



Морозов С.Л. ✉, Воинова В.Ю., Длин В.В.

Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Возможность прогнозирования развития стероидной зависимости у детей с идиопатическим нефротическим синдромом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Морозов С.Л., Длин В.В.; анализ и подготовка данных, написание текста – Морозов С.Л.; научное редактирование – Морозов С.Л., Воинова В.Ю.

Для цитирования: Морозов С.Л., Воинова В.Ю., Длин В.В. Возможность прогнозирования развития стероидной зависимости у детей с идиопатическим нефротическим синдромом. *Педиатрия Восточная Европа*. 2024;12(3):396–408. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.3.002>

Подана: 11.07.2024

Принята: 06.09.2024

Контакты: mser@list.ru

Резюме

Введение. Первичный нефротический синдром (НС) является одной из самых распространенных гломерулопатий у детей. Основной терапией НС является глюкокортикоидная терапия, однако более чем у 40% пациентов развивается резистентность или зависимость от стандартной терапии стероидами. В большинстве случаев молекулярная основа развития стероидрезистентности, стероидзависимости и неэффективности иммуносупрессивных препаратов при нефротическом синдроме не известна, что обосновывает необходимость изучения фармакогенетических аспектов применения иммуносупрессивных препаратов, используемых для лечения нефротического синдрома, а также возможности прогнозирования их эффективности на основе генотипирования до начала лечения.

Цель. Повысить эффективность лечения и снизить частоту осложнений от иммуносупрессивной и стероидной терапии у детей с первичным нефротическим синдромом на основе разработки молекулярно-генетических критериев персонализированной терапии.

Материалы и методы. В период 2017–2023 гг. на базе отделения нефрологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ проводилось открытое когортное проспективное сравнительное нерандомизированное исследование, посвященное оценке значения экспрессии генов, отвечающих за развитие стероидной зависимости, а также генов, участвующих в патогенезе формирования фокально-сегментарного гломерулосклероза. Под наблюдением находилось 48 детей с нефротическим синдромом (стероидзависимый – 32 ребенка, стероидрезистентный – 16 детей), из них 16 (33%) девочек и 32 (67%) 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.

Результаты. Продемонстрированы значение экспрессии гена ABCB1 (MDR1) и его роль в формировании стероидной резистентности у детей с первичным нефротическим синдромом. Продемонстрирована роль экспрессии катионных каналов потенциального рецептора TRPC в развитии фокально-сегментарного гломерулосклероза у детей с первичным нефротическим синдромом. Установлено значение уровней экспрессии генов TRPC3 и TRPC6 в формировании фокально-сегментарного гломерулосклероза у детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом.

Ключевые слова: дети, нефротический синдром, преднизолон, экспрессия, РНК, MDR1, TRPC6

Sergey L. Morozov ✉, Viktoria Yu. Voinova, Vladimir V. Dlin
Veltishev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery
of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Possibility of Predicting Steroid Dependence in Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Sergey L. Morozov, Vladimir V. Dlin; analysis and preparation of data, writing the text – Sergey L. Morozov; scientific editing – Sergey L. Morozov, Viktoria Yu. Voinova.

For citation: Morozov S., Voinova V., Dlin V. Possibility of Predicting Steroid Dependence in Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Pediatrics Eastern Europe*. 2024;12(3):396–408. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.3.002> (in Russian)

Submitted: 11.07.2024

Accepted: 06.09.2024

Contacts: mser@list.ru

Abstract

Introduction. Primary nephrotic syndrome (NS) is one of the most common glomerulopathies in children. The mainstay of NS therapy is glucocorticoid therapy, but more than 40% of patients develop resistance or dependence to standard steroid therapy. In most cases, the molecular basis for the development of steroid resistance, steroid dependence, and ineffectiveness of immunosuppressive drugs in nephrotic syndrome is unknown, which justifies the need to study the pharmacogenetic aspects of the use of immunosuppressive drugs used to treat nephrotic syndrome, as well as the possibility of predicting their effectiveness based on genotyping before treatment.

Purpose. To improve the effectiveness of treatment and reduce the incidence of complications from immunosuppressive and steroid therapy in children with primary nephrotic syndrome based on the development of molecular genetic criteria for personalized therapy.

Materials and methods. In the period 2017–2023, an open, prospective, comparative, non-randomized study was conducted at the Department of Nephrology of the Veltishev Research Clinical Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation to assess the significance of gene expression responsible for the development of steroid dependence, as well as genes involved in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. The study included 48 children with nephrotic syndrome (steroid-dependent – 32 children and steroid-resistant – 16 children), including 16 (33%) girls and 32 (67%) boys, the average age of children at the time of the study was 9.6 ± 3.8 years: boys – 9.4 ± 3.6 years, girls – 10.07 ± 4.5 years. The control group consisted of 24 conditionally healthy children (no history of kidney disease, as well as no data on steroid therapy), the average age was 9.4 ± 4.3 years, including 10 (42%) girls and 14 (58%) boys.

Results. The significance of the ABCB1 (MDR1) gene expression and its role in the formation of steroid resistance in children with primary nephrotic syndrome were demonstrated. The role of expression of cation channels of potential receptor TRPC in the development of focal segmental glomerulosclerosis in children with primary nephrotic syndrome is demonstrated. The significance of expression levels of genes TRPC3 and TRPC6 in the formation of focal segmental glomerulosclerosis in children with steroid-resistant nephrotic syndrome is established.

Keywords: children, nephrotic syndrome, prednisolone, expression, RNA, MDR1, TRPC6

■ ВВЕДЕНИЕ

Идиопатический нефротический синдром (НС) является одной из самых распространенных гломерулопатий у детей. Эпидемиологические исследования показывают, что заболеваемость первичным НС составляет 1,5–3,3 случая на 100 000 детского населения в год [1]. При этом кумулятивная распространенность первичного НС составляет 12–16 на 100 000 детского населения [2, 3]. Прогноз пациентов с нефротическим синдромом определяется главным образом морфологическим вариантом заболевания и чувствительностью к стероидной терапии [4]. Проведенное в 2013 году международное исследование заболеваний почек у детей (ISKDC) определило клинические, морфологические и лабораторные характеристики нефротического синдрома. Так, показано, что морфологическим вариантом первичного нефротического синдрома в 76% случаев являются минимальные изменения, при этом первичный ответ на стероиды имеют 95% пациентов, однако в 75% случаев отмечаются рецидивы нефротического синдрома, а в 50% случаев выявляется зависимость от стероидной терапии, что обуславливает необходимость длительного приема глюкокортикостероидов в высоких дозах и высокий риск нежелательных эффектов используемой терапии [5]. Кроме того, отмечается увеличение частоты стероидрезистентных форм нефротического синдрома у детей до 23% [6].

Эффективность иммуносупрессивной терапии стероидрезистентных форм нефротического синдрома колеблется от 25 до 65% [7], при этом около трети пациентов имеют недостаточный ответ на иммуносупрессивную терапию, что приводит к неоправданному риску осложнений неэффективной лекарственной терапии, т. к. средний период ожидания эффекта лечения составляет от 3 до 6 месяцев. Не меньший

интерес представляют дети со стероидчувствительным нефротическим синдромом, в случаях часто рецидивирующих и гормонозависимых форм заболевания эта группа пациентов имеет высокий риск побочных эффектов, связанных как со стероидной терапией, так и с использованием цитостатиков и антиметаболитов [8].

Основной терапией НС на протяжении 50 лет является глюкокортикоидная терапия, однако более чем у 40% пациентов развивается резистентность или зависимость к стандартной терапии стероидами, что в дальнейшем требует решения о назначении селективных иммуносупрессивных препаратов [9].

Несмотря на клиническую важность использования стероидных препаратов в соответствии с принятыми международными рекомендациями (<https://kdigo.org/guidelines/gd/>), в большинстве случаев молекулярная основа развития стероидзависимости/стероидрезистентности и неэффективности иммуносупрессивных препаратов при нефротическом синдроме не известна, что обосновывает необходимость изучения фармакогенетических аспектов применения иммуносупрессивных препаратов, используемых для лечения нефротического синдрома, а также возможности прогнозирования их эффективности на основе генотипирования до начала лечения.

К настоящему времени выявлено множество факторов, потенциально ассоциированных с зависимостью/резистентностью к стероидам. В первую очередь, это генетические факторы, связанные с рецептором глюкокортикоидов альфа (GR α), структурой его белкового гетерокомплекса. Однако большое внимание уделяется и другим белкам, экспрессирующимся в подоцитах. В частности, установлено, что мутации в генах гликопротеина Р могут оказывать существенное влияние на развитие глюкокортикоидной резистентности [10, 11].

Р-гликопротеин, также известный как MDR1, является одним из самых важных белков клеточной мембраны, ответственный за перенос веществ из клетки во внешнюю среду. Его ген MDR1 (Multiple Drug Resistance – множественная лекарственная устойчивость) находится на хромосоме 7q21 и относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров с широким спектром специфичности – его транспортные возможности распространяются на вещества от 300 до 2000 Да. Предполагается, что белок MDR1 весом 170 кДа эволюционно возник в качестве защитного механизма против токсичных субстанций, возникающих в клетке. Широкая экспрессия MDR1 в норме в различных тканях (гемопоэтической системе, клетках печени и почек, периферических мононуклеарных клетках крови, макрофагах, натуральных киллерах, дендритных клетках, Т- и В-лимфоцитах) служит для экспорта ксенобиотиков [11–15].

Молекулярные исследования указывают на то, что MDR1 является основным белком-транспортером, который вовлечен в развитие лекарственной устойчивости.

Также при развитии стероидной зависимости или резистентности отмечается формирование неблагоприятных морфологических вариантов нефротического синдрома, которые также отражают ответ на терапию. Так, замечено, что при формировании фокально-сегментарного гломерулосклероза у пациентов зачастую формируется зависимость или резистентность к терапии, что требует подключения селективной иммуносупрессивной терапии. Роль формирования фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) также отводится ряду молекулярных механизмов. В последнее время рассматривается роль катионных каналов потенциального рецептора TRPC. Известно, что подоциты клубочков экспрессируют TRPC1, TRPC3, TRPC4,

TRPC5 и TRPC6. С помощью электрофизиологических и фармакологических методов было показано, что только TRPC3 и TRPC6 обеспечивают поступление кальция в подоциты [14]. Наиболее изучена роль в повреждении почек катионных каналов TRPC5 и TRPC6, однако появляются данные о роли TRPC3. Так же как и TRPC6, TRPC3 вносит существенный вклад в увеличение уровня внутриклеточного кальция, тем самым активируя каскад передачи сигналов на кальциневрин, способствуя формированию фокально-сегментарного гломерулосклероза [15–19].

Таким образом, формирование стероидной зависимости или резистентности первичного нефротического синдрома является по настоящее время чрезвычайно актуальной проблемой, при этом основная задача ученых – поиск современных биомаркеров, которые определяли бы возможность прогнозирования стероидной зависимости у детей с идиопатическим нефротическим синдромом. Ранее в отделении наследственных и приобретенных болезней почек НИКИ педиатрии и детской хирургии проводились исследования, направленные на прогнозирование прогрессирующего течения стероидрезистентного нефротического синдрома при гломерулонефрите у детей (Патент на изобретение RU 2414852 C1, 27.03.2011) [20]. При этом авторы оценивают клинко-морфологические предикторы прогрессирования и эффективность 1-го курса иммуносупрессивной терапии, а в качестве клинко-морфологических предикторов прогрессирования определяют: фокально-сегментарный гломерулосклероз, ангиопатию сосудов сетчатки, повышение креатинина в крови при манифестации заболевания, стойкое повышение уровня холестерина в крови $>6,7$ ммоль/л, стойкое повышение уровня фибриногена в крови >4 г/л, нарушение суточного ритма артериального давления по типу «night-peackers» и «non-dippers», гипертрофию левого желудочка при эхокардиографии, увеличенные размеры почек при ультразвуковом исследовании, при выявлении более четырех клинко-морфологических предикторов и/или при отсутствии эффекта от 1-го курса иммуносупрессивной терапии прогнозируют прогрессирование стероидрезистентного нефротического синдрома у детей [20].

Недостаток предложенной методики состоит прежде всего в отсутствии учета генотипических особенностей ребенка, страдающего нефротическим синдромом, терапия и тактика ведения ребенка определяется только на основании совокупности клинко-лабораторных данных. Зачастую такие дети получают длительную стероидную терапию, сформировав осложнения, и, как следствие, имеет место позднее начало селективной иммуносупрессивной терапии.

В настоящее время в отделе наследственных и приобретенных болезней почек НИКИ педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева ведутся исследования по изучению молекулярно-генетических механизмов стероидной резистентности и зависимости при первичном нефротическом синдроме у детей, целью которых является повышение эффективности лечения на основе разработки молекулярно-генетических критериев персонализированной терапии.

Представленные в данной работе результаты направлены на повышение достоверности прогнозирования стероидной резистентности/зависимости у пациентов с идиопатическим нефротическим синдромом.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повысить эффективность лечения и снизить частоту осложнений от иммуносупрессивной и стероидной терапии у детей с первичным нефротическим синдромом на основе разработки молекулярно-генетических критериев персонализированной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период 2017–2023 гг. на базе отделения нефрологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ проводилось открытое когортное проспективное сравнительное нерандомизированное исследование, посвященное оценке значения экспрессии генов, отвечающих за развитие стероидной зависимости, а также генов, участвующих в патогенезе формирования фокально-сегментарного гломерулосклероза. Определение экспрессии РНК проводилось на цифровом анализаторе нуклеиновых кислот на основе разработанной кастомной панели генов MDR1, TPRC3, TRPC6, ассоциированных с течением и развитием идиопатического нефротического синдрома (табл. 1).

Анализ экспрессии генов проводился с помощью цифрового анализатора нуклеиновых кислот nCounter (Nanosttring Technologies, США).

У всех пациентов проводилось выделение РНК из лимфоцитов периферической крови. Каждый образец представлял собой 100 нг мРНК в концентрации 20 нг/мкл. Полученные данные по экспрессии генов выражены в условных единицах (числе

Таблица 1
Исследуемые гены, их функция, уровень экспрессии в контрольной группе
Table 1
Studied genes, their function, expression level in the control group

Исследуемый ген	Функция гена	Экспрессия гена в контрольной группе, усл. ед. N=24; M±m
ABCB1 (MDR1)	MDR1 (Multiple Drug Resistance – множественная лекарственная устойчивость), или ABCB1 (англ. ATP – binding cassette B 1), находится на хромосоме 7q21 и относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров с широким спектром специфичности – его транспортные возможности распространяются на вещества от 300 до 2000 Да. Является одним из самых важных белков клеточной мембраны, ответственных за перенос веществ из клетки во внешнюю среду	85,8±14,5
TRPC	Ген кодирует ионные каналы TRPC, обеспечивающие проницаемость клетки (подоцита) для кальция после их индукции вторичными мессенджерами (диацилглицерином и инозитол-1,4,5-трифосфатом), активированные фосфолипазой C	
TRPC3	Кодирует катионные каналы подоцитов клубочков, обеспечивающие поступление кальция в клетку	1,6±0,3
TRPC6	Кодирует катионные каналы подоцитов клубочков, обеспечивающие поступление кальция в клетку. Образует сигнальный комплекс (TRPC6 + щелевидная мембрана), обеспечивает регуляцию уровня кальция в клетке. Участвует в регуляции уровня кальция, обеспечивая работу сократительного аппарата ножек подоцитов, выполняя роль механорецептора	7,03±4,03

молекул мРНК на стандартный объем образца в запуске (5 мкл)). Качество выделенной РНК оценивалось с помощью электрофореза на агарозном геле в камере для горизонтального электрофореза SE-2 (ООО «Компания Хеликон», Россия). Результаты электрофореза документированы с помощью системы гель-документирования Gel Imager 2 (ООО «Компания Хеликон», Россия).

Количество выделенной РНК оценивалось с помощью прибора флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Далее проводилась гибридизация выделенной РНК с подобранными зондами на цифровом анализаторе нуклеиновых кислот nCounter (Nanostring Technologies, США).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программного обеспечения STATISTICA 10.0. Для оценки правильности распределения выборки использовался критерий Колмогорова – Смирнова. Если распределение отличалось от нормального, использовались методы непараметрической статистики: оценка зависимых и независимых групп, определение корреляции по методу Spearman. При оценке достоверности статистических гипотез наличие значимости определялось при значении $p < 0,05$.

Под наблюдением находилось 48 детей, из них 16 (33%) девочек и 32 (67%) 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: $K-S d=0,12$, $p>0,2$ и $K-S d=0,12$, $p>0,2$ соответственно.

На основании клинико-лабораторного и инструментального исследования у всех пациентов был диагностирован идиопатический нефротический синдром. В зависимости от уровня чувствительности к стероидной терапии были выделены следующие варианты НС (табл. 2).

Группа I – стероидрезистентный нефротический синдром (СРНС) характеризуется сохраняющейся протеинурией после курса преднизолона в дозе 2 мг/кг 24 часа (не более 60 мг / 24 часа) в течение 6–8 недель (и последующих 3 внутривенных введений метилпреднизолона в дозе 20–30 мг/кг, но не более 1 грамма на введение).

Группа II – стероидзависимый нефротический синдром (СЗНС) характеризуется развитием рецидивов заболевания при снижении дозы преднизолона или в течение 2 недель после его отмены (при условии проведения адекватных доз и курса стероидной терапии).

Группа III – стероидчувствительный нефротический синдром (СЧНС) характеризуется развитием полной клинико-лабораторной ремиссии заболевания на фоне приема преднизолона в дозе 2 мг/кг 24 часа (не более 60 мг / 24 часа) в течение 6–8 недель и отсутствием рецидива заболевания в течение 2 недель и более после его отмены.

Помимо распределения пациентов в зависимости от чувствительности к стероидной терапии, пациенты делились на группы в зависимости от морфологического варианта поражения почек. У детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в 100% случаев, при этом морфологический вариант у всех детей определялся как фокальный сегментарный гломерулосклероз.

Таблица 2
Распределение пациентов по группам в зависимости от чувствительности к глюкокортикостероидам
Table 2
Distribution of patients into groups depending on sensitivity to glucocorticosteroids

Группы	N	Возраст, лет; M±m	Пол, мальчи- ки/девочки
I – стероидрезистентный нефротический синдром (СРНС)	16	10,5±4,06	10/6
II – стероидзависимый нефротический синдром (СЗНС)	22	9,06±3,39	16/6
III – стероидчувствительный нефротический синдром (СЧНС)	10	8,4±4,06	6/4
IV – группа контроля	24	9,4±4,3	14/10

Таблица 3
Распределение пациентов по группам в зависимости от морфологического варианта патологии
Table 3
Distribution of patients into groups depending on the morphological variant of pathology

Группы	N	N биоп- сий	Фокально-сег- ментарный гло- мерулосклероз (ФСГС)	Мезангиопро- лиферативный гломерулонеф- рит (МПГН)	Минимальные изменения (ММ)	Пациенты без биоп- сии *
I – СРНС	16	16 (100%)	16 (100%)	–	–	–
II – СЗНС	22	16 (73%)	7 (44%)	–	9 (56%)	6 (27%)
III – СЧНС	10	5 (50%)		2 (40%)	3 (60%)	5 (50%)

Примечание: * учитывая строгие показания к нефробиопсии, морфологическое исследование проводилось не у всех пациентов.

У детей со стероидзависимым нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в 73% случаев, при этом из них ФСГС определялся в 44% случаев, а в 56% случаев имели место минимальные изменения. У детей со стероидчувствительным нефротическим синдромом нефробиопсия проведена в половине случаев, из них минимальные изменения отмечались у 60% пациентов, а в 40% случаев имел место мезангиопролиферативный вариант гломерулонефрита (ГН). Распределение пациентов по группам в зависимости от морфологического варианта и чувствительности к стероидной терапии представлено в табл. 3.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа экспрессии гена MDR1

При анализе экспрессии гена MDR1 у пациентов со стероидрезистентным нефротическим синдромом уровень экспрессии составлял 339,75±78,5 усл. ед., при стероидзависимом нефротическом синдроме – 217,03±42,5 усл. ед., при стероидчувствительном нефротическом синдроме уровень экспрессии составлял 84,1±14,6 усл. ед. Группу контроля составили условно здоровые дети (в анамнезе отсутствовали заболевания почек, а также отсутствовали данные о приеме стероидной терапии). Уровень экспрессии гена MDR1 в группе контроля (группа IV) составил 85,8±14,5 усл. ед. (рис. 1).

При сравнении исследуемых групп установлено, что у детей с СРНС и СЗНС уровень экспрессии гена MDR1 был достоверно выше, чем у пациентов с ГЧНС и у детей контрольной группы. В группе детей с СРНС уровень экспрессии гена MDR1 был достоверно выше, чем у пациентов с ГЗНС. Уровень экспрессии в группе контроля

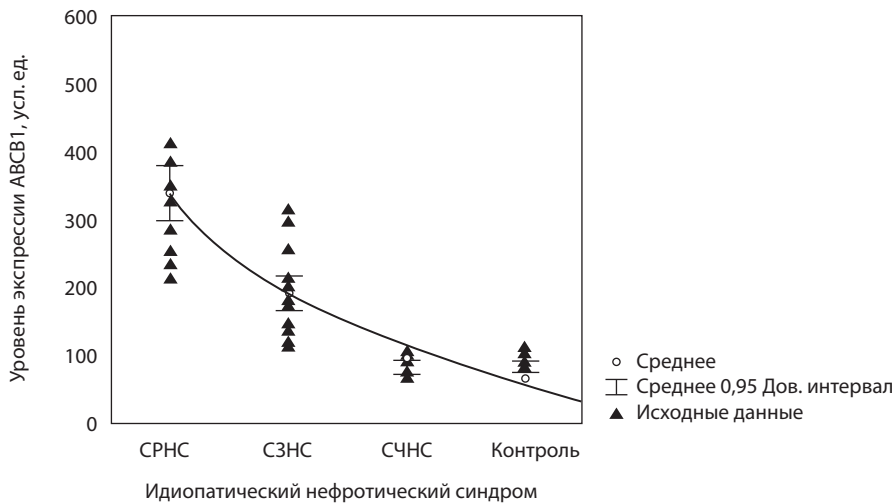


Рис. 1. Результаты анализа экспрессии гена MDR1 в исследуемых группах
Fig. 1. Results of the MDR1 gene expression analysis in the study groups

(группа IV) составил $85,8 \pm 14,5$ усл. ед. и достоверно не отличался от уровня экспрессии гена MDR1 при стероидчувствительном нефротическом синдроме ($p=0,9$) (табл. 4).

Таким образом, установлено, что уровень экспрессии гена MDR1 был наибольшим у пациентов со стероидрезистентным НС, на треть ниже при стероидзависимом варианте НС и почти в 4 раза ниже при стероидчувствительном НС и в группе

Таблица 4
Показатели экспрессии гена MDR 1 в исследуемых группах
Table 4
MDR 1 gene expression indices in the study groups

Группы	Показатели	Экспрессия ABCB1, усл. ед. M±m
I		339,75±78,5
II		217,03±42,5
III		84,1±14,6
IV (контрольная)		85,8±14,5
P I–II		0,000002*
P I–III		0,0002*
P I–IV		0,000002*
P II–III		0,00009*
P II–IV		0,000002*
P III–IV		0,9

Примечание: * достоверная разница при сравнении пациентов с первичным нефротическим синдромом и группой контроля ($p<0,05$).

контроля. При корреляционном анализе установлена обратная умеренной тесноты связь варианта ответа на стероидную терапию от степени экспрессии гена MDR1 ($r=-0,46$; $p<0,05$).

Результаты анализа экспрессии генов семейства катионных каналов потенциального рецептора TRPC в изучаемых группах пациентов

На основании данных литературы и полученных результатов наибольшего внимания заслуживает уровень экспрессии трех генов рецептора катионных каналов, это TRPC3, TRPC5 и TRPC6. Уровни экспрессии наиболее значимых генов у детей в зависимости от чувствительности к стероидам представлены в табл. 5. Также значения экспрессии исследуемых генов определялись в контрольной группе.

Таблица 5
Уровень экспрессии генов катионных каналов потенциального рецептора TRPC3, TRPC5 и TRPC6 в изучаемых группах
Table 5
Expression level of genes of cation channels of potential receptor TRPC3, TRPC5 and TRPC6 in the studied groups

Группы	N	TRPC3 (усл. ед.) $M\pm m$	TRPC5 (усл. ед.) $M\pm m$	TRPC6 (усл. ед.) $M\pm m$
Группа I – СРНС	16	$3,34\pm2,7$	$1,7\pm0,6$	$24,9\pm10,3$
Группа II – СЗНС	22	$1,69\pm0,59$	$1,5\pm0,4$	$20,5\pm9,1$
Группа III – СЧНС	10	$1,3\pm0,3$	$1,3\pm0,3$	$8,8\pm4,9$
Группа контроля	24	$1,6\pm0,3$	$1,5\pm0,4$	$7,03\pm4,03$

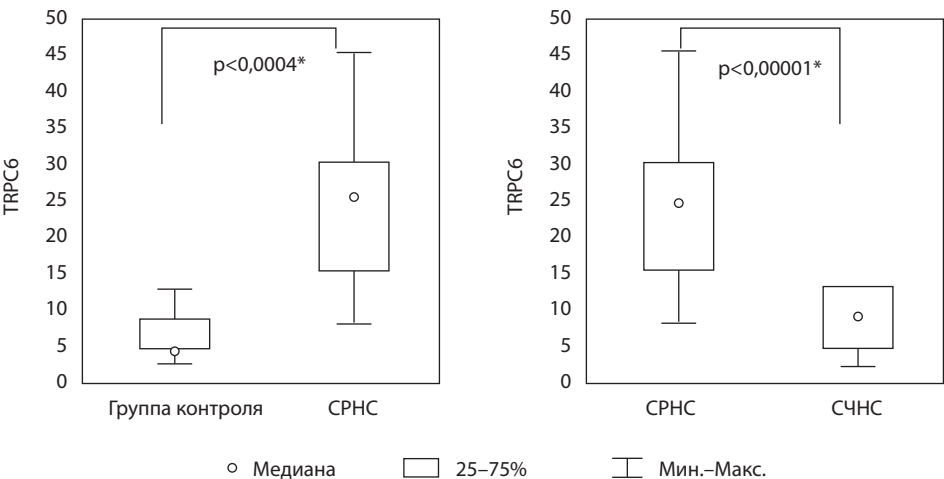


Рис. 2. Уровень экспрессии гена TRPC6 у детей с СРНС, СЧНС и в группе контроля
Fig. 2. TRPC6 gene expression level in children with SRNS, SCNS and in the control group

Примечание: * достоверная разница при сравнении пациентов с НС в зависимости от стероидной чувствительности ($p<0,05$).

Таблица 6
Уровень экспрессии генов катионных каналов потенциального рецептора TRPC3 и TRPC6 в зависимости от морфологического варианта НС
Table 6
Expression level of genes of cation channels of potential receptor TRPC3 and TRPC6 depending on the morphological variant of NS

Группы	N	TRPC3 (усл. ед.) M±m	TRPC6 (усл. ед.) M±m
I – фокально-сегментарный гломерулосклероз	26	2,97±0,4	27,3±6,9
II – минимальные изменения	9	1,23±0,3	10,2±3,8
P I-II		0,003*	0,000002*

Примечание: * достоверная разница при сравнении пациентов с НС в зависимости от морфологического варианта (p<0,05).

При сравнении вариантов нефротического синдрома в зависимости от ответа на стероидную терапию получена достоверная разница уровня экспрессии только гена TRPC6 между СРНС и СЧНС, а также группой контроля. Достоверной разницы уровня экспрессии генов TRPC3, TRPC5 и TRPC6 между СРНС и СЗНС не выявлено (рис. 2).

Проведенный корреляционный анализ выявил обратную средней силы тесноту связи между СРНС и уровнем экспрессии гена TRPC6 ($r=-0,54$; $p<0,05$). Поскольку в патогенезе развития ФСГС рецепторы TRPC принимают непосредственное участие, то сравнение независимых групп проводилось с учетом морфологических вариантов нефротического синдрома ФСГС и МИ, в результате чего получена достоверная разница уровня экспрессии гена TRPC3 и TRPC6 (табл. 6).

Проведенный корреляционный анализ показал связь между фокально-сегментарным гломерулосклерозом и уровнем экспрессии генов TRPC6 ($r=0,87$; $p<0,05$) и TRPC3 ($r=0,87$; $p<0,05$).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из полученных данных проведенного исследования, даже несмотря на относительно небольшую выборку, можно сделать вывод, что уровень экспрессии гена ABCB1 выше у пациентов со стероидрезистентным вариантом нефротического синдрома, чем у пациентов, которые имели ответ на стероидную терапию. Вместе с тем имеются достоверные отличия экспрессии ABCB1 между СЗНС и СЧНС. В клинической практике пациенты со стероидзависимым нефротическим синдромом дают рецидивы заболевания на фоне отмены преднизолона, что, вероятнее всего, объясняется быстрой элиминацией преднизолона и в дальнейшем требует пересмотра схемы снижения преднизолона.

В отличие от предыдущих исследований, проведенных другими центрами, где оценивался уровень экспрессии белка/рецептора, в нашей работе мы оценивали концентрацию мРНК у конкретного пациента, что, вероятнее всего, будет более объективным показателем, не зависящим от сопутствующей терапии, как продемонстрировано в ранее проведенных исследованиях с антагонистами рецептора ABCB1, когда удавалось добиться снижения экспрессии белка на фоне приема циклоспорина.

Также результаты настоящей работы являются перспективными в изучении патогенеза развития фокально-сегментарного гломерулосклероза у детей с первичным

нефротическим синдромом. Формирование ФСГС наблюдается преимущественно при тяжелых вариантах нефротического синдрома, которые резистентны к стандартной терапии стероидами, или же наблюдается развитие стероидной зависимости. Поиск ранних маркеров формирования ФСГС до проведения нефробиопсии нам представляется перспективным. В качестве таких маркеров возможно использование определения экспрессии генов TRPC3 и TRPC6, что позволяет прогнозировать развитие у пациента фокально-сегментарного гломерулосклероза.

Также высокую экспрессию гена TRPC6 можно расценить как косвенный признак имеющейся или формирующейся стероидной резистентности у детей с первичным нефротическим синдромом. При этом препаратами выбора иммуносупрессивной терапии у этих пациентов будут ингибиторы кальциневрина. Это объясняется прежде всего особенностью взаимодействия кальциневрина с рецепторами семейства TRPC.

На основании полученных данных уже в настоящее время можно говорить о разработке методов прогнозирования, основанных на транскриптомном анализе. Представленные данные демонстрируют, что у детей с идиопатическим нефротическим синдромом при определении уровня экспрессии гена MDR1 ≥ 100 усл. ед. возможно прогнозировать высокий риск стероидной зависимости, а при уровнях экспрессии гена MDR1 ≥ 100 усл. ед., гена TRPC3 – $\geq 2,5$ усл. ед. и гена TRPC6 – ≥ 20 усл. ед. возможно прогнозировать высокий риск стероидной зависимости с развитием фокально-сегментарного гломерулосклероза.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы являются перспективными в изучении механизмов стероидзависимости и стероидрезистентности идиопатического нефротического синдрома у детей, а полученные результаты можно использовать для разработки диагностических панелей на основе ПЦР-Real-Time, которые помогут уже до начала терапии определиться с оптимальной тактикой ведения пациента с НС.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dossier C., Lapidus N., Bayer F., Sellier-Leclerc A.L., Boyer O. Epidemiology of idiopathic nephrotic syndrome in children: endemic or epidemic? *Pediatr Nephrol.* 2016;31(12):2299–2308. doi: 10.1007/s00467-016-3509-z
2. McKinney P.A., Feltbower R.G., Brocklebank J.T., Fitzpatrick M.M. Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(12):1040–4. doi: 10.1007/s004670100021
3. Niaudet P. Treatment of childhood steroid-resistant idiopathic nephrosis with a combination of cyclosporine and prednisone. French Society of Pediatric Nephrology. *J Pediatr.* 1994;125(6 Pt 1):981–6. doi: 10.1016/s0022-3476(05)82020-7
4. Lieberman K., Pavlova-Wolf A. Adrenocorticotrophic hormone therapy for the treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children and young adults: a systematic review of early clinical studies with contemporary relevance. *J Nephrol.* 2017;30(1):35–44. doi: 10.1007/s40620-016-0308-3. Epub 2016 Apr 16.
5. Selewski D.T., Troost J.P., Cummings D., Massengill S.F., Gbadegesin R.A. Responsiveness of the PROMIS® measures to changes in disease status among pediatric nephrotic syndrome patients: a Midwest pediatric nephrology consortium study. *Health Qual Life Outcomes.* 2017;15(1):166. doi: 10.1186/s12955-017-0737-2
6. Banaszak B., Banaszak P. The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(6):927–32. doi: 10.1007/s00467-011-2083-7
7. Beins N.T., Dell K.M. Long-Term Outcomes in Children with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome Treated with Calcineurin Inhibitors. *Front Pediatr.* 2015;3:104. doi: 10.3389/fped.2015.00104
8. Abeyagunawardena A.S., Sebire N.J., Risdon R.A., Dillon M.J., Rees L. Predictors of long-term outcome of children with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(2):215–21. doi: 10.1007/s00467-006-0264-6
9. Barbarino J.M., Staats C.E., Venkataramanan R., Klein T.E., Altman R.B. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(10):563–85. doi: 10.1097/FPC.0b013e328364db84

10. Swierczewska M., Ostalska-Nowicka D., Kempisty B., Nowicki M., Zabel M. Molecular basis of mechanisms of steroid resistance in children with nephrotic syndrome. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(3):339–44. Epub 2013 Aug 1.
11. Bauer B., Hartz A.M., Fricker G., Miller D.S. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):413–9. doi: 10.1124/mol.66.3
12. Bauer B., Hartz A.M.S., Pekcec A., Toellner K., Miller D.S., Potschka H. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol. Pharmacol.* 2008;73(5):1444–1453. doi: 10.1124/mol.107.041210
13. Leopoldo M., Nardulli P., Contino M., Leonetti F., Luurtsema G., Colabufo N.A. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2019;29(6):455–461. doi: 10.1080/13543776.2019.1618273
14. Morozov S., Pakhomova V., Voinova V. Expression profile of genes associated with steroid dependence in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Prakticheskaja medicina.* 2024;22(3):57–62. (in Russian)
15. Morozov S., Voronkova A., Dlin V. The Significance of abcb1 Gene Expression in Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Nefrologija.* 2021;25(1):83–89. doi: 10.36485/1561-6274-2021-25-1-83-89 (in Russian)
16. Ilatovskaya D., Staruschenko A. TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;309(5):393–7. doi: 10.1152/ajprenal.00186.2015
17. Saliba Y., Karam R., Smayra V., Aftimos G., Abramowitz J., Birnbaumer L., et al. Evidence of a Role for Fibroblast Transient Receptor Potential Canonical 3 Ca²⁺ Channel in Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1855–1876. doi: 10.1681/ASN.2014010065
18. Morozov S., Dlin V. The problem of focal segmental glomerulosclerosis in primary glomerulonephritis. *Nefrologija.* 2023;27(1):108–114. doi: 10.36485/1561-6274-2023-27-1-108-114 (in Russian)
19. Morozov S., Dlin V. The role of cation channels of the potential receptor trpc in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Rossiiskij vestnik perinatologii i pediatrii.* 2021;66(5):67–74. doi: 10.21508/1027-4065-2021-66-5-67-74 (in Russian)
20. Prikhodina L., Dlin V., Ignatova M., Turpitko O. *Method for predicting the progressive course of steroid-resistant nephrotic syndrome in glomerulonephritis in children.* Patent for invention RU 2414852 C1, 27.03.2011. Application No. 2009130184/14 dated 06.08.2009. (in Russian)