

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. Приходина¹, О.П. Рыжкова², А.В. Поляков²

¹ **ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития России**

² **ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН», Москва**

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

L.S. Prikhodina¹, O.P. Ryzhkova², A.V. Polyakov²

¹ **Moscow Research Institute of Pediatrics and Children Surgery, Russian Ministry of Health**

² **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 м², 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 m², 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), α -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 м² 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).

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 (χ^2) и точный критерий Фишера с

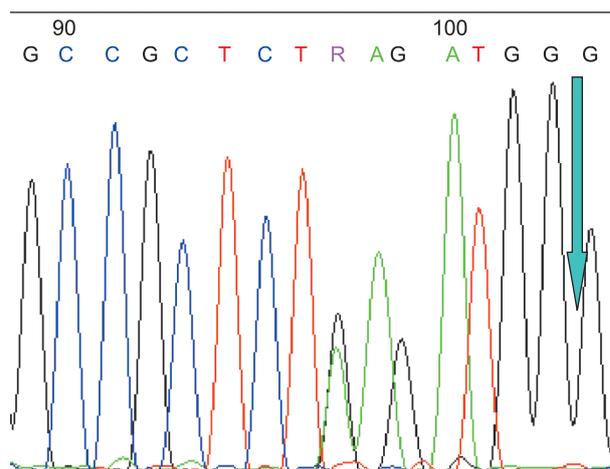


Рис. 1. Анализ нуклеотидной последовательности гена *NPHS1* методом прямого автоматического секвенирования, фрагмент экзона 3. Полиморфный маркер с.349 G>A

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 м²) 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 м² 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)	χ^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 ² /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.1218 G>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 м²/год (p = 0,17). Снижение СКФ <60 мл/мин/1,73 м² 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 м²/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).

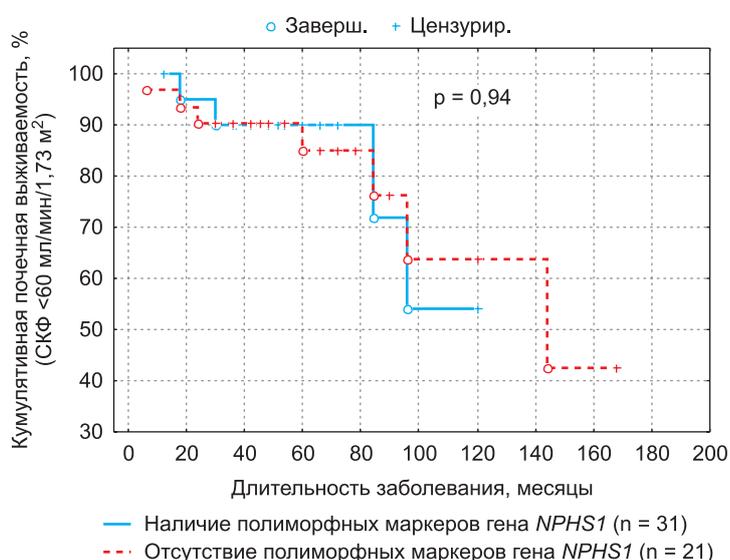


Рис. 2. Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от наличия полиморфных маркеров гена *NPHS1* (n = 52)

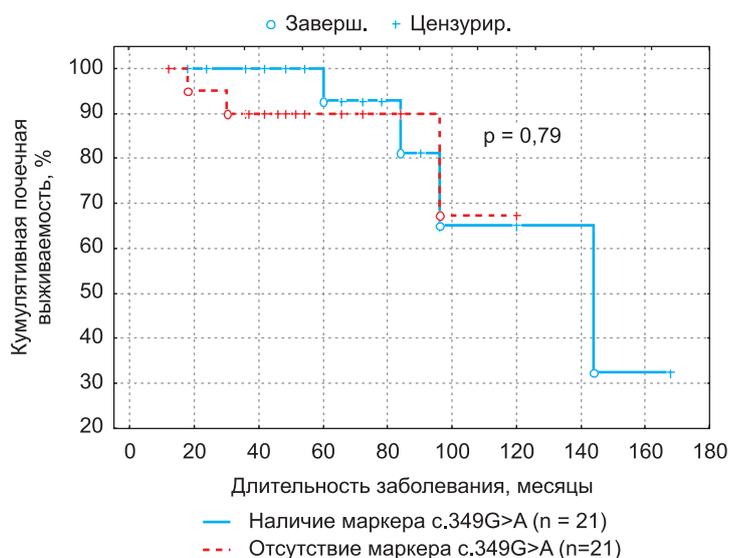


Рис. 3. Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от наличия полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1* (n = 42)

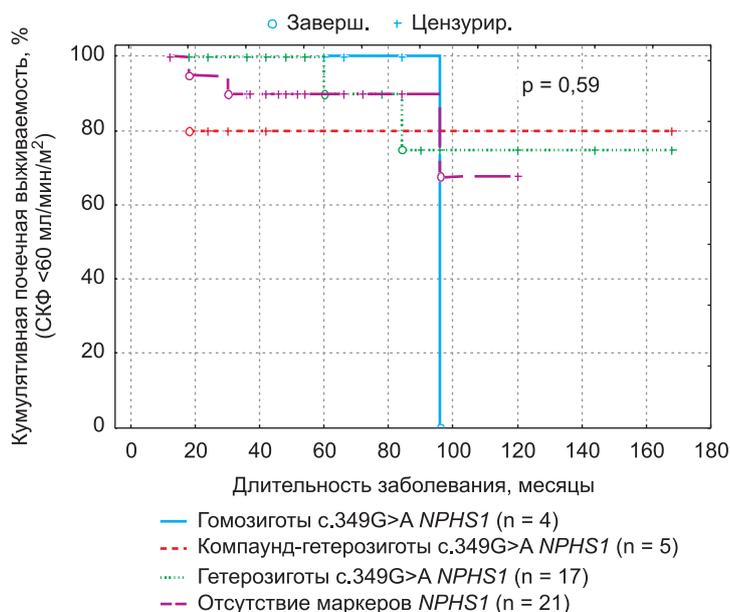


Рис. 4. Кумулятивная почечная выживаемость у детей с СРНС в зависимости от генотипа полиморфного маркера с.349G>A гена *NPHS1* (n = 47)

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, мочевиная 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 мочевиной кислоты в крови – 510 [410; 633] мкмоль/л – обнаружено снижение клиренса мочевиной кислоты – 5,3 [3,8; 7,5] мл/мин/1,73 м² 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 мочевиной кислоты (экскретируемой фракции мочевиной кислоты), а не с уровнем мочевиной 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