

spective observational evaluation study // *Critical Care*. 2009. Vol. 13. P. 184–195.

22. *Strazdins V, Watson AR, Harvey B*. Renal replacement therapy for acute renal failure in children: European Guidelines // *Pediatr. Nephrol*. 2004. Vol. 19. P. 199–207.

23. *Symons J.M, Chua AN, Somers M.J.G et al*. Demographic Characteristics of Pediatric Continuous Renal Replacement Therapy: A Report of the Prospective Pediatric Continuous Renal Replacement Therapy Registry // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2007. Vol. 2. P. 732–738.

24. *Symons J.M, Brophy P.D, Gregory M.J et al*. Continuous renal replacement therapy in children up to 10 kg // *Am. J. Kid. Dis*. 2003. Vol. 41. № 5. P. 984–989.

25. *Walters S, Porter C, Brophy P. D*. Dialysis and pediatric acute kidney injury: choice of renal support modality // *Pediatr. Nephrol*. 2009. Vol. 24. P. 37–48.

26. *Wedekin M, Ebrich J.H.H, Offner G et al*. Aetiology and outcome of acute and chronic renal failure in infants // *Nephrol. Dial. Transplant*. 2008. Vol. 23. P. 1575–1580.

27. *Williams D. M, Sreedhar S.S, Mickell J.J*. Acute Kidney Failure. A Pediatric Experience Over 20 Years // *Arch. Pediatr. Adolesc. Med*. 2002. Vol. 156. P. 893–900.

Дата получения статьи: 11.05.11

Дата принятия к печати: 15.10.11

## Полиморфные маркеры гена нефрина (*NPHS1*) при спорадическом стероид-резистентном нефротическом синдроме у детей

Л.С. Приходина<sup>1</sup>, О.П. Рыжкова<sup>2</sup>, А.В. Поляков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития России

<sup>2</sup> ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН», Москва

## Single nucleotide polymorphism in nephrin gene (*NPHS1*) in children with sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome

L.S. Prikhodina<sup>1</sup>, O.P. Ryzhkova<sup>2</sup>, A.V. Polyakov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow Research Institute of Pediatrics and Children Surgery, Russian Ministry of Health

<sup>2</sup> Medico-genetical Research Centre, the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

**Ключевые слова:** дети, стероид-резистентный нефротический синдром, ген нефрина (*NPHS1*), мутации, полиморфные маркеры.

В статье представлены результаты когортного исследования потенциальных ассоциаций полиморфных маркеров гена нефрина (*NPHS1*) с эффективностью иммуносупрессивной терапии и прогрессированием спорадического стероид-резистентного нефротического синдрома (СРНС) у детей. Обследовано 53 ребенка с первичным несемейным СРНС в возрасте 16,0 (12,0; 17,0) лет, включая 49,1% больных с фокально-сегментарным гломерулосклерозом, 22,6% – с мезангио-пролиферативным гломерулонефритом, 15,1% – с мембрано-пролиферативным гломерулонефритом, 7,5% – с мембранозной нефропатией и 5,7% – с нефротическим синдромом с минимальными изменениями. Установлена низкая частота гетерозиготных мутаций в гене *NPHS1* у детей со спорадическим СРНС, составляющая 1,9%.

У 58,5% пациентов идентифицировано 4 вида полиморфных маркеров гена *NPHS1*, преимущественно в гетерозиготном состоянии. Эффективность иммуносупрессивной терапии не различалась в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1*. Частота сниженной СКФ <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, темпы изменений СКФ в год и кумулятивная почечная выживаемость статистически значимо не различались среди пациентов с СРНС с наличием и отсутствием установленных маркеров гена *NPHS1*. Таким образом, не выявлено ассоциаций полиморфных маркеров гена *NPHS1* с прогрессированием спорадического СРНС у детей.

The results of a cohort study of potential association with single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *NPHS1* gene that encodes nephrin, with the efficacy of immunosuppressive treatment and progression of sporadic SRNS in children are presented. Fifty-three children with primary non-familial SRNS aged 16,0 (12,0; 17,0) years were studied. Renal biopsy showed FSGS in 49,1%, mesangial proliferative GN in 22,6%, MPGN in 15,1%, membranous nephropathy in 7,5% and MCD in 5,7% of patients. Low frequency of heterozygous mutations in the *NPHS1* gene (1,9%) in children with sporadic SRNS was found. Four types of SNP in the *NPHS1* gene were identified in 58,5% children, majority of the SNP

Адрес для переписки: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2. ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ

Телефон: 8 (495) 483-36-53. Приходина Лариса Серафимовна

Факс: 8 (495) 483-33-53

E-mail: prikhodina@rambler.ru

**were heterozygous. Efficacy of immunosuppressive treatment was not different significantly in patients with SNP in comparison those without them. There was no significant differences in the frequency of GFR <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, the rate of eGFR declined per year and cumulative renal survival in patients with SNP in the *NPHS1* gene. An association of the SNP in *NPHS1* gene and progression of sporadic SRNS in children was not found.**

**Key words:** children, steroid-resistant nephrotic syndrome, gene nephrin (*NPHS1*), mutations, single nucleotide polymorphism.

Стероид-резистентный нефротический синдром (СРНС) представляет собой генетически гетерогенную группу гломерулярных заболеваний, обусловленных мутациями в генах, кодирующих белки щелевой диафрагмы – нефрин (*NPHS1*) (ОМIM № 602716), подоцин (*NPHS2*) (ОМIM № 604766),  $\alpha$ -актинин-4 (*ACTN4*) (ОМIM № 604638), CD2-ассоциированный протеин (*CD2AP*) (ОМIM № 604241), транзиторийный рецептор потенциального катионного канала (*TRPC6*) (ОМIM № 603652), которые играют ключевую роль в обеспечении структурной целостности щелевой диафрагмы и селективной проницаемости гломерулярной базальной мембраны (ГБМ) [3, 10–12, 25]. СРНС характеризуется прогрессирующим течением с развитием хронической почечной недостаточности (ХПН) более чем у 50% пациентов в течение 5–10 лет от манифестации заболевания почки [5, 17].

Проблема изучения вклада генетических факторов в развитие и прогрессирование СРНС является одной из актуальных в клинической нефрологии. Мутации в генах могут не только вызывать развитие болезней почек, но и воздействовать на фенотип заболевания несколькими путями: определять клиническое течение и характер гистологических изменений, оказывать влияние на эффективность терапии, а также предрасполагать к прогрессированию болезни. Пристальное внимание исследователей мирового нефрологического сообщества обращено на изучение потенциальных ассоциаций мутаций и полиморфных маркеров генов щелевой диафрагмы ГБМ с развитием и прогрессированием гломерулопатий.

Ген *NPHS1* локализован на длинном плече 19-й хромосомы в регионе 19q13, включает 29 экзонов и кодирует трансмембранный белок нефрин (молекулярная масса 185 кДа), являющийся основным структурно-функциональным компонентом щелевой диафрагмы ГБМ, участвующим в регуляции актинового цитоскелета подоцитов и передаче клеточных сигналов [2, 7, 16].

У детей с врожденным нефротическим синдромом финского типа гомозиготные мутации в гене *NPHS1* Fin-major c.121 (del12) (*L41fsX90*) в экзоне 2 и Fin-minor c.3325 C>T (*R1109X*) в экзоне 26 приводят к структурному изменению белка нефрина в виде его укорочения и последующему снижению его экспрессии в ГБМ [11]. В настоящее время известно более 119 различных мутаций в гене *NPHS1*, большинство из которых представлено миссенс-мутациями [1, 8, 13, 15].

В экспериментальных моделях гломерулонефрита (ГН) была выявлена взаимосвязь между изменением экспрессии нефрина и выраженностью протеинурии [15, 23]. Снижение экспрессии нефрина с нарушением его ультраструктурного распределения в ГБМ установлено у пациентов с нефротическим синдромом с минимальными изменениями (НСМИ) [6, 24]. В литературе обсуждается вопрос возможного влияния полиморфных маркеров гена *NPHS1* на взаимосвязь нефрина с другими компонентами щелевой диафрагмы ГБМ – Neph1,

подоцин, CD2AP, приводящего к снижению передачи клеточных сигналов, а также на синтез структурно или функционально дефектного белка с последующим развитием патологических процессов, затрагивающих гломерулярный фильтр [9, 14, 22].

До настоящего времени остается неизученным вопрос потенциального влияния гетерозиготных мутаций и полиморфных маркеров гена *NPHS1* на клиническое течение спорадического СРНС у детей.

**Целью** настоящего исследования было определить, имеются ли ассоциации гетерозиготных мутаций и полиморфных маркеров гена *NPHS1* с эффективностью иммуносупрессивной терапии и прогрессированием спорадического СРНС у детей.

### Материалы и методы исследования

В когортное одноцентровое исследование были включены 53 ребенка (22 мальчика и 31 девочка) с первичным несемейным СРНС в возрасте 16,0 (12,0; 17,0) лет, поступивших в отдел наследственных и приобретенных болезней почек ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» из различных регионов России.

Критериями включения в исследование являлись: первичный, морфологически подтвержденный СРНС; возраст пациентов при манифестации заболевания >1,0 <17,0 лет. Пациенты с врожденным и инфантильным нефротическим синдромом, а также семейным, поздним и вторичным СРНС, связанным с генетическими синдромами, хромосомными aberrациями, болезнями соединительной ткани, васкулитами были исключены из исследования.

Нефротический синдром определялся как симптомокомплекс в виде протеинурии более 3 г/24 ч (>50 мг/кг/24 ч), гипоальбуминемии (<25 г/л), гиперлипидемии и отеков. СРНС характеризовался сохраняющейся протеинурией после 6–8 недель терапии преднизолоном в дозе 2 мг/кг/24 ч (максимум 60 мг/24 ч). Функциональное состояние почек оценивалось на основании динамического обследования пациентов с определением скорости клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанной по формуле G.J. Schwartz [21] в соответствии с классификацией хронической болезни почек Национального почечного фонда «Инициатива качества исходов болезней почек» (K/DOQI) [18].

Возраст манифестации заболевания обследованных больных составлял 9,5 (6,0; 13,0) года. Почечная биопсия с последующим морфологическим исследованием нефробиоптата с применением световой микроскопии и иммунофлюоресценции была выполнена у всех детей с СРНС. При гистологическом исследовании нефробиоптатов фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) выявлен у 26 (49,1%) больных, мезангио-пролиферативный гломерулонефрит (МзПГН) в виде мезангиальной гиперклеточности без преимущественного отложения IgA депозитов в мезангии – у 12 (22,6%), мембрано-пролиферативный

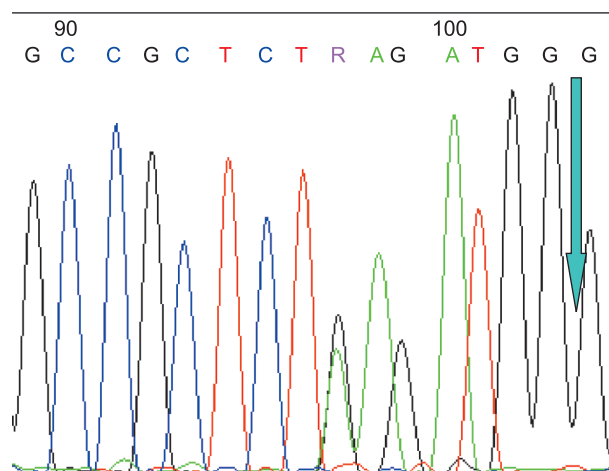
гломерулонефрит (МБПН) – у 8 (15,1%), мембранозная нефропатия (МН) – у 4 (7,5%), НСМИ – у 3 (5,7%). Длительность заболевания составила 60,0 (36,0; 84,0) месяцев. Катамнестическое наблюдение за пациентами осуществлялось в течение 42,0 (24,0; 60,0) месяцев. Прогрессирующее течение СРНС определялось при снижении СКФ <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> и отмечалось за период наблюдения у 11 (20,8%) больных.

Молекулярно-генетическое исследование 29 экзонов и прилегающих регуляторных областей гена *NPHS1*, кодирующего белок щелевой диафрагмы – нефрин, выполнено у всех 53 детей с СРНС. У 51 из 53 (96,2%) обследованных пациентов проведено исследование 8 экзонов в гене *NPHS2*, кодирующем подоцин, мутации не были идентифицированы. Контрольная группа для выявления мутаций и полиморфных маркеров в гене *NPHS1* состояла из образцов ДНК клинически здоровых детей (32 мальчика и 18 девочек) в возрасте от 2,0 до 17,0 лет, проживающих в различных регионах России (n = 50).

Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови пациентов с СРНС и детей группы контроля осуществлялось с помощью набора реагентов DNA Prep 200 DAtom™. Амплификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на программируемом термоциклере МС2 («ДНК-технология», Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер», Россия) и реактивов («Sigma-Aldrich», «Promega», США; «Serva», Германия). Для каждого из 29 экзонов гена *NPHS1* были выбраны оригинальные пары олигопраймеров, фланкирующие кодирующие области данного гена и прилегающие интронные области согласно ранее описанной методике [15].

Для идентификации мутаций в гене *NPHS1* применяли методы анализа полиморфизма длин рестриционных и амплифицированных фрагментов с использованием рестрицирующих эндонуклеаз: *VseMI*, *SsiP*, *BspLI*, *BstHNI*, *SmaI*, *SduI*, *Eco47I* («Биомастер», Россия). Исследование образцов ДНК на наличие точковых мутаций в гене *NPHS1* осуществляли методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК. Результаты амплификации оценивали с помощью вертикального электрофореза в 7% денатурирующем полиакриламидном геле. Последующее определение нуклеотидной последовательности образцов ДНК с выявленными изменениями электрофоретической подвижности проводили методом прямого автоматического секвенирования продукта ПЦР по Сенгеру (ABI Prism 310, Applied Biosystems, США) (рис. 1). Для поиска информации о нуклеотидной и аминокислотной последовательности гена *NPHS1* использовали электронные генетические базы данных: OMIM, MedLine, PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Human Gene Mutation Database ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)).

Анализ статистической значимости проводился с помощью непараметрических методов с оценкой медианы и интерквартильного размаха (25-й; 75-й перцентили). Значимость различий для непараметрических количественных переменных для независимых выборок по одному признаку оценивали по критерию Манна–Уитни. При анализе качественных бинарных признаков в независимых группах применялся критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и точный критерий Фишера с



**Рис. 1. Анализ нуклеотидной последовательности гена *NPHS1* методом прямого автоматического секвенирования, фрагмент экзона 3. Полиморфный маркер с.349 G>A**

расчетом величин отношения шансов (ОШ) в пределах 95% доверительных интервалов (95% ДИ). Почечная выживаемость оценивалась методом Каплана–Мейера с учетом длительности заболевания (целевая точка оценки неблагоприятного почечного исхода – СКФ <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) с определением статистической значимости установленных различий по критерию log-rank. Статистически значимыми считались различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакетов программ GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, США) и STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США).

## Результаты

Проведенное молекулярно-генетическое исследование у детей со sporadическим СРНС не выявило гомозиготных мутаций в гене *NPHS1*, ответственных за развитие врожденного нефротического синдрома финского типа.

У одного (1,9%) ребенка с ФСГС идентифицирована ранее не описанная гетерозиготная мутация сайта сплайсинга с.1218 G>A (*pAla406Ala*) в экзоне 10 гена *NPHS1* в комбинации с полиморфным маркером гена *NPHS2* с.872+7A>G в гетерозиготном состоянии в экзоне 7. Манифестация СРНС с ФСГС наблюдалась у данного пациента в возрасте 12 лет и сопровождалась повышением уровня креатинина в крови и артериальной гипертензией 1-й степени. На фоне проводимой иммуносупрессивной терапии циклоспорином А была достигнута частичная ремиссия заболевания. В динамике наблюдения СКФ остается >90 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> при длительности заболевания 66 месяцев.

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования гена *NPHS1* у 31 (58,5%) пациента с СРНС было выявлено 4 вида замен нуклеотидных последовательностей, ранее описанных в генетических базах данных: с.349G>A (*p.Glu117Lys*) (rs3814995) в экзоне 3 (n = 27), с.791C>G (*p.Pro264Arg*) (rs34982899) в экзоне 7 (n = 3), с.1175C>T (*p.Leu392Pro*) (rs3432060) (n = 3) и с.1223G>A (*p.Arg408Gln*) (rs33950747) в экзоне 10 (n = 4). Суммарная частота полиморфных маркеров гена *NPHS1* у детей с СРНС статистически значимо не

отличалась от группы контроля: 31 (58,5%) и 34 (68%) соответственно ( $p = 0,47$ ). Выявленные полиморфные маркеры гена *NPHS1* у 27 (87,1%) детей были в гетерозиготном состоянии, у 4 (12,9%) пациентов с полиморфным маркером с.349G>A – в гомозиготном состоянии по аллели А.

**Таблица 1**  
**Распределение аллельных частот и генотипов *NPHS1* у детей с СРНС и в группе контроля (n = 103)**

| Поли-морфные маркеры <i>NPHS1</i> | Аллель/Генотип | СРНС (n = 53)   | Группа контроля (n = 50) (*PubMed SNP, n = 58) | $\chi^2$ | p    | ОШ (95% ДИ)   |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|--|----------|------|---------------|
| с.349G>A (n = 27)                 | Аллель А       | 31/106 (29,3%)  | 39/116* (33,6%)                                | 0,49     | 0,24 | 0,8 (0,5–1,4) |
|                                   | Аллель G       | 75/106 (70,7%)  | 77/116* (66,4%)                                |          |      |               |
|                                   | Генотип GG     | 26/53 (49,1%)   | 25/58* (43,1%)                                 | 0,40     | 0,82 | –             |
|                                   | Генотип GA     | 23/53 (43,4%)   | 27/58* (46,6%)                                 |          |      |               |
|                                   | Генотип AA     | 4/53 (7,5%)     | 6/58* (10,3%)                                  |          |      |               |
| с.791C>G (n = 3)                  | Аллель C       | 103/106 (97,2%) | 98/100 (98%)                                   | 0,15     | 0,35 | 0,7 (0,1–4,3) |
|                                   | Аллель G       | 3/106 (2,8%)    | 2/100 (2%)                                     |          |      |               |
|                                   | Генотип CG     | 3/53 (5,7%)     | 2/50 (4%)                                      | 0,15     | 0,35 | 1,4 (0,2–9,0) |
|                                   | Генотип GG     | 0/53 (0%)       | 0/50 (0%)                                      |          |      |               |
|                                   | Генотип CC     | 50/53 (93,3%)   | 48/50 (96%)                                    |          |      |               |
| с.1175C>T (n = 3)                 | Аллель C       | 103/106 (97,2%) | 98/100 (98%)                                   | 0,15     | 0,35 | 0,7 (0,1–4,3) |
|                                   | Аллель T       | 3/106 (2,8%)    | 2/100 (2%)                                     |          |      |               |
|                                   | Генотип CT     | 3/53 (5,7%)     | 3/50 (6%)                                      | 0,005    | 0,47 | 0,9 (0,2–4,9) |
|                                   | Генотип TT     | 0/53 (0%)       | 0/50 (0%)                                      |          |      |               |
|                                   | Генотип CC     | 50/53 (93,3%)   | 47/50 (94%)                                    |          |      |               |
| с.1223G>A (n = 4)                 | Аллель G       | 102/106 (96,2%) | 96/100 (96%)                                   | 0,007    | 0,47 | 1,1 (0,3–4,4) |
|                                   | Аллель A       | 4/106 (3,8%)    | 4/100 (4%)                                     |          |      |               |
|                                   | Генотип GA     | 4/53 (7,6%)     | 4/50 (8%)                                      | 0,007    | 0,47 | 0,9 (0,2–4,0) |
|                                   | Генотип AA     | 0/53 (0%)       | 0/50 (0%)                                      |          |      |               |
|                                   | Генотип GG     | 49/53 (92,5%)   | 46/50 (94%)                                    |          |      |               |

Распределение аллельных частот и генотипов *NPHS1* у детей с СРНС в сравнении с группой контроля и популяционными данными находилось в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга, что свидетельствует об отсутствии ассоциации выявленных маркеров с.349G>A, с.791C>G, с.1175C>T и с.1223G>A с развитием заболевания в изучаемой выборке (табл. 1).

Сравнительный анализ клинических характеристик больных с СРНС в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* не выявил статистически значимых различий возраста манифестации и длительности заболевания, а также выраженности протеинурии и сроков катamnестического наблюдения больных (табл. 2).

При анализе распределения морфологических вариантов СРНС установлено, что у детей с наличием полиморфных маркеров гена *NPHS1* по сравнению с пациентами без маркеров отмечена статистически значимая тенденция более частого выявления МзПГН: 32,3 и 9,5%, ( $p = 0,05$ ) и редкого – НСМИ: 0 и 14,3% ( $p = 0,06$ ) (табл. 3).

**Таблица 2**  
**Клиническая характеристика пациентов с СРНС в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (n = 52)\***

| Показатели                          | Наличие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 31) | Отсутствие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 21) | p    |
|-------------------------------------|---|--|------|
| Возраст манифестации, годы          | 9,0 (5,0; 13,0)                             | 10,0 (6,5; 13,5)                               | 0,25 |
| Протеинурия, г/м <sup>2</sup> /24 ч | 3,8 (2,1; 5,8)                              | 3,1 (1,3; 9,4)                                 | 0,49 |
| Длительность заболевания, месяцы    | 60,0 (36,0; 90,0)                           | 51,6 (33,0; 78,0)                              | 0,2  |
| Длительность наблюдения, месяцы     | 42,0 (18,0; 54,0)                           | 48,0 (27,0; 81,0)                              | 0,24 |

\* – Пациент с гетерозиготной мутацией с.1218G>A в гене *NPHS1* исключен из анализа клинико-морфологических и функциональных характеристик.

**Таблица 3**  
**Распределение морфологических вариантов СРНС у детей в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (n = 52)**

| Морфологические варианты | Наличие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 31) | Отсутствие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 21) | p    | ОШ (95% ДИ)      |
|--------------------------|---|--|------|------------------|
| ФСГС (n = 25)            | 15 (48,4%)                                  | 10 (47,6%)                                     | 0,96 | 1,0 (0,3–3,1)    |
| НСМИ (n = 3)             | 0 (0%)                                      | 3 (14,3%)                                      | 0,06 | 0,08 (0,004–1,7) |
| МзПГН (n = 12)           | 10 (32,3%)                                  | 2 (9,5%)                                       | 0,05 | 0,2 (0,04–1,1)   |
| МбПГН (n = 8)            | 4 (12,9%)                                   | 4 (19,1%)                                      | 0,41 | 0,6 (0,1–2,9)    |
| МН (n = 4)               | 2 (6,4%)                                    | 2 (9,5%)                                       | 0,54 | 0,7 (0,1–5,1)    |

Таблица 4

**Сравнительная эффективность иммуносупрессивной терапии 1-й линии СРНС у детей в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (n = 40)**

| Показатели                  | Наличие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 25) | Отсутствие маркеров гена <i>NPHS1</i> (n = 15) | p    | ОШ (95% ДИ)    |
|-----------------------------|---|--|------|----------------|
| Полная ремиссия (n = 17)    | 11 (44%)                                    | 6 (40%)  | 0,54 | 1,2 (0,3–4,3)  |
| Частичная ремиссия (n = 6)  | 5 (20%)                                     | 1 (6,7%)                                       | 0,25 | 3,5 (0,4–33,3) |
| Отсутствие эффекта (n = 17) | 9 (36%)                                     | 8 (53,3%)                                      | 0,23 | 0,5 (0,1–1,8)  |

Определение эффективности иммуносупрессивной терапии 1-й линии проведено у 40 (75,5%) детей, у которых применялся циклофосфан в/в (n = 25), циклоспорин А (n = 13) и микофенолата мофетил (n = 2). Не выявлено статистически значимых различий у пациентов с наличием и отсутствием полиморфных маркеров гена *NPHS1* ни в частоте развития полной и частичной ремиссии заболевания, ни в частоте отсутствия эффекта проводимой иммуносупрессивной терапии 1-й линии (табл. 4).

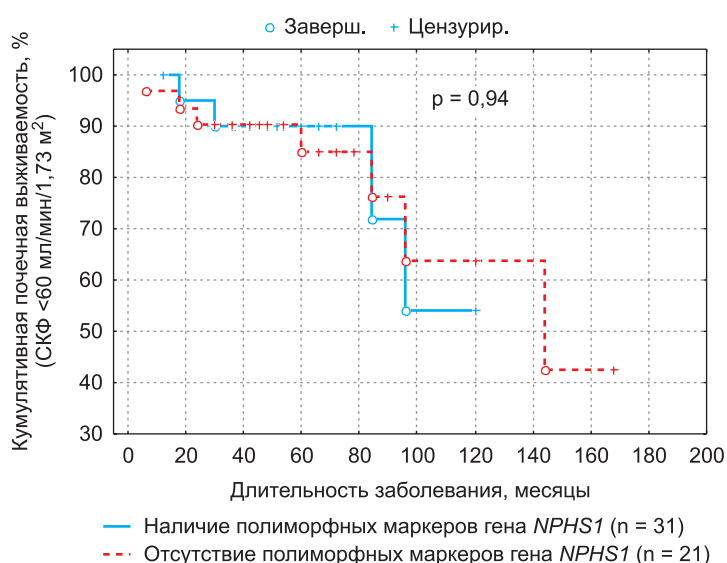
Медиана значений СКФ на последнее катамнестическое наблюдение статистически значимо не различалась у больных с СРНС с наличием и отсутствием полиморфных маркеров гена *NPHS1*: 135,4 (75,4; 168,5) и 123,6 (73,0; 149,4) мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>/год (p = 0,17). Снижение СКФ <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> выявлено у 7 (22,6%) больных с наличием полиморфных маркеров гена *NPHS1* и у 4 (19,1%) – с отсутствием данных маркеров (p = 0,52); ОШ = 1,2 (95% ДИ: 0,3–4,9). Темпы изменений СКФ в год также статистически значимо не различались среди пациентов с СРНС с наличием и отсутствием полиморфных маркеров гена *NPHS1*: 6,7 (1,8; 12,3) и 6,0 (0,3; 11,6) мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>/год (p = 0,38).

Кумулятивная почечная выживаемость значимо не различалась у больных СРНС с наличием и отсутствием полиморфных маркеров гена *NPHS1*: 5-летняя выживаемость составляла – 89,9 и 85,5%, 10-летняя – 53,8 и 63,2% соответственно (p = 0,94) (рис. 2).

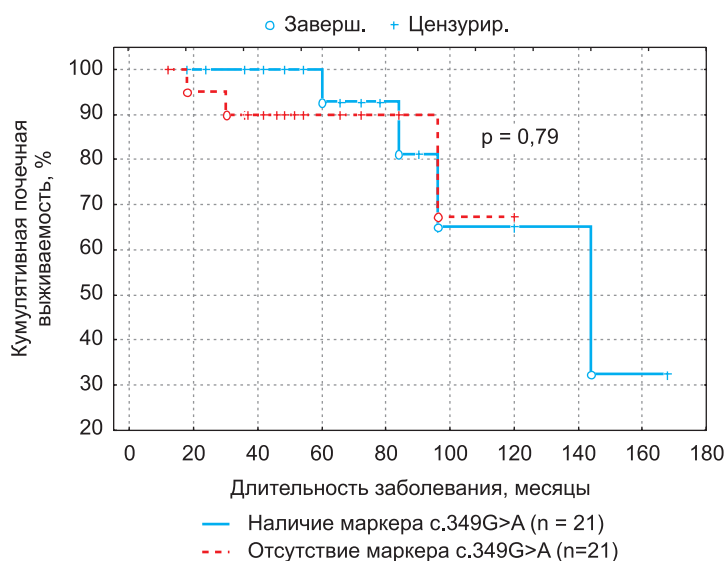
Учитывая наибольшую частоту полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1*, выявленного у 27 (50,9%) детей с спорадическим СРНС, нами определена кумулятивная почечная выживаемость у больных с наличием и отсутствием данного маркера, которая статистически значимо не различалась и составляла: 5-летняя – 92,9 и 89,2%, 10-летняя – 64,3 и 66,9% соответственно (p = 0,79) (рис. 3).

Кумулятивная почечная выживаемость статистически значимо не различалась у больных с СРНС в зависимости от генотипа полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1* и составила: 5-летняя – 100% у пациентов – носителей гомозигот, 80% – у компаунд-гетерозигот, 94,1% – у простых гетерозигот и 89,2% – у пациентов без *NPHS1* маркеров (p = 0,59); 10-летняя почечная выживаемость составляла 0% у гомозигот, 80% – у компаунд-гетерозигот, 77% – у простых гетерозигот и 66,9% – у детей без *NPHS1* маркеров (рис. 4).

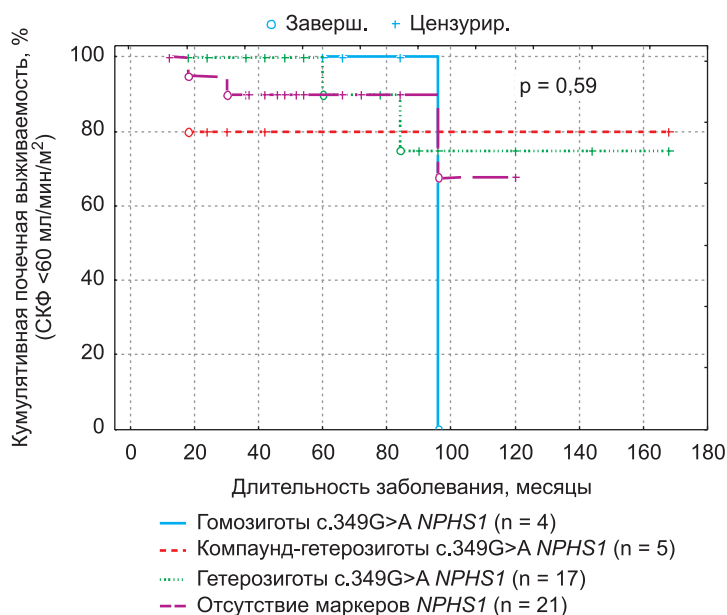
Риск прогрессирования спорадического СРНС у детей не зависел ни от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (p = 0,36; ОШ = 1,8; 95% ДИ: 0,4–7,7), ни от наличия маркера с.349G>A (p = 0,5; ОШ = 1,4 (0,3–7,3), ни от генотипа данного маркера с.349G>A: гомозиготного (p = 0,53; ОШ = 2,0 (0,2–26,2), компаунд-гетерозиготного (p = 0,6; ОШ = 1,5 (0,1–18,5), простого гетерозиготного (p = 0,38; ОШ = 1,9 (0,4–9,7).



**Рис. 2. Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (n = 52)**



**Рис. 3. Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от наличия полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1* (n = 42)**



**Рис. 4.** Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от генотипа полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1* (n = 47)

### Обсуждение

Проведенное молекулярно-генетическое исследование у детей со спорадическим СРНС не выявило гомозиготных мутаций в гене *NPHS1*, ответственных за развитие врожденного нефротического синдрома финского типа, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований [4, 14, 19, 20].

Гетерозиготная мутация с.1218 G>A (*pAla406Ala*) гена *NPHS1* идентифицирована у 1 (1,9%) пациента с СРНС в комбинации с полиморфным гетерозиготным маркером с.872+7A>G гена *NPHS2*. Согласно данным литературы, гетерозиготные мутации гена *NPHS1*, как простые, так и компаунд, определялись у 0–11,8% больных со спорадическим СРНС [4, 14, 19, 20]. В работе S. Santin et al. гетерозиготные *NPHS1* мутации идентифицированы у 14% детей и лишь у 2% взрослых пациентов со спорадическим ФСГС [20]. В исследовании A.T. Lahdenkari et al. у 1 из 25 (4%) взрослых пациентов с перенесенным в детстве НСМИ и сохранными функциями почек выявлена Fin-major мутация гена *NPHS1* в гетерозиготном состоянии [14]. В литературе имеются немногочисленные описания дигенного наследования гетерозиготных мутаций и полиморфных маркеров генов *NPHS1* и *NPHS2* при нефротическом синдроме с гипотетическим обсуждением возможного модифицирующего влияния данных генотипов на фенотип заболевания [13].

В представленном исследовании у 31 (58,5%) ребенка со спорадическим СРНС было выявлено 4 вида полиморфных маркеров гена *NPHS1*: с.349G>A, с.791C>G, с.1175C>T, с.1223G>A, преимущественно в гетерозиготном состоянии – у 87,1%. При этом полиморфный маркер с.349G>A в гене *NPHS1* был наиболее часто встречаемым и идентифицирован у 50,9% пациентов. В исследовании A.T. Lahdenkari et al., как и в нашей работе, полиморфный маркер с.349G>A в гене *NPHS1* выявлялся наиболее часто – у 17/25 (68%) пациентов с НСМИ [14].

Нами не выявлено статистически значимых различий эффективности иммуносупрессивной терапии 1-й линии у пациентов с наличием и отсутствием полиморфных маркеров гена *NPHS1*. Однако в работе A. Philippe et al. у 5 из 9 (55,6%) детей с компаунд гетерозиготными мутациями в гене *NPHS1* и манифестацией спорадического СРНС в возрасте 3,0 (0,6–8,0) лет отмечена резистентность к иммуносупрессивной терапии циклофосфором А и внутривенным циклофосфором А и последующее развитие ХПН [19]. Наличие компаунд гетерозиготных мутаций в гене *NPHS1* у пациентов со спорадическим СРНС авторами рассматривается как возможное объяснение менее выраженного фенотипа заболевания с остаточными функциями нефрина.

Полученные нами данные относительно отсутствия ассоциаций полиморфных маркеров в гене *NPHS1* с прогрессированием спорадического СРНС у детей согласуются с результатами исследований A.T. Lahdenkari et al. и G. Caridi et al., однако указанные исследования включали малочисленные выборки пациентов (n = 5) и (n = 2) соответственно [14, 4].

Таким образом, у детей со спорадическим СРНС установлена низкая частота гетерозиготных мутаций в гене *NPHS1*, составляющая 1,9%. У 58,5% пациентов идентифицировано 4 вида полиморфных маркеров гена *NPHS1*, преимущественно в гетерозиготном состоянии. При этом полиморфный маркер с.349G>A гена *NPHS1* являлся наиболее часто идентифицируемым в данной выборке и определялся у 50,9% пациентов с СРНС. Не выявлено ассоциаций полиморфных маркеров гена *NPHS1* с эффективностью иммуносупрессивной терапии 1-й линии и прогрессированием спорадического СРНС у детей независимо от вида и генотипа. Наличие полиморфных маркеров гена *NPHS1* не оказывает модифицирующего влияния на течение спорадического СРНС у детей.

### Литература

1. Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U. et al. Mutation spectrum in the nephrin gene (*NPHS1*) in congenital nephrotic syndrome // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17. P. 368–373.
2. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm // J. Am. Soc. Nephrol. 2004. Vol. 15. P. 1382–1391.
3. Boute N, Gribouval O, Roselli S. et al. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome // Nat. Genet. 2000. Vol. 24. P. 349–354.
4. Caridi G, Gigante M, Ravani P. et al. Clinical Features and Long-Term Outcome of Nephrotic Syndrome Associated with Heterozygous *NPHS1* and *NPHS2* Mutations // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2009. Vol. 4. P. 1065–1072.
5. Ebrich J.H.H., Geerlings C., Zivicnjak M. et al. Steroid-resistant idiopathic childhood nephrosis: overdiagnosed and undertreated // Nephrol. Dial. Transplant. 2007. Vol. 22. P. 2183–2193.
6. Furness P.N., Hall L.L., Shau J.A. et al. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome // Nephrol. Dial. Transplant. 1999. Vol. 14. P. 1234–1237.
7. Gerke P., Huber T.B., Sellin L. et al. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1 // J. Am. Soc. Nephrol. 2003. Vol. 14. P. 918–926.
8. Heeringa S.F., Vlangos C.N., Chernin G. et al. Thirteen novel *NPHS1* mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome // Nephrol. Dial. Transplant. 2008. Vol. 23. P. 3527–3533.

9. Huber T.B., Kottgen M., Schilling B. et al. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 41543–41546.
10. Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N. et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis // *Nature Genet.* 2000. Vol. 24. P. 251–256.
11. Kestila M., Lenkkeri U., Mannikko M. et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome // *Molec. Cell.* 1998. Vol. 1. P. 575–582.
12. Kim J.M., Wu H., Green G. et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility // *Science.* 2003. Vol. 300. P. 1298–1300.
13. Koziell A., Grech V., Hussain S. et al. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration // *Hum. Mol. Genet.* 2002. Vol. 11. P. 379–388.
14. Labdenkari A.T., Kestila M., Holmberg C. et al. Nephrin gene (NPHS1) in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS) // *Kidney Int.* 2004. Vol. 65. P. 1856–1863.
15. Lenkkeri U., Mannikko M., McCready P. et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 64. P. 51–61.
16. Liu G., Kaw B., Kurfis J. et al. Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 112. P. 209–221.
17. Mekabli D., Shav V., Ledermann S.E. et al. Long-Term Outcome of Infants with Severe Chronic Kidney Disease // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. Vol. 5. P. 10–17.
18. National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiatives. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease Evaluation Classification Stratification // *Am. J. Kidney. Dis.* 2002. Vol. 39. P. 1–266.
19. Philippe A., Nevo F., Esquivel E. et al. Nephrin Mutations Can Cause Childhood-Onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. Vol. 19. P. 1871–1878.
20. Santin S., Garcia-Maset R., Ruiz P. et al. on behalf of the FSGS Spanish Study Group. Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis // *Kidney Int.* 2009. Vol. 76. P. 1268–1276.
21. Schwartz G.J., Brion L.P., Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration in for estimating glomerular filtration rate in infants, children and adolescents // *Pediatr. Clin. North. Am.* 1987. Vol. 34. P. 571–590.
22. Sellin L., Huber T.B., Gerke P. et al. NEPH1 defines a novel family of podocin interactin proteins // *FASEB J.* 2003. Vol. 17. P. 115–117.
23. Topham P.S., Kawachi H., Haydar S.A. et al. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin // *J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 104. P. 1559–1566.
24. Wernerson A., Duner F., Pettersson E. et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003. Vol. 18. P. 70–76.
25. Wimm M.P., Conlon P.J., Lynn K.L. et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis // *Science.* 2005. Vol. 308. P. 1801–1804.

Дата получения статьи: 25.12.11  
Дата принятия к печати: 25.01.12

## Парциальные функции почек у больных подагрой без признаков хронической болезни почек

**А.Н. Максудова, Т.Н. Халфина**  
**ГУ ВПО «Казанский ГМУ» Минздравсоцразвития России**

### Renal functions in patients with gout and no signs of chronic renal disease

**A.N. Maksudova, T.N. Khalfina**  
**Kazan state medical university**

**Ключевые слова:** подагра, функция почек, мочевая кислота, гиперурикемия, канальцевая дисфункция.

В последние десятилетия отмечается увеличение распространенности подагры. Помимо суставного синдрома у 30–50% больных имеется поражение почек, в том числе подагрическая нефропатия.

Цель исследования: изучить парциальные функции почек и их взаимосвязь с клиническими показателями у пациентов с подагрой и сохранной функцией почек.

Обследовано 62 больных с верифицированным диагнозом подагра, без признаков ХБП. Контрольную группу составляли 29 здоровых добровольцев.

В исследуемой группе кроме высокого уровня мочевой кислоты в крови – 510 [410; 633] мкмоль/л – обнаружено снижение клиренса мочевой кислоты – 5,3 [3,8; 7,5] мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> и ее экскретируемой фракции на фоне значимого повышения фильтруемого объема и реабсорбции. Выявлены взаимосвязи между уровнем МК крови и такими клиническими показателями, как наличие тофусов, общее количество пораженных суставов, частота обострений, Ро-стадия и индекс тяжести подагры. Определена связь функциональной недостаточности артрита с показателями почечного обмена мочевой кислоты (экскретируемой фракции мочевой кислоты), а не с уровнем мочевой кислоты крови.

Адрес для переписки: г. Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 138. Республиканская клиническая больница МЗ РТ  
Телефон/факс: 8 (843) 261-51-99. Максудова Аделя Наилевна  
E-mail: adehyamaksudova@gmail.com