
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN - POLONIA

VOL.LX, SUPPL. XVI, 220

SECTIO D

2005

Studenckie Koło Naukowe Zakładu Medycyny Rodzinnej
Akademii Medycznej im. Prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie
Kierownik: Prof. dr hab. Jerzy Łopatyński
Department of Family Medicine
Professor Feliks Skubiszewski Medical University School of Lublin

BARTOSZ KONDRACKI, ADRIANNA IGNATIUK, JOANNA BATALIA,
KATARZYNA GIL, PIOTR KSIAŻEK

*Genetic predispositions of diabetic nephropathy
in type 2 diabetes associated with renin-angiotensin system*

**Genetyczne uwarunkowania nefropatii w cukrzycy typu 2 związane z układem
renina-angiotensyna**

Wszystkie choroby są wynikiem interakcji między indywidualnym, unikalnym zestawem informacji genetycznych a środowiskiem. Nefropatia cukrzycowa (Nephropathia diabetica) jest najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek (ESRD). Jest powikłaniem polegającym na uszkodzeniu kłębuszków nerkowych. Początkowo zwiększa się wydalanie albumin w moczu (mikroalbuminuria), następnie wydalone są większe ilości białka w moczu (jawny białkomocz). Zwykle w tym stadium pojawia się nadciśnienie tętnicze. W kolejnym etapie następuje stopniowy wzrost stężeń mocznika i kreatyniny we krwi. W najbardziej zaawansowanych stadiach nefropatii konieczna jest dializoterapia. Genetyczna predyspozycja jest jednym z decydujących czynników w rozwoju nerkowych i sercowo-naczyniowych komplikacji w cukrzycy. Znaczenie genów układu renina-angiotensyna zasługuje na szczególne podkreślenie z powodu znaczącej roli, jaką układ ten odgrywa w regulacji ciśnienia krwi, metabolizmu sodu i nerkowej hemodynamiki. Genetyczna różnorodność układu renina-angiotensyna ma znaczący wpływ na progresję niewydolności nerek. Główną rolę odgrywa polimorfizm trzech genów. Gen konwertazy angiotensyny (ACE), który jest zlokalizowany na chromosomie 17 (17q23). Polimorfizm tego genu jest oparty na insercji i delecji, obecności albo braku 287bp sekwencji Alu w intronie 16, obecne są dwa allele I (490bp) oraz D(190bp). Kolejnym jest gen angiotenstnogeny (AGT) zlokalizowany na chromosomie 1 (1q42-43), podstawą jego polimorfizmu M235T jest substytucja treoniny z metioniną w eksonie 2, obecne są dwa allele M (165bp) i T(141bp). Gen receptora typu 1 angiotensyny II (AT1R) wykazuje polimorfizm A1166C genu AT1R, którego podstawą jest substytucja cytozyny z adeniną w pozycji 1166, występują dwa allele C(231bp) i A(255bp) oraz trzy genotypy (AA, AC, CC).

Celem pracy była ocena roli genetycznego polimorfizmu układu renina-angiotensyna w cukrzycy typu 2.

MATERIAŁ

Przebadano 117 pacjentów z nefropatią cukrzycową (włączając 73 hemodializowanych pacjentów z ESRD) i porównano z grupą kontrolną 200 pacjentów chorych na cukrzycę, bez objawów nefropatii cukrzycowej. Charakterystykę pacjentów oraz grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów oraz grupy kontrolnej

Badane grupy	NC (n = 44)	PH (n = 23)	GK (n = 200)
Wiek (lata)	58,7±7,0	56,9 ±11,2	48,5 ±11,2
Mężczyzna/Kobieta*	12/32	38/35	119/81
Czas choroby (lata)	5,2	8,1 6,2	ND
Cholesterol w osoczu (mg/dl)*	218,3±31,6	204,3±50,5	162 ±39
Mocznik w osoczu(mg/dl)*	39,1±6,8	131±31	NM
Kreatynina w osoczu(mg/dl)*	0,87 ±0,18	8,1±1,94	NM
Nadciśnienie (%)	33(75)	64(88%)	0
Obciążenie rodzinne cukrzycą (%)	18(41%)	28(38%)	0

NC- pacjenci z nefropatią cukrzycową; PH- pacjenci hemodializowani; GK- grupa kontrolna; ND- nie dotyczy; NM- nie mierzono; *p<0,05

METODY

Metoda, która została zastosowana w badaniach składała się z:

- Izolacji DNA z krwi
 - Amplifikacji PCR specyficznymi primerami AGT i AT1R
- PCR (Polymerase Chain Reaction) to łańcuchowa reakcja polimerazy służąca do amplifikacji (namnożenia) wybranego fragmentu DNA in vitro. Prowadzona jest w termocyklerach, wymaga termostabilnej polimerazy DNA (np. polimerazy Taq), wolnych trójfosforanów nukleotydów, jonów Mg²⁺ oraz primerów. Primery (startery) są krótkimi (zazwyczaj 18-24 nukleotydów długości), jednociecznymi fragmentami DNA, które łączą się z komplementarnym fragmentem DNA i umożliwiają polimerazie DNA rozpoczęcie reakcji. Pierwszym etapem reakcji jest denaturacja podwójnej helisy DNA, która zachodzi w temperaturze około 95°C. Następnie temperatura jest obniżana do około 50°C, co umożliwia połączenie się primerów z komplementarnymi sekwencjami. W końcowej fazie temperatura jest podnoszona do około 72°C i rozpoczyna się reakcja polimeryzacji, w wyniku której powielany jest fragment zawarty pomiędzy dwoma primerami. Ta sekwencja cykli jest powtarzana wiele razy, w zależności od ilości materiału, który chce się uzyskać. Metoda ta jest powszechnie wykorzystywana do amplifikacji genów, określania obecności i orientacji wstawionego do wektora fragmentu.
- Cięcia enzymami restrykcyjnymi PstI i BsuRI
 - Elektroforezy w żelu agarowym do identyfikacji genotypów AGT i AT1R

WYNIKI BADAŃ

W tabeli 2 przedstawiono rozkład alleli oraz genotypów genu konwertazy angiotensyny (ACE) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono znaczącej różnicy między częstością alleli, a rozkładem genotypów polimorfizmu genu konwertazy angiotensyny (ACE). Genotypy II, ID i DD były obecne w podobnym stopniu u pacjentów z neuropatią cukrzycową jak w grupie kontrolnej.

Tabela 2. Rozkład alleli oraz genotypów genu konwertazy angiotensyny (ACE) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej, p = 0,1

Grupa	Allele		Genotypy		
	I	D	II	ID	DD
Pacjenci z nefropatią cukrzycową (n=117)	0,49	0,51	31 (26%)	53 (45%)	33 (29%)
Grupa Kontrolna (n=200)	0,42	0,58	41 (20,5%)	89 (44,5%)	70 (35%)

W tabeli 3 zamieszczono rozkład alleli oraz genotypów genu angiotensynogenu (AGT) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej. Z analizy danych wynika, że polimorfizm genu angiotensynogenu (AGT) nie wpływa na częstotliwość alleli. W grupie kontrolnej jak i u pacjentów z neuropatią cukrzycową genotypy MM, MT i TT były obecne w podobnym stopniu.

Tabela 3. Rozkład alleli oraz genotypów genu angiotensynogenu (AGT) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej, p = 0,26

Grupa	Allele		Genotypy		
	M	T	MM	MT	TT
Pacjenci z nefropatią cukrzycową (n=117)	0,51	0,49	29 (25%)	61 (52%)	27 (23%)
Grupa Kontrolna (n=200)	0,56	0,44	72 (36%)	80 (40%)	48 (24%)

Tabela 4 prezentuje rozkład alleli oraz genotypów genu receptora typu 1 angiotensyny II(AT1R) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej. Wyniki polimorfizmu genu receptora typu 1 angiotensyny II(AT1R) wykazały znaczące różnice w częstości i rozkładzie alleli i genotypów. Genotyp CC występował częściej u pacjentów z nefropatią cukrzycową niż w grupie kontrolnej. Genotypy z allelem C (AC+CC) były obecne u 56% pacjentów z nefropatią cukrzycową natomiast w grupie kontrolnej były obecne u 38%.

Tabela 4. Rozkład alleli oraz genotypów genu receptora typu 1 angiotensyny II(AT1R) u pacjentów z nefropatią cukrzycową i w grupie kontrolnej p<0,05

Grupa	Allele		Genotypy		
	A	C	AA	AC	CC
Pacjenci z nefropatią cukrzycową (n=117)	0,66	0,34	51 (43,5%)	54 (46%)	11 (9,5%)
Grupa Kontrolna (n=200)	0,79	0,21	123 (61,5%)	70 (35%)	7 (3,5%)

OMÓWIENIE

W patogenezie nefropatii cukrzycowej dużą rolę odgrywają czynniki genetyczne. Jest bardzo mało prawdopodobnym, aby defekt pojedynczego genu odpowiadał za rozwój nefropatii. Przypuszcza się, że geny w połączeniu z czynnikami metabolicznymi prowadzą do rozwoju nefropatii. Wiele czynników genetycznych bierze udział w jej rozwoju. Grupy genów kandydatów zwiększających ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej przedstawiono w tabeli 5. Wśród nich znajdują się mogą geny biorące udział w etiologii cukrzycy, jak również geny nieuczestniczące w jej etiopatogenezie. Rozwój nefropatii cukrzycowej zależy od interakcji czynników genetycznych oraz "środowiskowych" (zostało to zgodnie potwierdzone w pracach wielu badaczy), do których należą: obecność lub brak nadciśnienia tętniczego, zaburzeń lipidowych, oraz zła kontrola glikemii.

Tabela 5. Grupy "genów kandydatów" zwiększających ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej

– Geny mające znaczenie w etiologii cukrzycy:
1. geny regionu HLA;
2. geny regionu insuliny;
3. geny biorące udział w etiologii cukrzycy typu 2.
– Geny uczestniczące w regulacji ciśnienia tętniczego:
1. geny układu transporterów kationów;
2. geny układu renina-angiotensyna;
3. geny wrażliwości na insulinę;
– Gen przedśionkowego peptydu natriuretycznego;
1. gen śródbłonkowej syntazy tlenu azotu;
– Geny adducyny i endoteliny;
– Geny kodujące składowe kłębuszka nerkowego.
– Geny biorące udział w niezależnym od insuliny metabolizmie glukozy.
– Geny biorące udział w regulacji gospodarki lipidowej.

WNIOSKI

1. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:
2. W nefropatii cukrzycowej istotne znaczenie odgrywają czynniki genetyczne.
3. Znacząca jest rola genetycznego polimorfizmu układu renina-angiotensyna w cukrzycy typu 2.

4. Stwierdzono zwiększoną podatność nefropatii cukrzycowej u osobników posiadających genotyp CC.
5. Polimorfizm A1166C genu receptora typu 1 angiotensyny II(AT1R) może stanowić potencjalny genetyczny marker zwiększonej podatności na komplikacje nerkowe w cukrzycy typu 2.

PIŚMIENNICTWO

1. Czyżyk A., Ławecki J.: Encyklopedia chorego na cukrzycę. PWN, 2001
2. Grzeszczak W.: Nefropatia cukrzycowa. PZWL, 2002
3. Jorde L.B. i wsp.: Genetyka Medyczna, Wydawnictwo Czelej, 2000
4. Kokot F., Koj A.: Biochemia Harpera. PZWL, 1995
5. Nablifoff B. D., Rosenthal M.: Effects of age on complications in adult onset diabetes. J. M. Geriatr. Soc., 37, 838-842, 1989
6. Grzeszczak W.: Diabetes mellitus – serious nephrological problem in the XXI century PNM Tom XVI (1-2/2003)

STRESZCZENIE

Nefropatia cukrzycowa jest najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek (ESRD). Genetyczna predyspozycja jest jednym z decydujących czynników w rozwoju nerkowych i sercowo-naczyniowych komplikacji w cukrzycy. Znaczenie genów układu renina-angiotensyna zasługuje na szczególne podkreślenie z powodu roli, jaką odgrywają w regulacji ciśnienia krwi, metabolizmu sodu i nerkowej hemodynamiki. Genetyczna różnorodność układu renina-angiotensyna ma znaczący wpływ na progresję niewydolności nerek. W celu oceny roli genetycznego polimorfizmu układu renina-angiotensyna cukrzycy typu 2 przebadano 117 pacjentów z nefropatią cukrzycową (włączając 73 hemodializowanych pacjentów z ESRD) i porównano z grupą kontrolną 200 pacjentów chorych na cukrzycę, bez objawów nefropatii cukrzycowej.

Wyniki wykazują podwyższoną podatność na nefropatię cukrzycową u osób posiadających genotyp CC. Polimorfizm A1166C genu AT1R może stanowić potencjalny genetyczny marker zwiększonej skłonności do nerkowych komplikacji cukrzycy typu 2.

ABSTRACT

Diabetic nephropathy is the most common cause of final stage renal failure. One of the most crucial factor in the development of renal and cardiovascular complications of diabetes is genetic predisposition. The genes of the renin-angiotensin system have drawn special attention due to the main role of this system in the regulation of blood pressure, sodium metabolism and renal hemodynamics. Genetic variability of the renin-angiotensin system affects the progression of renal failure. The aim of this study was to evaluate possible role of genetic polymorphisms of renin-angiotensin system genes in type 2 diabetes nephropathy. The study was conducted on 117 patients with diabetic nephropathy (including 73 hemodialysed patients with ESRD), compared with 200 healthy subject as a control group.

Results suggest increased susceptibility to diabetic nephropathy in individuals keeping CC genotype. A1166C polymorphism of the AT1R gene could be a potential genetic marker of increased susceptibility to renal complication in type 2 diabetes.