

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. Петросян¹, А.Н. Цыгин², А.Е. Шестаков³, В.В. Носиков³

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

¹ Российский государственный медицинский университет, ² Научный центр здоровья детей РАМН,
³ 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-

кую концентрацию IgE в крови. Высокая концентрация IgE и IgG₄ у больных с НСМИ выявлена во многих исследованиях и, по мнению Kimata и соавт. [5], обусловлена экспрессией Т-клетками ИЛ4 и ИЛ13. Более того, обнаруженные рецепторы к этим цитокинам на подоцитах и их выраженная экспрессия при НСМИ подтверждают роль последних в патогенезе данного заболевания.

В последнее десятилетие большое внимание уделяется изучению генов, регулирующих синтез ИЛ4 и ИЛ13. С полиморфизмом определенных локусов данных генов связывают многие атопические заболевания и высокую концентрацию IgE [6]. При изучении полиморфизма ИЛ4 и его рецептора Kobayashi Y. и соавт. [7] обнаружили ассоциацию с аллелью С в промоторной области (С-590Т) гена ИЛ4 у больных со стероидчувствительным НС. Acharya B. и соавт. [8], изучая полиморфизм генов ИЛ4 и ИЛ13, получили достоверную ассоциацию ТТ генотипа ИЛ4 в промоторной области (С-590Т) и снижение частот GG генотипа в 4 экзоне гена ИЛ13 (G4257A) у детей с НСМИ. Однако Parry и соавт. [9], изучая полиморфизм гена рецептора ИЛ4 и самого цитокина, не получили никаких ассоциаций между последними и стероидчувствительным НС. Столь разноречивые данные обусловили необходимость нашего исследования по изучению полиморфизма генов ИЛ4 в промоторной области (С-590Т) и ИЛ13 в 4 экзоне (G4257A) у больных с разным течением НСМИ.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены у 73 больных с НСМИ в возрасте от 1 года до 18 лет (24 девочки и 49 мальчика). Среди обследованных детей с НС острое течение заболевания наблюдалось у 5, часто рецидивирующее течение имели 23 пациента с положительным ответом на стероидную терапию, у 41 ребенка отмечалось персистирующее течение со стероидзависимостью и у 4 больных наблюдалось хроническое течение с отсутствием ответа на стероидную терапию. Нефробиопсия была проведена 14 больным, среди которых 4 были дети со стероидрезистентной формой НС, остальные — со стероидзависимой формой.

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

В качестве популяционного контроля использовали выборку из 70 человек (39 мужчин и 31 женщина) в возрасте от 27 до 78 лет (средний возраст 50,1±16,5 лет) без хронических заболеваний почек и аллергических реакций.

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,

pH 8,8, 16,6 мМ сульфат магния, 1,5 мМ хлорид магния, 0,01% твин-20, 10% диметилсульфоксид, по 33 нг праймеров (ИЛ4F5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3' и ИЛ4-R5'-TGGGGAAAGATAGAGTAATA-3) или (ИЛ13F5'-TGGCGTTCTACTCACGTG-3' и ИЛ13R5'-TTTTCGAAG-7TTTCAGTGGAAC-3'), 1,5 ед. полимеразы Taq, 50—100 нг геномной ДНК. Условия амплификации фрагмента ДНК: 94 °С/2 мин — 1-й цикл; 94 °С/20 с, (57 °С для ИЛ4 или 58 °С для ИЛ13) /40 с, 72 °С/20 с — 35 циклов; 72 °С/6 мин — последний цикл. Размер продукта амплификации: 195 последовательностей нуклеотидов (п. н.) для участка, содержащего полиморфный маркер С(-590)Т гена ИЛ4, и 154 п. н. для участка, содержащего полиморфный маркер G4257A гена ИЛ13.

Аллели полиморфного маркера С(-590)Т гена ИЛ4 определяли, обрабатывая амплифицированный фрагмент ДНК рестриктазой Eco47I (Fermentas, Литва) (инкубация при 37 °С 3 ч, 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 ИЛ13 выявляли, расщепляя фрагмент ДНК рестриктазой BspI (Fermentas, Литва) (инкубация при 37 °С 3 ч, 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 [11]. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой MspI.

Статистический анализ проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия Фишера. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Для описания относительного риска развития заболевания рассчитывали отношение шансов (OR). Вычисления производили с помощью программы Calculator for confidence intervals of odds ratio (David Hutchon). OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR>1 — как положительную ассоциацию («повышенный риск развития патологии»), OR<1 — как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием («пониженный риск развития патологии»). Также рассчитывали величину доверительного интервала (CI, confidence interval) — интервала значений, в пределах которого с вероятностью 95% находится ожидаемое значение рассматриваемого параметра, в данном случае, значение OR.

Результаты и их обсуждение

Роль аллергической реакции I типа — IgE-реактивного типа — у больных с НСМИ доказана. Нами изучена ассоциация между потенциальными генетическими вариантами ИЛ4 и ИЛ13 и развитием НСМИ у больных. Мы не выявили ассоциации полиморфного маркера С-590Т с развитием НСМИ (табл. 1). Роль полиморфизма гена ИЛ4 в генезе атопической

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера С-590Т гена ИЛ4 у больных с НСМИ в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные с НСМИ (n=73)	Контрольная группа (n=70)	p	OR	95% CI
Аллель С	0,315	0,255	>0,05	—	—
Аллель Т	0,685	0,745	>0,05	—	—
Генотип С/С	4 (5,47%)	4 (5,71%)	>0,05	0,63	—
Генотип С/Т	47 (64,4%)	35 (50,01%)	>0,05	0,09	—
Генотип Т/Т	22 (30,13%)	31 (44,28%)	>0,05	—	—

реакции не однозначна. Так, Kawashima и соавт. [12] продемонстрировали, что гомозиготная форма Т аллели ИЛ4 ассоциирована с атопическим дерматитом в японской популяции. По данным Kobayashi и соавт. [7], у больных с НСМИ, напротив, наблюдалось уменьшение частот гомозиготных генотипов ТТ в промоторной области ИЛ4. Среди больных с НСМИ индонезийской популяции отмечается уменьшение частот генотипов СС [8]. Изучая полиморфизм ИЛ4 в промоторной области у больных с НСМИ в английской популяции, Parry и соавт. [9] не выявили различий между распределением генотипов и аллелей в сравнении с контрольной группой. Аналогичные результаты получены и нами. Столь противоречивые данные по полиморфизму ИЛ4 в промоторной области С-590Т позволили нам предполагать, что данный полиморфный маркер не влияет на синтез ИЛ4 у больных с НСМИ и не может рассматриваться как маркер предрасположенности к последнему.

Ассоциация полиморфного маркера ИЛ13 в локусе G4257A отмечена у больных с бронхиальной астмой [13], атопическим дерматитом [14] и повы-

шением концентрации IgE [6], ИЛ13 [15]. В нашем исследовании получена достоверная ассоциация гомозиготного генотипа АА с НСМИ (табл. 2). Обобщая выше изложенное, мы можем предположить, что повышенная концентрация IgE и ИЛ13 у больных с НСМИ определяется наличием генотипа АА в локусе G4257A гена ИЛ13.

Заключение

Нами изучен полиморфизм генов ИЛ4 и ИЛ13 у больных с НСМИ в российской популяции. Мы не обнаружили достоверных отличий между распределением генотипов в промоторной области С-590Т ИЛ4 у данной категории больных в сравнении с контрольной группой, что позволяет нам исключить данный полиморфизм как маркер риска развития НС в детском возрасте. Однако статистически достоверная ассоциация генотипа АА в полиморфном локусе G4257A гена ИЛ13 с НСМИ может рассматриваться как маркер развития атопической реакции в генезе данного заболевания, а также как маркер предрасположенности к стероидчувствительному НС.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G4257A гена ИЛ13 у больных с НСМИ в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Больные с НСМИ (n=73)	Контрольная группа (n=70)	p	OR	95% CI
Аллель А	0,844	0,745	>0,05	—	—
Аллель G	0,156	0,255	>0,05	—	—
Генотип А/А	57 (78,08%)	39 (54,9%)	0,0117	3,12	1,28—7,59
Генотип А/G	9 (12,32%)	27 (39,2%)	0,0011	0,18	0,06—0,53
Генотип G/G	7 (9,6%)	4 (5,9%)	>0,05	—	—

ЛИТЕРАТУРА

См. online-версию журнала <http://www.pediatricjournal.ru> № 5/2006, приложение № 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Niaudet P. // *Curr. Opin. Pediatr.*— 1993.— Vol. 5.— P. 174—179.
2. Tomizawa S., Maruyama K., Nagasawa N. et al. // *Nephron.* — 1985.— Vol. 41.— P. 157—160.
3. Meadow S.R., Sarsfield J.K. // *Arch. Dis. Child.* — 1981.—Vol. 56.— P. 57—64.
4. Laurent J., Rostoker G., Robeva R. et al. // *Nephron.* — 1987.—Vol. 47.— P. 7—11.
5. Kimata H., Fujimoto M., Furusho K. // *Eur. J. Immunol.* — 1995.— Vol. 25.— P. 1497—1501.
6. Liu X., Beaty T.H., Deindl P. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003.— Vol. 112.— P 382—388.
7. Kobayashi Y., Arakawa H., Suzuki M. // *Am. J. Kidney Dis.* — 2003.— Vol. 42.— P. 271—276.
8. Acharya B., Shirakawa T., Pungky A. et al. // *Am. J. Nephrol.* — 2005.— Vol. 25.— P. 30—35.
9. Parry R.G., Gillespie K.M., Parhnam A. et al. // *Clin. Science.* — 1999.— Vol. 96.— P. 665—668.
10. Mathew C.G.P. // *Humana Press.*— 1984.— Vol. 2.— P. 31—34.
11. Sajantilla A., Budowle B., Strom M. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1992.— Vol. 50.— P. 816—825.
12. Kawashima T., Noguchi E., Arinami T. et al. // *J. Med. Genet.* — 1998.— Vol. 35.— P. 502—504.
13. Heinzman A., Jerkic S.P., Ganter K. et al. // *Hum. Mol. Genet.* .— 2000.— Vol. 9.— P. 549—559.
14. Kruse S., Japha T., Tedner M. et al. // *Immunology.* — 1999.— Vol. 96.— P. 365—371.
15. Arima K., Imeshita-Suyama R., Sakata Y. et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2002. — Vol. 105.
— P. 980—987.