

Связь одностороннего и двустороннего уролитиаза с генетическими факторами

Correlation of unilateral and bilateral urolithiasis and genetic factors

*O.I. Apolikhin, A. V. Sivkov,
O. V. Konstantinova,
P.A. Slonimskiy, T.V. Tupitsina,
D.N. Kalinichenko*

We have investigated the relationship between unilateral and bilateral urolithiasis and single nucleotide polymorphisms (SNP) in known urolithiasis-related genes in Russian population. Overall, 115 adult patients from the Central Russia – 71 male patients (61.7%) and 44 female patients (38.3%) - were included as study group, and 188 healthy adults as control group (from the corresponding region). The mean age of the study group patients was 44.5±14 years. Among the patients of study group 41 had unilateral and 74 bilateral urolithiasis. Venous blood was the source of DNA. Real-time PCR (Applied Biosystems) was used to detect spectrum and allele frequency of 3 candidate genes: gene of the vitamin D receptor (*VDR*, rs1540339), gene of extracellular calcium-sensitive receptor (*CASR*, rs2202127), and gene-modulator of the calcium release activator 1 (*ORAI1*, rs7135617). Using Fisher angle transformation and chi-square statistics the relationship was shown for SNPs of *ORAI1* and unilateral urolithiasis in the Russian population, and for *CASR* and bilateral urolithiasis. *VDR* gene SNPs showed no significant associations to any form of urolithiasis. The results obtained show that the genetic factors could be of significant importance for the development of uni- and bilateral urolithiasis in the Russian population, namely SNPs of the genes *ORAI1* and *CASR*, correspondingly.

**О.И. Аполихин¹, А.В. Сивков¹, О.В. Константинова¹,
П.А. Сломинский², Т.В. Тупицына², Д.Н. Калининченко¹**

¹НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

²Институт молекулярной генетики РАН

Одно из ведущих мест в структуре урологической заболеваемости занимает мочекаменная болезнь (МКБ). Доля больных с МКБ в урологических стационарах составляет 30-40% [1, 2]. По данным официальной статистики, в 2012 году показатель заболеваемости МКБ на 100 тыс. населения по Российской Федерации составил 550,5, а абсолютное число зарегистрированных пациентов – 787 555, прирост количества заболевших по сравнению с 2002 г. составил 25,1%. В регионах Российской Федерации заболеваемость различна – в 2012 году самые высокие показатели заболеваемости были отмечены в Алтайском крае (1234,7), Ненецком автономном округе (989,7), Амурской (939,1) и Новгородской областях (926,9), а самые низкие – в Республике Калмыкия (272,1) и Республике Бурятия (317,5) [3].

В последние годы в мире одним из основных аспектов изучения проблемы мочекаменной болезни является поиск генетических факторов риска развития уролитиаза: выявление его ассоциации с полиморфными вариантами того или иного гена. В нашей стране, в НИИ урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина, в течение нескольких лет проводится исследование, направленное на поиск полиморфных вариантов кандидатных генов мочекаменной болезни в российской популяции: обнаружена связь между полиморфизмом генов *VDR* и *ORAI1* с возникновением уролитиаза. Для генов *TNFRSF11B*, *TNFSF11*, *ESR1*, *KL*,

CASR, *SLC26A6* такой зависимости не установлено [4]. Выявлена ассоциация полиморфизма гена *ORAI1* с развитием кальций-оксалатного формы заболевания [5]. Также была определена связь между рецидивным уролитиазом и полиморфизмом гена *ORAI1*, между рецидивным течением и полиморфизмом гена *CASR* [6].

В публикациях, посвященных генетическим факторам риска возникновения МКБ, приводятся результаты исследования связи развития заболевания или его рецидивирования с полиморфными вариантами генов [7, 8, 9, 10]. Однако не менее важной является проблема прогнозирования характера течения мочекаменной болезни: одностороннего или двустороннего, что позволит выбрать адекватную тактику ведения больного уролитиазом.

В связи с этим целью данного исследования явился поиск ассоциаций одностороннего и двустороннего течения уролитиаза с полиморфными вариантами кандидатных генов МКБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью методов генетического анализа обследовано 115 пациентов с МКБ (основная группа) и 188 здоровых человека из общей российской популяции (контрольная группа). Средний возраст больных основной группы – 44,5±14 лет. Основную группу составили 71 мужчина (61,7%) и 44 женщины (38,3%). У 41 пациента диагностировали односторонние камни и у 74 двусторонние.

Для проведения анализа поли-

морфных ДНК-маркеров в кандидатных генах пациентов и лиц контрольной группы были созданы две коллекции ДНК, выделенной из венозной крови обследуемых лиц посредством стандартного фенолхлороформного метода или с использованием набора AxyPrepBlood Genomic DNA Miniprep Kit («Axygene», США).

Для генетического исследования были выбраны полиморфизмы с учетом аналогичных работ по этим генам. Полиморфные варианты анализируемых трех генов: ген рецептора витамина D (*VDR*, rs1540339), ген внеклеточного кальций-чувствительного рецептора (*CASR*, rs2202127), ген модулятора активатора высвобождения кальция 1 (*ORAI1*, rs7135617) определяли методом ПЦР с TaqMan-зондами в режиме реального времени с использованием тест-систем компании «Applied Biosystems» у лиц контрольной группы и у больных МКБ. Для определения достоверности различия частот встречаемости аллелей между сравниваемыми группами использовался метод углового преобразования Фишера. Для определения достоверности различия частот встречаемости генотипов между сравниваемыми группами использовался критерий χ^2 . Для достоверных различий по этому критерию рассчитывалось отношение шансов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить частоты встречаемости вариантов генотипов и аллелей трех кандидатных генов мочекаменной болезни в контрольной группе и у пациентов с МКБ и провести их сравнительный анализ. Учитывая современные тенденции в проведении ассоциативных исследований группы с односторонним и двусторонним уролитиазом отдельно каждая сравнивались с контрольной группой. В таблицах (табл. 1 и 2) представлены данные о частоте встречаемости генотипов и аллелей и достоверности различия в группах больных.

При определении полиморфизма гена *VDR* отличия в частотах встречаемости генотипов и аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с односторонними камнями были недостоверными (для генотипов $p = 0,802$, для аллелей $p = 0,51$).

Также установлено, что для гена *CASR* отличия в частотах встречаемости генотипов и аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с односторонними камнями были недостоверными (для генотипов $p = 0,763$, для аллелей $p = 0,464$) (табл. 1).

Для гена *ORAI1* частота генотипов следующая: в контрольной группе G/G – 13,2%; G/T – 50,8%; T/T – 36,0%, у пациентов с односторонним уролитиазом G/G – 36,6%; G/T – 31,7%; T/T – 31,7%. Выявлено, что отличия в частоте генотипов в контрольной выборке и выборке пациентов с МКБ являются достоверными, $p = 0,001$,

$\chi^2 = 13,33$ (отношение шансов = 1,21). Частота аллелей в контрольной группе G – 38,6%; T – 61,4%, в основной G – 52,4%; T – 47,6%. Отличия в частоте аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с односторонним уролитиазом являются достоверными, $p = 0,015$ (табл. 1).

При исследовании возможной связи двустороннего уролитиаза с полиморфизмами генов МКБ установлено, что для гена *VDR* не выявлено достоверных отличий в частотах генотипов и аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с МКБ (для генотипов $p = 0,14$, для аллелей $p = 0,054$) (табл. 2).

Для гена *CASR* частота генотипов следующая: в контрольной группе A/A – 47,0%; A/G – 42,5%; G/G – 10,5%, у пациентов с о двусторонним уролитиазом A/A – 35,1%; A/G – 51,4%; G/G – 13,5%. Выявлено, что отличия

Таблица 1. Сравнение частоты встречаемости генотипов и аллелей в контрольной группе и группе больных с односторонним уролитиазом

№	Ген	Варианты генотипов и аллелей	Частота генотипов и аллелей, %		Достоверность различий
			Контрольная группа	Пациенты с односторонним уролитиазом	
1	<i>VDR</i>	G/G	26,5	24,4	$p = 0,802$ $\chi^2 = 0,44$
		G/A	50,8	56,1	
A/A	22,7	19,5			
		G	51,9	52,4	$p = 0,51$
		A	48,1	47,6	
2	<i>CASR</i>	A/A	47	51,2	$p = 0,763$ $\chi^2 = 0,54$
		A/G	42,5	36,6	
		G/G	10,5	12,2	
		A	68,3	69,5	$p = 0,464$
		G	31,7	30,5	
3	<i>ORAI1</i>	G/G	13,2	36,6	$p = 0,001$ $\chi^2 = 13,33$
		G/T	50,8	31,7	
		T/T	36,0	31,7	
		G	38,6	52,4	$p = 0,015$
		T	61,4	47,6	

Таблица 2. Сравнение частоты встречаемости генотипов и аллелей в контрольной группе и группе больных с двусторонним уролитиазом

№	Ген	Варианты генотипов и аллелей	Частота генотипов и аллелей, %		Достоверность различий
			Контрольная группа	Пациенты с односторонним уролитиазом	
1	<i>VDR</i>	G/G	26,5	37,8	$p = 0,14$ $\chi^2 = 3,92$
		G/A	50,8	43,3	
A/A	22,7	18,9			
		G	51,9	59,5	$p = 0,054$
		A	48,1	40,5	
2	<i>CASR</i>	A/A	47	35,1	$p = 0,165$ $\chi^2 = 3,6$
		A/G	42,5	51,4	
		G/G	10,5	13,5	
		A	68,3	60,8	$p = 0,047$
		G	31,7	39,2	
3	<i>ORAI1</i>	G/G	13,2	24,3	$p = 0,091$ $\chi^2 = 4,79$
		G/T	50,8	44,6	
		T/T	36,0	31,1	
		G	38,6	46,6	$p = 0,057$
		T	61,4	53,4	

в частоте генотипов в контрольной выборке и выборке пациентов с МКБ являются недостоверными, $p = 0,165$, $\chi^2 = 3,6$. Частота аллелей в контрольной группе А – 68,3%, G – 31,7%, в основной А – 60,8%, G – 39,2%. Отличия в частоте аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с двусторонним уролитиазом являются достоверными, $p = 0,047$ (табл. 2).

Для гена *ORAI1* не выявлено достоверных отличий в частоте генотипов и аллелей в контрольной выборке и выборке пациентов с МКБ (для генотипов, $p = 0,091$, для аллелей $p = 0,057$) (табл. 2).

Таким образом определены достоверные отличия в частоте полиморфизмов гена *ORAI1* между контрольной группой и группой больных с односторонними камнями. Отличия достоверны как по генотипам, так и по аллелям. Анализ частот генотипов и аллелей показывает, что у больных мочекаменной болезнью повышается встречаемость аллеля G с 38,6% до 52,4%, генотипа G/G с 13,2% до 36,6% по сравнению с контрольной

группой. Это свидетельствует об ассоциации развития мочекаменной болезни с этим геном, в частности с развитием одностороннего камнеобразования. Сравнение полученных данных с результатами, полученными Y. Chou [9] в единственной зарубежной работе по данному гену, проведенной в китайской популяции указывает на то, что связь мочекаменной болезни с геном *ORAI1* выявлена и в российской и в китайской популяциях. Однако в китайскую работу были включены только пациенты с кальциевым уролитиазом и не проводилось изучение возможной связи между формированием односторонних мочевых камней и полиморфизмом указанного гена.

Для двустороннего уролитиаза получены достоверные отличия в частоте аллелей только для гена *CASR*. Анализ частот аллелей показывает, что у больных мочекаменной болезнью повышается частота аллеля G с 31,7% до 39,2% по сравнению с контрольной группой. При сравнении полученных результатов с данными зарубежных

исследований необходимо отметить, что есть работы, указывающие на связь развития мочекаменной болезни с геном *CASR* [10], но не проводилось изучение возможной ассоциации с формированием двусторонних камней.

Выводы

Существуют разные генетические факторы риска одностороннего и двустороннего течения МКБ в российской популяции. Выявлена ассоциация одностороннего течения мочекаменной болезни с полиморфизмом гена модулятора активатора высвобождения кальция 1 (*ORAI1*, rs7135617), как по генотипам, так и по аллелям. Зависимости между односторонними и двусторонним уролитиазом и полиморфизмом гена рецептора витамина D (*VDR*, rs1540339) в российской популяции не обнаружено. Установлена ассоциация двустороннего уролитиаза с полиморфизмом гена внеклеточного кальций-чувствительного рецептора (*CASR*, rs2202127) по аллелям. ■

Резюме:

Проведено изучение ассоциации одностороннего и двустороннего уролитиаза с полиморфизмами кандидатных генов уролитиаза. Обследовано 115 взрослых пациентов с мочекаменной болезнью – 71 мужчина (61,7%) и 44 женщины (38,3%) – (основная группа) из Центральной России и 188 здоровых взрослых лиц (контрольная группа) из этого же региона. Средний возраст больных основной группы – 44,5±14 лет. Основную группу составили 41 пациент с односторонними камнями и 74 больных с двусторонними. Материалом для исследований служили образцы венозной крови. С помощью метода ПЦП с TaqMan-зондами в режиме реального времени с использованием тест-систем компании «Applied Biosystems» определяли спектр и частоты полиморфных вариантов трех кандидатных генов МКБ: гена рецептора витамина D (*VDR*, rs1540339), гена внеклеточного кальций-чувствительного рецептора (*CASR*, rs2202127) и гена модулятора активатора высвобождения кальция 1 (*ORAI1*, rs7135617). С помощью методов углового преобразования Фишера и χ^2 установлена связь одностороннего течения мочекаменной болезни с полиморфными вариантами гена *ORAI1* в российской популяции. Установлена ассоциация двустороннего течения уролитиаза с аллелем гена *CASR*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в российской популяции в развитии одностороннего и двустороннего уролитиаза могут играть роль разные генетические факторы, в частности, полиморфные варианты генов *ORAI1* и *CASR*, соответственно.

Ключевые слова: уролитиаз, двусторонний, односторонний, генетические исследования, *ORAI1*, *VDR*, *CASR*, полиморфные гены.

Key words: urolithiasis, bilateral, unilateral, genetic research, *ORAI1*, *VDR*, *CASR*, gene polymorphism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тиктинский О.Л., Александров В.П. Мочекаменная болезнь. СПб.: Питер, 2000. 384С.
2. Лопаткин Н.А., Мартов А.Г. (под ред.). Избранные лекции по урологии // М.: Литтерра; 2008.
3. Аполихин О.И., Сивков А.В., Москалева Н.Г., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ урологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2002-2012 гг.). // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. N 2. С. 4-12.
4. Аполихин О.И., Сивков А.В., Константинова О.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В. Калиниченко Д.Н. Поиск полиморфных вариантов кандидатных генов мочекаменной болезни в российской популяции. // Экспериментальная и клиническая урология. 2013. – №3. – С. 56-60.
5. Аполихин О.И., Сивков А.В., Константинова О.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В. Калиниченко Д.Н. Генетические факторы риска различных форм уролитиаза в российской популяции. // Тезисы докладов XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 2015, С. 16
6. Константинова О.В., Аполихин О.И., Сивков А.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В. Калиниченко Д.Н. Генетические факторы риска рецидивирования мочекаменной болезни в российской популяции. // Тезисы докладов XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 2015, С. 54.
7. Monaco C, Weinstein A, Jiang Z. Phenotypic and functional analysis of human SLC26A6 variants in patients with familial hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis // American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2008. Volume 6, pp.1096-1103.
8. Soleimani M. The role of SLC26A6-mediated chloride/oxalate exchange in causing susceptibility to nephrolithiasis // J. Physiol. 2008, Volume pp.1205-1206.
9. Chou Y, Juo S, Chiu Y A polymorphism of the ORAI1 gene is associated with the risk and recurrence of calcium nephrolithiasis // The Journal of urology. 2011. Volume 5, pp.1742-1746.
10. Vezzoli G, Terranegra A., Arcidiacono T, R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria // Kidney international, 2007, Vol.11, pp. 1155-1162

Наши ВОЗМОЖНОСТИ

Биохимическая
лаборатория
НИИ урологии



В настоящее время НИИ урологии имеет необходимую методическую и приборную базу для выполнения **диагностики метаболических факторов риска МКБ:**

- диагностическая панель биохимических тестов (мочи и крови пациентов) для диагностики видов литогенных нарушений, рекомендованная Европейским обществом урологов (Guidance on Urolithiasis, 2012-2013, EUA);



- точный анализ минерального состава мочевых камней у пациентов - с помощью современного инфракрасного спектрофотометра (Nicolet iS10, США) со встроенной библиотекой спектров. На основании полученных данных проводится целенаправленное противорецидивное лечение МКБ, ее эффективная метафилактика.

Онкоурология:

- Определение онкомаркеров рака предстательной железы (PSA, хромогранин А)

- Определение онкомаркеров рака мочевого пузыря (BTA, UBC, NMP22, CYFRA 21.1).



Трансплантология:

- мониторинг концентрации иммуносупрессоров (такролимуса, циклоспорина, сиролимуса) в крови больных после трансплантации почки.

Перспективы: дальнейшее совершенствование методов диагностики урологических заболеваний.