

На правах рукописи

ШЕСТАКОВ АЛЕКСЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ РЯДА ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ С
ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2006

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»).

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Носиков Валерий Вячеславович.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Савостьянов Кирилл Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Фаворова Ольга Олеговна

кандидат биологических наук
Бабенко Ольга Владимировна

Ведущая организация: Институт Молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН.

Защита состоится «21» декабря 2006г. в часов на заседании
Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-
исследовательском институте генетики и селекции промышленных
микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан « » ноября 2006.г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Заиграева Г.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Прогрессирование хронических заболеваний почек и поиск способов предотвращения их развития, а также замедления прогрессирования остается одной из наиболее актуальных проблем нефрологии.

В общей сложности, по данным крупных европейских медицинских центров, наследственные гломерулопатии занимают от 6,5 до 15% среди патологий, ведущих к хронической почечной недостаточности (ХПН). Связь той или иной патологии почек с генетическими дефектами может помочь выработать тактику терапии этих заболеваний.

Роль генетики в развитии нефрологии состоит не только в выявлении генетической компоненты заболевания, но и в изменении представлений о так называемых приобретенных заболеваниях, появлении новых концепций механизмов развития болезни, дополнении информации о предохраняющих и предрасполагающих факторах в развитии заболеваний, а также формировании гипотезы о совокупности экзогенных и эндогенных факторов, приводящих к болезни.

Для многофакторных заболеваний характерен сложный механизм формирования фенотипа, в основе которого лежит взаимодействие генетических факторов с факторами внешней среды. Однако для каждого конкретного заболевания можно выделить группу, так называемых генов-кандидатов, продукты которых могут быть прямо или косвенно вовлечены в развитие данной патологии.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной молекулярной генетике заболеваний является поиск полиморфных маркеров в генах-кандидатах и выявление их ассоциации с наследственными заболеваниями.

При исследовании ассоциации сравнивают распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера, расположенного внутри или рядом с геном-кандидатом, в группах больных и здоровых доноров. Наличие достоверных различий в распределении аллелей и генотипов свидетельствует об ассоциации полиморфного маркера с заболеванием.

Установление ассоциации гена с заболеванием и последующая оценка индивидуального генетического риска имеют важное значение для разработки дифференцированного подхода к профилактике и лечению данной патологии и ее

осложнений в зависимости от наследственной предрасположенности конкретного больного.

Цель и задачи работы. Целью данной работы явилось изучение ассоциации ряда полиморфных маркеров генов-кандидатов с развитием хронического гломерулонефрита. Это были полиморфные маркеры внутри генов, кодирующих подоцин (*NPHS2*), нефрин (*NPHS1*), антагонист рецептора интерлейкина 1 (*IL1RN*), интерлейкин 4 (*IL4*), интерлейкин 13 (*IL13*), поверхностный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*), ген-супрессор опухолей (*TP53*), главный регулятор супрессора опухолей p53 (*MDM2*) и поли(ADP-рибозил)полимеразу (*ADPRT1*). Кроме того использовались микросателлитные маркеры *D6S2414* и *D6S1271*, расположенные рядом с генами *HLA* класса II.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов *NPHS2*, *NPHS1*, *IL1RN*, *IL4*, *IL13*, *CTLA4*, *TP53*, *MDM2* и *ADPRT1*, а также, полиморфных микросателлитов *D6S2414* и *D6S1271* в группе больных ХГН и в группе здоровых доноров.

2. Провести сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров, расположенных в вышеуказанных генах-кандидатах, и двух полиморфных микросателлитов в области *HLA* в исследованных выборках для выявления их ассоциации с развитием ХГН и определения вклада данных генов в наследственную предрасположенность к патологии.

Научная новизна работы. В этой работе впервые в мире исследована ассоциация полиморфных маркеров *A(-601)G* и *Arg229Gly* гена *NPHS2*, *Glu117Lys* гена *NPHS1*, *VNTR* во втором интроне гена *IL1RN*, *C(-590)T* гена *IL4*, *G4257A* гена *IL13*, *Ala177Thr* гена *CTLA4*, *Pro72Arg* гена *TP53*, *G(-309)T* гена *MDM2*, *Val762Ala* и *Leu54Phe* гена *ADPRT1*, полиморфных микросателлитов *D6S2414* и *D6S1271* у русских пациентов с ХГН, проживающих в г. Москве.

Практическая ценность работы. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров различных генов-кандидатов, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического гломерулонефрита, создает базу для разработки диагностических методов прогнозирования течения заболевания.

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП «ГосНИИ Генетика» 25 Октября 2006 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, включая 3 статьи, а также тезисы докладов и сообщений на конференциях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 94 страницах машинописного текста и содержат 16 таблиц и 11 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Формирование группы больных с хроническим гломерулонефритом и методы исследования.

Общеклиническое обследование и формирование выборки больных, проводилось в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева ММА им. И. М. Сеченова, в Детской Городской больнице №13 им. Н.Ф. Филатова, а также в Научном Центре Здоровья Детей РАМН.

Морфологическое исследование ткани почки, полученной с помощью чрезкожной биопсии, проводилось на кафедре патологической анатомии ММА им. И. М. Сеченова. При определении морфологического варианта ХГН использовали классификацию В. В. Серова (1977 г.).

Обследовано 370 человек: 290 больных ХГН и 80 человек без заболеваний почек и артериальной гипертензии, составивших контрольную группу. Оценка клинических особенностей ХГН проводилась у больных на основании данных анамнеза. Она включала анализ дебюта ХГН, клинических и морфологических вариантов нефрита с характеристикой лабораторных показателей на момент первого обследования и на момент биопсии почки, а также анализ течения ХГН.

Анализ нуклеотидных последовательностей интересующих нас хромосомных областей осуществляли с помощью системы NCBI в сети Интернет (www.ncbi.nlm.nih.gov), используя при этом следующие разделы: MapView (расположение этих полиморфных маркеров на хромосоме), dbSNP (информация об однонуклеотидных полиморфизмах). Для подбора праймеров и рестриктаз использовали пакеты программ DNAS_tar и VectorNTI 9.0.

Идентификация аллелей полиморфных маркеров проводилась с использованием полимеразной цепной реакции, дальнейшего расщепления фрагментов ДНК рестриктазами и электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 8-12%-ном полиакриламидном геле или в 2-3% -ном агарозном геле.

2. Изучение ассоциации полиморфных маркеров A(-601)G и Arg229Gly гена *NPHS2* с ХГН.

Интегральный мембранный белок подоцин с молекулярной массой 42 кДа относится к стоматиновому протеиновому семейству и на 47% гомологичен стоматину человека. В основном подоцин экспрессируется в гломерулярных подоцитах и в меньшей степени - в яичках, фетальных тканях сердца и печени (Boute et al, 2000). Подоцин, подобно «шпильке», замыкает нефрин в подоцитах и тем самым входит в единую структуру щелевой диафрагмы (ЩД) (Roselli et al, 2002), а также связан с липидными мостиками последней (Schwarz et al, 2001). Роль подоцина в формировании гломерулопатий стало возможным изучить после идентификации гена, кодирующего этот белок. Ген подоцина (*NPHS2*) расположен в хромосомной области 1q25-q31 (Huber et al, 2003). В пятом экзоне гена *NPHS2* расположен однонуклеотидный полиморфизм A/G, в положении 755 от точки начала транскрипции, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков Arg/Gly в положении 229.

По данным Перейры и соавторов (2004) носительство гетерозиготного генотипа *Arg229Gly* коррелирует с микроальбуминурией у людей, не имеющих заболеваний почек (Pereira et al, 2004). В ряде случаев спорадически возникший ФСГС во взрослом состоянии был ассоциирован с носительством гетерозиготного генотипа *Arg/Gly*. Считается, что у этих людей достаточно полно сохранена функция подоцина в детском возрасте, но в дальнейшем она утрачивается, приводя к развитию нефротического синдрома.

В группах ХГН и здоровых доноров частота аллеля *Gly* резко преобладала над частотой аллеля *Arg*. Наиболее распространенным генотипом в обеих группах были гомозиготы *Gly/Gly* (0,87 и 0,89 в группе больных хроническим гломерулонефритом и здоровых доноров, соответственно). Гомозиготы *Arg/Arg* не наблюдались ни в группе ХГН, ни в группе здоровых доноров. В группе больных с ХГН было отмечено незначительное увеличение содержания гетерозигот *Arg/Gly*, однако оно носило недостоверный характер (табл. 1).

Таблица 1.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg229Gly* гена *NPHS2* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель <i>Arg</i>	0,065	0,053	НД
Аллель <i>Gly</i>	0,935	0,947	НД
Генотип <i>Arg/Arg</i>	-	-	-
Генотип <i>Arg/Gly</i>	0,130	0,105	НД
Генотип <i>Gly/Gly</i>	0,870	0,895	НД

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии ассоциации полиморфного маркера *Arg229Gly* гена *NPHS2* с развитием ХГН.

Второй полиморфный маркер расположен в промоторном участке гена *NPHS2* и также представляет собой однонуклеотидный полиморфизм *A/G* в положении -601 п.н. от участка инициации транскрипции. В обеих группах отмечено преобладание содержания аллеля *G*, при этом наиболее частыми генотипами являлись: в группе больных гомозиготные генотипы *G/G*, а в группе контроля гетерозиготные генотипы *A/G* (0,47 и 0,59 в группах ХГН и здоровых доноров, соответственно). Гомозиготные генотипы *A/A* наблюдались крайне редко – их доля в выборке больных и здоровых доноров составляла 0,10 и 0,09, соответственно (табл. 2).

Таблица 2.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *A(-601)G* гена *NPHS2* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>CI</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель <i>A</i>	0,31	0,39	НД	-	-
Аллель <i>G</i>	0,68	0,60	НД	-	-
Генотип <i>A/A</i>	0,10	0,09	НД	-	-
Генотип <i>A/G</i>	0,41	0,59	0,019	0,49	0,27-0,88
Генотип <i>G/G</i>	0,47	0,31	0,027	1,99	1,09-3,63

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов выявил как снижение доли генотипа *A/G*, так и возрастание содержания гомозигот *G/G* в группе больных по сравнению с контрольной группой. Эти различия статистически достоверны и свидетельствуют об ассоциации данного полиморфного маркера с хроническим гломерулонефритом. При этом носительство гетерозиготного генотипа *A/G* связано с устойчивостью к развитию ХГН (*OR* = 0,49; *CI* 0,27 – 0,88), тогда как гомозиготность по аллелю *G* повышает риск развития патологии (*OR* = 1,99; *CI* 1,09-3,63).

3. Изучение ассоциации полиморфного маркера *Glu117Lys* гена *NPHS1* с ХГН.

Нефрин является основным белком щелевой диафрагмы (ЩД), он связывает два рядом расположенных подоцита (Holzman et al, 1999). Обнаружение нефрина в составе ЩД дало новое понимание клубочкового фильтра и роли ЩД как заключительного фильтрационного барьера для прохождения белка (Kestila et al, 1998).

Нефрин – это трансмембранный белок, который относится к суперсемейству иммуноглобулинов с адгезивными функциями. Он состоит из 1241 аминокислотного остатка и его молекулярная масса составляет 185 кДа (Lenkkeri et al, 1999). Доказательством важной роли нефрина в клубочковой фильтрации служат исследования, проведенные на крысах. Инъекция моноклональных антинефриновых антител, приводила к развитию протеинурии (Oikasa et al, 1988). Эти данные подтверждают значимость нефрина как обязательного компонента щелевой мембраны, формирующей фильтрационный барьер гломерул (Tryggvason et al, 1999). Нарушения в структуре как самого нефрина, так и ассоциированного с ним белкового комплекса приводят к изменениям архитектоники подоцита - сглаживанию «ножек» и протеинурии (Boute et al, 2000). В 1998 г. Кестила и соавт. обнаружили, что ген *NPHS1*, расположенный на хромосоме 19, ответственен за развитие врожденного нефротического синдрома финского типа (Kestila et al, 1998). Ген *NPHS1* содержит 29 экзонов. В финской популяции обнаружены две мутации: делеция в экзоне 2 и нонсенс-мутация в экзоне 26. Обе мутации приводят к нарушению синтеза нефрина.

В экзоне 3 гена *NPHS1* (положение 349) расположен однонуклеотидный полиморфизм *A/G*, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков *Glu/Lys* в положении 117. Ланденкари и соавт. обнаружили, что этот полиморфный маркер (*G349A*) ассоциирован как с той формой ХГН, что поддается терапии стероидами при минимальных изменениях нефротического

синдрома (форма зависимая от стероидов), так и с другой формой ХГН, при которой стероиды не эффективны (форма устойчивая к действию стероидов) (Landenkari et al, 2004).

Таблица 3.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Glu117Lys* гена *NPHS1* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		p
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель <i>Lys</i>	0,35	0,39	НД
Аллель <i>Glu</i>	0,65	0,61	НД
Генотип <i>Lys/Lys</i>	0,11	0,14	НД
Генотип <i>Lys/Glu</i>	0,47	0,51	НД
Генотип <i>Glu/Glu</i>	0,41	0,35	НД

В группах ХГН и здоровых доноров частота аллеля *Glu* резко преобладала над частотой аллеля *Lys*, также как и встречаемость гомозигот *Glu/Glu* - над встречаемостью генотипа *Lys/Lys* (табл. 3). При этом различия в распределении аллелей и генотипов между двумя группами были незначительными и носили недостоверный характер.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии ассоциации полиморфного маркера *Glu117Lys* гена *NPHS1* с развитием хронического гломерулонефрита. Возможно, отсутствие корреляции между нашими данными, и данными, полученными Ланденкари с соавт. (Landenkari et al, 2004), связано с различиями в формировании группы больных.

4. Изучение ассоциации полиморфного минисателлита, расположенного в интроне 2 гена *IL1RN*, с ХГН.

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. В первую очередь они регулируют развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, соединительной ткани и клеток эпителия. Гиперпродукция цитокинов ведет к развитию системной воспалительной реакции и может служить причиной развития ряда патологических состояний, в частности, гломерулонефрита. Экспрессия генов

цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение или повреждение тканей. Согласно данным последних лет, полиморфизм генов, кодирующих цитокины, оказывает существенное влияние на предрасположенность к гломерулонефриту и способу его лечения, в частности на цитокиновую и антицитокиновую терапию.

Антагонист рецептора интерлейкина-1 блокирует связывание интерлейкинов 1 α и 1 β (IL-1 α и IL-1 β) с рецептором. Ингибирующее действие антагониста имеет важное физиологическое значение в организации иммунного ответа и в развитии воспалительного процесса при различных патологиях. Ген *IL1RN* картирован в хромосомной области 2q14.2 (Patterson et al, 1993). Его продуктами являются две изоформы антагониста, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Одна из них остается в цитоплазме, а другая секретируется наружу. Секреция антагониста осуществляется гепатоцитами, регулируется цитокинами на стадиях, предшествующих воспалительной реакции и происходит во время острой фазы воспалительного процесса (Gabay et al, 1997).

В интроне 2 гена *IL1RN* расположен VNTR, состоящий из tandemных повторов длиной 86 п.н. Минисателлит включает 5 аллелей, из которых наиболее распространены аллели с четырьмя (*IL1RN*4*) и двумя (*IL1RN*2*) повторами (Tarlow et al., 1993). При этом аллель *IL1RN*2* является маркером риска многих хронических заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом: язвы кишечника (Mansfield et al, 1994), системной красной волчанки (Иллариошкин и соавт., 1995), сепсиса (Fang et al, 1999) и других. Противоречивы данные о роли гена *IL1RN* в развитии таких аутоиммунных заболеваний как ревматоидный артрит (Tjernstrom et al, 1999) и базедова болезнь (Blakemore et al, 1995). Показана ассоциация аллеля *IL1RN*2* с повышенным риском поражения почек при СД типа 1 (Blakemore et al, 1996).

При анализе контрольной выборки (80 человек) было выявлено 3 аллеля длиной 240, 410 и 495 п.н. (табл. 5). В группе больных ХГН встречались 4 аллеля размером 240, 326, 412, 495 п.н. Наибольшими частотами в группах больных и контроля обладали аллели с 2 (0,273 и 0,290) и 4 (0,699 и 0,685) повторами соответственно.

Из 10 возможных генотипов нам удалось обнаружить 6. В группах больных и здоровых доноров преобладали гетерозиготные генотипы 2/4 (0,481 и 0,419) и гомозиготные генотипы 4/4 (0,435 и 0,468), соответственно (табл. 4).

Таблица 4.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного минисателлита в гене *IL1RN* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель 2	0,273	0,290	НД
Аллель 3	0,005	0,000	НД
Аллель 4	0,699	0,685	НД
Аллель 5	0,023	0,024	НД
Генотип 2/2	0,028	0,065	НД
Генотип 2/4	0,481	0,419	НД
Генотип 2/5	0,009	0,032	НД
Генотип 3/4	0,009	0,000	НД
Генотип 4/4	0,435	0,468	НД
Генотип 4/5	0,037	0,016	НД

Сравнительный анализ с использованием точного критерия Фишера не выявил достоверных различий в частотах аллелей и генотипов полиморфного минисателлита гена *IL1RN* между группой здоровых доноров и группой ХГН, следовательно, полиморфный минисателлит во втором интроне гена, *IL1RN*, не ассоциирован с хроническим гломерулонефритом.

5. Изучение ассоциации полиморфных маркеров *C(-590)T* гена *IL4* и *G4257A* гена *IL13* с ХГН.

В настоящее время установлено, что одной из возможных причин развития хронического гломерулонефрита является повышенный синтез интерлейкинов 4 и 13 (Laurent et al, 1987). При этом доказано, что при ХГН уровень экспрессии гена *IL13* выше уровня экспрессии гена *IL4* (Kimata et al, 1995). Оба эти цитокина играют важную роль в развитии атопических заболеваний и определяют высокую концентрацию IgE в крови. Высокая концентрация IgE и IgG₄ у больных выявлена во многих исследованиях и, по мнению Кимата и соавторов (Kimata et al, 1995), обусловлена повышенной экспрессией в Т-клетках интерлейкинов 4 и 13. Более того, обнаружены рецепторы к этим цитокинам на подоцитах. Выраженная экспрессия этих рецепторов при ХГН подтверждает роль последних в патогенезе данного заболевания.

В последнее десятилетие большое внимание уделяется изучению участков в промоторах, регулирующих экспрессию генов *IL4* и *IL13*. Предполагается, что ряд полиморфных маркеров этих генов ассоциирован с некоторыми атопическими заболеваниями и повышенной концентрацией IgE (Liu et al, 2003). При изучении полиморфных маркеров гена *IL4* и его рецептора Кобаяши и соавт. (Kobayashi et al, 2003) обнаружили ассоциацию аллеля С полиморфного маркера *C(-590)T* в промоторной области гена с нефротическим синдромом, чувствительным к действию стероидов. Ачэрья и соавт. (Acharya et al, 2005) изучая ассоциацию полиморфных маркеров генов *IL4* и *IL13* получили достоверное увеличение частоты встречаемости генотипа *TT* полиморфного маркера *C(-590)T* гена *IL4* и достоверное снижение частоты встречаемости генотипа *GG* полиморфного маркера *G4257A* гена *IL13* в группе детей с нефротическим синдромом с минимальными изменениями. Однако Пэрри и соавт. (Parry et al, 1999), не обнаружили никаких ассоциаций между полиморфными маркерами генов *IL4*, рецептора интерлейкина 4 и хроническим гломерулонефритом. Столь разноречивые данные обусловили необходимость нашего исследования по изучению ассоциации полиморфного маркера *C(-590)T* гена *IL4* и полиморфного маркера *G4257A* гена *IL13* с хроническим гломерулонефритом.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *C(-590)T* гена *IL4* статистически достоверных различий между двумя группами обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии ассоциации маркера с заболеванием (табл. 5.).

Таблица 5.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *C(-590)T* гена *IL4* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель С	0,31	0,26	НД
Аллель Т	0,69	0,74	НД
Генотип С/С	0,5	0,6	НД
Генотип С/Т	0,64	0,50	НД
Генотип Т/Т	0,31	0,44	НД

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного

маркера *G4257A* гена *IL13* было обнаружено как увеличение частоты встречаемости генотипа *AA*, так и уменьшение частоты встречаемости генотипа *AG* у больных ХГН по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 6.)

Таблица 6.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *G4257A* гена *IL13* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель <i>A</i>	0,84	0,75	НД	-	-
Аллель <i>G</i>	0,16	0,25	НД	-	-
Генотип <i>G/G</i>	0,9	0,6	НД	-	-
Генотип <i>A/G</i>	0,13	0,39	0,0011	0,18	0,06-0,53
Генотип <i>A/A</i>	0,78	0,55	0,0117	3,12	1,28-7,59

Данные различия являлись статистически достоверными, что свидетельствует об ассоциации полиморфного маркера *G4257A* гена *IL13* с ХГН. При этом носительство генотипа *AA* (*OR* = 3,12) предрасполагает к развитию заболевания, тогда как носительство генотипа *AG* (*OR* = 0,18), напротив связано с пониженным риском развития патологии.

6. Изучение ассоциации полиморфных микросателлитов *D6S2414* и *D6S1271*, расположенных в локусе *MHC* класса II с ХГН.

В настоящее время активно обсуждают значение генетических факторов в определении особенностей иммунного ответа на те или иные воздействия. В частности, особое внимание уделяют изучению роли полиморфных маркеров, расположенных среди генов главного комплекса гистосовместимости (*MHC*) класса II.

Гены локуса *MHC* класса II: *HLA-DQ*, *HLA-DR* и *HLA-DP* расположены в хромосомной области 6р21 и экспрессируются в клетках, представляющих антигены. Белковые продукты данных генов участвуют в связывании и экспонировании на поверхности макрофагов фрагментов различных антигенов. В дальнейшем с участием рецептора Т-клеток происходит распознавание антигенов и инициируется иммунный ответ (Levine et al, 1984).

Гены системы *HLA* вовлечены в развитие многих аутоиммунных болезней. Обнаружение непосредственного регулирующего влияния антигенов системы *HLA* на течение иммунного ответа при ХГН (Kitagava et al, 2005), а также

достоверно большей частоты выявления антигенов *HLA AW19*, *B8*, *B14*, *B41* у больных ХГН, позволяет обсуждать возможный вклад генов *MHC* класса II в возникновение заболевания и в определение особенностей его развития и течения.

На основании этих исследований можно предполагать, что область *HLA* вовлечена в развитие хронического гломерулонефрита. Для изучения ассоциации локуса *HLA* с ХГН мы использовали тетраплексные полиморфные маркеры, расположенные среди генов *MHC* класса II. Это микросателлитные маркеры *D6S2414* и *D6S1271*. Оба маркера состоят из повторов *GATA*. При сравнительном анализе распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *D6S2414* в группе больных ХГН и в группе здоровых доноров было обнаружено 6 аллелей размером от 164 до 184 п.н., включающих от 6 до 11 повторов (табл. 7).

У больных ХГН достоверно повышена частота аллеля 9 по сравнению с контрольной группой. Этот аллель обладает наибольшим значениям *OR* и, таким образом, ассоциирован с повышенным риском развития ХГН. В то же время, у больных достоверно снижено содержание аллеля 10, характеризующегося минимальными значениями *OR*, что свидетельствует о связи этого аллеля со сниженным риском развития патологии (табл. 7).

Таблица 7.

Распределение аллелей полиморфного маркера *D6S2414* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели	Частота аллелей		<i>p</i>	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель 6	0,008	0,018	НД	-	-
Аллель 7	0,025	0,018	НД	-	-
Аллель 8	0,223	0,259	НД	-	-
Аллель 9	0,541	0,420	0,0396	1,63	1,04-2,57
Аллель 10	0,157	0,241	0,0366	0,59	0,34-1,02
Аллель 11	0,045	0,045	НД	-	-

У больных ХГН и здоровых доноров удалось обнаружить 13 генотипов из 21 возможного. Наблюдаемое распределение генотипов подчиняется равновесию Харди-Вайнберга. Однако, достоверных различий в распределении генотипов локуса *D6S2414* не наблюдалось, что, возможно, связано с небольшим размером выборки по сравнению с большим количеством возможных генотипов (табл. 8)

Таблица 8.

Распределение частот генотипов полиморфного маркера *D6S2414* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Генотипы	Частота генотипов		<i>p</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Генотип 6/6	0,000	0,000	НД
Генотип 6/7	0,000	0,000	НД
Генотип 6/8	0,014	0,036	НД
Генотип 6/9	0,000	0,000	НД
Генотип 6/10	0,000	0,000	НД
Генотип 6/11	0,000	0,000	НД
Генотип 7/7	0,000	0,000	НД
Генотип 7/8	0,014	0,000	НД
Генотип 7/9	0,014	0,000	НД
Генотип 7/10	0,000	0,036	НД
Генотип 7/11	0,000	0,000	НД
Генотип 8/8	0,085	0,089	НД
Генотип 8/9	0,211	0,161	НД
Генотип 8/10	0,063	0,125	НД
Генотип 8/11	0,007	0,036	НД
Генотип 9/9	0,296	0,196	НД
Генотип 9/10	0,176	0,232	НД
Генотип 9/11	0,085	0,036	НД
Генотип 10/10	0,021	0,036	НД
Генотип 10/11	0,014	0,018	НД
Генотип 11/11	0,000	0,000	НД

При сравнительном анализе распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *D6S1271* найдено 4 аллеля размером от 184 до 196 п.н., причем аллель 12 длиной 192 п.н. встречался наиболее часто (таблица 9). Из 10 возможных вариантов генотипов обнаружили 5 (таблица 10). Наблюдаемое распределение генотипов хорошо подчинялось равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 9.

Распределение частот аллелей полиморфного маркера *D6S1271* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели	Частота аллелей		<i>p</i>	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель 10	0,074	0,019	0,018	4,12	1,19-14,3
Аллель 11	0,070	0,063	НД	-	-
Аллель 12	0,852	0,873	НД	-	-
Аллель 13	0,004	0,044	0,008	0,09	0,01-0,77

Обнаружены достоверные различия в частотах двух аллелей и двух генотипов. У больных было увеличено содержание аллеля 10 (табл. 9) и генотипа 10/12 (табл.10), тогда как доля аллеля 13 (табл. 9) и генотипа 12/13 (табл.10) существенно снижены. Таким образом, аллель 10 и генотип 10/12 связаны с повышенным риском развития ХГН, тогда как аллель 13 и генотип 12/13, напротив, со сниженным.

Таблица 10.

Распределение частот генотипов полиморфного маркера *D6S1271* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Генотипы	Частоты генотипов		<i>p</i>	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Генотип 10/10	0,009	0,000	НД	-	-
Генотип 10/12	0,130	0,038	0,042	3,80	1,06-13,6
Генотип 11/12	0,139	0,127	НД	-	-
Генотип 12/12	0,713	0,759	НД	-	-
Генотип 12/13	0,009	0,063	0,040	0,13	0,01-5,63

Таким образом, оба микросателлита (*D6S1271* и *D6S2414*) ассоциированы с хроническим гломерулонефритом в русской популяции. Поскольку данные микросателлиты расположены в хромосомной области занимаемой генами *HLA*,

то их ассоциация с ХГН косвенно свидетельствует о возможной вовлеченности данной области в развитие патологии.

К сожалению, нет данных о сцепленности конкретных аллелей маркеров *D6S2414* и *D6S1271* с генами *HLA*. В дальнейшем было бы интересно провести подобный анализ тех же больных непосредственно по генам *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* и *HLA-DRB1* с тем, чтобы определить как ассоциацию с заболеванием конкретными аллелями *HLA*, так и группы сцепления последних с определенными аллелями локусов *D6S1271* и *D6S2414*.

7. Изучение ассоциации полиморфного маркера *Ala17Thr* гена *CTLA4* с ХГН.

Продукт экспрессии гена *CTLA4* участвует в активации Т-клеток (Homann et al., 2006). Современная модель активации Т-клеток предполагает наличие двух сигналов (Kalergis et al, 2001). Первый специфический сигнал поступает в момент связывания комплекса *MHC* с антигеном, находящимся на поверхности клетки, представляющей антиген, с Т-клеточным рецептором (TCR), а второй, неспецифический сигнал поступает после соединения другого рецептора Т-клетки (CD28) с его лигандами В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86), также находящимися на поверхности клетки, представляющей антиген. Часто второй сигнал называют ко-стимулирующим. Если оба сигнала поступили, то имеет место активация Т-клетки, секреция цитокинов и дальнейшая пролиферация Т-клетки. Однако ситуация усложнилась после обнаружения другого рецептора (CTLA-4) с противоположным действием, связывающегося с теми же лигандами В7-1 и В7-2, но переводящего Т-клетку в состояние "безответности" к данному антигену, называемое анергией, за которой следует программируемая смерть Т-клетки (апоптоз) (Ostrov et al, 2000).

Последовательности рецепторов CTLA-4 и CD28 очень похожи. Нарушения в тонком взаимодействии этих белков с лигандами В7-1 и В7-2 могут являться одной из причин аутоиммунных заболеваний (Schwartz et al, 2001).

Ген *CTLA4* находится в хромосомной области 2q33 и состоит из 3-ех экзонов (Guzman et al., 2005). Первый экзон кодирует сигнальный пептид и внеклеточный белковый домен из 116 аминокислот. В этом экзоне в кодоне 17 расположен полиморфизм *Ala/Thr*, сцепленный со многими аутоиммунными заболеваниями (Ikegami et al., 2005). Последние исследования показали, что одни из важнейших локусов предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям лежат именно в области генов *HLA* (6p21) и *CTLA4* (2q31-q33) и примерно наполовину определяют генетическую предрасположенность к патологии (Vaidya et al, 1999). Таким

образом, с высокой степенью вероятности можно сделать вывод, что ген *CTLA4* не только вовлечен в развитие, но и связан с генетической предрасположенностью к хроническому гломерулонефриту, так как нами уже была обнаружена ассоциация с локусом *HLA*.

У пациентов с хроническим гломерулонефритом наблюдается возрастание частоты аллеля *Thr*, тогда как в выборке здоровых доноров преобладающим аллелем являлся аллель *Ala*. Наиболее распространенным генотипом были гетерозиготы *Ala/Thr*. Гомозиготы *Ala/Ala* наблюдались редко – их доля в выборке больных ХГН и в контрольной группе составляла 0,13 и 0,17 соответственно. В группе больных ХГН количество гомозигот *Thr/Thr* было в 6,5 раз больше, чем в группе здоровых доноров (0,26 и 0,04 соответственно).

Таблица 11.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Ala17Thr* гена *CTLA4* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		p	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель <i>Ala</i>	0,43	0,56	0,011	0,59	0,39-0,89
Аллель <i>Thr</i>	0,57	0,43	0,011	1,70	1,12-2,57
Генотип <i>Ala/Ala</i>	0,13	0,17	НД	-	-
Генотип <i>Ala/Thr</i>	0,60	0,80	0,010	0,41	0,21-0,80
Генотип <i>Thr/Thr</i>	0,26	0,04	0,000	8,69	2,55-29,5

Все различия, кроме тех, которые касались генотипа *Ala/Ala*, были достоверными (табл.11). Таким образом, из этих данных следует, что полиморфный маркер *Ala17Thr* гена *CTLA4* ассоциирован с развитием ХГН у русских жителей г. Москвы. При этом аллель *Thr* и гомозиготность по данному маркеру связаны с повышенным риском развития патологии ($OR = 1,70$ и $OR = 8,69$, соответственно), тогда как носительство аллеля *Ala* и гетерозигот *Ala/Thr* связано, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания ($OR = 0,59$ и $OR = 0,41$, соответственно).

8. Изучение ассоциации полиморфного маркера *Pro72Arg* гена *TP53* с ХГН.

Белок p53 играет важную роль в регуляции транскрипции и клеточного цикла, он вовлечен в процесс апоптоза, связан с поддержанием геномной стабильности,

взаимодействует со многими клеточными белками. Показано, что повреждение ДНК приводит к накоплению p53, который в свою очередь блокирует клеточный цикл в фазе G1, таким образом препятствуя репликации ДНК до репарации повреждения. Если повреждение нерепарируемо, p53 запускает механизм апоптоза. При стрессах и повреждениях клеток активность и содержание p53 в них повышается. Показано, что активация p53 может происходить на фоне окислительного клеточного стресса, вызванного NO. При различных стрессах и внутриклеточных повреждениях происходят пост-трансляционные модификации, в частности, фосфорилирование и ацетилирование определенных аминокислот молекулы p53, определяющие ее переход в так называемую стрессовую конформацию. Такой p53 значительно более стабилен (т.е. резко увеличивается его количество в клетке) и эффективно транс-активирует и/или транс-репрессирует специфические гены-мишени, следствием чего является индукция в аномальных клетках, либо остановки клеточного цикла, либо апоптоза (Копнин, 2001).

Ген *TP53*, кодирующий белок p53, расположен в хромосомной области 17q13.1. В данном гене и его фланкирующих областях обнаружен ряд полиморфных участков, в том числе однонуклеотидный полиморфизм G/C, которому соответствует аминокислотный полиморфизм *Pro/Arg* в положении 72 полипептидной цепи (Ara et al, 1990). Участок, образованный аминокислотными остатками с 43-го по 73-ий, образует дополнительный транскрипционный домен (Walker et al, 1996). Участок, обогащенный остатками пролина между аминокислотами 63 и 97 предположительно вовлечен в процесс апоптоза (Venot et al, 1998, Sakamuro et al, 1997).

Показано, что при воспалительных процессах в клетках повышается содержание p53 (Hofsirth et. al., 2002). Известно, что одной из главных причин развития гломерулонефрита является воспаление почечных клубочков. Это дает основания предполагать вовлеченность продукта гена *TP53* в патогенез хронического гломерулонефрита.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *Pro72Arg* гена *TP53* среди больных ХГН и здоровых доноров обнаружено преобладание частоты аллеля *Arg* над частотой аллеля *Pro*, и встречаемость генотипа *Arg/Arg* над частотой генотипа *Pro/Pro* в обеих исследованных группах (таблица 12).

Таблица 12.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Pro72Arg* гена *TP53* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		p
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель <i>Arg</i>	0,692	0,728	НД
Аллель <i>Pro</i>	0,308	0,272	НД
Генотип <i>Arg/Arg</i>	0,463	0,500	НД
Генотип <i>Arg/Pro</i>	0,458	0,456	НД
Генотип <i>Pro/Pro</i>	0,079	0,044	НД

Однако различия в распределении аллелей и генотипов между группами были незначительными и носили недостоверный характер, что свидетельствовало об отсутствии ассоциации между данным полиморфным маркером гена *TP53* и хроническим гломерулонефритом.

9. Изучение ассоциации полиморфного маркера *G309T* гена *MDM2* с ХГН.

Ключевую роль в стабилизации белка p53 и повышении его транскрипционной активности играют изменения во взаимодействии p53 с белком-ингибитором Mdm2, ген которого является потенциальным онкогеном. Этот белок, представляющий собой специфическую убиквитин-лигазу, связывается с N-концом молекулы p53 и стимулирует его убиквитинирование и, как результат, протеасомную деградацию белка p53 (Fry et al, 2005). Кроме того, связываясь с N-концевым участком p53 в районе домена, взаимодействующего с базовыми факторами транскрипции, Mdm2 подавляет способность p53 трансаktivировать гены-мишени (Копнин, 2000). В результате, несмотря на то, что ген, кодирующий p53, постоянно транскрибируется и транслируется, сам белок быстро подвергается деградации зависимой от убиквитина, и при этом, даже не успевший распасться p53 не проявляет активности (Chan et al., 2006; Чумаков, 2000). Ускорение деградации p53 при связывании с Mdm2 происходит за счет двух процессов. Как p53, так и Mdm2 содержат участки, отвечающие за экспорт белка из ядра. Благодаря этим сигналам Mdm2 выводит p53 из ядра и направляет его в протеасомы, где оба белка подвергаются деградации зависимой от убиквитина.

Ген *MDM2* содержит 12 экзонов и занимает 25 т.п.н. В первом интроне гена

MDM2 описан однонуклеотидный полиморфизм остатков *T/G* в положении 309 от точки инициации транскрипции (Wilkening et al., 2006; Menin et al, 2006). Бонд и соавт. показали, что этот полиморфизм связан с повышенным уровнем белкового продукта гена в организме, и пониженной активностью белка p53, а также со спорадическими формами саркомы у людей. При этом частота аллеля *G* была значительно повышена в группе людей, заболевших саркомой в раннем возрасте.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *G309T* гена *MDM2* статистически достоверных различий между двумя группами обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии ассоциации маркера с заболеванием (табл. 13).

Таблица 13.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *G309T* гена *MDM2* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)	
Аллель <i>T</i>	0,629	0,642	НД
Аллель <i>G</i>	0,371	0,358	НД
Генотип <i>TT</i>	0,377	0,415	НД
Генотип <i>TG</i>	0,503	0,453	НД
Генотип <i>GG</i>	0,119	0,132	НД

10. Изучение ассоциации полиморфных маркеров *Val762Ala* и *Leu54Phe* гена *ADPRT1* с ХГН.

Показано, что окислительный стресс и апоптоз вносят немалый вклад в патогенез ХГН. На определенном этапе прогрессирования ХГН апоптоз является одним из механизмов уничтожения гломерулярных клеток при развитии склероза. Апоптоз происходит в мезангиальной зоне клубочка и не наблюдается в капиллярах. Гибель интерстициальных клеток происходит на высоте активации механизма апоптоза, что доказано в экспериментальных работах. Повреждения ДНК, обусловленные генотоксичным действием свободных радикалов, приводят к активации поли(ADP-рибозил)полимераз (PARP). Эти ферменты участвуют в репарации ДНК, катализируя поли(АДФ-рибозилирование) белков, связанных с ДНК (Новожилова 1996, Oliver et al, 1999). Донором АДФ-рибозы является НАД+. Активность PARP возрастает в 500 раз и более при связывании с участками

разрыва ДНК. Известны несколько видов PARP, кодируемых разными генами. Из них ассоциации с патогенезом ХГН, прежде всего следует ожидать от PARP-1, так как она ответственна за синтез до 90% поли(ADP-рибозы) в клетке (Суханова и соавт., 2004). Фермент PARP-1 вовлечен в процессы репликации (Cesarone et al, 1990), транскрипции (Meisterernst et al, 1997) и репарации (Dantzer et al, 1999) Повышенная активация PARP-1 может приводить к существенному снижению содержания внутриклеточного NAD+ и, как следствие, к гибели клетки (Skaper et al, 2003).

Ген *ADPRT1* локализован в хромосомной области 1q41-1q42. В данной работе мы исследовали ассоциацию двух однонуклеотидных полиморфных маркеров гена *ADPRT1*: *T/C*, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков *Val/Ala* в положении 762 полипептидной цепи и однонуклеотидный полиморфизм *C/G*, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков *Leu/Phe* в положении 54 полипептидной цепи.

В группе здоровых доноров частота обоих аллелей полиморфного маркера *Val762Ala* почти одинакова, в то время как в группе ХГН выявлено преобладание аллеля *Val*. В группе больных ХГН существенно преобладал гомозиготный генотип *Val/Val*, наряду с резким уменьшением встречаемости генотипа *Ala/Ala* по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 14).

Таблица 14.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Val762Ala* гена *ADPRT1* в группе больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и в группе здоровых доноров (ЗД).

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	OR	CI
	ХГН (n = 290)	ЗД (n = 80)			
Аллель <i>Ala</i>	0,287	0,509	0,00003	0,39	0,25-0,61
Аллель <i>Val</i>	0,713	0,491	0,00003	2,57	1,64-4,03
Генотип <i>Ala/Ala</i>	0,092	0,316	0,00165	0,22	0,10-0,49
Генотип <i>Ala/Val</i>	0,390	0,386	НД	-	-
Генотип <i>Val/Val</i>	0,518	0,298	0,00032	2,53	1,37-4,87

Различия в частотах встречаемости аллелей и генотипов носили достоверный характер, что свидетельствует об ассоциации полиморфного

маркера *Val762Ala* гена *ADPRT1* с развитием хронического гломерулонефрита. При этом носительство аллеля *Val* ($OR = 2,57$) и генотипа *Val/Val* ($OR = 2,53$) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство аллеля *Ala* ($OR = 0,39$) и генотипа *Ala/Ala* ($OR = 0,22$) коррелирует со сниженным риском развития ХГН.

В нашей работе при исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *Leu54Phe* гена *ADPRT1* в группе хронического гломерулонефрита и в группе здоровых доноров наибольшая частота была выявлена у аллеля *Phe* (0,647 в группе ХГН и 0,603 в группе здоровых доноров). Наиболее распространенным генотипом были гетерозиготы *Leu/Phe*. Гомозиготы *Leu/Leu* встречались наиболее редко – их доля в выборке больных ХГН и в группе здоровых доноров составила 0,076 и 0,098 соответственно. Гомозиготы *Phe/Phe* встречались с частотой 0,370 и 0,304 (табл. 15).

Таблица 15.

Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Leu54Phe* гена *ADPRT1* в группе больных хроническим гломерулонефритом и в группе здоровых доноров.

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	ХГН	Здоровые доноры	
Аллель <i>Leu</i>	0,353	0,397	НД
Аллель <i>Phe</i>	0,647	0,603	НД
Генотип <i>Leu/Leu</i>	0,076	0,098	НД
Генотип <i>Leu/Phe</i>	0,554	0,598	НД
Генотип <i>Phe/Phe</i>	0,370	0,304	НД

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *Leu54Phe* гена *ADPRT1* в группе хронического гломерулонефрита и в группе здоровых доноров статистически достоверных различий обнаружено не было. Таким образом, полиморфный маркер *Leu54Phe* гена *ADPRT1* не ассоциирован с ХГН у русских пациентов г. Москвы.

Полученные нами результаты коррелируют с ранее полученными данными об ассоциации полиморфного маркера *Val762Ala* гена *ADPRT1* с диабетической полинейропатией (ДПН) при сахарном диабете типа 1 (СД типа 1), при котором одним из патогенетических факторов развития является окислительный стресс и избыточное образование свободных радикалов оказывающих повреждающее

действие на ДНК и мембранные структуры нейронов, и как следствие приводящих к гибели клеток и апоптозу.

ВЫВОДЫ.

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров *A(-601)G* и *Arg229Gly* гена *NPHS2*, *Glu117Lys* гена *NPHS1*, *VNTR* во втором интроне гена *IL1RN*, *C(-590)T* гена *IL4*, *G4257A* гена *IL13*, полиморфных микросателлитов *D6S2414* и *D6S1271* расположенных среди генов *HLA* класса II расположенных среди генов азличий между двумя группами обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии ассоциации маркера, *Ala17Thr* гена *CTLA4*, *Pro72Arg* гена *TP53*, *G(-309)T* гена *MDM2*, *Val762Ala* и *Leu54Phe* гена *ADPRT1* в группе больных хроническим гломерулонефритом, а также в группе здоровых доноров.

2. Для полиморфных маркеров *Arg229Gly* гена *NPHS2*, *Glu117Lys* гена *NPHS1*, *VNTR* во втором интроне гена *IL1RN*, *C(-590)T* гена *IL4*, *Pro72Arg* гена *TP53*, *Leu54Phe* гена *ADPRT1* показано отсутствие ассоциации с ХГН у русских пациентов г. Москвы.

3. Обнаружена ассоциация полиморфных микросателлитных маркеров *D6S2414* и *D6S1271* расположенных среди генов *HLA* с заболеванием, что косвенно свидетельствует о вовлеченности этой области в развитие ХГН.

4. Показана ассоциация полиморфных маркеров *A(-601)G* гена *NPHS2*, *Ala17Thr* гена *CTLA4*, *G4257A* гена *IL13* и *Val762Ala* гена *ADPRT1* с развитием хронического гломерулонефрита у русских пациентов города Москвы.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Петросян Э.К., Цыгин А.Н., Шестаков А.Е., Носиков В.В. (2006) Роль генетического полиморфизма интерлейкина-4 и интерлейкина-13 в развитии нефротического синдрома с минимальными изменениями у детей и подростков. *Педиатрия*. №5, стр 7-10.
2. Шестаков А.Е., Камышова Е.С., Кутырина И.М., Савостьянов К.В., Носиков В.В. (2006) Ассоциация полиморфных маркеров *D6S2414* и *D6S1271*, расположенных в локусе *MHC* (6p21.31), с хроническим гломерулонефритом среди русских г. Москвы. *Генетика*, 42 (12), стр. 1727-1730.
3. Шестаков А.Е., Камышова Е.С., Петросян Э.К., Кутырина И.М., Савостьянов К.В., Носиков В.В. (2007) Изучение ассоциации полиморфных маркеров *Val762Ala* и *Leu54Phe* гена *ADPRT1* с хроническим гломерулонефритом у русских пациентов города Москвы. *Генетика*, 43 (2), в печати
4. Петросян Э.К., Цыгин А.Н., Ильенко Л.И., Врублевский С.Г., Шестаков А.Е. Генетический полиморфизм антагониста рецептора интерлейкина-1 у больных хроническим гломерулонефритом. Тезисы 10-го конгресса педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии». *Вопросы современной педиатрии*, 5 (2), стр. 99 (6 – 9 февраля 2006 г.).
6. Петросян Э.К., Ильенко Л.И., Цыгин А.Н., Шестаков А.Е., Носиков В.В. Полиморфизм гена антигена цитотоксического Т-лимфоцита-4 (CTLA-4) у больных хроническим гломерулонефритом. V-ый Российский конгресс по детской нефрологии, стр. 171, Воронеж, Россия (19-21 сентября 2006 г).
6. K.V. Savost'anov, A.E. Shestakov, E.S. Kamyshova, I.M. Kutyryna, V.V. Nosikov. Association of *CTLA4* gene and polymorphic microsatellite *D6S2414* located in HLA region with chronic glomerulonephritis. *Nephrol. Abstracts of the XLII Congress of the ERA-EDTA*, p.V219, Istanbul, Turkey (June 4 - 7, 2005).