

© Э.К.Петросян, А.Н.Цыгин, А.Е.Шестаков, В.В.Носиков, 2006
УДК 616.61-008.6-053.2-02:575

Э.К. Петросян, А.Н. Цыгин, А.Е. Шестаков, В.В. Носиков

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ

E.K. Petrosyan, A.N. Tsygin, A.E. Shestakov, V.V. Nosikov

GENETIC MARKERS OF NEPHROTIC SYNDROME IN CHILDREN

Российский государственный медицинский университет, Научный центр здоровья детям, РАМН, Государственный научно-исследовательский институт «Генетика», Москва, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определить полиморфизм генов IL-4 в промотерной области (С-590Т) и IL-13 в 4-м экзоне (G4257A), NPHS1 в 3-м экзоне (G349A), NPHS2 в 5-м экзоне (G755A) у больных с нефротическим синдромом. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Изучение полиморфных маркеров генов IL-4, IL-13, NPHS1 и NPHS2 проводилось у 74 больных с нефротическим синдромом в возрасте от 1 года до 18 лет. Все пациенты были разделены на две большие группы: I группа – 53 ребенка с нефротическим синдромом с минимальными изменениями (НСМИ) и II группа – 21 ребенок с фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлена достоверная ассоциация полиморфного маркера IL-13 с НСМИ ($\chi^2=7,64$; $p<0,05$) и полиморфных маркеров NPHS1 ($\chi^2=6,25$; $p<0,05$) и NPHS2 с ФСГС ($\chi^2=9,18$; $p<0,05$). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проведенное исследование позволило выявить ассоциации различных генетических маркеров с НСМИ и ФСГС, тем самым подтвердить гипотезу о различных патогенетических механизмах в структуре данных морфологических форм.

Ключевые слова: нефротический синдром с минимальными изменениями, фокально-сегментарный гломерулосклероз, гены IL-4, IL-13, NPHS1, NPHS2.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to define polymorphism of genes IL-4 in the promoter areas (C-590T) and IL-13 in the 4th exone (G4257A), NPHS1 in the 3rd exone (G349A), NPHS2 in the 5th exone (G755A) in patients with the nephrotic syndrome. **PATIENTS AND METHODS.** Studying the polymorphic markers of genes IL-4, IL-13, NPHS1 and NPHS2 was carried out in 74 patients with the nephrotic syndrome in the age from 1 through 18 years. All patients were divided into two big groups: the first group – 53 children with the nephrotic syndrome with minimal changes (NSMC) and the second group – 21 patients with focal-segmental glomerulosclerosis (FSGS). **RESULTS.** The authentic association of polymorphic marker IL-13 with NSMC ($\chi^2=7.64$; $p<0.05$) and polymorphic markers NPHS1 ($\chi^2=6.25$; $p<0.05$) and NPHS2 with FSGS was established ($\chi^2=9.18$; $p<0.05$). **CONCLUSION.** The research has allowed revealing an association of various genetic markers with NSMC and FSGS and thus the hypothesis was confirmed about various pathogenetic mechanisms in the structure of the morphological forms in question.

Keywords: nephrotic syndrome with minimal changes, focal-segmentary glomerulosclerosis, genes IL-4, IL-13, NPHS1, NPHS2

ВВЕДЕНИЕ

Термин «идиопатический» нефротический синдром (НС) часто используется при описании гетерогенной группы гломерулопатий, наблюдаемых в детском возрасте. Наиболее частой морфологической основой НС у детей являются минимальные изменения, встречающиеся в зависимости от расовой принадлежности в 35–80% случаев [1,2]. Клинически нефротический синдром с минимальными изменениями (НСМИ) характеризуется высокоселективной протеинурией, преимущественно альбуминурией и положительной ответной реакцией на глюкокортикоидную терапию. Однако около 10% больных имеют стероидрезистентную форму НСМИ. При данном заболевании нередко наблюдается рецидивирующее течение, а также стероидзависимые формы. Известно, что в основе патогенеза НСМИ лежит дисфункция Т-лимфоцитов, активация которых определяет гиперпродук-

цию ряда цитокинов-IL-4, IL-10; IL-13. Ряд авторов предполагает, что гиперсекреция данных цитокинов обусловлена полиморфизмом кодирующих их генов [3–5].

Вторым по частоте морфологической формой НС в детском возрасте является фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), составляющий примерно 10–15% случаев НС у детей. В настоящее время нет четкой концепции патогенеза ФСГС. Считается, что в ряде случаев он может быть исходом НСМИ вследствие выраженного отложения фибрина и тромбоцитов [6]. Другой гипотезой развития ФСГС является усиление процессов апоптоза подоцитов, приводящих к подоцитопении и «оголению» участков базальной мембраны с формированием в них склероза [7,8].

Клубочковый фильтр состоит из трех слоев: фенестрированный эндотелий, базальная мембрана и подоциты, соединенные между собой щеле-

Характеристика больных с НСМИ

Признаки	Количество
Пациенты	53
Пол (девочки/мальчики)	16/37
Атопические реакции	39
Возраст дебюта заболевания (лет)	4,9(1,2-14,8) ¹
Длительность заболевания (лет)	5,3(0,6-14) ¹
Рецидивы заболевания	6,4(2-13)
Стероидчувствительные/стероидрезистентные формы	49/4
Стероидзависимые формы	35
Рецидивирующие/часторецидивирующие формы	5/9
Больные с почечной недостаточностью	0
Больные в ремиссии	9

¹ – среднее значение (диапазон в годах).**Характеристика больных с ФСГС**

Признаки	Количество
Пациенты	21
Пол (девочки/мальчики)	11/10
Атопические реакции	4
Возраст дебюта заболевания	9,3(0,4-14) ¹
Длительность заболевания	3,8(0,6-6,7) ¹
Стероидчувствительные/стероидрезистентные формы	2/19
Больные с почечной недостаточностью нет/есть	17/4
Больные в ремиссии	0

¹ – среднее значение (диапазон в годах).

вой диафрагмой. Все три слоя обеспечивают зарядно-селективную функцию клубочка, ограничивая фильтрацию белка. Наиболее важную роль в этом процессе играет подоцит с его сложной внутриклеточной структурой и межподоцитарная щелевая диафрагма (ЩД). Основным белком ЩД является нефрин. Как известно, мутация гена нефрина-NPHS1, расположенного на 19-й хромосоме [9], лежит в основе врожденного нефротического синдрома финского типа. Он состоит из 29 экзонов. Среди финской популяции отмечаются две мутации: делеция во 2-м экзоне – Fin-major и нонсенс-мутация в 26-м экзоне – Fin-minor. Обе мутации ведут к нарушению синтеза нефрина. С полиморфизмом гена NPHS1 A. Landenkari и соавт. связывают часто рецидивирующие, стероидзависимые и стероидрезистентные формы НС при минимальных изменениях [10].

Другим белком ЩД, мутация которого может привести к развитию НС, является подоцин. Роль подоцина в формировании НС была наиболее изучена после обнаружения гена, кодирующего этот белок. NPHS2- ген подоцина расположен в хромосоме 1q25-q31 [11]. Мутация подоцина выявлена в 45–55% случаев при семейном НС и в 8–20% случаях спорадически возникшего НС.

Наиболее частой мутацией NPHS2 является R229Q. Гетерозиготный полиморфизм, сочетающийся с другими мутациями подоцина, и гомозиготная мутация R229Q выявлены в некоторых

семьях с аутосомно-рецессивным НС [12]. В то же время клиническое значение мутации R229Q не совсем ясно. Как известно, гетерозиготное состояние R229Q обнаружено у 4% европейского населения. В ряде случаев спорадически возникший ФСГС во взрослом состоянии, имеющий стероидную чувствительность, был ассоциирован только с гетерозиготным полиморфизмом R229Q.

Целью нашего исследования явилось определение полиморфизма генов, IL-4 в промотерной области (С-590Т), IL-13 в 4-м экзоне (G4257A), NPHS1 в 3-м экзоне (G349A) и NPHS2 в 5-м экзоне (G755A) у больных с НС.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находилось 74 ребенка в возрасте от 1 года до 18 лет, средний возраст

11,8±5,45. Всем детям был диагностирован НС на основании стандартного обследования, в которое входило определение сывороточного белка, альбумина, холестерина, триглицеридов, креатинина, а также исследование мочи. Клиническая характеристика больных представлена в таблицах 1 и 2. Нефротический синдром с минимальными изменениями выявлен у 53 детей. Семерым детям с НСМИ проведена нефробиопсия: у 4 пациентов отмечалась стероидрезистентность и 3 ребенка были со стероидзависимой формой. Стероидчувствительность наблюдалась в 49 случаях заболевания. Рецидивирующее течение заболевания отмечалось у 14 пациентов. Девять из них имели часто рецидивирующее течение (не менее четырех эпизодов заболевания в год). Стероидзависимые формы заболевания зафиксированы у 35 больных. Стероидрезистентные формы были установлены в случае отсутствия ответа на терапию при приеме преднизолона в дозе 2 мг/кг/сут в течение 4–6 недель.

Фокально-сегментарный гломерулосклероз наблюдался у 21 ребенка. Данный диагноз ставился на основании данных морфологического исследования нефробиоптата. У 16 больных ФСГС дебютировал с полного нефротического синдрома, характеризующегося стероидрезистентностью. В ряде случаев (n=5) первым проявлением заболевания был мочевого синдром в виде умеренной протеинурии и микрогематурии. В последующем по

мере прогрессирования болезни развивался нефротический синдром, у троих детей он был неполным из-за отсутствия отека. Анализ аллергического анамнеза позволил выявить высокую частоту аллергических реакций у пациентов с НСМИ. Аллергические реакции проявлялись в виде крапивницы (n=10), атопического дерматита (n=12), нейродермита (n=7), поллиноза (n=3), бронхиальной астмы (n=3), отека Квинке (n=4). Среди 21 больного с ФСГС у 4 отмечалась пищевая аллергия, проявляющаяся умеренной крапивницей.

Генотипирование полиморфных маркеров С-590Т гена IL-4, G4257A гена IL-13, G349A гена NPHS1, G755A 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 [10]. Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ФГУП ГосНИИ «Генетика» (г. Москва). Амплификацию необходимых участков ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва), в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфат магния, 1,5 мМ хлорид магния, 0,01%-ный твин-20, 10%-ный диметилсульфоксид, по 33 нг праймеров

(ИЛ-4_F 5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3' и ИЛ-4_R 5'-TGGGGAAAGATAGAGTAATA-3) или (ИЛ-13_F 5'-TGGCGTTCTACTCACGTG-3' и ИЛ-13_R 5'-TTTCGAAGTTTCAGTGGGAAC-3'),

1,5 ед. полимеразы Taq, 50-100 нг геномной ДНК. Условия амплификации фрагмента ДНК: 94°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/20 сек, (57°C для ИЛ-4 или 58°C для ИЛ-13) /40 сек, 72°C/20 сек – 35 циклов; 72°C/6 мин – последний цикл. Размер продукта амплификации: 195 п.н. для участка, содержащего полиморфный маркер С(-590)Т гена ИЛ-4; и 154 п.н. для участка, содержащего полиморфный маркер G4257A гена ИЛ-13.

Аллели полиморфного маркера С(-590)Т гена ИЛ-4 определяли, обрабатывая амплифицированный фрагмент ДНК рестриктазой Eco47I (Fermentas, Литва) (инкубация при 37°C 3 часа, 2 ед.). При расщеплении фрагмента, содержащего аллель Т, образуются продукты размером 175 и 20 п.н., в то время как фрагмент ДНК, содержащий аллель С, остается нерасщепленным. Наличие фрагмента длиной 195 п.н. после обработки рестриктазой соответствовало генотипу СС, двух фрагментов (175 и 20 п.н.) – генотипу ТТ и трех фрагментов (195, 175 и 20 п.н.) – гетерозиготному генотипу СТ.

Аллели полиморфного маркера G4257A гена ИЛ-13 выявляли, расщепляя фрагмент ДНК рестриктазой BspLI (Fermentas, Литва) (инкубация при 37°C 3 часа, 2 ед.). При расщеплении фрагмента, содержащего аллель А, образуются продукты размером 134 и 20 п.н., в то время как фрагмент ДНК, содержащий аллель G, остается нерасщепленным. Наличие фрагмента длиной 154 п.н. после обработки рестриктазой соответствовало генотипу GG, двух фрагментов (134 и 20 п.н.) – генотипу AA и трех фрагментов (154, 134 и 20 п.н.) – гетерозиготному генотипу AG. Продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой MspI.

В третьем экзоне гена NPHS1 (положение 349) расположен однонуклеотидный полиморфизм А/G, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков Е117К.

Амплификацию участка ДНК, содержащего полиморфный маркер G(349)А гена NPHS1, проводили с использованием следующих праймеров:

G(349)A F 5'- CAT ACC CAG GAT GGA GAG GAT -3'

G(349)A R 5'- AGC GAT GAC GCG GAG TAT GAG T -3'

Буфер для амплификации: 10 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ КСl, 2,5 мМ хлорид 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 С/25 сек, 64 С/25 сек, 72 С/25 сек – 30 циклов.

Размер продукта амплификации: 120 п.н. Метод идентификации аллелей: PCR-RFLP/AluI.

Расщепление рестриктазой VseMII: 3 ед. рестриктазы («Fermentas», Литва) на пробу объемом 20 мкл в буфере, рекомендованном производителем, при 37°C в течение ночи. Фрагмент ДНК, содержащий аллель А (соответствующий аминокислотному остатку К), остается нерасщепленным. Фрагмент ДНК, содержащий аллель G (соответствующий аминокислотному остатку Е), расщепляется рестриктазой VseMII, образуя продукты размером 95 и 25 п.н. Разделение продуктов расщепления: электрофорез в 10%-ном ПААГ с последующей окраской бромистым этидием или нитратом серебра. Наличие фрагмента длиной 120 п.н. после обработки VseMII соответствует генотипу AA, двух фрагментов (95 и 20 п.н.) – генотипу G/G и трех (120, 95 и 25 п.н.) – гетерозиготному генотипу A/G.

В пятом экзоне гена NPHS2 расположен однонуклеотидный полиморфизм А/G, в положении 755

от начала стартового кодона, которому соответствует полиморфизм аминокислотных остатков R229Q.

Амплификацию участка ДНК, содержащего полиморфный маркер G(755)A гена NPHS2, проводили с использованием следующих праймеров:

A(755)G F 5'- AGG ATT TAC CAC AGG ATT AAG TTG TGC A -3'

A(755)G R 5'- TAG CTA TGA GCT CCC AAA GGG ATG G -3'

Буфер для амплификации: 10 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ КСl, 2,5 мМ хлорид 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 С/25 сек, 64 С/25 сек, 72 С/25 сек – 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 °С 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±16,5 года) без хронических заболеваний почек.

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. Достоверными считались различия при $p < 0,05$; $0,05 \leq p < 0,1$ рассматривали как тенденцию к различию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическую предрасположенность к развитию НС оценивали путем сравнения распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов IL-4, IL-13, NPHS1 NPHS2 у 74 больных НС и 80 человек из контрольной группы.

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера С-590Т гена IL-4 у больных НСМИ и ФСГС в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные НСМИ n=53	Больные ФСГС n=21	Контрольная группа n=80
Аллель С	40 (37,6%)*	20 (47,6%)**	49 (30,6%)
Аллель Т	66 (62,4%)	22 (52,4%)	151 (69,4%)
Генотип С/С	3 (5,6%)	7 (33,3%)	5 (6,25%)
Генотип С/Т	34 (64,1%)	6 (28,6%)	39 (48,75%)
Генотип Т/Т	16 (30,18%)	8 (38,1%)	36 (45%)

* $\chi^2=5,88$; $p=0,01$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и контрольной группы. ** $\chi^2=9,1$; $p=0,002$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с ФСГС и контрольной группы

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G4257A гена IL-13 у больных НСМИ и ФСГС в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные НСМИ n=53	Больные ФСГС n=21	Контрольная группа n=80
Аллель G	17 (16,0%)	13 (30,9%)	43 (26,8%)
Аллель A	89 (84,0%)*	29 (69,1%)**	117 (73,2%)
Генотип G/G	5 (9,4%)	2 (9,5%)	6 (7,5%)
Генотип G/A	7 (13,2%)	9 (42,9%)	31 (38,75%)
Генотип A/A	41 (77,4%***)	10 (47,6%****)	43 (53,75%)

* $\chi^2=4,29$; $p=0,038$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и контрольной группы. ** $\chi^2=4,14$; $p=0,04$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и детей с ФСГС. *** $\chi^2=7,64$; $p=0,005$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и контрольной группы. **** $\chi^2=6,21$; $p=0,01$ различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и детей с ФСГС.

Результаты генотипирования по локусам С-590Т гена IL-4, G4257A гена IL-13, G349A гена NPHS1 и G755A гена NPHS2 представлены в таблицах 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 различных полиморфных маркеров выявил следующие тенденции: что частота аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена IL-4 не ассоциирована ни с одной из морфологических форм НС (табл. 3). Более того, и НСМИ и ФСГС были ассоциированы с С аллелью ($\chi^2=5,88$; $p<0,05$ и $\chi^2=9,1$; $p<0,05$). Как видно из табл. 4 частота генотипа AA гена IL-13 значимо выше у больных НСМИ как в сравнении с контрольной группой ($\chi^2=7,64$; $p<0,05$), так и в сравнении с ФСГС ($\chi^2=6,21$; $p<0,05$).

Таблица 5
Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G349A гена NPHS1 у больных НСМИ, ФСГС в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные НСМИ n=53	Больные ФСГС n=21	Контрольная группа n=80
Аллель G	69 (53,8%)	18 (42,9%)	94 (69,0%)
Аллель A	37 (46,2%)	24 (57,1%)*	62 (31,0%)**
Генотип G/G	22 (41,5%)	5 (23,8%)	29 (36,25%)
Генотип G/A	25 (47,2%)	8 (38,1%)	40 (50%)
Генотип A/A	6 (11,3%)	8 (38,1%***)	1 (1,75%****)

* $\chi^2=6,14$; $p=0,01$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и детей с ФСГС. ** $\chi^2=4,08$; $p=0,04$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с ФСГС и контрольной группы. *** $\chi^2=7,03$; $p=0,008$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и детей с ФСГС. **** $\chi^2=6,45$; $p=0,01$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с ФСГС и контрольной группы.

Таблица 6
Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G755A гена NPHS2 у больных НСМИ, ФСГС в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные НСМИ n=53	Больные ФСГС n=21	Контрольная группа n=80
Аллель G	103 (97,2%)	37 (87,8%)	157 (98,1%)
Аллель A	3 (2,8%)	5 (12,2%)	3 (1,9%)*
Генотип G/G	50 (94,4%)	16 (76,2%)	77 (96,25%)
Генотип G/A	3 (5,6%)	5 (23,8%)**	3 (3,75%***)

* $\chi^2=4,23$; $p=0,04$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с ФСГС и контрольной группы. ** $\chi^2=5,14$; $p=0,023$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с НСМИ и детей с ФСГС. *** $\chi^2=9,18$; $p=0,003$; различия достоверны в сравнении с соответствующими показателями у детей с ФСГС и контрольной группы.

Анализ распределения частот генотипов NPHS1 (ген нефрина) продемонстрировал достоверную ассоциацию ($\chi^2=6,45$; $p<0,05$) полиморфного маркера G349A (E117K) только с ФСГС (табл. 5). Больные с НСМИ по своему генетическому спектру не отличались от контрольной группы ($\chi^2=0,17$; $p=0,68$). Обнаружено значимое различие в распределениях частот как аллелей, так и генотипов в группе больных с НСМИ и ФСГС ($\chi^2=6,14$; $p<0,05$).

Сходные результаты нами получены при исследовании полиморфного маркера NPHS2- гена подоцина в локусе G755A (табл. 6). Распределение частот аллелей и генотипов у пациентов с НСМИ практически соответствовало таковой в контрольной группе. В то время как у детей с ФСГС гетерозиготный генотип GA наблюдался в 23,8% случаев в сравнении с больными с НСМИ – 5,6% ($\chi^2=9,18$; $p<0,05$).

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что НСМИ ассоциирован с гомозигот-

ным генотипом AA полиморфного маркера гена IL-13. Больные ФСГС достоверно ассоциированы с полиморфными маркерами генов NPHS1 и NPHS2.

ОБСУЖДЕНИЕ

До настоящего времени остается актуальным дискуссионный вопрос о единых патогенетических механизмах нефротического синдрома с минимальными изменениями и фокально-сегментарного гломерулосклероза. Ряд авторов считает, что НСМИ и ФСГС являются двумя концевыми точками одного и того же процесса [13–15]. Доказательством этой концепции могут служить клинические наблюдения. Так, H.Ahmad и A.Tejaní [16] выявили, что в 50% случаев из 49 больных НСМИ развивался ФСГС спустя 10 лет от дебюта заболевания. Более того, единая морфологическая картина, наблюдаемая при НСМИ и в непораженных клубочках при ФСГС, и дефект Т-лимфоцитов, обнаруженный при обоих заболеваниях, позволяют отстаивать данную точку зрения. Исследования последних лет, посвященные изучению структуры подоцита и его изменению при патологических состояниях, позволили выделить разницу между НСМИ и ФСГС. С одной стороны, было доказано, что в обоих случаях при электронной микроскопии обнаруживается разрушение межподоцитарной щелевой диафрагмы с повреждением нефрина, главного белка ЩД [17]. С другой стороны, при иммунофлюоресцентном исследовании нефробиоптата было выявлено, что потеря дистрогликанов отмечается при НСМИ, сохраняющемся при ФСГС [18]. H.Schmid и соавт. при изучении уровня экспрессии гломерулярных mRNA различных белков подоцита обнаружили различия в соотношениях синаптоподина к подоцину у больных с НСМИ и ФСГС. Оказалось что экспрессия mRNA подоцина значима выше у больных с НСМИ при практически одинаковом уровне mRNA синаптоподина в обоих случаях [19].

В настоящее время детально изучены патогенетические механизмы НСМИ. В основе патогенеза лежит дисфункция Т-лимфоцитов с гиперпродукцией таких цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, обуславливающих развитие atopических реакций [20]. Изучив распределение генотипов IL-4 и IL-13 у больных с НСМИ и ФСГС, мы получили достоверную ассоциацию гомозиготного генотипа AA полиморфного маркера IL-13 только у больных НСМИ. Аналогичная ассоциация была выявлена у больных с бронхиальной астмой [21], atopическим дерматитом [22], нефротическим синдромом с минимальными изменениями [4] и повышением концентрации IgE [23] и IL-13 [24]. Отсутствие ассоциации у данной ка-

тегории больных с полиморфным маркером С-590Т IL-4 можно объяснить неоднозначностью его роли в генезе atopической реакции. Так, Т. Kawashima и соавт. [25] продемонстрировали, что гомозиготная форма Т аллели IL-4 ассоциирована с atopическим дерматитом в японской популяции. По данным Y. Kobayashi и соавт. [3], у больных НСМИ, напротив, наблюдалось уменьшение частот гомозиготных генотипов ТТ в промоторной области IL-4. Среди больных НСМИ индонезийской популяции отмечается уменьшение частот генотипов СС [4]. Изучая полиморфизм IL-4 в промоторной области у больных НСМИ в английской популяции, R. Parry и соавт. [5] не выявили различий между распределением генотипов и аллелей в сравнении с контрольной группой. Полученные нами данные демонстрируют значение полиморфного маркера G4257A гена IL-13 только в патогенезе НСМИ, тем самым подтверждая гипотезу о значимости IgE-реагинового типа аллергической реакции в патогенезе последнего. Это также подкреплено клиническими наблюдениями, так как у 39 (73,5%) из 53 больных отмечалось сочетание НСМИ с другими аллергическими заболеваниями.

Изучая полиморфные маркеры генов нефрина и подоцина, входящих в структуру подоцита, мы выявили достоверную их ассоциацию только с ФСГС. Известно, что мутации обоих генов могут привести к развитию ФСГС. Выявленные мутации в гене NPHS1, ответственные за протеинурию в случае врожденного нефротического синдрома финского типа [9], приводят к нарушению синтеза нефрина, наблюдаемого при других формах нефротического синдрома у людей [26–28], а также в экспериментальной модели нефроза у крыс [29–31]. С полиморфизмом гена NPHS1 в 3-м экзоне (G349A) и 26-м экзоне (G3315A) A. Landenkari и соавт. связывали часто рецидивирующие, стероидзависимые и стероидрезистентные формы НС при минимальных изменениях [10]. Год спустя эти же авторы, проведя анализ анамнестических, катанестических и генетических данных пациентов с НСМИ, сделали вывод, что полиморфные маркеры гена NPHS1 играют наименьшую значимость у этих пациентов [32]. Таким образом, отсутствие ассоциации полиморфного маркера G349A NPHS1 с НСМИ в нашем исследовании лишь подтверждают данный вывод.

Пристальное внимание к гену подоцина NPHS2 позволило выявить его мутацию в 45–55% случаев при семейном НС и в 8–20% случаев спорадически возникшего НС. Наиболее частой мутацией NPHS2 является R229Q. Гетерозиготный полиморфизм, сочетающийся с другими мутациями подо-

цина, и гомозиготная мутация R229Q обнаружены в некоторых семьях с аутосомно-рецессивным НС [12]. Данная мутация приводит к снижению возможности подоцина закреплять нефрин. В то же время клиническое значение мутации R229Q не совсем ясно. Как известно, гетерозиготное состояние R229Q обнаружено у 4% европейского населения. В нашей работе у больных с ФСГС гетерозиготный генотип R229Q был выявлен в 5 случаях из 21, что составляло 23,8%. У пациентов с НСМИ распределение генотипов R229Q не отличалось от контрольной группы. Таким образом, высокая ассоциация R229Q (G755A) гена NPHS2 и G349A гена NPHS1 с ФСГС позволяет нам предположить, что в патогенезе ФСГС большую роль играют функциональные и структурные нарушения значимых белков подоцита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование продемонстрировало разницу между ассоциациями различных генетических маркеров у детей с НСМИ и ФСГС. Выявлена достоверная ассоциация полиморфного маркера IL-13 с НСМИ, тогда как ФСГС был достоверно ассоциирован с полиморфными маркерами генов NPHS1 и NPHS2. Данные результаты подтверждают гипотезу о различных патогенетических механизмах НСМИ и ФСГС.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Churg J, Habib R, and White R.H. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet* 1970; 1299-1302
2. White RH, Glasgow EF, Mills RJ. Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 1970; 1353-1359
3. Kobayashi Y, Arakawa H, Suzuki M et al. Polymorphisms of interleukin-4-related genes in Japanese children with minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 271-276
4. Acharya B, Shirakawa T, Pungky A et al. Polymorphism of the IL-4, IL-13 and signal transducer and activator transcription 6 genes in Indonesian children with minimal change nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 2005; 25: 30-35
5. Parry RG, Gillespie KM, Parhnam A et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphism in minimal change nephropathy. *Clin Sci* 1999; 96: 665-668
6. Glasscock RJ, Adler SG, Ward HJ et al. Primary glomerular diseases. In: *The Kidney*. BM. Brenner, FC. Rector, eds., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1991; 1182-1279
7. Shirata I, Hosser H, Kimura K et al. The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch* 1996; 429: 255-273
8. Shankland SJ, Floege J, Thomas SE et al. Cyclin kinase inhibitors are increased during experimental membranous nephropathy: Potential role in limiting glomerular epithelial cell proliferation in vivo. *Kidney Int* 1997; 52: 404-413
9. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1:575-582
10. Lahdenkari AT, Kestila M, Holmberg C et al. Nephritin gene (NPHS1) in patients with minimal change nephritic syndrome (MCNS). *Kidney Int* 2004; 65: 1856-1863

11. Huber TB, Simons M, Hartleben B et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to the lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 2003; 12:3397-3405
12. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephritic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 66:571-579
13. Рябов СИ. *Нефротический синдром*. Гиппократ, СПб., 1992; 352
14. Шулушко БИ. *Вторичные нефропатии*. Медицина, М., 1987; 208
15. Fuchshuber A, Mehls O. Familial steroid-resistant nephrotic syndromes: recent advances. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1897-1900
16. Ahmad H, Tejani A. Predictive value of repeat renal biopsies in children with nephrotic syndrome. *Nephron* 2000; 84: 342-346
17. Wernerson A, Duner F, Petterson E et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 70-76
18. Regele HM, Fillipovic E, Langer B et al. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 403-412
19. Schmid H, Henger A, Cohen CD et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2958-2966
20. Romagnani S. Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 293-266
21. Heinzman A, Jerkic SP, Ganter K et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 549-559
22. Kruse S, Japha T, Tedner M et al. The polymorphism S503P and Q576R in interleukin-4 receptor α gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 1999; 96: 365-371
23. Liu X, Beaty TH, Deindl P. Association between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL-4, IL-13 and IL-4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 382-388
24. Arima K, Imeshita-Suyama R, Sakata Y et al. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL-13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 105: 980-987
25. Kawashima T, Noguchi E, Arinami T et al. Linkage and association of an interleukin-4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 1998; 35: 502-504
26. Doublie S, Ruotsalainen V, Salvadio G et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723-1731
27. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1234-1237
28. Kim BK, Hong HK, Kim JH, Lee HS. Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric diseases. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 964-973
29. Kawachi H, Koike H, Kurihara H et al. Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 2000; 57: 1949-1961
30. Luimula P, Ahola H, Wang SX et al. Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 2000; 58: 1461-1468
31. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA et al. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 946-956
32. Lahdenkari AT, Suvanto M, Kajantie E et al. Clinical features and outcome of childhood minimal change nephrotic syndrome: is genetics involved? *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 1073-1080

Поступила в редакцию 21.04.2006 г.