДИ 95% 0,29–0,69; OR=0,45, ДИ 95% 0,26–0,77 соответственно (табл. 3).

Мы также провели анализ распределения генотипов маркера *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* в зависимости от уровня альбуминурии. Данные представлены на рис. 1. Достоверной ассоциации выявлено не было, что может указывать на различные генетические детерминанты основных клинических маркеров патологии почек — альбуминурии и СКФ.

Маркер *I/D* гена *APOB* (аполипопротеина В): частота носительства генотипа DD гена APOB у пациентов с ХБП была достоверно ниже: 2,7% vs 12%, $p=0,02$. При использовании доминантной модели наследования установлено, что носительство генотипа DD гена APOB имеет протективное значение (OR=0,20, ДИ 95% 0,05–0,88), при этом в отсутствие данного генотипа риск развития ХБП повышается в 5 раз по сравнению с носителями генотипа DD (уровень значимости $p=0,02$, OR=5,0, ДИ 95% 1,14–21,98). Данные представлены в табл. 3.

Маркер *rs12255372* гена *TCF7L2*: частота аллеля T и генотипа T/T была выше у пациентов с ХБП. При анализе рецессивной модели наследования генотип T/T предрасполагает к развитию ХБП с уровнем значимости $p=0,03$, OR=3,03, ДИ 95% 1,07–8,58, и напротив, носительство любого из генотипов G/G или G/T снижает вероятность развития осложнения OR=0,33, ДИ 95% = 0,12–0,94. Данные представлены в табл. 4.

Маркер *rs5219* гена *KCNJ11*: аллель A достоверно чаще встречался у пациентов с ХБП, аллель G — в группе без ХБП. Установлена достоверная ассоциация этого маркера с развитием ХБП, уровень значимости $p=0,03$. Аллель A пред-

Таблица 3

Распределение аллелей и генотипов маркеров *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* и *I/D* гена *APOB* у пациентов с наличием и отсутствием ХБП

Аллели/генотипы	ХБП+ (n=78)	ХБП- (n=175)	χ^2	p	OR	95% CI
ecNOS4a/4b						
Мультипликативная модель наследования						
Аллель 4a	47 (30,1%)	56 (16%)	12,43 (df=1)	0,0004	2,26	1,45 – 3,54
Аллель 4b	109 (69,9%)	294 (84%)			0,44	0,29–0,69
Общая модель наследования						
4a/4a	8 (10,3%)	2 (1,1%)	16,1 (df=2)	0,00032	9,88	2,05–47,72
4a/4b	31 (39,7%)	52 (29,7%)			1,56	0,89–2,72
4b/4b	39 (50%)	121 (69,2%)			0,45	0,26–0,77
APOB I/D						
Мультипликативная модель наследования						
Аллель I	113 (62,4%)	239 (68,3%)	0,69 (df=1)	0,41	1,22	(0,8–1,85)
Аллель D	43 (27,6%)	111 (31,7%)			0,82	(0,54–1,24)
Доминантная модель наследования						
II+ID	76 (47,4%)	154 (48,6%)	5,48 (df=1)	0,02	5,00	(1,14–21,98)
DD	2 (2,7%)	21 (12%)			0,20	(0,05–0,88)

Таблица 4

Распределение аллелей и генотипов маркеров генов *TCF7L2* и *KCNJ11* у пациентов с наличием и отсутствием ХБП

Аллели/генотипы	ХБП+ (n=38)	ХБП– (n=144)	χ^2	p	OR	95% CI
TCF7L2	Мультипликативная модель наследования					
Аллель G	16 (43,4%)	72 (50%)	1,04 (df = 1)	0,31	0,77	0,46–1,28
Аллель T	22 (56,6%)	72 (50%)			1,30	0,78–2,17
Рецессивная модель наследования						
GG+GT	31 (81,6%)	134 (93,1%)	4,68 (df=1)	0,03	0,33	0,12–0,94
TT	7 (18,4%)	10 (6,9%)			3,03	1,07–8,58
KCNJ11	Мультипликативная модель наследования					
Аллель A	23 (59,2%)	65 (45,5%)	4,54 (df = 1)	0,03	1,74	(1,04–2,91)
Аллель G	15 (40,8%)	79 (54,5%)			0,82	(0,34–0,96)
Рецессивная модель наследования						
AA	13 (34,2%)	27 (18,8%)	4,19 (df = 1)	0,04	2,25	(1,02–4,97)
AG+GG	25 (65,8%)	117 (81,3%)			0,44	(0,20–0,98)

располагает к развитию ХБП: OR=1,74, ДИ 95% 1,04–2,91, аллель G защищает OR=0,57 (95% ДИ 0,34–0,96). При анализе рецессивной модели наследования с уровнем значимости $p=0,04$, $\chi^2=4,19$ генотип A/A повышает риск развития ХБП OR=2,25, ДИ 95% 1,02–4,97, носительство любого из генотипов A/G или G/G защищает от ХБП OR=0,44, ДИ 95% 0,2–0,98. Данные представлены в табл. 4.

Статистически достоверной ассоциации маркеров других исследованных генов: *ACE* (гена ангиотензинпревращающего фермента), *APOE* (гена аполипопротеина E), *PPARG2* (гена рецептора активатора пролифератора пероксисом), *SLC30A8* (гена белка-транспортера цинка типа 8) с развитием ХБП при СД2 в нашем исследовании не получено.

Мы также оценили частоту развития ХБП у пациентов с различным набором генотипов риска исследованных генов. Данные представлены на рисунке 2.

Для группы 1 (n=253) генотипы риска это: *NOS* – 4a/4a, *APOB* – I/I или I/D, *APOE* e3/e3, *ACE* – D/D (последние 2 гена, не показавшие достоверной ассоциации в нашем исследовании, – по данным литературы). Так, у пациентов с отсутствием генотипов риска ХБП развилась только у 4 пациентов, в пересчете на риски: OR=0,23, у пациентов с одним генотипом риска частота ХБП составила 25%,

OR=0,77, с двумя генотипами риска – 19,4%, OR=0,47, с тремя – 35,4%, OR=1,62, и у пациентов с полным набором четырех генотипов риск ХБП был максимальным – 44%, OR=2,13. При распределении пациентов из 2-й группы (n=182) была получена аналогичная тенденция: при отсутствии генотипов риска генов *TCF7L2* и *KCNJ11* частота развития ХБП составила 17%, OR=0,35, у пациентов с одним генотипом риска – 31%, OR=2,04 и при наличии двух генотипов риск ХБП возрастал более чем в 13 раз – 67%, OR=13,81

Обсуждение

Работы, посвященные изучению генетических маркеров патологии почек у пациентов с СД2, немногочисленны и очень противоречивы. И связано это не столько с разнородностью этнических групп или межпопуляционными различиями результатов исследований. В первую очередь, само определение поражения почек у пациентов с СД2 вызывает значительные сложности. В условиях многофакторности поражения органов-мишеней при СД2, значительной частоты сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, АГ, мочевого инфекции, широкого использования средств, блокирующих ренин-ангиотензиновую систему (РАС),

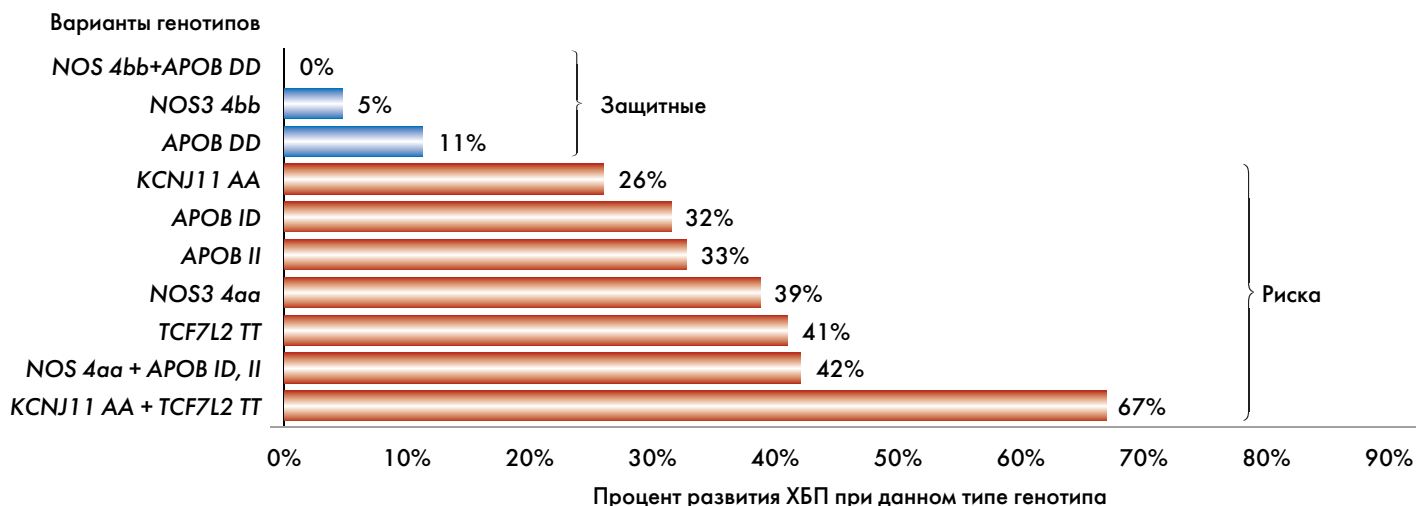


Рис. 2. Частота развития ХБП у пациентов с генотипами риска и «защитными» генотипами генов *NOS3*, *APOB*, *TCF7L2* и *KCNJ11*.

что значительно влияет на оценку экскреции белка, выделение классической ДН крайне затруднительно. В этой связи использование классификации ХБП в качестве основного критерия формирования групп сравнения представляется нам наиболее оптимальным выбором.

На чем основано влияние полиморфизма генов на развитие той или иной патологии и, соответственно, возможность изучения и оценки рисков? Полиморфный маркер гена представляет собой вариативный участок ДНК, носительство определенного варианта которого вызывает изменение продукта экспрессии гена (активность фермента или белка-транспортера), что, в свою очередь, непосредственно или, чаще всего, опосредованно, изменяет некий фенотипический признак. Однако наличие аллеля или генотипа риска *per se* не приводит к развитию заболевания, только при определенной комбинации аллелей и генотипов генетическая предрасположенность может реализоваться в фенотип патологии под воздействием патологических средовых факторов. Поскольку вклад одного гена может быть ничтожно мал, наибольшие перспективы в изучении генетических факторов представляет комплексный полигенный подход. Как правило, в исследование включаются полиморфные маркеры тех генов, которые кодируют модуляторы изучаемой патологии, известные на основе патогенеза заболевания.

В нашем исследовании достоверную ассоциацию с развитием ХБП показали маркеры генов, кодирующих ключевые медиаторы повреждения почек: факторы эндотелия (ген *NOS3*), факторы липидного обмена (ген *APOB*), факторы секреции инсулина (*KCNJ11*, *TCF7L2*).

Традиционно в патогенезе патологии почек при СД важнейшую роль отводят эндотелиальной дисфункции, ведущей к гиперактивации РАС и нарушению продукции вазопротективных факторов. Синтез основного вазопротективного фактора эндотелия — оксида азота (NO) обеспечивает фермент NO-синтетаза. Влияние варианта *4a* связано с нарушением экспрессии гена *NOS3*, что приводит к уменьшению выработки NO. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы: установлена ассоциация маркера *ecNOS4a/4b* гена *NOS* с развитием ХБП [6], с прогрессированием до терминальной стадии поражения почек, требующей проведения заместительной почечной терапии, OR=1,74, и с ДН у пациентов с СД2, OR=2,03 [7]. Для данного полиморфизма также описана ассоциация с различной сердечно-сосудистой патологией: атеросклерозом, ИБС, инфарктом миокарда (ИМ) и АГ при СД 2 [8].

Наиболее изученным геном, кодирующим вазоактивные факторы эндотелия, является *ACE*, полиморфизм типа вставка/отсутствие вставки (*I/D*, insertion/deletion). Данный полиморфизм связан с уровнем ангиотензинпревращающего фермента и, соответственно, регулирует продукцию ангиотензина II — ключевого фактора развития и прогрессирования гломерулосклероза. К настоящему времени накоплено множество данных о наличии ассоциации *I/D* полиморфизма *ACE* с сосудистыми осложнениями СД: ДН, ИБС и инфарктом миокарда. По данным метаанализа, включившего исследования за 10-летний период и 14727 пациентов с СД, генотип *DD* гена *ACE* является независимым

фактором риска развития ДН при СД1 и СД2 [9]. В нашей работе статистически значимых различий между группами ХБП при СД2 выявлено не было, в отличие от проведенного нами ранее исследования, где полиморфизм *I/D* гена *ACE* показал сильную связь с развитием ДН при СД1 [10]. Это может быть обусловлено как недостаточной выборкой для проявления ассоциации при СД2, так и принципиально разным подходом к формированию групп сравнения, основанным на оценке экскреции белка — при СД1 и скорости фильтрации — при СД2. Возможно, основные клинические маркеры патологии почек — альбуминурия и СКФ, вследствие различных механизмов регуляции, могут иметь и различные генетические детерминанты.

Ген *APOB* кодирует аполипопротеин В — структурный апобелок основных атерогенных фракций липидов — хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), который является лигандом для рецепторов ЛПНП, опосредуя поступление холестерина внутрь клетки. В литературе широко обсуждается роль дислипидемии в качестве предиктора прогрессирования патологии почек [11]. Центральная роль, которую аполипопротеин В (*apoB*) играет в транспорте липидов, позволяет предположить, что носительство определенных аллельных вариантов гена *APOB* может быть одной из причин, определяющих индивидуальные различия в уровне липидов. Мы исследовали *I/D* полиморфизм сигнального пептида, связанный с делецией трех кодонов Лей-Ала-Лей в положении -14/-16. Изменения структуры сигнального пептида могут влиять на способность транспорта *apoB* через мембраны, тем самым повышая атерогенные свойства крови. Процессы гломеруло- и атеросклероза имеют общие механизмы развития. Для аллеля *D*, показавшего достоверную ассоциацию с ХБП в нашем исследовании, обнаружена ассоциация с развитием атеросклероза [12].

Ген *APOE* кодирует аполипопротеин Е, который также играет важную роль в метаболизме липидов. Его основная функция — транспорт холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания. Аполипопротеин Е существует в трех изоформах: Е2, Е3 и Е4, которые кодируются одним геном (*APOE*). В проведенном нами ранее исследовании была выявлена ассоциация полиморфного маркера $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *APOE* с развитием ДН при СД1 [13]. В зарубежных работах описана ассоциация данного маркера с развитием ДН при СД2 [14]. В нашей работе при СД2 значимой ассоциации с развитием ХБП установить не удалось. Вследствие наличия трех изоформ, данный маркер наиболее сложен в техническом выполнении, что требует значительного увеличения выборки для выявления статистически значимых различий.

Однако наибольший интерес из полученных результатов, на наш взгляд, представляют маркеры генов, которые традиционно не связывались с патогенезом ХБП — *KCNJ11* и *TCF7L2*.

Продукт гена *KCNJ11* — белок Kir6.2 — является одной из двух субъединиц АТФ-зависимых калиевых каналов, регулирующих секрецию инсулина путем изменения потенциала клеточной мембраны. Полиморфный маркер *rs5219*

гена *KCNJ11* ассоциирован с различными фенотипами нарушений углеводного обмена: от гиперинсулинемии и неонатального диабета до снижения секреции инсулина при СД2. Влияние данного полиморфизма на риск развития сосудистых осложнений, в том числе, ХБП, активно обсуждается в связи с тем, что данный тип калиевых каналов обнаружен не только в β -клетках, но также в стенке сосудов [15]. Мутации в гене *KCNJ11* приводят к структурной модификации белка Kir6.2, что возможно, определяет индивидуальные различия в степени восприимчивости к патологическим эффектам гипергликемии.

Ген *TCF7L2* кодирует транскрипционный фактор 7, подобный фактору 2, который является сигнальным белком передачи информации в клетке. *TCF7L2* может оказывать влияние на пролиферацию и дифференцировку β -клеток, и, что крайне важно, участвует в транскрипции гена проглюкагона, увеличивая продукцию глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1). Традиционно *TCF7L2* ассоциировали с развитием ожирения и маркерами воспаления. Позднее два однонуклеотидных полиморфизма — *rs12255372* и *rs7903146* гена *TCF7L2* показали сильную ассоциацию с развитием СД2 [16]. Гипергликемия и воспаление являются ключевыми в патогенезе сосудистых осложнений и поражения почек при СД. Кроме того, нарушение секреции ГПП-1 в настоящее время рассматривается не только как фактор развития СД, но и наиболее перспективный предиктор и терапевтический субстрат поражения почек при СД [17]. Ассоциация гена *TCF7L2* с ХБП показана на японской популяции [18]. Также хотелось бы отметить исследование, в котором изучали связь 18 генетических маркеров СД2 с развитием нефропатии, показавшее ассоциацию маркеров генов *KCNJ11* и *TCF7L2* с низким уровнем СКФ, но не с альбуминурией [19], что подтверждает нашу гипотезу о различных генетических детерминантах клинических маркеров ХБП.

Для ряда классических генов-кандидатов поражения почек (*ACE*, *NOS3*) показана сочетанная генетическая предрасположенность к развитию СД, что может свидетельствовать об общих патогенетических механизмах развития СД и его осложнений. Поэтому мы включили в поиск генетической предрасположенности к ХБП гены *PPARG2* и *SLC30A8*.

Ген *PPARG2* кодирует ядерный рецептор, посредством которого регулируется синтез жирных кислот, TNF- α , резистина, адипонектина, факторов адипогенеза. Комплекс PPAR γ с ретиноидным X рецептором (RXR) связывается с PPAR-связывающими структурными элементами в промоторных областях генов-мишеней, регулируя их экспрессию. Мутации в гене *PPARG* являются причиной PPAR γ лиганд-резистентного синдрома, который проявляется комплексом клинических симптомов: инсулинорезистент-

ности, дислипидемии, гипертензии, увеличения массы тела и нарушения гомеостаза глюкозы. Показана ассоциация полиморфизма гена *PPARG2* с СД2 [20]. В нашем исследовании ассоциации гена с риском ХБП получено не было.

Продуктом гена *SLC30A8* является белок-транспортёр цинка типа 8 (ZnT-8), который регулирует концентрацию ионов цинка в β -клетках, необходимых для секреции инсулина. Цинк играет важную роль в регуляции созревания, хранения и секреции инсулина β -клетками. Вовлеченность гена *SLC30A8* в развитие СД2 показана в нескольких крупномасштабных исследованиях [20]. К сожалению, выявить ассоциацию гена с риском ХБП нам не удалось.

При подсчете отношения шансов развития ХБП было выявлено, что риск развития ХБП зависел от количества генотипов риска: при отсутствии генотипов риска (носительстве только защитных вариантов) — относительный риск ХБП был минимальным: OR=0,23 и 0,35 в 1-й и 2-й группе соответственно и прогрессивно возрастал по мере увеличения количества генотипов риска до OR=2,13 и 13,8. Безусловно, для построения шкал риска ХБП данных недостаточно — необходимы исследования на большей выборке пациентов. Тем не менее, результаты нашей работы еще раз подтверждают полигенный характер развития ХБП.

Заключение

В результате исследования установлено, что развитие ХБП при СД2 генетически детерминировано. Выявлена достоверная ассоциация риска ХБП с генами, кодирующими факторы эндотелия (*NOS3*), факторы липидного обмена (*APOB*) и факторы секреции инсулина (*KCNJ11*, *TCF7L2*), продукты экспрессии которых участвуют в основных патогенетических механизмах поражения почек при СД. При комплексном анализе изученных маркеров определяющее значение имело накопление генотипов риска: при наличии только защитных генотипов риск ХБП был очень низким и прогрессивно повышался при накоплении генотипов риска, что позволяет предложить использовать данную панель полиморфных маркеров в качестве генетического диагностикума с целью прогнозирования ХБП и формирования групп риска развития патологии на доклиническом этапе.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов в связи с написанием данной статьи.

Исследование проведено в рамках НИР при поддержке ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

Список литературы

- | | |
|--|--|
| 1. Маслова ОВ, Сунцов ЮИ, Шестакова МВ, Казаков ИВ, Викулова ОК, Сухарева ОЮ, и др. Распространенность поражения почек при сахарном диабете 1 и 2 типов в Российской Федерации. Сахарный диабет. 2009;(4):47–51. [Maslova OV, | Suntsov YI, Shestakova MV, Kazakov IV, Vikulova OK, Sukhareva OY, et al. Prevalence of renal lesions in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus in the Russian Federation. Diabetes mellitus. 2009;(4):47–51.] doi: 10.14341/2072-0351-5704 |
|--|--|

2. Шестакова МВ, Дедов ИИ. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек. Москва; 2009. [Shestakova MV, Dedov II. Diabetes mellitus and Chronic kidney disease. Moscow; 2009.]
3. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements. 2013;3(1):1–150. Available from: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
4. Fogarty DG, Rich SS, Hanna L, Warram JH, Krolewski AS. Urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes is heritable and genetically correlated to blood pressure. *Kidney Int.* 2000;57(1):250–257. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00833.x
5. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1989;320(18):1161–1165. doi: 10.1056/NEJM198905043201801
6. Zeng Z, Li L, Zhang Z, Li Y, Wei Z, Huang K, et al. A meta-analysis of three polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and their effect on the risk of diabetic nephropathy. *Hum Genet.* 2010;127(4):373–381. doi: 10.1007/s00439-009-0783-x
7. Ma Z-J, Chen R, Ren H-Z, Guo X, Chen JG, Chen L-M. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4b/a polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Meta Gene.* 2014;2:50–62. doi: 10.1016/j.mgene.2013.10.015
8. Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(7):372–379. doi: 10.1007/s001090000124
9. Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia.* 2005;48(5):1008–1016. doi: 10.1007/s00125-005-1726-2
10. Shestakova MV, Vikulova OK, Gorashko NM, Voronko OE, Babunova NB, Nosikov VV, et al. The relationship between genetic and haemodynamic factors in diabetic nephropathy (DN): Case-control study in type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 74(2):S41–50. doi: 10.1016/j.diabres.2006.06.013
11. Tolonen N, Forsblom C, Thorn L, Wadén J, Rosengård-Bärlund M, Saraheimo M, et al. Lipid abnormalities predict progression of renal disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(12):2522–2530. doi: 10.1007/s00125-009-1541-2
12. Hixson JE, McMahan CA, McGill HC Jr, Strong JP. Apo B insertion/deletion polymorphisms are associated with atherosclerosis in young black but not young white males. *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Arterioscler Thromb.* 1992;12(9):1023–1029. doi: 10.1161/01.ATV.12.9.1023
13. Видулова ОК. Клинико-лабораторные и генетические факторы развития и прогрессирования диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 1 типа. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Москва; 2003. [Vikulova OK. Kliniko-laboratornye i geneticheskie faktory razvitiya i progressirovaniya diabetichey nefropatii u bol'nykh sakharnym diabedom 1 tipa [dissertation]. Moscow; 2003]
14. Araki S, Koya D, Makiishi T, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R, et al. APOE polymorphism and the progression of diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes: results of a prospective observational follow-up study. *Diabetes Care.* 2003;26(8):2416–2420. doi: 10.2337/diacare.26.8.2416
15. Yoshida H, Feig JE, Morrissey A, Ghiu IA, Artman M, Coetzee WA. K ATP channels of primary human coronary artery endothelial cells consist of a heteromultimeric complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B subunits. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(4):857–869. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.022
16. Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol.* 2008;22(11):2383–2392. doi: 10.1210/me.2008-0135
17. Fujita H, Morii T, Fujishima H, Sato T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.* 2014;85(3):579–589. doi: 10.1038/ki.2013.427
18. Maeda S, Osawa N, Hayashi T, Tsukada S, Kobayashi M, Kikkawa R. Genetic variations associated with diabetic nephropathy and type II diabetes in a Japanese population. *Kidney Int Suppl.* 2007;(106):S43–48. doi: 10.1038/sj.ki.5002385
19. Franceschini N, Shara NM, Wang H, Voruganti VS, Laston S, Haack K, et al. The association of genetic variants of type 2 diabetes with kidney function. *Kidney Int.* 2012;82(2):220–225. doi: 10.1038/ki.2012.107
20. Hu C, Zhang R, Wang C, Wang J, Ma X, Lu J, et al. PPARG, KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A-CDKN2B, IDE-KIF11-HHEX, IGF2BP2 and SLC30A8 are associated with type 2 diabetes in a Chinese population. *PLoS One.* 2009;4(10):e7643. doi: 10.1371/journal.pone.0007643

Железнякова Анна Викторовна

аспирант, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация
E-mail: azhelez@gmail.com

Лебедева Надежда Олеговна
 Викулова Ольга Константиновна

аспирант, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация
 к.м.н., в.н.с. ФГБУ Эндокринологический научный центр; доц. кафедры эндокринологии и диабетологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

Носиков Валерий Вячеславович

д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики, РФ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва, Российская Федерация

Шамхалова Минара Шамхаловна

д.м.н., зав. отделением диабетической нефропатии и гемодиализа, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва, Российская Федерация

Шестакова Марина Владимировна

член-корр. РАН, директор Института диабета ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва; проф., зав. кафедры эндокринологии и диабетологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация