

Новый метод молекулярно-генетической диагностики стероидрезистентного нефротического синдрома

Сладков Д.Г.^{1*}, Савостьянов К.В.², Цыгин А.Н.², Пушков А.А.²,
Жанин И.С.², Никитин А.Г.², Пахомов А.В.², Ананьин П.В.²

¹ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины;
* mitrofan93@yandex.ru

² — Федеральное государственное автономное учреждение «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Первопричиной развития любого наследственного заболевания, и стероидрезистентного нефротического синдрома (СРНС) в частности, являются нуклеотидные замены, приводящие к патогенным изменениям кодируемых белков. Данное исследование направлено на разработку оптимального алгоритма диагностики различных наследственных болезней почек, объединенных симптомокомплексом нефротического синдрома. На основе технологии секвенирования нового поколения и секвенирования по Сэнгеру были обследованы 45 пациентов в возрасте от 0 до 6 лет с подозрением на нефротический синдром. У всех пациентов наблюдалась резистентность к гормональной терапии. В результате исследования у 35 пациентов были обнаружены мутации генов *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6*, *ACTN4*, *WT1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *CD2AP*, *COQ2*, *COQ6*, при этом было выявлено 10 новых мутаций. Полученные данные могут свидетельствовать о значительной гетерогенности СРНС в Российской Федерации.

Ключевые слова: нефротический синдром, дети, гены, секвенирование нового поколения, молекулярная диагностика

New method of molecular and genetic diagnostics of steroid-resistant nephrotic syndrome

Sladkov D.G.^{1*}, Savost'yanov K.V.², Cygin A.N.², Pushkov A.A.²,
Zhanin I.S.², Nikitin A.G.², Pakhomov A.V.², Anan'in P.V.²

¹ — MSU, Faculty of Basic Medicine; * mitrofan93@yandex.ru

² — Federal State Autonomous Institution «Scientific Center of Children's Health» of the Ministry of Health of the Russian Federation

The original cause of development of any hereditary disease and steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) in particular are the nucleotide substitutions leading to pathogenic changes in the encoded proteins. This research is directed to development of optimum algorithm of diagnostics of various hereditary diseases of kidneys united by symptom complex of nephrotic syndrome. On the basis of next generation sequencing and Sanger sequencing technology we examined 45 patients aged from 0 to 6 years old with suspicion on a nephrotic syndrome. Resistance to hormonal therapy was observed at all patients. As a result of research we have found mutations in 35 patients in genes *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6*, *ACTN4*, *WT1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *CD2AP*, *COQ2*, *COQ6* and moreover we have revealed 10 new mutations. The obtained data can confirm considerable heterogeneity of SRNS in the Russian Federation.

Key words: nephrotic syndrome, children, genes, next generation sequencing, molecular diagnostics

Актуальность

Нефротический синдром (НС) является актуальной проблемой педиатрии. Клинико-лабораторный симптомокомплекс НС характеризуется периферическими или генерализованными отеками, массивной протеинурией (более 2,5 г/сут. или 50 мг/кг/сут.), гипо- и диспротеинемией, гипоальбуминемией (менее 40 г/л), гиперлипидемией и липидурией [1, 2]. Особого внимания заслуживает генетически обусловленный врожденный НС, возникающий у детей первого года жизни. Подавляющее большинство таких больных резистентны ко всем видам стероидной и иммуносупрессивной терапии, что значительно осложняет их лечение и ухудшает прогноз [3]. На основании клинических признаков, функциональной и

биохимической диагностики постановка диагноза пациентам с стероидрезистентным нефротическим синдромом весьма затруднительна; для выявления первопричины развития НС необходимо проведение молекулярно-генетического исследования.

Сложность выявления пациентов с врожденным НС, постоянное увеличение числа больных, прогрессирующее заболевание, частые рецидивы, резистентность к стероидной и иммуносупрессивной терапии подавляющего числа пациентов требуют не только настойчивого диагностического поиска и разработки патогенетических подходов к лечению, но и создания оптимального и эффективного способа диагностики широкого спектра болезней, объединенных симпто-

комплексом нефротического синдрома, на основе верификации диагноза методами молекулярно-генетической диагностики с использованием технологии секвенирования нового поколения (СНП). Такой подход к диагностике НС позволяет значительно снизить временные и материальные затраты за счет одновременно поиска мутаций в целевых областях генов, для которых связь с рассматриваемой патологией была описана ранее [4].

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлась разработка нового алгоритма молекулярной диагностики различных наследственных болезней почек, сопровождающихся симптомокомплексом нефротического синдрома, на основе технологии СНП и секвенирования по Сэнгеру.

Основной задачей данного исследования являлось проведение молекулярно-генетической диагностики 45 пациентов с подозрением на СРНС.

Материалы и методы

В исследование были включены 45 пациентов, госпитализированных в нефрологическое отделение ФГАУ НЦЗД, отобранных согласно следующим критериям.

1. Возраст младше 18 лет;
2. Наличие клинических, биохимических и лабораторно-инструментальных проявлений НС;
3. Отсутствие ответа на гормональную терапию.

Для охвата наибольшего количества целевых областей генома человека, изменения в которых являются патогенными для развития НС, были выбраны следующие гены: *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6*, *ACTN4*, *WT1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *CD2AP*, *COQ2*, *COQ6*.

Всем пациентам была проведена молекулярно-генетическая диагностика, в ходе которой предполагалось обнаружить мутации, вызывающие наследственно обусловленный нефротический синдром. Диагностика проводилась в три этапа. На первом этапе пациентам методом прямого автоматического секвенирования был проведен анализ всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *NPHS2*, мутации которого являются самой частой причиной возникновения СРНС. На втором этапе, на базе платформы JUNIOR 454 (ROCHE) методом СНП, был проведен анализ кодирующих, прилегающих интронных, а также 3'- и 5'-нетранслируемых областей генов, включенных в целевую панель (табл. 1). На заключительном этапе оценивалась эффективность данного способа диагностики путем подтверждения выявленных путём СНП мутаций классическим методом секвенирования по Сэнгеру.

Основные результаты

У 45 пациентов были исследованы целевые области гена *NPHS2*, в результате чего у 9 пациентов (20%) были выявлены патогенные мутации, в том числе у 5 пациентов — нонсенс-мутация *c.259G>T* (*p.Glu87X*), характерная для жителей Российской Федерации, тогда как у двоих пациентов были выявлены не описанные ранее миссенс-мутации *c.897G>C* (*p.Lys299Asn*) и *c.275G>C* (*p.Gly92Ala*).

С целью выявления мутаций у остальных 36 пациентов методом СНП был проведен анализ целевых областей генов *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6*, *ACTN4*, *WT1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *CD2AP*, *COQ2*, *COQ6*, мутации в которых приводят к развитию болезней почек, сопровождающихся симптомокомплексом нефротического синдрома. Патогенные варианты были обнаружены еще у 26 (57,8%) пациентов (табл. 2).

Для всех новых мутаций был проведен биоинформатический анализ патогенности *in silico* с помощью компьютерной программы *Alamut Visual*, а их балл по *PolyPhen 2* составил 1,0. Результатом проведенной статистической обработки полученных генетических вариантов являлось заключение о наличии либо отсутствии у пациента патогенных нуклеотидных замен, которые могут приводить к развитию симптомокомплекса НС.

Все выявленные в ходе проведенного исследования мутации были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Выводы

Настоящие исследования продемонстрировали генетическую гетерогенность СРНС, обусловленную мутациями в генах *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6*, *ACTN4*, *WT1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *CD2AP*, *COQ2*, *COQ6*. Выявлены 10 (37%) новых мутаций из 27 суммарно выявленных у 10 (22,2%) пациентов из 45 исследованных. Разработанный алгоритм диагностики наследственно обусловленного нефротического синдрома позволил выявить генетическую причину патологии у 35 пациентов, что составляет 77,8% обследованных. Полученные результаты позволяют считать предложенный алгоритм диагностики пациентов с НС, разработанный нами на основе технологии СНП, оптимальным и эффективным методом диагностики различных форм нефротического синдрома.

Выявление у пациента генетически детерминированного нефротического синдрома с использованием предложенного метода позволит уточнить поставленные ранее диагнозы, скорректировать тактику лечения, снизить степень возможной инвалидизации, повысить качество жизни пациентов.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Гены, включенные в панель для диагностики СРНС методом СНП [5, 6]

Ген	OMIM	Кодируемый белок	Заболевание	Тип наследования
<i>NPHS1</i>	602716	Нефрин	СРНС, тип 1	Аутосомно-рецессивный
<i>NPHS2</i>	604766	Подоцин	СРНС, тип 2	Аутосомно-рецессивный
<i>PLCE1</i>	608414	Фосфолипаза С эпсилон-1	СРНС, тип 3	Аутосомно-рецессивный
<i>TRPC6</i>	603652	Белок семейства неселективных катионных каналов	Фокально-сегментарный гломерулосклероз, СРНС	Аутосомно-доминантный
<i>ACTN4</i>	604638	Альфа-актинин-4	Фокально-сегментарный гломерулосклероз, СРНС	Аутосомно-доминантный
<i>WT1</i>	607102	Фактор транскрипции	Опухоль Вильмса, синдром Денис-Драша, синдром Фрайзера, СРНС	Аутосомно-доминантный
<i>COL4A3</i>	120070	Альфа-3 субъединица коллагена 4 типа	Синдрома Альпорта, фокально-сегментарный гломерулосклероз, гематурия	Аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный
<i>COL4A4</i>	120131	Альфа-4 субъединица коллагена 4 типа	Синдрома Альпорта, фокально-сегментарный гломерулосклероз, гематурия	Аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный
<i>COL4A5</i>	303630	Альфа-5 субъединица коллагена 4 типа	Синдрома Альпорта	X сцепленный
<i>CD2AP</i>	604241	CD2-ассоциированный белок	Фокально-сегментарный гломерулосклероз	Аутосомно-рецессивный
<i>COQ2</i>	609825	Парагидроксibenзоат-полипре-нил-трансфераза	Дефицит коэнзима Q10, СРНС	Аутосомно-рецессивный
<i>COQ6</i>	614647	Флавинзависимая монооксигеназа-6	СРНС	Аутосомно-рецессивный

Таблица 2

Спектр выявленных мутаций

Ген	Мутации ¹
<i>NPHS2</i>	<i>c.259G>T (p.Glu87X); c.686G>A (p.Arg229Gln)</i> (полиморфизм); <i>c.868G>T (p.Val290Met); c.897G>C (p.Lys299Asn); c.275G>C (p.Gly92Arg)</i>
<i>NPHS1</i>	<i>c.3478C>T (p.Arg1160X); c.3478C>T (p.Arg1109X); c.2746G>T (p.Ala916Ser); c.1673G>T (p.Arg558Leu)</i>
<i>PLCE1</i>	<i>c.3346C>T (p.Arg1116X); c.1405T>A (p.Ser469Thr); c.5738G>A (p.Arg1913Gln)</i>
<i>ACTN4</i>	<i>c.682T>C (p.Phe228Leu)</i>
<i>WT1</i>	<i>c.1432+4C>T; c.1432+5G>A; c.1384C>T (p.Arg462Trp); c.1392C>A (p.Asp464Glu)</i>
<i>COL4A3</i>	<i>c.2501A>G (p.Lys834Arg); c.4021C>T (p.Pro1341Ser)</i>
<i>COL4A4</i>	<i>c.2996G>A (p.Gly999Glu); c.2399C>G (p.Pro800Arg); c.2756A>G (p.Glu919Gly)</i>
<i>CD2AP</i>	<i>c.1120A>G (p.Thr374Ala)</i>
<i>COQ2</i>	<i>c.571-1G>A; c.683A>G (p.Asn228Ser)</i>
<i>COQ6</i>	<i>c.1078C>T (p.Arg360Trp); c.1235A>G (p.Tyr412Cys)</i>

Примечание. ¹ Выделены не описанные ранее мутации

Список литературы

1. Лойман Э, Цыгин АН, Саркисян АА. Детская нефрология. Практическое руководство. М., 2010, 390 с.
2. Смирнов АВ, Шилов ЕМ, Добронравов ВА [и др.]. Национальные рекомендации: Хроническая болезнь почек: основные положения, определение, диагностика, скрининг, подходы к профилактике и лечению. СПб: Научное общество нефрологов России, 2012. 51 с.
3. Петросян ЭК. Врожденный нефротический синдром: этиология, диагностика, лечение (обзор литературы). Вестник современной клинической медицины. 2013;6(6):70-78.
4. Батушин ММ, Пасечник ДГ. Протеинурия: вопросы дифференциальной диагностики. Consilium Medicum. 2013;15(7):48-56.
5. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.omim.org/>.
6. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.