

© Коллектив авторов, 2006

Э.К. Петросян<sup>1</sup>, Л.И. Ильенко<sup>1</sup>, А.Н. Цыгин<sup>2</sup>, А.Е. Шестаков<sup>3</sup>, В.В. Носиков<sup>3</sup>

### ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА P53 НА ТЕЧЕНИЕ И ИСХОДЫ ХРОНИЧЕСКОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

<sup>1</sup> ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, <sup>2</sup> ГУ Научный центр здоровья детей РАМН, <sup>3</sup> ГУ Научно-исследовательский институт «Генетика», Москва

Впервые исследована роль полиморфизма гена p53 (проапоптического белка) в 72 кодоне Arg/Pro у детей с хроническим гломерулонефритом (ГН). В результате исследования обнаружено, что у больных с гематурической формой ГН наблюдалось увеличение частоты гомозиготных аллелей Pro/Pro ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контрольной группой. При других формах ГН частоты аллелей не отличались от контрольной группы. Мы предполагаем, что ассоциацию Pro аллели с гематурической формой ГН можно рассматривать как маркер благоприятного исхода заболевания.

Role of p53 gene (proapoptotic protein) polymorphism in 72 codon Arg/Pro in cases of pediatric chronic glomerulonephritis (GN) was studied in first time. The study showed that rate of homozygous alleles Pro/Pro in patients with hematuric glomerulonephritis was increased in comparison with control group ( $p < 0,05$ ). In patients with other variants of GN rate of different alleles was similar with control group. Authors assume that association of Pro allele with hematuric glomerulonephritis can be estimated as marker of favorable prognosis.

Гломерулонефрит (ГН) — заболевание, являющееся частой причиной хронической почечной недостаточности. До сих пор остается не ясным, какие молекулярные механизмы определяют течение и исход заболевания. Значимую роль в течении заболевания играет нарушение баланса между процессами повреждения и восстановления клеток клубочка [1]. В своих исследованиях Baker и соавт. [2] и Shimizu и соавт. [3] продемонстрировали, что активация апоптоза у больных нефритом подавляет воспалительные явления в клубочке и уменьшает риск развития возврата ГН. В то же время, по данным Takemura и соавт. [4] и Sugiyama и соавт. [5], отмечалась прямая корреляция между количеством клеток, находящихся в состоянии апоптоза, выраженностью склеротических изменений в гломеруле и нарушением функции почек. Таким образом, роль апоптоза в патогенезе ГН и его исходе остается до сих пор противоречивой.

Апоптоз или запрограммированная гибель клеток зависит от функции многих молекул, включающих белок p53. P53 — транскрипционный фактор, ядерный белок, кодируемый одноименным геном — супрессором опухолевого роста, регулирует многие

клеточные функции, включая митотический цикл, репарацию поврежденной ДНК, дифференцировку клеток и их гибель по типу апоптоза [6]. Белок p53 постоянно синтезируется клетками, но очень быстро расщепляется (период полураспада составляет около 20 мин), поэтому концентрация p53 в большинстве нормальных клеток и тканей очень низка. Концентрация белка p53 резко повышается при воздействии различных стрессорных факторов на клетку. В ответ на клеточный стресс транскрипция и экспрессия p53 резко повышаются и способствуют подавлению процессов, связанных с делением клеток, посредством индукции транскрипции генов p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, bax, GADD45 и hdm2 (22/a4) [7], которые блокируют клеточный цикл. Таким образом, p53 играет ключевую роль в регуляции пролиферации и апоптоза при многих патологических состояниях, таких как опухолевый рост и атерогенезис. Кодирующий белок p53 гена TP53 расположен на хромосоме 17q13.1. В данном гене и его фланкирующих областях обнаружен ряд полиморфных участков, в том числе однонуклеотидный полиморфизм G/C, которому соответствует аминокислотный полиморфизм Arg/Pro в положении 72 полипептидной цепи [8].

Полиморфизм р53 в 72 кодоне происходит в богатой пролином области, необходимой для белка, чтобы осуществлять свою проапоптотическую роль [9]. Генетические варианты в 72 кодоне по-разному влияют на клеточный цикл. Обнаружено, что эффективность апоптоза выше у лиц с гомозиготной формой аллелей Arg/Arg, тогда как Pro/Pro форма индуцирует клеточный цикл в фазе G1, определяя тем самым клеточную пролиферацию [10].

Целью нашего исследования было изучить полиморфизм гена р53 в 72 кодоне — Pro72Arg — у детей и подростков с разными клиническими и морфологическими формами хронического ГН (ХГН).

#### Материалы и методы исследования

Исследования проведены у 108 больных ХГН в возрасте от 1 года до 18 лет (46 девочек и 62 мальчика). Все дети были распределены по клиническим и морфологическим формам ХГН. Среди обследованных было 68 детей с нефротической формой (НФ) ХГН: 51 — с минимальными изменениями (НСМИ), 3 — с мембранозной нефропатией (МГН), 14 — с фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС). У 24 больных наблюдалась смешанная форма (СФ) ХГН: у 6 — мезангиокапиллярный ГН (МКГН), у 5 — IgM-нефропатия, у 2 — ФСГС, у 11 — мезангиопротролиферативный ГН (МППГН). У 16 детей была выявлена гематурическая форма (ГФ) ХГН, 5 из которых была проведена нефробиопсия: у всех был обнаружен МППГН. Для удобства статистической обработки все дети с различными морфологическими формами ХГН были распределены в 2 группы: 1-ю группу составили 28 пациентов с пролиферативными нефритами (ПГН): МППГН, МКГН, IgM-нефропатия; во 2-ю группу вошли 70 детей с непролиферативными нефритами (НПГН): НСМИ, ФСГС, МГН.

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

В качестве популяционного контроля использовали выборку из 71 человека (40 мужчин и 31 женщина) в возрасте от 27 до 78 лет (средний возраст 50,1±16,5 лет) без хронических заболеваний почек и артериальной гипертензии.

Генотипирование полиморфного маркера Arg72Pro проводили с помощью цепной полимеразной реакции (ПЦР) с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов. Термостабильная ДНК-полимераза Taq получена от НПО «Биотех» (Москва), протеиназа K — фирмы «Merck» (Германия). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПО «Синтол» (Москва). Геномную ДНК выделяли из цельной крови пациентов посредством экстракции фенолом-хлороформом после инкубации с протеиназой K.

ПЦР проводили на термоциклере «Терцик» ДНК-технологии, в 25 мкл среды, содержащей 67 мМ Трис-HCl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфат магния, 2 мМ хлорид магния, 0,01% раствор твин-20, 10% раствор диметилсульфоксид, 0,2 мМ каждого dNTP, по 25 нг праймеров TP53-F+72 (GAATGCAAGAAGCCAGAC) и TP53-R+72

Таблица 1

#### Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у пациентов с нефротической формой ХГН и здоровых лиц

Полиморфизм	Пациенты с НФ (n=68)	Здоровые (n=71)	OR	p
Arg/Arg	29 (42,6%)	35 (49,3%)	0,76	нд
Arg/Pro	34 (50%)	32 (45,1%)	1,22	нд
Pro/Pro	5 (7,4%)	4 (5,6%)	1,33	нд
Аллели				
Arg	0,676	0,718	0,82	нд
Pro	0,324	0,282	1,22	нд

Здесь и в табл. 2—5: нд — недостоверно.

(GGATGATTTGATGCTGTCCC), 20—50 нг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы. 35 циклов ПЦР проводили по программе: 94 °C/30 с; 62 °C/30 с, 72 °C/30 с. Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием (EtBr).

Аллели полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 определяли, обрабатывая амплифицированный фрагмент ДНК длиной 229 п.н. рестриктазой Bsh1236I. Фрагмент ДНК, содержащий аллель Arg, расщепляется этой рестриктазой, образуя продукты размером 126 и 103 п.н., тогда как фрагмент ДНК, содержащий аллель Pro, остается нерасщепленным.

Достоверность различий частот встречаемости аллелей и генотипов локуса Arg72Pro в группах определяли с помощью точного критерия Фишера. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Для оценки роли генетического маркера (аллеля или генотипа) в развитии ХГН рассчитывали значения относительного риска (OR). OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR>1 как фактор риска и OR<1 как фактор, предохраняющий от развития патологии.

Таблица 2

#### Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у пациентов со смешанной формой ХГН и здоровых лиц

Полиморфизм	Пациенты с СФ (n=24)	Здоровые (n=71)	OR	p
Arg/Arg	11 (45,8%)	35 (49,3%)	0,87	нд
Arg/Pro	10 (41,7%)	32 (45,1%)	0,87	нд
Pro/Pro	3 (12,5%)	4 (5,6%)	2,39	нд
Аллели				
Arg	0,667	0,718	0,78	нд
Pro	0,333	0,282	1,28	нд

Таблица 3

**Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у пациентов с гематурической формой ХГН и здоровых лиц**

Полиморфизм	Пациенты с ГФ (n=16)	Здоровые (n=71)	OR	p
Arg/Arg	3 (18,75%)	35 (49,3%)	0,10	нд
Arg/Pro	8 (50,0%)	32 (45,1%)	2,13	нд
Pro/Pro	5 (31,25%)	4 (5,6%)	6,28	0,007
Аллели				
Arg	0,409	0,718	0,27	нд
Pro	0,591	0,282	3,68	0,003

**Результаты и их обсуждение**

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у детей с разными формами ХГН представлены в табл. 1—3. Статистически достоверные различия получены только у больных с гематурической формой ХГН.

Поскольку нарушения в системе апоптоза приводят либо к усилению его и как следствие — к развитию склероза, либо к его угнетению, в результате которого преобладают пролиферативные процессы, то мы рассмотрели распределение генотипов p53 среди больных с пролиферативными и непролиферативными формами ХГН (табл. 4 и 5). При анализе распределения частот генотипов у больных ППН наблюдается отсутствие достоверных различий частот генотипов, однако частота выявления аллели Arg в этой группе достоверно выше, чем в контрольной группе. У больных НППН не отмечается значимых различий в сравнении со здоровыми людьми.

Белок p53 играет важную роль в регуляции транскрипции и поддержании геномной стабильнос-

ти и взаимодействует со многими клеточными белками. Показано, что повреждение ДНК приводит к накоплению p53, который, в свою очередь, блокирует прогрессирование клеточного цикла в фазе G1, таким образом препятствуя репликации ДНК до репарации повреждения. Если повреждение нерепарируемо, p53 приводит к апоптозу. Другой функцией белка p53 является повышение экспрессии провоспалительных медиаторов, таких как оксид азота и супероксиды, которые экспрессируются мезангиальными клетками [11]. Таким образом, выраженная мезангиальная пролиферация, которая может быть следствием активности противоапоптотических белков, одновременно стимулирует экспрессию проапоптотических протеинов, в том числе и p53 [12], запуская апоптоз. Действительно, при иммуногистохимическом изучении про- и противоапоптотических протеинов в ткани почек не было выявлено достоверных различий между экспрессией обеих групп белков [13]. Более того, степень выраженности Bcl-2 — противоапоптотического белка — у больных люпус-нефритом, фокально-сегментарным гломерулосклерозом и IgA-нефропатией коррелировала с выраженностью экспрессии гладкомышечного  $\alpha$ -актина (усиливающий процессы склероза) и степенью протеинурии [14]. Таким образом, опираясь на данные приведенных исследований, можно однозначно говорить, что процессы пролиферации и апоптоза идут «рука об руку», усиливая друг друга.

В нашем исследовании только у больных с гематурической формой ХГН было обнаружено достоверное повышение гомозиготных форм Pro/Pro в сравнении с контрольной группой. Аналогичные данные были получены Lee Y. и соавт. [15], предположившими, что Pro аллель является маркером риска развития волчанки. Однако, принимая во внимание, что гомозиготные формы Pro аллели предрасположены к пролиферативным процессам, легко объяснить полученные данные H.Soto и соавт. [16] о подавлении апоптоза у больных люпус-нефритом. Ве-

Таблица 4

**Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у больных пролиферативными нефритами и здоровых лиц**

Полиморфизм	Пациенты с ППН (n=28)	Здоровые (n=71)	OR	p
Arg/Arg	12 (42,85%)	35 (49,3%)	0,73	нд
Arg/Pro	11 (39,28%)	32 (45,1%)	0,73	нд
Pro/Pro	5 (17,85%)	4 (5,6%)	1,39	нд
Аллели				
Arg	0,517	0,718	1,69	0,01
Pro	0,483	0,282	2,43	0,01

Таблица 5

**Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg72Pro гена TP53 у пациентов с непролиферативными нефритами и здоровых лиц**

Полиморфизм	Пациенты с НППН (n=70)	Здоровые (n=71)	OR	p
Arg/Arg	36 (51,42%)	35 (49,3%)	0,97	нд
Arg/Pro	29 (41,42%)	32 (45,1%)	0,83	нд
Pro/Pro	5 (7,14%)	4 (5,6%)	1,2	нд
Аллели				
Arg	0,692	0,718	0,77	нд
Pro	0,308	0,282	1,28	нд

роятно, что именно высокая частота гомозиготных форм Pro аллели у пациентов с гематурической формой ХГН, морфологической основой которого является МПГН, обуславливает развитие данной формы ХГН. Однако нами не выявлена аналогичная ассоциация с МПГН и другими ПГН, клинической картиной которых была смешанная форма ГН, т. е. наряду с эритроцитурией в мочевом синдроме появляется значимая протеинурия. Как известно, персистирующая протеинурия является одним из неблагоприятных факторов прогрессирования ГН, и коррелирует со степенью активности апоптоза [13]. Это позволяет нам предположить, что у больных со смешанной формой ХГН, возможно, генетически детер-

минировано усиление апоптоза, что подтверждает достоверное повышение частот аллелей Arg в этой группе.

#### Заключение

Таким образом, наше исследование показало, что только гематурическая форма ХГН ассоциирована с гомозиготным вариантом аллели Pro. Данная Pro аллель может являться маркером риска развития указанной клинической формы ХГН, в то же время определяя ее благоприятное течение и исход. Отсутствие ассоциации полиморфизма гена р53 в 72 кодоне у больных с другими формами ХГН позволяет нам предположить влияние других генетических маркеров на их течение и прогноз.

#### ЛИТЕРАТУРА

См. online-версию журнала <http://www.pediatrjournal.ru> № 5/2006, приложение № 1.

© Коллектив авторов, 2006

Э.К. Петросян<sup>1</sup>, А.Н. Цыгин<sup>2</sup>, А.Е. Шестаков<sup>3</sup>, В.В. Носиков<sup>3</sup>

## РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 4 И 13 В РАЗВИТИИ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА С МИНИМАЛЬНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

<sup>1</sup> Российский государственный медицинский университет, <sup>2</sup> Научный центр здоровья детей РАМН,  
<sup>3</sup> Государственный научно-исследовательский институт «Генетика», Москва

Впервые исследована роль полиморфизма генов ИЛ4 и ИЛ13 у детей с нефротическим синдромом с минимальными изменениями (НСМИ). В результате исследования обнаружено, что у больных данной категории отмечается достоверная ассоциация с гомозиготным генотипом AA в локусе G4257A ИЛ13. Распределение частот генотипов ИЛ4 не отличалось от контрольной группы. Авторы считают, что гомозиготный генотип AA в полиморфном локусе G4257A гена ИЛ13 может рассматриваться и как маркер развития атопической реакции в генезе НСМИ, и как маркер предрасположенности к стероидчувствительному нефротическому синдрому.

Role of IL4 and IL13 genes polymorphism in cases of pediatric minimal change nephrotic syndrome (MCNS) was studied in first time. The study showed that patients of this group demonstrated significant association with homozygous genotype AA in locus G4257A IL13. Distribution of IL4 genotypes rates was similar with control. Authors suppose that homozygous AA genotype in polymorphous locus G254A IL13 gene can be estimated both as marker of atopic reactions development in MCNS genesis, and marker of predisposition to steroid-sensitive nephritic syndrome development.

Нефротический синдром (НС) с минимальными изменениями (НСМИ) — наиболее частая форма среди всех форм гломерулонефрита (ГН) в детском возрасте, который характеризуется массивной протеинурией, гипоальбуминемией, гиперхолестеринемией и отеками. В патогенезе НСМИ лежит дисфункция Т-лимфоцитов [1]. Считается, что повреждение фильтрационного барьера при НСМИ связано с действием Т-клеточного фактора проницаемости сосудов, обнаруженного у боль-

ных с НС [2]. Иммунологическая несостоятельность на фоне различных инфекций и вакцинаций, приводящая к активности Т-клеток, продуцирующих ряд цитокинов, обуславливает развитие НСМИ [3].

В настоящее время известно, что НСМИ связан с гиперпродукцией ИЛ4 и ИЛ13 [4]. При этом доказано, что при НСМИ экспрессия ИЛ13 выше ИЛ4 [5]. Оба эти цитокина играют большую роль в развитии атопических заболеваний и определяют высо-

ЛИТЕРАТУРА

1. Ortiz A., Lorz C., Egido J. // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 1999. — Vol. 14.— P. 1831 —1834.
2. Baker A.J., Mooney A., Hughes J. et al. // *J. Clin. Invest* — 1994 — Vol. 94.— P. 2105—2116.
3. Shimuzu A., Masuda Y., Kitamura H. et al. // *Nephron.* — 1998. — Vol.79.— P. 206—214.
4. Takemura T., Murakami K., Miyazato H. et al. // *Kidney Int.* — 1995 .— Vol. 48. — P. 1886—1892.
5. Sugiyama H., Kashihara N., Makino H. et al. // *Kidney Int.* — 1996 — Vol. 49. — P. 103—111.
6. Vogelstein B., Kinzler K.W. // *Cell.*— 1992.— Vol.70.— P. 523—526.
7. Choisy-Rossi C., Reisdorf P., Yonish-Rouach E. // *Toxicol. Lett.* — 1998. — Vol. 102. — P. 491—496.
8. Ara S., Lee P.S.Y., Hansen M.F. et al. // *Nucleic Acids Res.* — 1990.— Vol. 18.— P. 4961—4967.
9. Sakamuro D., Sabbatini P., White E. et al. // *Oncogene.* — 1997.— Vol. 15.— P. 887—898.
10. Matlashewski G.J., Tuck S., Pim D. et al. // *Mol. Cell Biol.* — 1987.— Vol. 7.— P. 961—963.
11. Qun Qiu L., Sinniah R., Hong Hsus S. // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2004.— Vol. 15.— P. 2066—2078.
12. Sandau K., Pfeilschifter J., Brune B. // *Kidney Int.* — 1997. — Vol. 52. — P. 378—386.
13. Uguz A., Gonlusen G., Ergin M., Tunger L. // *Nephrology.* — 2005.— Vol.10.— P. 311—316.
14. Uda S., Yoshimura A., Sugeno Y. et al. // *Am. J. Nephrol.* — 1998.— Vol. 18.— P. 291—295.
15. Lee Y.H., Rho Y.H., Choi S.J. et al. // *Lupus.* — 2005.— Vol. 14.— P. 842—845.
16. Soto H., Mosquera J., Rodrigues-Iturbe B. et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 1997.— Vol. 12. — P. 273—280.