

Эпигенетические маркеры репарации подоцитов у детей с первичным нефротическим синдромом

С.Л. Морозов^{1,2}, В.В. Длин¹, В.Ю. Воинова¹, А.В. Смирнова¹, О.Р. Пирузиева¹

¹ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю. Е. Вельтищева» (Институт Вельтищева) ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Epigenetic markers of podocyte repair in children with primary nephrotic syndrome

S.L. Morozov^{1,2}, V.V. Dlin¹, V. Yu. Voinova¹, A.V. Smirnova¹, O.R. Piruzieva¹

¹Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

С точки зрения модели исследования повреждения гломерул идиопатический нефротический синдром представляет наиболее яркий пример. Во всем мире нефротический синдром признан социально значимым заболеванием и считается одной из самых частых гломерулопатий детского возраста, приводящей к развитию хронической болезни почек, а в случае прогрессирования заболевания — к формированию терминальной стадии хронической почечной недостаточности. В статье приводятся данные собственного исследования и обсуждаются эпигенетические маркеры репарации подоцитов у детей с первичным нефротическим синдромом. Нами отмечено, что у пациентов со стероидчувствительными вариантами нефротического синдрома экспрессия генов *WT1* (фактор транскрипции подоцитов) и *NPHS1* (ген, кодирующий нефрин — трансмембранный белок, который служит структурным компонентом щелевой диафрагмы подоцита) достоверно выше, чем в группе контроля и у детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом. Полученные данные открывают перспективы для разработки персонализированного подхода к ведению детей с первичным нефротическим синдромом, определяя маркеры стадийности и/или тяжести патологического процесса, происходящего в гломерулах. В настоящее время геномные и постгеномные технологии все чаще стали применяться в клинической практике, что приведет к разработке персонализированных диагностических панелей на основе инновационных технологий.

Ключевые слова: дети, нефротический синдром, мРНК, экспрессия генов, фокальный сегментарный гломерулосклероз.

Для цитирования: Морозов С.Л., Длин В.В., Воинова В.Ю., Смирнова А.В., Пирузиева О.Р. Эпигенетические маркеры репарации подоцитов у детей с первичным нефротическим синдромом. Рос вестн перинатол и педиатр 2023; 68:(3): 68–76. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-3-68-76

In terms of a glomerular injury research model, idiopathic nephrotic syndrome is the most prominent example. Worldwide, nephrotic syndrome is a socially significant disease and is considered one of the most common glomerulopathies in childhood, leading to the development of chronic kidney disease, and in the case of progression of the disease, to the formation of terminal chronic renal failure. This article presents data from our own study and discusses epigenetic markers of podocyte repair in children with primary nephrotic syndrome. We noted that in patients with steroid-sensitive variants of nephrotic syndrome, the expression of the *WT1* (podocyte transcription factor) and *NPHS1* (the gene encoding nephrin — a transmembrane protein that is a structural component of the slit diaphragm of the podocyte) genes is significantly higher than in the control group and in children with steroid resistant nephrotic syndrome. The data obtained open up prospects for the development of a personalized approach to the management of children with primary nephrotic syndrome by determining the markers of the staging and/or severity of the pathological process occurring in the glomeruli. Currently, genomic and post-genomic technologies are increasingly being used in clinical practice, which will eventually lead to the development of personalized diagnostic panels based on innovative technologies.

Key words: children, nephrotic syndrome, mRNA, gene expression, focal segmental glomerulosclerosis.

For citation: Morozov S.L., Dlin V.V., Voinova V. Yu., Smirnova A.V., Piruzieva O.R. Epigenetic markers of podocyte repair in children with primary nephrotic syndrome. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2023; 68:(3): 68–76 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-3-68-76

© Коллектив авторов, 2023

Адрес для корреспонденции: Морозов Сергей Леонидович — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела наследственных и приобретенных болезней почек им. профессора М.С. Игнатовой Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, доц. кафедры госпитальной педиатрии №2 педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000-0002-0942-0103 e-mail: mser@list.ru

Длин Владимир Викторович — д.м.н., проф., рук. отдела наследственных и приобретенных болезней почек им. профессора М.С. Игнатовой, зам. директора по научной работе в педиатрии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-0942-0103

Воинова Виктория Юрьевна — д.м.н., зам. дир. по трансляционной медицине, гл. науч. сотр. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-8491-0228

Смирнова Анна Викторовна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной и биохимической диагностики Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-8491-0228

Пирузиева Оксана Рашидовна — врач-нефролог отделения нефрологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю. Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-7663-6070

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

В эпоху современной медицины сформировались фундаментальные научные принципы диагностики заболеваний почек, которые основаны на традиционных диагностических инструментах. Однако в последние десятилетия общепринятые методы становятся недостаточными для верификации различных вариантов течения нефрологических заболеваний, особенно при нетипичных клинических проявлениях [1]. В настоящее время стала активно развиваться молекулярно-генетическая диагностика, которая не только дополняет традиционные методы исследования, но и дает понимание патогенеза заболеваний с точки зрения молекулярной биологии [1, 2]. Наибольший интерес в сфере молекулярной медицины сегодня представляет изучение динамических продуктов, к которым в первую очередь относится РНК, включая некодирующие микроРНК [2].

Классификация многих заболеваний почек в настоящее время строится на морфологическом, иммунологическом и клиническом принципах, что зачастую не объясняет патофизиологические механизмы. Несмотря на свои преимущества, морфологическая оценка ограничена в интерпретации поражений почек, что зачастую не позволяет установить точный диагноз и определить прогноз заболевания [2–5]. Одной из самых малоизученных и важных областей в нефрологии остается оценка состояния гломерулярного аппарата почек, особенно его изменений в ходе патологического процесса, включающих как этапы повреждения, так и стадию репарации. Оценка этих этапов позволит судить об изменениях в гломерулах и даст возможность оценить эффективность проводимой терапии и определить прогноз заболевания.

С точки зрения модели исследования повреждения гломерул идиопатический нефротический синдром — наиболее яркий пример. Во всем мире нефротический синдром признан социально значимым заболеванием и считается одной из самых частых гломерулопатий детского возраста, приводя-

щей к развитию хронической болезни почек, а в случае прогрессирования заболевания — к формированию терминальной стадии хронической почечной недостаточности [2, 6–8].

Большинство хронических гломерулярных заболеваний имеют однотипный патофизиологический механизм развития. Так, прогрессирование заболевания приводит к повреждению большого числа нефронов, нарушению гломерулярного барьера, что ведет к снижению клубочковой фильтрации [4, 8, 9]. Гломерулярный барьер обеспечивается высокодифференцированными клетками — подоцитами, повреждение которых приводит к развитию нефротического синдрома.

Одним из самых неблагоприятных морфологических вариантов нефротического синдрома является фокальный сегментарный гломерулосклероз. Чаще всего при фокальном сегментарном гломерулосклерозе отмечается первичное повреждение подоцитов, которое характеризуется распластыванием ножек подоцитов и расслоением базальной мембраны (рис. 1), что приводит к выраженной протеинурии [10].

Структура гломерулярной базальной мембраны представлена множеством компонентов, таких как Р-кадгерин, *zonula occludens* (комплекс контактов между клетками), члены семейства катенинов, специфических белков, экспрессируемых в ножках подоцитов — нефрин, синаптоподин и подоцин [8]. Отмечено, что при повреждении гломерул определяется снижение количества специфических белков ножек подоцитов (нефрин и подоцин), и это может свидетельствовать о важной роли регуляции транскрипции генов, кодирующих эти белки, в патогенезе повреждения гломерул [11]. Одним из ключевых генов, участвующим в построении архитектуры гломерулярного аппарата почки, признан ген *WT1*, который в ряде исследований определен как фактор транскрипции подоцитов, осуществляющий важную регуляторную роль [11–14]. *WT1* — один из самых известных генов, мутации в котором приводят к раз-

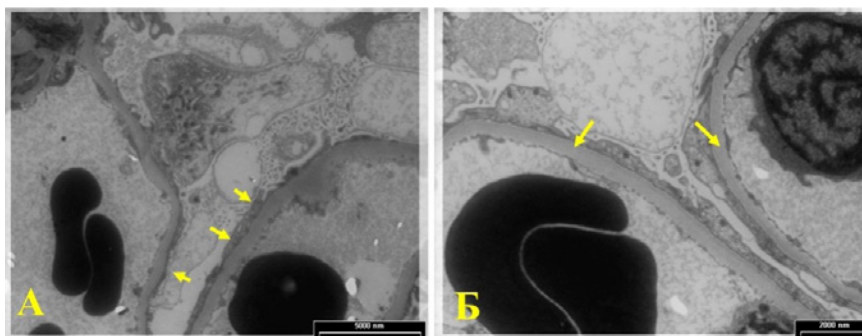


Рис. 1. Пример изменения гломерул. Первичный нефротический синдром; фокально сегментарный гломерулосклероз (собственное наблюдение).

Стрелками указаны: а — распластывание ножек подоцитов; б — расслоение базальной гломерулярной мембраны.

Fig. 1. Example of glomerular changes. Primary nephrotic syndrome. Focal segmental glomerulosclerosis. (own observation).

а — spreading of podocyte legs; б — stratification of the basal glomerular membrane.

витию инфантильного нефротического синдрома [15, 16]. Кроме того, показана его регуляторная роль в отношении генов *NPHS1*, *NPHS2* и *INF2*, участвующих в синтезе белков, которые входят в состав подоцитов почки [10–12].

В исследовании на биологических моделях с индукцией повреждения почек адриамицином продемонстрировано увеличение числа сайтов иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq), связанных с *WT1*, а также увеличение экспрессии важнейших генов подоцитов на ранних стадиях повреждения, что может отражать репарацию подоцитов [11, 17]. Кроме того, в этой работе продемонстрирована роль *WT1* в поддержании активных меток хроматина в генах подоцитов. Авторами доказано, что повреждение подоцитов приводит к переходу от активных модификаций гистонов к репрессивным в генах *NPHS2* и *SYNPO*. Эти два гена-мишени *WT1* были изучены для выяснения транскрипционного ответа на повреждение. Ген *NPHS2* кодирует белок подоцин — компонент щелевой мембраны, он также определяет структуру межклеточных соединений между подоцитами, предотвращая попадание белка в просвет канальца из гломерулы. Ген *SYNPO* кодирует синаптоподин-актин-ассоциированный протеин, который участвует в поддержании структуры цитоскелета подоцитов. Чтобы напрямую продемонстрировать *WT1*-зависимую экспрессию генов, *WT1* был инактивирован в подоцитах взрослых мышей *Nphs2-CreERT2*, *WT1^{fl/fl}*, что приводило к массивной протеинурии. В результате исследования была определена модель, согласно которой повреждение гломерул приводит к активации фактора транскрипции подоцитов *WT1* [13]. При начальных стадиях повреждения почек отмечается увеличение экспрессии генов, имеющих решающее значение для поддержания функции подоцитов. Подобные данные обсуждаются в работе авторов Z. Limin и соавт. (2017) [цит. по 18], которыми при проведении нефропротективной терапии у крыс с повреждением почек, протеинурией и морфологическими изменениями в виде слияния ножек подоцитов, утолщения базальной гломерулярной мембраны отмечалось повышение экспрессии мРНК *NPHS1*, при этом наблюдалось купирование мочевого синдрома, свидетельствующее о восстановлении гломерулярного барьера. Другая ситуация наблюдалась при прогрессировании повреждения почек, когда при снижении экспрессии *WT1* отмечалось снижение связывания одноименного белка с генами-мишенями фактора транскрипции подоцитов, что приводило к морфологическим изменениям подоцитов, а именно расплыванию их ножек, расслоению гломерулярной базальной мембраны, появлению протеинурии и формированию фокального сегментарного гломерулосклероза [11, 19–21].

В настоящее время в отделе наследственных и приобретенных болезней почек им. профессора М.С. Игнатовой Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю. Е. Вельтищева ведутся исследования по изучению молекулярно-генетических механизмов развития первичного нефротического синдрома у детей, цель которых — повышение эффективности лечения на основе разработки молекулярно-генетических критериев персонализированной терапии. В представленной работе на примере детей с идиопатическим нефротическим синдромом рассматривается экспрессия генов *WT1*, *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2*, которые участвуют в синтезе белков, входящих в состав гломерулярного аппарата почки. Важно отметить, что оценка проводилась с учетом морфологической картины заболевания и чувствительности к стероидной терапии. В отличие от других исследователей изменения оценивали не на биологических моделях, а в клинической практике, что повышает ценность полученной информации и позволяет наметить дальнейший вектор развития молекулярной нефропатологии.

Цель исследования: оценка значения экспрессии генов *WT1*, *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2* у детей с первичным нефротическим синдромом в зависимости от морфологического варианта заболевания для определения их роли как маркеров репарации подоцитов.

Характеристика детей и методы исследования

Под наблюдением находились 48 детей, из них 15 (31%) девочек и 33 (69%) мальчика, средний возраст детей на момент исследования составлял $9,6 \pm 3,8$ года: мальчиков — $9,4 \pm 3,6$ года, девочек — $10,07 \pm 4,5$ года. Группу контроля составили 24 условно здоровых ребенка (*в анамнезе отсутствовали заболевания почек, а также отсутствовали данные о приеме стероидной терапии*), средний возраст которых составил $9,4 \pm 4,3$ года, из них 10 (42%) девочек и 14 (58%) мальчиков. Распределение по возрасту основной группы и группы контроля правильное: $K-C d=0,12, p>0,2$ и $K-C d=0,12, p>0,2$ соответственно.

На основании результатов клинико-лабораторного и инструментального исследования у всех пациентов основной группы был диагностирован идиопатический нефротический синдром. В зависимости от уровня чувствительности к стероидной терапии были выделены следующие варианты нефротического синдрома:

I. Стероидрезистентный нефротический синдром — характеризуется сохраняющейся протеинурией после курса преднизолона в дозе 2 мг/кг/сут (не более 60 мг/сут) в течение 6–8 нед (и последующих 3 внутривенных введений метилпреднизолона в дозе 20–30 мг/кг, но не более 1 г на введение).

II. Стероидзависимый нефротический синдром — характеризуется развитием рецидивов

заболевания при снижении дозы преднизолона или в течение 2 нед после его отмены (при условии применения адекватных доз и проведения курса стероидной терапии).

III. Стероидчувствительный нефротический синдром — характеризуется развитием полной клинико-лабораторной ремиссии заболевания на фоне приема преднизолона в дозе 2 мг/кг/сут (не более 60 мг/сут) в течение 6–8 нед и отсутствием рецидива заболевания в течение 2 нед после его отмены.

Распределение пациентов по группам представлено в табл. 1.

Помимо распределения в зависимости от чувствительности к стероидной терапии, пациентов разделили на группы в зависимости от морфологического варианта. У детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в 100% случаев, при этом морфологический вариант у всех детей определялся как фокальный сегментарный гломерулосклероз. У детей со стероидзависимым нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в 73% случаев, при этом фокальный сегментарный гломерулосклероз определялся в 44% случаев, а минимальные изменения в 56% случаев. У детей со стероидчувствительным нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в 50% случаев, при этом минимальные изменения отмечались у 60% пациентов, у 40% выявлен мезангиопролиферативный вариант гломерулонефрита. Распределение пациентов по группам в зависимости от морфологи-

ческого варианта и чувствительности к стероидной терапии представлено в табл. 2.

В исследуемых группах проводился анализ экспрессии генов, отвечающих за развитие нефротического синдрома, на цифровом анализаторе нуклеиновых кислот nCounter («Nanosttring Technologies», США; рис. 2). У всех пациентов выделяли РНК из периферической крови. Каждый образец представлял собой 100 нг мРНК в концентрации 20 нг/мкл. Полученные данные по экспрессии генов выражены в условных единицах (числе молекул мРНК на стандартный объем образца в запуске –5 мкл).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. Для оценки правильности распределения выборки использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Если распределение отличалось от нормального, применяли методы непараметрической статистики: оценка зависимых и независимых групп, определение корреляции по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Уровень экспрессии генов *WT1*, *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2* при первичном нефротическом синдроме у детей в зависимости от чувствительности к стероидной терапии представлен в табл. 3. При оценке исследуемых групп выявлено выраженные изменения уровней экспрессии только двух генов *WT1* и *NPHS1*.

Таблица 1. Распределение пациентов по группам в зависимости от чувствительности к преднизолону
Table 1. Distribution of patients into groups depending on the level of sensitivity to prednisolone

Группа	Число пациентов	Возраст, годы	Пол, мальчики/девочки
I. Стероидрезистентный нефротический синдром	16	10,5±4,06	10/6
II. Стероидзависимый нефротический синдром	22	9,06±3,39	16/6
III. Стероидчувствительный нефротический синдром	10	8,4±4,06	6/4
IV. Группа контроля	24	9,4±4,3	14/10

Таблица 2. Распределение пациентов по группам в зависимости от морфологического варианта патологии
Table 2. Distribution of patients into groups depending on the morphological variant of the pathology

Группа	Число пациентов	Число биопсий	Фокальный–сегментарный гломерулосклероз	Мезангиопролиферативный гломерулонефрит	Минимальные изменения	Пациенты без биопсии*
I. Стероидрезистентный нефротический синдром	16	16 (100%)	16 (100%)	—	—	—
II. Стероидзависимый нефротический синдром	22	16 (73%)	7 (44%)	—	9 (56%)	6 (27%)
III. Стероидчувствительный нефротический синдром	10	5 (50%)	—	2 (40%)	3 (60%)	5 (50%)

Примечание. * — ввиду строгих показаний к нефробиопсии, морфологическое исследование проводилось не у всех пациентов.

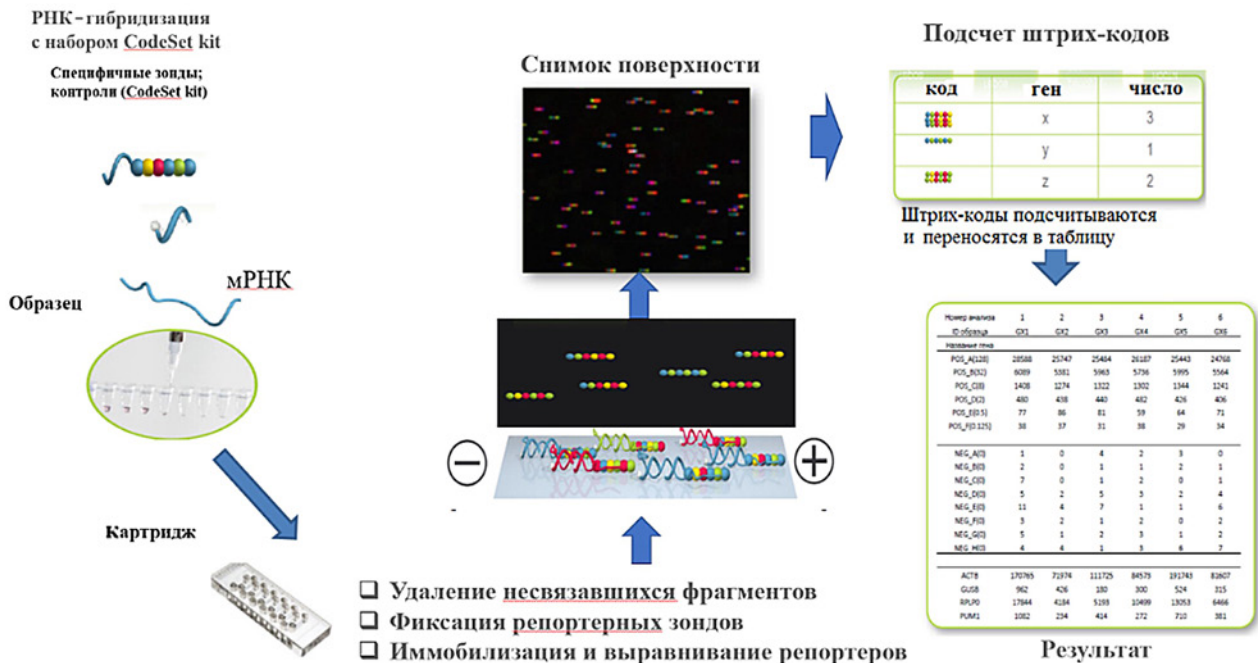


Рис. 2. Технология анализа нуклеиновых кислот nCounter (Nanostring Technologies, США), применяемая для оценки экспрессии исследуемых генов.

Fig. 2. nCounter nucleic acid analysis technology (Nanostring Technologies, USA) used to evaluate the expression of the studied genes.

Уровень экспрессии гена *WT1* статистически значимо различался в сравниваемых группах, статистически значимые различия не выявлены только между больными со стероидрезистентным нефротическим синдромом и группой контроля (рис. 3). На рис. 4 представлены уровни экспрессии изучаемых групп гена *NPHS1*, где продемонстрированы статистически значимые различия между сравниваемыми группами. Между группами стероидрезистентного нефротического синдрома и контрольной группой, а также между больными со стероидзависимым нефротическим синдромом и стероидчувствительным нефротическим синдромом статистически значимых различий по уровням экспрессии гена *NPHS1* не получено.

Был проведен анализ зависимости уровня экспрессии от морфологического варианта заболе-

вания у пациентов, имевших результаты нефробиопсии (табл. 4). Среди детей с первичным нефротическим синдромом уровень экспрессии гена *WT1* был достоверно выше у пациентов, имеющих морфологическую картину заболевания — минимальные изменения. Кроме того, проведенный корреляционный анализ выявил прямую средней силы связь между морфологическим вариантом нефротического синдрома и уровнем экспрессии гена *WT1* ($r=0,54$; $p<0,05$). Такая же направленность изменений получена при анализе экспрессии гена *NPHS1*. Установлено, что ее уровень у пациентов с минимальными изменениями был достоверно выше, чем у пациентов с фокальным сегментарным гломерулосклерозом, а проведенный корреляционный анализ выявил прямую средней силы связь между морфологическими

Таблица 3. Уровень экспрессии генов *WT1*, *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2* при первичном нефротическом синдроме у детей в зависимости от чувствительности к стероидной терапии

Table 3. Expression level of *WT1* and *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2* genes in primary nephrotic syndrome in children depending on sensitivity to steroid therapy

Группа	Число пациентов	<i>WT1</i> , усл. ед. ($M\pm m$)	<i>NPHS1</i> , усл. ед. ($M\pm m$)	<i>NPHS2</i> , усл. ед. ($M\pm m$)	<i>INF2</i> , усл. ед. ($M\pm m$)
I. СРНС	16	1,59±0,53	1,8±0,7	1,36±0,42	71,03±30,1
II. СЗНС	22	3,31±1,57	3,2±1,9	1,44±0,44	63,1±22,49
III. СЧНС	10	6,03±1,3	4,3±1,14	1,13±0,17	83,7±28,66
IV. Группа контроля	24	2,02±0,75	1,65±0,46	1,20±0,28	72,1±27,2

Примечание. СРНС — стероидрезистентный нефротический синдром; СЗНС — стероидзависимый нефротический синдром; СЧНС — стероидчувствительный нефротический синдром.

Таблица 4. Уровень экспрессии генов *WT1* и *NPHS1* в зависимости от морфологического варианта
 Table 4. Expression level of the *WT1* and *NPHS1* genes depending on the morphological variant

Группа	Число пациентов	<i>WT1</i> , усл. ед. ($M \pm m$)	<i>NPHS1</i> , усл. ед. ($M \pm m$)
I. Фокально-сегментарный гломерулосклероз	26	1,62±0,53	1,89±0,72
II. Минимальные изменения	9	3,43±1,73	2,94±1,58
p_{I-II}^*		0,003	0,004

Примечание. * — при сравнении больных с нефротическим синдромом в зависимости от морфологического варианта.

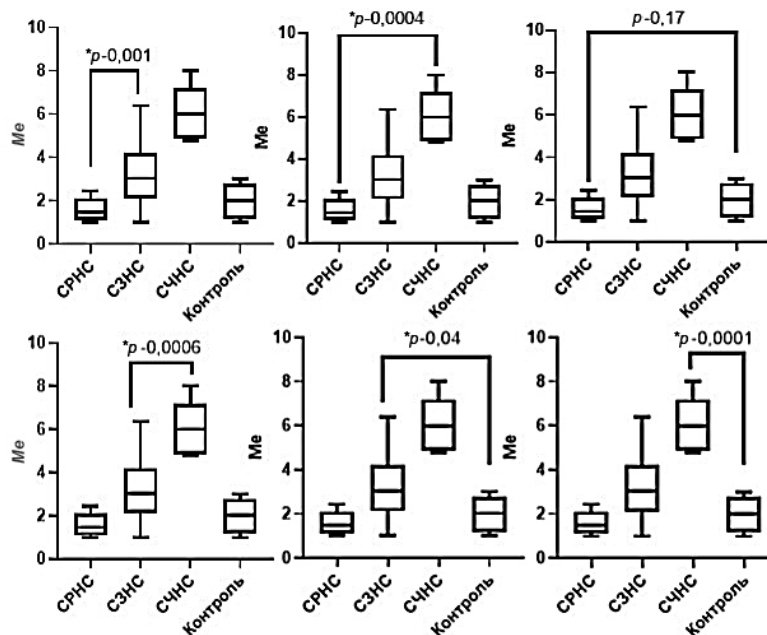
вариантами нефротического синдрома и уровнем экспрессии гена *NPHS1* ($r=0,41$; $p<0,05$).

Оценивая значение экспрессии представленных генов у детей с нефротическим синдромом, не прибегая к инвазивным методам обследования, таким как пункционная нефробиопсия, уже на раннем этапе можно предположить морфологическую картину заболевания и оценить не только степень повреждения, но и возможности и степень репаративных процессов, происходящих в органе. Приведенный анализ с построением ROC-кривых показал высокие чувствительность и специфичность уровня экспрессии исследуемых генов по отношению к типу морфологического варианта нефротического синдрома (рис. 5).

Представленный анализ на основании технологии nCounter также позволяет строить тепловые карты экспрессии всех исследуемых генов для предварительного визуального анализа полученных данных. Ниже приводим фрагмент такого анализа, при котором по визуальной оценке экспрессии

можно предположить направление патологического процесса (рис. 6).

Полученные данные и анализ литературы позволяют сделать вывод, что ген *WT1* можно рассматривать как фактор транскрипции подоцитов, играющий важную роль не только в индуцированном повреждении почек на биологических моделях, но и в организме больного ребенка. Полученные нами данные открывают перспективы для разработки персонализированного подхода к ведению детей с первичным нефротическим синдромом, определяя маркеры стадийности и/или тяжести патологического процесса проходящего в гломерулах. Нами отмечено, что у пациентов со стероидчувствительными вариантами нефротического синдрома экспрессия генов *WT1* и *NPHS1* достоверно выше, чем в группе контроля и у детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом. Это, вероятно, свидетельствует об активных репаративных процессах в ножках подоцитов, и, наоборот, сниженная экспрессия тех же генов, по-видимому, отражает угнетение процессов

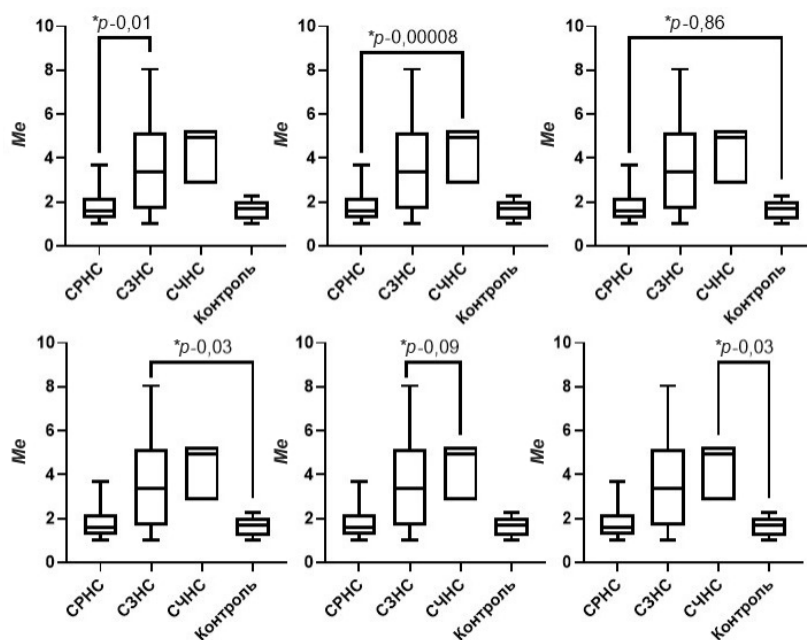


Примечание: * - достоверная разница в группах сравнения при $p<0,05$

Рис. 3. Уровень экспрессии гена *WT1* в изучаемых группах.
 SRNS — стероидрезистентный нефротический синдром; SZNS — стероидзависимый нефротический синдром; SChNS — стероидчувствительный нефротический синдром.
 Fig. 3. The level of expression of the *WT1* gene in the studied groups.

репарации, при этом характерна морфологическая картина в виде фокального сегментарного гломерулосклероза. Полученные нами данные также согласуются с результатами исследований других авторов, которые отметили изменения экспрессии *WT1* при искусственном моделировании фокального сегментарного гломерулосклероза на биологических моделях путем нокаута гена *CRB2*, кодирующего трансмембранный белок I типа, связанный с клеточной полярностью, экспрессируемый в апикальной мембране подоцитов. Авторы отмечают статистически значимое снижение экспрессии *WT1*, *NPHS2*, *NPHS1* в тканях почки [22, 23].

Такой эпигенетический ландшафт определяет степень повреждения гломерул: если в начале повреждения наблюдаются процессы активации экспрессии и репарации подоцитов, то при прогрессировании формируется фокального-сегментарный гломерулосклероз, что свидетельствует о необратимых процессах, приводящих к снижению экспрессии генов подоцитов [20, 24]. Эти эпигенетические признаки могут служить биомаркерами прогрессирования фокального сегментарного гломерулосклероза, а также способствовать диагностике и разработке терапевтических подходов, нацеленных на эпигеном.



Примечание: * - достоверная разница в группах сравнения при $p < 0,05$

Рис. 4. Уровень экспрессии гена *NPHS1* в изучаемых группах. SRNS — стероидрезистентный нефротический синдром; S3NS — стероидзависимый нефротический синдром; S4NS — стероидчувствительный нефротический синдром.
Fig. 4. The expression level of the *NPHS1* gene in the studied groups.

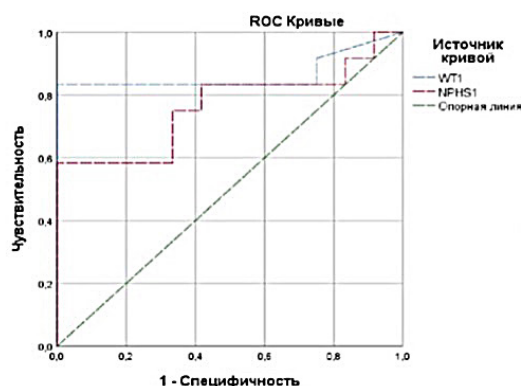


Рис. 5. Чувствительность и специфичность экспрессии *WT1* и *NPHS1* по отношению к морфологическому варианту нефротического синдрома.

Fig. 5. Sensitivity and specificity of *WT1* and *NPHS1* expression in relation to the NS morphological variant.

Площадь под кривой

Переменные результаты проверки	Область	Стандартная ошибка в соответствии с непараметрическими параметрами	Асимптотическая значимость. Нулевая гипотеза: действительная площадь = 0,5
<i>WT1</i>	0,865	0,09	0,002
<i>NPHS1</i>	0,764	0,1	0,028

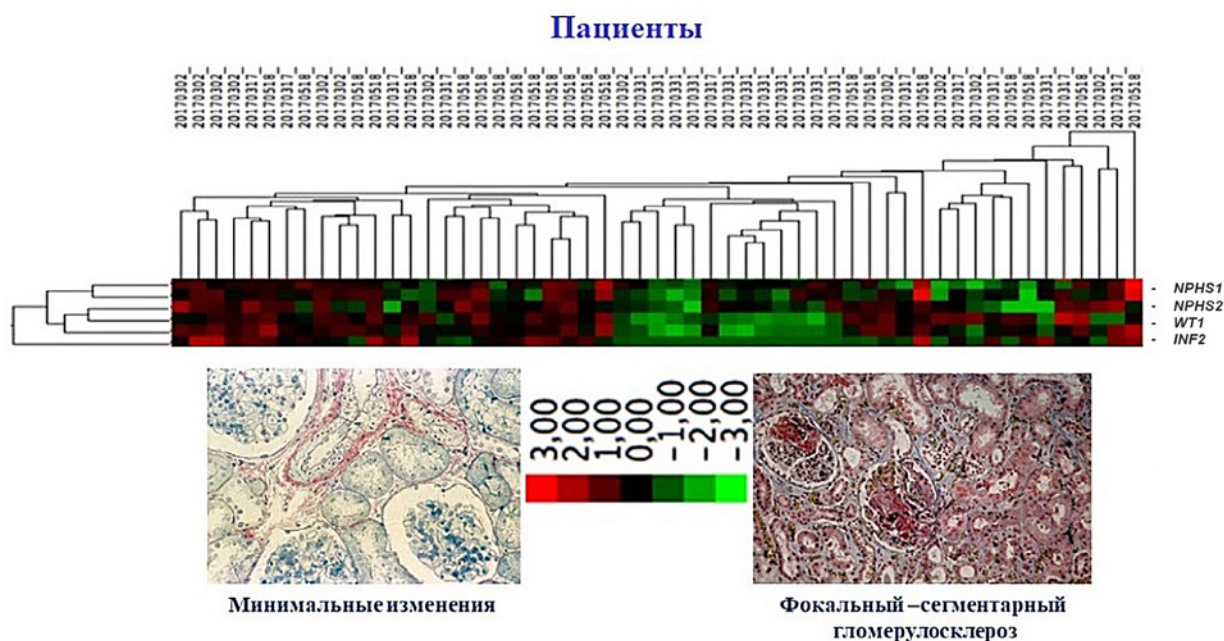


Рис. 6. Фрагмент тепловой карты экспрессии *WT1* и *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2*. Программное обеспечение nSolver 4.0. (собственные данные).

Fig. 6. Fragment of the heat map of *WT1* and *NPHS2*, *NPHS1*, *INF2* expression. nSolver 4.0 software. (own data).

Заключение

Таким образом, в настоящее время геномные и постгеномные технологии все больше применяются в клинической практике, что приведет к разработке

персонализированных диагностических панелей на основе экономичных методов исследования, таких как ПЦР в реальном времени. Это позволит определять тактику ведения пациентов с нефротическим синдромом на начальных этапах заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Adam B., Mengel M. Molecular nephropathology: ready for prime time? *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 309(3): F185–188. DOI: 10.1152/ajprenal.00153.2015
- Морозов С.Л., Длин В.В., Сухоруков В.С., Воронкова А.С. Молекулярная нефропатология: новые возможности диагностики заболеваний почек. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2017; 62(3): 32–36. [Morozov S.L., Dlin V.V., Suhorukov V.S., Voronkova A.S. Molecular nephropathology: new possibilities for diagnosing kidney diseases. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2017; 62(3): 32–36. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2017–62–3–32–36
- Broecker V., Mengel M. The significance of histological diagnosis in renal allograft biopsies in 2014. *Transpl Int* [Internet]. 2015; 28(2): 136–145. DOI: 10.1111/tri.12446
- Drenth B.F., de Zeeuw R.A. High-performance liquid chromatography in the elucidation of the metabolic fate of butopropine: screening for unknown metabolites in the rat. *J Chromatogr* 1980; 191: 109–114. DOI: 10.1016/s0021–9673(00)86369–4
- Игнатова М.С., Длин В.В. Нефротический синдром: прошлое, настоящее и будущее. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2017; 6(62): 29–44. [Ignatova M.S., Dlin V.V. Nephrotic syndrome: past, present and future. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2017; 6(62): 29–44. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2017–62–5–29–44
- Морозов С.Л., Воронкова А.С., Длин В.В. Значение экспрессии гена *ABCB1* у детей с идиопатическим нефротическим синдромом. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2021; 25(1): 83–89. [Morozov S.L., Voronkova A.S., Dlin V.V. Significance of *ABCB1* gene expression in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2021; 25(1): 83–89. (in Russ.)] DOI: 10.36485/1561–6274–2021–25–1–83–89
- Eddy A.A., Symons J.M. Nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet* [Internet]. 2003; 362(9384): 629–639. DOI: 10.1016/S0140–6736(03)14184–0
- Морозов С.Л., Длин В.В. Роль катионных каналов потенциального рецептора TRPC в патогенезе идиопатического нефротического синдрома у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2021; 66(6): 66–74. [Morozov S.L., Dlin V.V. The role of cation channels of the potential TRPC receptor in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2021; 66(6): 66–74. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2021–66–5–67–74
- Gipson D.S., Selewski D.T., Massengill S.F., Wickman L., Messer K.L., Herreshoff E. et al. Gaining the PROMIS perspective from children with nephrotic syndrome: a Midwest pediatric nephrology consortium study. *Health Qual Life Outcomes* 2013; 11:30. DOI: 10.1186/1477–7525–11–30
- Wiggins R-C. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney International* [Internet] 2007; 71(12): 1205–1214. DOI: 10.1038/sj.ki.5002222
- Ettou S., Jung Y.L., Miyoshi T., Jain D., Hiratsuka K., Schumacher V. et al. Epigenetic transcriptional reprogramming by *WT1* mediates a repair response during podocyte injury. *Sci Adv* 2020; 6(30): eabb5460. DOI: 10.1126/sciadv.abb5460

12. Dong L., Pietsch S., Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney Int* 2015; 88(4): 684–690. DOI: 10.1038/ki.2015.198
13. Kann M., Ettou S., Jung Y.L., Lenz M.O., Taglienti M.E., Park P.J. et al. Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(9): 2097–2104. DOI: 10.1681/ASN.2014090940
14. Cook H.T., Tarzi R., D'Souza Z., Laurent G., Lin W.-C., Aitman T.J. et al. AP-1 transcription factor JunD confers protection from accelerated nephrotoxic nephritis and control podocyte-specific Vegfa expression. *Am J Pathol* 2011; 179(1): 134–140. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.006
15. Длин В.В., Морозов С.Л. Персонализированная терапия в детской нефрологии: проблемы и перспективы. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2021; 66(2): 6–12. [Dlin V.V., Morozov S.L. Personalized Therapy in Pediatric Nephrology: Problems and Perspectives. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2021; 66(2): 6–12. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027–4065–2021–66–2–6–12
16. Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Maeda M., Pelletier J., Housman D. et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74(4): 679–691. DOI: 10.1016/0092–8674(93)90515-r
17. Carpenter B., Hill K.J., Charalambous M., Wagner K.J., Lahiri D., James D.I. et al. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Mol Cell Biol* 2004; 24(2): 537–549. DOI: 10.1128/MCB.24.2.537–549.2004
18. Zhai L., Gu J., Yang D., Hu W., Wang W., Ye S. Metformin ameliorates podocyte damage by restoring renal tissue nephrin expression in type 2 diabetic rats. *J Diabetes* 2017; 9(5): 510–517. DOI: 10.1111/1753–0407.12437
19. Osterwalder M., Barozzi I., Tissières V., Fukuda-Yuzawa Y., Mannion B.J., Afzal S.Y. et al. Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. *Nature* 2018; 554(7691): 239–243. DOI: 10.1038/nature25461
20. Torban E., Braun F., Wanner N., Takano T., Goodyer P.R., Lennon R. et al. From podocyte biology to novel cures for glomerular disease. *Kidney Int* 2019; 96(4): 850–861. DOI: 10.1016/j.kint.2019.05.015
21. Wang Y., Wang Y.P., Tay Y.C., Harris D.C. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000; 58(4): 1797–1804. DOI: 10.1046/j.1523–1755.2000.00342.x
22. Tanoue A., Katayama K., Ito Y., Joh K., Toda M., Yasuma T. et al. Podocyte-specific Crb2 knockout mice develop focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Rep* 2021; 11(1): 20556. DOI: 10.1038/s41598–021–00159-z
23. Guo J.-K., Menke A.L., Gubler M.-C., Clarke A.R., Harrison D., Hammes A. et al. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet* 2002; 11(6): 651–659. DOI: 10.1093/hmg/11.6.651
24. Iijima K., Someya T., Ito S., Nozu K., Nakanishi K., Matsuo K. et al. Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele. *Pediatrics* 2012; 129(6): e1621–1625. DOI: 10.1542/peds.2011–1323

Поступила: 18.04.23

Received on: 2023.04.18

Работа выполнена в рамках финансирования госзадания «Клинические и молекулярно-генетический критерии прогнозирования эффективности стероидной и иммуносупрессивной терапии первичного нефротического синдрома у детей» № 200080056

The work was supported by State Assignment “Clinical and molecular genetic criteria for predicting the effectiveness of steroid and immunosuppressive therapy for primary nephrotic syndrome in children” No. 200080056

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest, which should be reported.