

Ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie poznanych mutacji w genie NPHS2 u dzieci z zespołem nerczycowym

Małgorzata JARONIEC

Danuta OSTALSKA-NOWICKA

Magdalena ŚMIECH

Aldona SIWIŃSKA

Jacek ZACHWIEJA

*Michał NOWICKI

Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej

* Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Kliniki:
prof. dr hab. n. med. Aldona Siwińska

Słowa kluczowe:

- zespół nerczycowy
- steroidooporność
- polimorfizmy SNP

Key words:

- nephrotic syndrome
- steroidoresistance
- SNP polymorphisms

U podłoża zespołu nerczycowego u dzieci leżą zmiany molekularne białek powiązanych z podocytami. Najczęstsze anomalie strukturalne bariery filtracyjnej powiązane ze zmianami w genie NPHS2. Opisano wiele mutacji i polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w różnych rejonach świata. Celem pracy była analiza wybranych sześciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w kodujących rejonach genu NPHS2 u dzieci z zespołem nerczycowym i u osób z populacji kontrolnej oraz wykazanie ewentualnych różnic w częstości poszczególnych alleli i genotypów badanych SNP u pacjentów z ZN oraz osób zdrowych. Ponadto, celem pracy było skorelowanie zmian genetycznych podocyny z przebiegiem klinicznym zespołu nerczycowego. Wyniki: wykazano obecność allelu C w SNP rs3818587 u 5 z 16 pacjentów ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, którzy nie uzyskali trwałej remisji białkomoczu oraz u 3 z 12 pacjentów ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym. Wnioski: obecność SNP rs3818587 wskazuje na asocjację z rozwojem ZN u dzieci z rejonu Wielkopolski i nie może stanowić czynnika rokowniczego terapii immunosupresyjnej u dzieci z ZN. Natomiast ujawnienie SNP rs3818587 u pacjentów ze steroidoopornym zespołem nerczycowym może sugerować modyfikację leczenia immunosupresyjnego na korzyść inhibitorów kalcyneuryny.

(NEFROL. DIAL. POL. 2010, 14, 111-115)

Analysis of single nucleotide polymorphisms localized within the neighborhood of gene NPHS2 mutations in children with nephrotic syndrome

Molecular alterations underlying nephrotic syndrome are connected with podocyte proteins. Structural malformations of filtration barrier were most often identified within NPHS2 gene. Variable mutations and polymorphisms were profiled depending on population analyzed. The aim of this study was to analyze six chosen single nucleotide polymorphisms localized within coding regions of NPHS2 gene in children suffering from nephrotic syndrome, and compared with control population in order to define significant differences in frequencies of alleles and genotypes of SNPs between two groups. Additionally, correlation of genetic changes with clinical outcome of NS was analyzed. Results: C variant of rs3818587 was detected in 5 out of 16 steroido-resistant NS patients without total remission and in 3 out of 12 steroid-sensitive NS patients. Conclusions: C genotype of rs3818587 in NPHS2 gene correlates with NS in children from Wielkopolska, and it cannot be regarded as potential prognostic marker of immunosuppressive therapy in NS patients. However, presence of rs3818587 variant in steroid-resistant NS patients may suggest modification of immunosuppressive therapy towards calcineurin inhibitors.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2010, 14, 111-115)

*Praca finansowana jest ze środków na naukę
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
przyznanych w latach 2008-2011.
Nr NN 401 00 60 35*

Wstęp

Zespół nerczycowy u dzieci charakteryzuje się nadmierną utratą białka (powyżej 50 mg/kg/24h), następstwem którego są: obrzęki, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, obniżenie stężenia antytrombiny III oraz hiperlipidemia [1]. Najczęstszą przyczyną białkomoczu u dzieci jest idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN), u podłoża którego opisy-

wane są zaburzenia odpowiedzi humoralnej i komórkowej prowadzące do przebudowy ultrastruktury podocytów, kluczowych komórek w barierze filtracyjnej kłębuszków nerkowych [2,3]. Zastosowanie leków przeciwzapalnych, w tym glikokortykosteroidów (GK) prowadzi do remisji klinicznej (ustąpienie obrzęków) oraz biochemicznej (białkomoczu < 150 mg w dobowej zbiórce moczu

Adres do korespondencji:

Szpital Kliniczny im. Karola Jonschera
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
60-572 POZNAŃ UL. Szpitalna 27/33
Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej
Tel. (061) 8491-448, fax (061) 8480-403
e-mail: malgorzata.jaroniec@gmail.com

(DZM) oraz normalizacja parametrów biochemicznych surowicy pacjentów)[4]. U dzieci w ponad 90% IZN jest steroidowrażliwy, a pozostały odsetek stanowi steroido-oporny zespół nerczycowy (SOZN). Przebieg kliniczny I rzutu ZN stanowi właściwe rozpoznanie i może wskazywać na dalszy przebieg ZN. I rzut ZN, który nie odpowiada na leczenie GK (steroido-oporny ZN), jest wskazaniem do zintensyfikowanie leczenia GK w postaci dożylnych wlewów [5,6]. Taka terapia ma na celu indukować remisję, ale nierzadko prowadzi do ujawniania się licznych objawów ubocznych GK [7] bez trwałej remisji ZN. Natomiast zastosowanie leczenia inhibitorami kalcyneuryny (IK) powodowało poprawę kliniczną oraz ustąpienie białkomoczu, gdyż działanie IK charakteryzuje się nie tylko immunosupresyjnym efektem ale również mechanicznym zmniejszeniem filtracji kłębuszka nerkowego [8]. Obserwacje kliniczne, a przede wszystkim badania molekularne doprowadziły do selekcjonowania wielu białek w obrębie bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego (błony komórkowej i cytoplazmy podocytów oraz w błonkach szczelinowatych). Defekty tych molekuł powiązane z występowaniem ZN szczególnie opornym na leczenie immunosupresyjne. Spośród długiej listy poznanych białek związanych z podocytami najlepiej opisano następujące cząsteczki: nefrynę (NPHS1), podocynę (NPHS2), białko CD2AP i alfa aktyninę 4 (ACTN4) [9-11]. Ponadto, powiązane szeregiem zmian w genach wymienionych białek z występowaniem zespołu nerczycowego w różnym wieku rozwojowym. Szczególnie ciekawe wydają się wyniki wielu prac pochodzących z różnych ośrodków dotyczących zaburzeń ekspresji genu NPHS 2 u pacjentów z ZN. Szacuje się, że od 30 do 40 % pacjentów z SOZN (odpowiednio sporadycznym i rodzinnym SOZN) wykazuje liczne zmiany w genie dla NPHS 2 [10]. Miejsca występowania mutacji w genie wskazują rejony nici DNA, które są istotne w patogenezie zespołu nerczycowego. Najczęściej opisywane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) znajdują się w rejonach potencjalnie narażonych na wystąpienie mutacji w genie NPHS 2. Ponadto analiza takich polimorfizmów może pozwolić na uzyskanie informacji o zmianach w genomie, które powodują rozwój zespołu nerczycowego, bez potrzeby sekwencjonowania genu. Takie podejście do analizy molekularnego podłoża ZN jest nowatorskie, ale istnieje ryzyko, że badanie SNP nie będzie korelowało z różnym obrazem częstości alleli u pacjentów z zespołem nerczycowym w odniesieniu do populacji kontrolnej. Ponadto, bliskość fizyczna na mapie genomowej, wyrażona w parach zasad, nie musi być jednoznaczna ze sprzężeniem genetycznym, czyli wspólnym dziedziczeniem danych cech genetycznych. Powiązanie zmian w obrębie wspomnianych białek z zespołem nerczycowym pozwala sklasyfikować ZN jako chorobę o potencjalnym podłożu genetycznym. Wśród tej grupy chorób wyróżnia się choroby monogenowe, takie jak mukowiscydoza, oraz złożone, których rozwój powiązany jest grupą genów pełniących niejednokrotnie bardzo zróżnicowane funkcje. O ile choroby monogenowe zostały dobrze

Tabela I

Dane kliniczne pacjentów z grupy badanej.

Clinical data of patients from studied group.

Pacjent	Wiek	Płeć	Rozpoznanie kliniczne	Biopsja nerki	Czas trwania choroby (lata)	Dotychczasowe leczenie	Remisja ZN
1 *	9	M	SOZN	MP, GS	3	GK, CF, CsA, MMF	PR
2 *	11	M	SOZN	MP	5	GK, CsA, MMF	PR
3	6	K	SOZN	N, MP	4	GK, CF, CsA, MMF	CR
4	8	M	SWZN; (SZZN)	N, MP	5	GK, CF	CR
5	9	K	SOZN	MCD	<1	GK, CsA, MMF	PR
6	18	K	SOZN	MPGM	3	GK, CsA, MMF	PR
7	6	M	SWZN	MP	3	GK	CR
8	3	M	SWZN	Brak biopsji	<1	GK	CR
9	8	K	SWZN	Brak biopsji	<1		
10	11	M	SOZN	MCD	9	GK, CF, CsA, MMF	CR
11	17	M	SOZN	MP	10	GK, CF, CsA, MMF	PR
12	15	M	SOZN	MP	13	GK, CF, CsA	CR
13	9	K	SWZN	Brak biopsji	6	GK	CR
14	17	M	SOZN	MP	2	GK, CsA, MMF	PR
15	19	K	SOZN	FSGS	18	GK, CF, CsA, MMF	CR
16	16	K	SWZN	FSGS	1	GK, MMF	CR
17	2	M	SWZN	Brak biopsji	<1	GK	CR
18 *	15	M	SOZN	MP	2	GK, CsA	CR
19	12	K	SOZN	MCD	<1	GK, CsA	PR
20	11	K	SWZN	MCD, N	9	GK, CF	CR
21	2	K	SWZN	Brak biopsji	<1	GK	CR
22 *	17	M	SWZN (SZZN)	MP	1	GK, CsA	CR
23	18	K	SOZN	MP	16	GK, CF, CsA, MMF	CR
24	2	K	SOZN	MP	1	GK, CsA	PR
25 *	7	M	SWZN (I rzut ZN)	Brak biopsji	1	GK	CR
26 *	19	M	SOZN	FSGS	17	GK, CF, CsA	CR
27 *	11	M	SOZN (I rzut ZN)	FSGS	<1	GK	Brak remisji
28 *	3	M	SWZN (SZZN, II rzut ZN)	Brak biopsji	<1	GK	CR

Legenda do tabeli

* -obecność wariantu C w SNP rs3818587; M-męska, Ż-żeńska

ZN- zespół nerczycowy, SZZN- steroidozależny ZN, SWZN- steroidowrażliwy ZN, SOZN-steroido-oporny zespół nerczycowy. Biopsja nerki (rozpoznanie histologiczne): Mezngialna proliferacja (MP), Zmiany minimalne (ang. minimal change disease, MCD), wykładniki morfologiczne niedojrzałość kłębuszków nerkowych (N), glomeruloskleroza (GS), Błoniasto rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. Membrane proliferative glomerulonephritis, MPGN), Ogniskowo-segmentalna sklerotyzacja kłębuszków nerkowych(ang. focal segmental glomerulosclerosis, FSGS), GK- glikokortykosteroidy, CF- cyklofosfamid, MMF- mykofenolan mofetylu, CsA- cyklosporyna A CR -całkowita remisja, PR- częściowa remisja (ang. partial remission)

Tabela II

Informacje dotyczące lokalizacji badanych SNP w genie podocyny oraz odległości od znanych mutacji w genie, opisanych u pacjentów z ZN.

Information about localization of analyzed SNPs in podocin gene with distances from known mutations associated with nephrotic syndrome in podocin.

Lp.	Nazwa SNP	Lokalizacja w genie	Bliskość mutacji	Odległość od mutacji (pz)
1	rs2026014	Promotor	Brak	
2	rs3829795	Promotor	Brak	
3	rs12568913	Exon 5	V180atg Q215X	47 56
4	rs5005771	Exon 8	A297V E310V	1 37
5	rs3818587	Exon 8	R322G	73
6	rs4399118	Exon 8	R322G	170

poznane, to choroby złożone wciąż nie zostały w pełni poznane. Odkryto, iż udział poszczególnych genów w chorobach złożonych nie musi oznaczać obecności mutacji, ale może wiązać się z odmienną częstością występowania zmienionych wariantów SNP [11,12]. Do chorób złożonych zalicza się min. nowotwory, alergie, reumatoidalne zapalenie stawów, oraz najprawdopodobniej zespół nerczycowy [13].

Celem badania była analiza wybranych sześciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w kodujących rejonach genu NPHS 2 u dzieci z zespołem nerczycowym i u osób z populacji kontrolnej oraz wykazanie ewentualnych różnic w częstości poszczególnych alleli i genotypów badanych SNP u pacjentów z ZN oraz osób zdrowych. Ponadto, celem pracy było skorelowanie zmian genetycznych podocyny z przebiegiem klinicznym zespołu nerczycowego.

Materiały i metody

Grupę badaną stanowiło 28 pacjentów: 57% chłopców (n=16) i 43% dziewcząt (n=12) w wieku od 2 do 19 lat (średnia 10,8; mediana 11) hospitalizowanych z powodu zespołu nerczycowego w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W rozpoznaniu klinicznym stwierdzono: steroidooporny ZN (SOZN, n=16), steroidozależny ZN (SZZN, n=3) oraz steroidowrażliwy ZN (SWZN, n=9). Szczegółowe informacje dotyczące grupy badanej zestawiono w tabeli I.

Grupę kontrolną stanowiło 90 osób (płeć żeńska n=38, płeć męska n=52) (ochotnicy, n=21 i dzieci z Kliniki Otolaryngologii Dziecięcej UM w Poznaniu, n=69) z polskiej populacji, z województwa wielkopolskiego w wieku od 3 do 40 lat (średnia 12,5; mediana 9), u których nigdy nie wystąpiły objawy zespołu nerczycowego ani białkomoczu. Ponadto w rodzinach tych pacjentów nie opisywano ZN oraz chorób nerek. Każda z tych osób miała wykonaną analizę ogólną moczu, która mieściła się w granicach przyjętych norm [14], badania moczu obejmowały następujące parametry: pH, ciężar właściwy, białko, glukoza, liczba erytrocytów i leukocytów w osadzie moczu.

Badania przeprowadzono, po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz podpisaniu ankiety przez uczestników badania i ich opiekunów.

Materiał badawczy stanowiło 200 µl krwi obwodowej uzyskanej w trakcie rutynowych badań. Z krwi obwodowej izolowano następnie całkowity jądrowy DNA pochodzący z leukocytów przy zastosowaniu zestawu QIAamp DNA Mini Blood firmy QIAGEN bazującego na kolumnach ze złożem krzemionkowym. W celu analizy SNP wykorzystano system sond typu TaqMan firmy Applied Biosystems oparty o fluorescencyjnie wyznaczone startery komplementarne do jednej z dwóch odmian polimorfizmu SNP. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem termocyklera Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR, na płytach 384 w objętości 5 µl. Dla każdego badanego polimorfizmu, w mieszaninie reakcyjnej oprócz starterów służących do namnożenia fragmentu PCR, znajdowały się dwie sondy, służące do wykrycia allelu natywnego oraz zmienionego w danym locus genowym [15]. Sondy wyznaczone były różnymi

Tabela III

Zestawienie otrzymanych wyników dotyczących częstości alleli oraz genotypów w obu badanych grupach. Information about allele and genotype frequencies in both analyzed groups.

Nazwa SNP	rs2026014	rs3829795	rs12568913	rs5005771	rs3818587	rs4399118
Grupa badana						
Częstość alleli	A: 1.00	A: 0.67	A: 0.50	C: 1.00	C: 0.14	A: 0.00
	T: 0.00	G: 0.33	G: 0.50	T: 0.00	T: 0.86	G: 1.00
Częstość genotypów	AA: 1.00	AA: 0.00	AA: 0.00	CC: 1.00	CC: 0.00	AA: 0.00
	TT: 0.00	GG: 0.34	GG: 0.00	TT: 0.00	TT: 0.72	GG: 1.00
	AT: 0.00	AG: 0.66	AG: 1.00	CT: 0.00	CT: 0.28	AG: 0.00
Grupa kontrolna						
Częstość alleli	A: 1.00	A: 0.28	A: 0.50	C: 1.00	C: 0.07	A: 0.00
	T: 0.00	G: 0.72	G: 0.50	T: 0.00	T: 0.93	G: 1.00
Częstość genotypów	AA: 1.00	AA: 0.00	AA: 0.00	CC: 1.00	CC: 0.00	AA: 0.00
	TT: 0.00	GG: 0.44	GG: 0.00	TT: 0.00	TT: 0.85	GG: 1.00
	AT: 0.00	AG: 0.56	AG: 1.00	CT: 0.00	CT: 0.15	AG: 0.00

Tabela IV

Obliczenia ilorazu szans (OR) dla polimorfizmu SNP rs3818587.

Calculations of odds ratio value for SNP polymorphism rs3818587.

	Narażenie na czynnik ryzyka (obecność allelu A)		
	Tak	Nie	Suma
Grupa badana (n=56 alleli, 28 osób)	8 (a)	48 (b)	56 (a+b)
Grupa kontrolna (n=162 allele, 81 osób)	12 (c)	150 (d)	162 (c+d)
Suma (n=218 alleli, 109 osób)	20 (a+c)	198 (b+d)	218 (a+b+c+d)
OR = (axd)/(cxb) = 2.08			

barwnikami: VIC oraz FAM, które po wzbudzeniu emitują światło różnej długości, dzięki czemu możliwe było rozróżnienie dwóch alleli w jednej reakcji. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem odczynników Applied Biosystems (20x SNP genotyping assay oraz 2xTaqMan Universal PCR Master Mix). System sond typu TaqMan wykorzystano w celu analizy 6 polimorfizmów SNP. Informacje o lokalizacji SNP oraz bliskości znanych mutacji w genie podocyny zawarte zostały w tabeli II.

Metody analizy genetycznej i statystycznej

Badanie polimorfizmów SNP ma na celu uchwycenie różnic w częstości występowania zmienionych alleli pojedynczego nukleotydu w grupie pacjentów cierpiących na daną jednostkę chorobową, w odniesieniu do populacji kontrolnej [16]. Znalazienie istotnych statystycznie różnic stanowić może nie tyle o roli polimorfizmu w zachorowaniu na chorobę, lecz w podatności na zachorowanie.

Istnieje kilka modeli prowadzenia badań genetycznych uwzględniających udział grupy badanej oraz kontrolnej, opisywane badania dotyczą modelu badań porównawczych przypadków (ang. case-control studies). Badania takie polegają na zdefiniowaniu pewnego czynnika ryzyka, w tym przypadku jest to polimorfizm SNP w genie podocyny, który może zwiększać podatność na rozwój zespołu nerczycowego. Wybór czynnika ryzyka oparty jest o uzyskane częstości alleli oraz genotypów badanych SNP. Przeprowadzona analiza sześciu polimorfizmów SNP w genie podocyny pozwoliła na uzyskanie informacji, czy wybrane SNP są istotne dla podatności na rozwój ZN u dzieci z polskiej populacji, regionu Wielkopolski.

Pierwszym etapem oceny uzyskanych wyników genotypowania jest ustalenie, czy częstości genotypów spełniają prawo równowagi Hardy-Weinberga (ang. Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE) [17]. Dopiero, gdy ten warunek jest spełniony, możliwe są dalsze obliczenia prowadzące do określenia, czy badany SNP jest istotny dla podatności na zachorowanie, co wyrażone jest poprzez współczynnik tzw. iloraz szans (ang. odds ratio, OR), który jest wartością względną. OR jest wartością, która wyraża, czy badany potencjalny czynnik ryzyka rzeczywiście zwiększa podatność na wystąpienie choroby, czy też jego występowanie nie różni się istotnie w grupie badanej i kontrolnej. OR oblicza się ze wzoru: $OR(\text{exp})/OR(\text{unexp})$, gdzie $OR(\text{exp})$ to szansa bycia w grupie badanej nie posiadając czynnika ryzyka, zaś $OR(\text{unexp})$ to szansa bycia w grupie badanej posiadając czynnik ryzyka. Wartość OR równa 1 oznacza, że ryzyko zachorowania jest takie samo w grupie narażonej na czynnik ryzyka jak i w grupie nie narażonej. Z kolei, wartość $OR = 0.2$ informuje, iż badany wariant SNP jest czynnikiem ochronnym przed zachorowaniem, ryzyko zachorowania w grupie narażonej na czynnik jest mniejsze niż w grupie nie narażonej, zaś $OR = 2.7$ jest wynikiem przeciwnym i wskazuje na wzrost podatności na zachorowanie, ryzyko zachorowania w grupie narażonej na czynnik jest większe niż w grupie nie narażonej.

Wyniki

Wszystkie dzieci z grupy badanej w wieku od 2. do 19. roku życia pochodzą z polskiej populacji, regionu Wielkopolski. U

wszystkich pacjentów wykluczono obecność we krwi obwodowej autoprzeciwciał (tj. ANA, ANCA, dsDNA). Ponadto, u krewnych wszystkich pacjentów w grupie badanej nie obserwowano zespołu nerczycowego. Dane kliniczne dzieci w grupie badanej zestawiono w tabeli 1. Ośmiu pacjentów (płci męskiej) z grupy badanej (8/28) ujawniło nieprawidłowości w strukturze genu NPHS 2. Żadne z dzieci z ww. zmianami genetycznymi nie miało pierwszego rzutu ZN przed ukończeniem 2. roku życia. Rozpoznanie kliniczne choroby nerek dzieci, u których ujawniono polimorficzne SNP w genie NPHS 2, były następujące: SOZN (n=5; 5/16; 32%) i SWZN (n=3; 3/12, 40%). Wśród trzech pacjentów z SWZN dwóch chłopców miało przebieg SZZN. Remisję kliniczną i biochemiczną białkomoczu obserwowano u wszystkich pacjentów z SWZN (n=13), natomiast u pacjentów z SOZN (n=16) ośmiu dzieci wykazało częściową remisję (PR), siedmiu całkowitą remisję (CR) kliniczną i biochemiczną a jeden pacjent wykazał oporność na leczenie immunosupresyjne. Wśród pacjentów z SOZN i zmianami genetycznymi w genie podocyny (n=5) dwóch pacjentów wykazało całkowitą i dwóch chłopców częściową remisję kliniczną i biochemiczną ZN w trakcie leczenia inhibitorami kalcyneryny. Jeden pacjent z SOZN i polimorfizmem dla genu NPHS 2 prezentował wszystkie wykładniki ZN w trakcie czteromiesięcznego leczenia (pierwszy rzut ZN). U żadnego z pacjentów nie doszło do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Wśród pacjentów wykluczono choroby o podłożu genetycznym towarzyszące zespołom nerczycowym. Do wykluczonych schorzeń zalicza się: głuchotę, ślepotę, małogłowie, opóźnienie psychoruchowe, cukrzyca typu I i II, dysmorfie twarzy, sześciopalczałość, dysplazję kręgowo-nasadową, choroby pęcherza moczowego. Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem sond typu TaqMan pozwoliła na poznanie częstości alleli oraz genotypów sześciu wybranych polimorfizmów SNP w genie podocyny u pacjentów z ZN oraz w polskiej populacji kontrolnej. Szczegóły dotyczące lokalizacji badanych SNP w genie NPHS1 oraz odległości od znanych mutacji w genie, opisanych u pacjentów z ZN zostały przedstawione w Tabeli 2. Wyniki przedstawione w tabeli 3 informują o częstościach alleli oraz genotypów w obu grupach, badanej i kontrolnej. Trzy polimorfizmy SNP okazały się niepolimorficzne (rs2026014, rs5005771, rs4399118), jeden (rs12568913) jest obecny u każdej badanej osoby jako heterozygota, zaś dwa SNP (rs3829795, rs3818587) są polimorficzne i występują w różnych wariantach genotypowych (występują w wariantach heterozygoty oraz częściej homozygoty, brak natomiast rzadkiej homozygoty). Polimorfizm rs3829795 nie spełnia założenia prawa HWE przy wartości $P < 0,05$ ($P = 0,0087$ w grupie badanej, $P = 0,0004$ dla grupy kontrolnej). Polimorfizm rs3818587 spełnia założenie prawa HWE przy $P > 0,05$ ($P = 0,389$ dla grupy badanej, $P = 0,472$ dla grupy kontrolnej). Z tego względu do dalszej analizy kwalifikują się wyniki uzyskane dla SNP rs3818587. Wybrany czynnikiem ryzyka jest allel C, gdyż jego częstość jest większa w grupie badanej w odniesieniu do

grupy kontrolnej. Obliczona wartość OR dla polimorfizmu rs3818587 wynosi 2,08, co wskazuje, że może to być czynnik ryzyka dla zespołu nerczycowego. Statystycznie wartość $OR = 2,7$ wskazuje na rolę danego SNP w podatności na zachorowanie lub rozwój choroby złożonej. Z kolei wynik $OR = 1,00$ nie jest istotny. Tabela IV zawiera informacje, które umożliwiły obliczenie $OR = (axd)/(cxb)$.

Omówienie

Badania populacyjne polimorfizmów SNP dzieli się na kilka typów, w przypadku badania dwóch grup, badanej (cases) oraz kontrolnej (controls) najczęściej są to badania porównawcze przypadków (case-control studies) [16]. Jest to typ badań asocjacyjnych, w których porównywane grupy różnicuje obecność lub brak cechy badanej (w tym przypadku choroby). Poza tym czynnikiem, grupy powinny być jak najbardziej jednorodne. W przypadku analizy SNP bardzo ważny jest przede wszystkim czynnik pochodzenia geograficznego. Ten warunek został spełniony, gdyż wszystkie badane osoby pochodzą z polskiej populacji, regionu Wielkopolski. Przeprowadzona analiza sześciu polimorfizmów SNP w genie podocyny miała na celu zbadanie, czy u pacjentów z zespołem nerczycowym częstość występowania poszczególnych wariantów jest inna niż w kontrolnej populacji polskiej, co wskazywałoby na rolę SNP w podatności na rozwój ZN. Badanie z wykorzystaniem sond typu TaqMan obejmowało SNP zlokalizowane w niedalekim sąsiedztwie znanych mutacji w genie podocyny, opisanych u pacjentów ZN. Wynik uzyskany dla polimorfizmu rs4399118 jest zaskakujący i wymaga weryfikacji za pomocą sekwencjonowania [18], gdyż jest bardzo mało prawdopodobne, aby w tak licznej grupie zawierały się jedynie heterozygoty. W przypadku obecności heterozygot, w badanej grupie muszą znaleźć się przypadki obu wariantów homozygotycznych. Jest to podstawowe założenie równowagi *Hardy-Weinberga*, która zakłada, że stosunek genotypów AA:Aa:aa powinien wynosić 1:2:1. Z kolei, dwa polimorfizmy - rs3829795, rs3818587 - występują z wariantem heterozygoty oraz częściej homozygoty, brak natomiast rzadkiej homozygoty. Spośród 6 SNP genu NPHS 2, które powiązane są z rozwojem ZN u dzieci w grupie badanej wykazano obecność tylko jednego. Otrzymany istotny wynik dla polimorfizmu rs3818587 odniesiono do danych klinicznych pacjentów w grupie badanej. Wśród ośmiu pacjentów z ZN, którzy posiadali czynnik ryzyka (allel C w polimorfizmie rs3818587) nie znaleziono wspólnej cechy wyróżniającej od pozostałych pacjentów z grupy badanej. Kliniczne rozpoznanie pacjentów posiadających czynnik ryzyka obejmowało zarówno steroidooporny (n=5) jak i steroidowzrażliwy ZN (n=3). Z klinicznego punktu widzenia pacjenci z SWZN należą do grupy dzieci, które uzyskują remisję po zastosowaniu leczenia immunosupresyjnego [1]. Natomiast w grupie pacjentów nie reagujących na leczenie farmakologiczne (SOZN, n=16) zmiany genetyczne w NPHS 2 ujawniono u 5 pacjentów, co stanowi ok. 31%. Wskazani pacjenci nie uzyskali remisji klinicznej i biochemicznej ZN. Z literatury

wiadomo, że obecność opisanych markerów mutacji czy też znanych SNP dla genu NPHS 1 i NPHS 2 u pacjentów z zespołem nerczycowym nie stanowi czynnika prognostycznego odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne [19, 20]. Natomiast ujawnienie zmian genotypowych w genie NPHS 1 wskazuje na podatność rozwoju ZN. Z kolei wykazanie zmian genotypowych u pacjentów z ZN, a zwłaszcza opornym na leczenie steroidami, skłania do modyfikacji leczenia immunosupresyjnego na korzyść inhibitorów kalcyneryny (np. cyklosporyna A) [8].

Ponadto, uwagę zwraca odmienna mapa genetyczna w różnych rejonach świata, które charakteryzują się często nie tylko występującymi znanymi polimorfizmami ale również brakiem zmian w niektórych egzonach genu NPHS 1 [21]. Taka sytuacja znajduje swoje przełożenie w praktyce, ponieważ można ograniczyć diagnostykę molekularnego podłoża nie analizując wybranych egzonów w danej populacji.

Aby potwierdzić rolę polimorfizmu rs3818587 w podatności na rozwój ZN, należałoby zwiększyć liczebność grupy badanej, a także grupy kontrolnej. Ponadto wykonać taką samą analizę wśród rodzeństwa i rodzin tych pacjentów. Wykrycie zmian genotypowych wśród krewnych pacjentów z ZN przynosi dodatkowe informacje na temat przekazywania takiej cechy w rodzinie i możliwości powtórzenia się choroby u innych członków badanych rodzin. Ponadto, w celu weryfikacji otrzymanych wyników należałoby potwierdzić częstości alleli oraz genotypów poprzez inną metodę, np. sekwencjonowanie (badanie to jest w trakcie opracowania). Należy także podkreślić, że liczba SNP w genach powiązanych z zespołem nerczycowym jest bardzo duża i w celu uzyskania pełnego obrazu wpływu SNP na podatność na rozwój ZN należy kontynuować badania, uwzględniając takie geny jak NPHS 1, CD2AP czy ACTN4. Niewątpliwie jednak otrzymane wyniki zachęcają do podjęcia próby przeprowadzenia genotypowania pozostałych genów, których produkty białkowe uczestniczą w budowie kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

Wnioski

Obecność SNP rs3818587 wskazuje na asocjacje z rozwojem ZN u dzieci z rejonu Wielkopolski.

Obecność SNP rs3818587 nie może stanowić czynnika rokowniczego terapii immunosupresyjnej u dzieci z ZN.

Ujawnienie SNP rs3818587 u pacjentów ze steroidoopornym zespołem nerczycowym może sugerować modyfikację leczenia immunosupresyjnego na korzyść inhibitorów kalcyneryny.

Piśmiennictwo

1. Lane J.C., Kaskel F.J.: Pediatric nephrotic syndrome: from the simple to the complex. *Semin. Nephrol.* 2009, 29, 389.
2. Musiał K., Ciszak L., Kosmaczewska A. et al.: Zeta chain expression in T and NK cells in peripheral blood of children with nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 119.
3. Araya C., Diaz L., Wasserfall C. et al.: T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2009, 24, 1691.
4. MacHardy N., Miles P.V., Massengill S.F. et al.:

- Management patterns of childhood-onset nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2009, 24, 2193.
5. **Shenoy M., Plant N.D., Lewis M.A. et al.:** Intravenous methylprednisolone in idiopathic childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 899.
 6. **Ulinski T., Aoun B.:** Pediatric idiopathic nephrotic syndrome: treatment strategies in steroid dependent and steroid resistant forms. *Curr. Med. Chem.* 2010, 17, 847.
 7. **Kyrieleis H.A., Löwik M.M., Pronk I. et al.:** Long-term outcome of biopsy-proven, frequently relapsing minimal-change nephrotic syndrome in children. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 4, 1593.
 8. **Bensman A., Niaudet P.:** Non-immunologic mechanisms of calcineurin inhibitors explain its anti-proteinuric effects in genetic glomerulopathies. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 1285.
 9. **Welsh G.I., Saleem M.:** Nephritin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J. Pathol.* 2010, 220, 328.
 10. **Megremis S., Mitsioni A., Mitsioni A.G. et al.:** Nucleotide variations in the NPHS2 gene in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Genet. Test. Mol. Bioma.* 2009, 13, 249.
 11. **Benoit G., Machuca E., Antignac C.:** Hereditary nephrotic syndrome: a systematic approach for genetic testing and a review of associated podocyte gene mutations. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 1621.
 12. **Benoit G., Machuca E., Nevo F. et al.:** Analysis of recessive CD2AP and ACTN4 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2010, 25, 445.
 13. **Machuca E., Benoit G., Antignac C.:** Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum. Mol. Genet.* 2009, 18, 185.
 14. **Traubici J., Lim R.:** Laboratory Evaluation at Different Ages w Comprehensive Pediatric Nephrology. Mosby Elsevier. 2008, 1, 39.
 15. **Kiesler P., Shakya A., Tantin D. et al.:** An allergy-associated polymorphism in a novel regulatory element enhances IL13 expression. *Hum. Mol. Genet.* 2009, 23, 4513.
 16. **Payseur B., Place M., Weber J.:** Linkage Disequilibrium between STRs and SNPs across the Human Genome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82, 1039.
 17. **Stern C.:** The Hardy-Weinberg law. *Science.* 1943, 97, 137.
 18. **LaFramboise T.:** Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 4181.
 19. **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, 4, 1065.
 20. **Machuca E., Hummel A., Nevo F. et al.:** Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int.* 2009, 75, 727.
 21. **Otukesh H., Ghazanfari B., Fereshtehnejad S.M. et al.:** NPHS2 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Iran J. Kidney Dis.* 2009, 3, 99.