

Полиморфный маркер R229Q гена подоцина у детей с нефротическим синдромом

Э.К. Петросян*, А.Н. Цыгин**, Л.И. Ильенко*, А.Е. Шестаков***, В.В. Носиков***

* Российский государственный медицинский университет,

** Научный центр здоровья детей, РАМН,

*** Государственный научно-исследовательский институт «Генетика», г. Москва

Polymorphic marker R229Q of podocin gene in children with nephrotic syndrome

E.K. Petrosyan, A.N. Tzygin, L.I. Il'enko, A.E. Shestakov, V.V. Nosykov

Ключевые слова: нефротический синдром, фокально-сегментарный гломерулосклероз, нефротический синдром с минимальными изменениями, подоцин, ген подоцина (NPHS2), R229Q.

Целью нашего исследования было определение распространения различных генотипов полиморфного маркера R229Q (G755A) гена подоцина (NPHS2) у детей с нефротическим синдромом. Генетический полиморфизм G755A исследован у 86 детей с нефротическим синдромом с минимальными изменениями (НСМИ) и 29 больных фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС). Группа контроля состояла из 80 человек без заболеваний почек. В результате проведенного обследования нами выявлена высокая ассоциация гетерозиготного генотипа GA с ФСГС. Причем в группе больных, манифестация ФСГС у которых отмечалась в возрасте 1–6 лет, установлено достоверное в сравнении с детьми, дебют заболевания которых наблюдался в школьный период, повышение доли гетерозиготного генотипа GA. Не установлена связь полиморфного маркера R229Q с НСМИ. Однако у детей с манифестацией НСМИ в возрасте 7–15 лет частота генотипа GA была достоверно выше в сравнении с контрольной группой.

The purpose of our research was to define distribution of various genotypes of polymorphic marker R229Q (G755A) of the podocin gene (NPHS2) in children with nephrotic syndrome. Genetic polymorphism G755A was investigated in 86 children with minimal changes nephrotic syndrome (MCNS) and 29 patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). Control group included 80 persons without kidney disease. We found high association of heterozygotic genotype GA with FSGS. Moreover, in those patients, who manifested symptoms of FSGS in age of 1–6 years was established significant increase of a share of heterozygotic genotype GA in comparison to children with disease manifestation during the school period. No association of polymorphic marker R229Q with MCNS was found. However in children, who demonstrated symptoms of MCNS in age of 7–15 years, frequency of genotype GA was significantly higher in comparison to control group.

В настоящее время установлена роль генетических мутаций в нарушении структуры некоторых компонентов подоцита. В 1998 г. M. Kestila и соавт. впервые определили ген, ответственный за развитие врожденного нефротического синдрома (НС) финского типа [6]. В 2000 г. N. Boue и соавт. [1] опубликовали данные генетического исследования больных семейным НС. Оказалось, что аутосомно-рецессивная форма стероидрезистентного НС обусловлена мутацией гена подоцина (NPHS2). Порядка десяти различных мутаций были найдены у детей в возрасте от 3 мес. до 5 лет. В последующем Н. Tsukaguchi и соавт. (2002) провели генетическое исследование у больных фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС). Были обследованы 30 семей с аутосомно-рецессивным НС и 91 пациент со спорадически возникшим ФСГС. Результатом данного исследования оказалось достаточно частое выявление полиморфизма R229Q при семейных формах НС, сочетающегося с другими мутациями. У 11 больных со спорадически возникшим ФСГС также был

обнаружен полиморфный маркер гена NPHS2 – R229Q. У двух из них отмечено сочетание данного полиморфизма с другой мутацией гена NPHS2 [11]. В 2003 г. G. Caridi и соавт. генотипировали детей со стероидрезистентной и стероидчувствительной формами НС. Из 22 детей с мутацией гена подоцина 10 были носителями полиморфного маркера R229Q. В группе больных стероидчувствительным НС в 8,5% случаев был выявлен только гетерозиготный генотип R229Q [3, 4].

Как видно из представленных данных, одним из часто выявляемых генетических маркеров среди больных НС был R229Q [11], клиническое значение которого не совсем ясно. Как известно, гетерозиготное состояние R229Q обнаружено у 4% европейского населения. По данным А.С. Pereira и соавт. (2004), гетерозиготный полиморфизм R229Q коррелирует с микроальбуминурией у людей, не имеющих заболевания почек [9]. С данным полиморфизмом связывают уменьшение возможности подоцина закреплять нефрин [11]. В ряде случаев спорадически возникший стероидчувствительный ФСГС у

Телефон: 254-25-83 (раб.)
E-mail: Ed3565@yandex.ru

взрослых был ассоциирован только с гетерозиготным полиморфизмом R229Q [11]. Предполагают, что у этих больных относительно сохранена функция подоцина в детском возрасте, но в дальнейшем она утрачивается, приводя к развитию НС.

Целью нашего исследования являлось изучение роли полиморфного маркера R229Q гена NPHS2 у детей с НС.

Материал и методы

Под нашим наблюдением находилось 115 детей в возрасте от 8 мес. до 18 лет, средний возраст $11,8 \pm 5,45$ года. У всех детей НС был диагностирован на основании стандартного обследования, в которое входило определение сывороточного белка, альбумина, холестерина, триглицеридов, креатинина, а также исследование мочи. Клиническая характеристика больных представлена в табл. 1 и 2. Нефротический синдром с минимальными изменениями (НСМИ) диагностирован у 86 детей. Диагноз НСМИ в 77 случаях был поставлен по характерным клинико-лабораторным, функциональным данным и быстрому положительному ответу на стероидную терапию, не прибегая к биопсии. Девятерым детям (6 со стероидзависимой формой и 3 со стероидрезистентностью) диагноз НСМИ был установлен при нефробиопсии. Стероидрезистентные формы были диагностированы в случае отсутствия ответа на терапию при приеме преднизолона в дозе 2 мг/кг/сут в течение 4–6 нед.

ФСГС наблюдался у 29 детей. Данный диагноз ставился на основании морфологического исследования нефробиоптата. У 24 больных ФСГС дебютировал полным НС, характеризующимся стероидрезистентностью. В 5 случаях первым проявлением заболевания был мочевого синдром в виде умеренной протеинурии и макро/микрогематурии. В последующем по мере прогрессирования болезни развивался НС, у троих детей он был неполным из-за отсутствия отека.

Все дети находились на стационарном обследовании и лечении в детской клинической городской больнице № 13 им. Н.Ф. Филатова и Научном центре здоровья детей РАМН.

Генотипирование полиморфного маркера G755A (R229Q) гена NPHS2, проводилось с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестриктазных фрагментов.

Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных посредством стандартной экстракции фенолом-хлороформом. Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ФГУП ГосНИИ генетики (г. Москва). Амплификацию необходимых участков ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва).

Амплификацию участка ДНК, содержащего полиморфный маркер G755A гена NPHS2, проводили с использованием следующих праймеров:

A755G F 5'-AGG ATT TAC CAC AGG ATT AAG TTG TGC A-3',

A755G R 5'-TAG CTA TGA GCT CCC AAA GGG ATG G-3'.

Буфер для амплификации: 10 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ KCl, 2,5 мМ хлорида магния, 0,2 мМ каждого dNTP, по 66 нг праймеров, 50–100 нг геномной ДНК и 2,5 ед. ДНК-полимеразы Taq. Условия амплификации фрагмента ДНК: 94 C/25 с, 64 C/25 с, 72 C/25 с – 30 циклов. Размер продукта амплификации: 545 п. н. Метод идентификации аллелей: PCR-RFLP/AluI. Расщепление рестриктазой Bsu15I: 5 ед. рестриктазы (Fermentas, Литва) на пробу объемом 20 мкл в буфере, рекомендованном производителем, при 37 °C в течение ночи. Фрагмент ДНК, содержащий аллель G (соответствующий аминокислотному остатку R) остается нерасщепленным. Фрагмент ДНК, содержащий аллель A (соответствующий аминокислотному остатку Q), расщепляется рестриктазой Bsu15I, образуя продукты размером 364 и 181 п. н.

Разделение продуктов расщепления: электрофорез в 3% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием.

Наличие фрагмента длиной 545 п. н. после обработки Bsu15I соответствует генотипу GG, двух фрагментов (364 и 181 п. н.) – генотипу AA и трех (545, 364 и 181 п. н.) – гетерозиготному генотипу G/A.

В качестве популяционного контроля использовали выборку из 80 человек (44 мужчины и 36 женщин) в возрасте от 27 до 78 лет (средний возраст $50,1 \pm 16,5$ года) без хронических заболеваний почек.

Таблица 1

Характеристика больных с НСМИ

Характеристика	Количество
Пациенты	86
Пол (девочки/мальчики)	27/59
Атопические реакции	51
Возраст дебюта заболевания (лет)	4,7 (0,8–14,8)*
Длительность заболевания (лет)	5,3 (0,6–14)*
Дебют заболевания в возрасте 1–6 лет (дети)	64
Дебют заболевания в возрасте 7–15 лет (дети)	22
Рецидивы заболевания	6,4 (2–13)
Стероидчувствительные/стероидрезистентные формы	80/6
Стероидзависимые формы	45
Рецидивирующие/часторецидивирующие формы	13/67
Больные с почечной недостаточностью	0
Больные в ремиссии	9

Примечание. * – среднее значение (диапазон в годах).

Таблица 2

Характеристика больных ФСГС

Характеристика	Количество
Пациенты	29
Пол (девочки/мальчики)	13/16
Атопические реакции	5
Возраст дебюта заболевания (лет)	9,3 (0,4–14)*
Дебют заболевания в возрасте 1–6 лет (дети)	13
Дебют заболевания в возрасте 7–15 лет (дети)	16
Длительность заболевания (лет)	3,8 (0,6–6,7)*
Стероидчувствительные/стероидрезистентные формы	2/27
Больные с почечной недостаточностью (нет/есть)	21/8
Больные в ремиссии	0

Примечание. * – среднее значение (диапазон в годах).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи компьютерной программы для статистического анализа Statistica 6,0. Для проверки статистической значимости различий частотных показателей использовали критерий χ^2 по Пирсону. Зависимость клинического течения заболевания от генетического маркера определяли с помощью множественного регрессионного анализа. Достоверными считались различия при $p < 0,05$; p от 0,05 до 0,1 рассматривали как тенденцию к различию.

Таблица 3

Распределение генотипов и аллелей полиморфного маркера R229Q гена NPHS2 у больных с НСМИ и ФСГС в сравнении с контрольной группой (%)

Ген NPHS2	Больные с НСМИ (n = 86)	Больные ФСГС (n = 29)	Контрольная группа (n = 80)
Аллель G	94,77	91,38	98,1
Аллель A	5,23*	8,62***	1,9
Генотип GG	89,54	82,76	96,25
Генотип GA	10,46**	17,25****	3,75

Примечание. * – $\chi^2 = 2,68$; $p = 0,1$; ** – $\chi^2 = 2,79$; $p = 0,09$ – различия в показателях между пациентами с НСМИ и контрольной группы; *** – $\chi^2 = 5,33$; $p = 0,02$; **** – $\chi^2 = 5,7$; $p = 0,017$ – различия в показателях между пациентами с ФСГС и контрольной группы.

Таблица 4

Распределение генотипов и аллелей полиморфного маркера R229Q гена NPHS2 у больных с НСМИ и ФСГС в возрасте 1–6 лет в сравнении с контрольной группой (%)

Ген NPHS2	Больные с НСМИ (n = 64)	Больные ФСГС (n = 13)	Контрольная группа (n = 80)
Аллель G	95,3	88,45	98,1
Аллель A	4,7*	11,55***	1,9
Генотип GG	90,6	76,9	96,25
Генотип GA	9,4**	23,1****	3,75

Примечание. * – $\chi^2 = 2,32$; $p = 0,13$; ** – $\chi^2 = 1,92$; $p = 0,16$ – различия в показателях между пациентами с НСМИ и контрольной группы; *** – $\chi^2 = 6,69$; $p = 0,009$; **** – $\chi^2 = 6,92$; $p = 0,008$ – различия в показателях между пациентами с ФСГС и контрольной группы.

Таблица 5

Распределение генотипов и аллелей полиморфного маркера R229Q гена NPHS2 у больных с НСМИ и ФСГС в возрасте 7–15 лет в сравнении с контрольной группой (%)

Ген NPHS2	Больные с НСМИ (n = 22)	Больные ФСГС (n = 16)	Контрольная группа (n = 80)
Аллель G	90,9	93,75	98,1
Аллель A	9,1*	6,25***	1,9
Генотип GG	81,8	87,5	96,25
Генотип GA	18,2**	12,5****	3,75

Примечание. * – $\chi^2 = 9,52$; $p = 0,002$; ** – $\chi^2 = 5,62$; $p = 0,02$ – различия в показателях между пациентами с НСМИ и контрольной группы; *** – $\chi^2 = 2,01$; $p = 0,15$; **** – $\chi^2 = 2,07$; $p = 0,15$ – различия в показателях между пациентами с ФСГС и контрольной группы.

Результаты исследования

Результаты генотипирования в локусе G755A гена представлены в табл. 3–6. Во всех группах распределение генотипов подчинялось равновесию Харди–Вейнберга (т. е. ожидаемые частоты соответствовали наблюдаемым).

Проведенный сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G755A гена NPHS2 выявил следующие тенденции: частота аллелей и генотипов полиморфного маркера R229Q статистически достоверно отличалась в сравнении с контрольной группой у больных ФСГС. Выявленная у больных с НСМИ по сравнению с контролем частота генотипа GA (10,46 против 3,75%) носила недостоверный характер (табл. 3). Однако у детей с НСМИ, манифестировавшим в школьном возрасте, достоверно чаще отмечался генотип GA (табл. 4). Противоположные результаты получены у пациентов с ФСГС. При дебюте заболевания в раннем и дошкольном возрасте отмечалась достоверная ассоциация генотипа GA с данной патологией (табл. 4). Частота генотипа GA у детей, дебют заболевания которых наблюдался в школьный период, достоверно не отличалась от контрольной группы (табл. 5).

В группе больных со стероидрезистентным НС также отмечалось достоверное повышение доли GA-генотипа (табл. 6).

Однако множественный регрессионный анализ не выявил влияния генотипа R229Q на длительность заболевания ($\chi^2 = 0,25$; $p = 0,62$), частоту рецидивов ($\chi^2 = 0,017$; $p = 0,89$) у больных с НСМИ и на формирование хронической почечной недостаточности у детей с ФСГС ($\chi^2 = 0,42$; $p = 0,51$).

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что гетерозиготный генотип R229Q ассоциирован с ФСГС. Причем в группе больных, манифестация ФСГС у которых отмечалась в возрасте 1–6 лет, установлено достоверное в сравнении с детьми, дебют заболевания которых наблюдался в школьный период, повышение доли гетерозиготного генотипа GA. У больных с НСМИ достоверно значимое повышение генотипа GA определено только у детей, начало заболевания у которых выявлено в возрасте 7–15 лет.

Обсуждение

Таблица 6

Распределение генотипов и аллелей полиморфного маркера R229Q гена NPHS2 у больных со стероидрезистентным НС в сравнении с контрольной группой (%)

Ген NPHS2	Больные с НСМИ (n = 35)	Контрольная группа (n = 80)
Аллель G	90	98,1
Аллель A	10*	1,9
Генотип GG	80	96,25
Генотип GA	20**	3,75

Примечание. * – $\chi^2 = 7,73$; $p = 0,0054$; ** – $\chi^2 = 6,96$; $p = 0,008$ – различия в показателях между пациентами со стероидрезистентным НС и контрольной группы.

Наше исследование, посвященное определению частоты полиморфного маркера R229Q у больных с НСМИ и ФСГС, продемонстрировало высокую ассоциацию данного маркера с ФСГС. Полипатогенетичность ФСГС хорошо известна. Одним из факторов, приводящих к его развитию, является мутация генов, кодирующих структурные белки подоцитов, к которым относится, в частности, подоцин. Генетические мутации подоцина при спорадически возникающем ФСГС определены G. Caridi и соавт. (2004) [2, 3] и R.G. Ruf и соавт. (2004) [10], причем эти мутации часто сочетались с полиморфным маркером R229Q. Эти данные позволяют нам предположить, что у части обследованных детей полиморфный маркер R229Q сочетался с другими мутациями NPHS2, что и определяет их резистентность к иммуносупрессивной терапии. Эту гипотезу также подтверждает обнаруженная высокая частота генотипа GA в группе детей с ФСГС, манифестация которого отмечалась в раннем и дошкольном возрасте, так как мутация гена подоцина обуславливает развитие не только семейного ауто-ре-рессивного НС, но и спорадически возникшего стероидрезистентного НС, проявляющегося в раннем возрасте [5].

Распределение частот генотипов полиморфного маркера G755A гена NPHS2 у больных с НСМИ достоверно не отличалось от контрольной группы. Однако в группе детей, манифестация НС у которых наблюдалась в возрасте 7–15 лет, достоверно чаще определялся гетерозиготный генотип GA. Следует отметить, что большая часть из этих детей были пациенты с часторецидивирующей/стероидзависимой формой НС. Отсутствие ассоциации НСМИ с генетическими мутациями как гена нефрина, так и подоцина уже установлено в ряде исследований [2, 8, 10]. Более того, в настоящее время детально изучены патогенетические механизмы НСМИ. Как известно, в основе патогенеза лежит дисфункция Т-лимфоцитов с гиперпродукцией таких цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, обуславливающих развитие атопических реакций [7, 12]. Также установлено, что НСМИ чаще наблюдается у детей в возрасте 1–6 лет и связано это с особенностью иммунного гомеостаза у детей. Исходя из данных нашего исследования, можно предположить, что дебют НСМИ в более старшем возрасте определен не только склонностью к развитию атопических реакций, но и дисфункцией подоцина. В то же время нами не выявлено ассоциации R229Q с длительностью заболевания, клиническим течением и формированием хронической почечной недостаточности у больных ФСГС. Поэтому нельзя рассматривать генотип GA как неблагоприятный маркер, влияющий на характер течения и исхода болезни.

Выводы

1. Выявлена достоверная ассоциация полиморфного маркера R229Q с ФСГС.
2. Высокая частота гетерозиготного генотипа GA полиморфного маркера G755A отмечалась в группе больных ФСГС, дебют заболевания у которых отмечался в возрасте 1–6 лет.
3. Не установлена связь полиморфного маркера R229Q с НСМИ. Однако у детей, манифестация НСМИ у

которых отмечалась в возрасте 7–15 лет, частота генотипа GA достоверно выше в сравнении с контрольной группой.

4. GA-генотип полиморфного маркера R229Q нельзя рассматривать в качестве маркера, влияющего на течение НСМИ и исход ФСГС.

Литература

1. Boute N, Gribouwal O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchsbuber A, Daban K, Gubler M.C., Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349–354.
2. Caridi G, Bertelli R, Carrea A, Di Duca M, Catarci P, Artero M, Carraro M, Zennaro C, Candiano G, Musante L, Seri M, Ginevri F, Perfumo F, Gbiggeri G.M. Prevalence, genetics, and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-resistant nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2742–2746.
3. Caridi G, Bertelli R, Scolari F, Sanna-Cberchi S, Di Duca M, Gbiggeri G.M. Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood. *Kidney Int* 2003; 64: 365–371.
4. Caridi G, Bertelli R, Di Duca M, Dagnino M, Emma F, Onetti Muda A, Scolari F, Miglietti N, Mazzucco G, Murer L, Carrea A, Massella L, Rizzoni G, Perfumo F, Gbiggeri G.M. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1278–1286.
5. Frisberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, Raas-Rothschild A. Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 400–405.
6. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan C.E., Peltonen L., Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575–582.
7. Kimata H, Fujimoto M, Furusbo K. Involvement of interleukin (IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1497–1501.
8. Labdenkari A.T., Suwanto M., Kajantie E., Koskimies O., Kestila M., Jalanko H. Clinical features and outcome of chilyood minimal change nephritic syndrome: is genetics involved? *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 1073–1080.
9. Pereira A.C., Pereira A.B., Mota G.F., Cunha R.S., Herkenhoff F.L., Pollak M.R., Mill J.G., Krieger J.E. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int* 2004; 65: 1026–1030.
10. Ruf R.G., Lichtenberger A., Karle S.M., Haas J.P., Anacleto F.E., Schultheiss M., Zalewski I., Imm A., Ruf E.M., Mucha B., Bagga A., Neubaus T., Fuchsbuber A., Bakkaloglu A., Hildebrandt F. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 722–732.
11. Tsukaguchi H., Sudbakar A., Cam Le T., Nguyen T., Yao J., Schwimmer J.A., Schachter A.D., Poch E., Abreu P.F., Appel G.B., Pereira A.B., Kalluri R., Pollak M.R. NPHS2 mutation in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002; 11: 1659–1666.
12. Yap H.K., Cheung W., Murugasu B., Sim S.K., Seah C.C., Jordan S.C. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: Evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 529–537.