

На правах рукописи

Бобылева Ирина Андреевна

Генетические детерминанты развития мембранозной нефропатии

14.01.29 – Нефрология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Бобкова Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

Батюшин Михаил Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра внутренних болезней №2, профессор кафедры

Прокопенко Елена Ивановна, доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», кафедра трансплантологии, нефрологии и искусственных органов, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «12» октября 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.05 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент



Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

В последние несколько десятилетий научный интерес в области нефрологии сосредоточен на изучении механизмов возникновения и прогрессирования мембранозной нефропатии (МН) как одной из наиболее частых причин нефротического синдрома у взрослых [Ronco P. и соавт., 2020; Alsharhan L. и соавт., 2021]. МН – иммуноопосредованное поражение почек, которое характеризуется диффузным утолщением и изменением структуры базальной мембраны клубочков в результате субэпителиального и интрамембранозного отложения иммунных комплексов [Causer W.G. и соавт., 2017].

Ключевыми этапами в понимании молекулярно-генетических основ иммунокомплексного повреждения при идиопатической (первичной) мембранозной нефропатии (ИМН) стали идентификация наиболее распространенного в популяции пациентов (у 80%) подоцитарного антигена – рецептора фосфолипазы А₂М-типа (M-type phospholipase A2 receptor, PLA2R) и подтверждение роли в развитии ИМН антител (АТ) к этому антигену [Beck L.H. и соавт., 2009]. В то же время факторы, определяющие выработку АТ к PLA2R, до сих пор не установлены. Обсуждается генетическая детерминированность этих механизмов, в частности, взаимодействие между геном *PLA2R1*, кодирующим подоцитарный рецептор PLA2R, и генами главного комплекса гистосовместимости человека (*HLA*) класса II, ответственными за синтез аутоантител к нему [Stanescu H.C. и соавт., 2011]. Полагают, что генетически обусловленные конформационные изменения рецептора превращают его в аутоантигенную мишень, к которой при наличии определенного генотипа гена *HLA* вырабатываются специфические антитела (АТ к PLA2R).

В российской популяции изучение ассоциаций вариантов данных генов с выработкой АТ к PLA2R, развитием и течением ИМН не проводилось, вместе с тем, это направление исследований представляется перспективным, поскольку позволяет персонафицировать подходы к диагностике и лечению ИМН.

Степень разработанности темы

Генетические детерминанты развития ИМН, в частности роль гена *PLA2R1* и генов главного комплекса гистосовместимости человека (*HLA*), изучаются зарубежными авторами со второй декады 2000 гг. Наиболее значимый вклад внесли H.C. Stanescu и соавт. (2011), которые впервые выявили статистически значимую ассоциацию полиморфных маркеров *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и *rs4664308* гена *PLA2R1* с развитием ИМН в трех европейских популяциях (Дания, Франция и Великобритания). При этом оказалось, что у пациентов, гомозиготных по аллелям риска обоих полиморфных маркеров, вероятность развития ИМН возрастает почти в 80 раз

(отношение шансов 78). В дальнейшем J. Lv и соавт. (2013), G. Bullich и соавт. (2014), R. Ramachandran и соавт. (2016) продолжили исследования в этом направлении и установили взаимосвязь между носительством аллелей риска данных полиморфных маркеров и развитием ИМН, ее течением и ответом на патогенетическую терапию.

В российской популяции ассоциация вариантов генов *PLA2R1* и *HLA* с предрасположенностью к развитию ИМН и особенностями ее течения изучена нами впервые.

Цель исследования

Изучить вклад вариантов генов, ответственных за синтез специфического подоцитарного антигена (*PLA2R1*) и аутоантител к нему (*HLA-DQA1*), в развитие ИМН и оценить их влияние на течение заболевания.

Задачи исследования

В популяции российских пациентов с морфологически подтвержденной ИМН:

1. изучить ассоциацию полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их сочетания с предрасположенностью к ИМН и установить аллели/генотипы повышенного риска.
2. Оценить взаимосвязь аллелей и генотипов повышенного риска полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с продукцией АТ к PLA2R.
3. Выявить особенности клинической картины ИМН в зависимости от генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1*, *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их комбинаций.
4. Проанализировать характер ответа на патогенетическую терапию с учетом генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1*, *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их комбинаций.
5. Определить роль полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1*, *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их комбинаций в прогрессировании дисфункции почек.

Научная новизна работы

Впервые в российской популяции изучена ассоциация полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с развитием ИМН.

Впервые проведено отечественное исследование по оценке влияния носительства различных аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их комбинаций на характер течения ИМН и ответа на патогенетическую терапию.

Теоретическая и практическая значимость работы

Идентифицированы аллели и генотипы полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA*, определяющие высокий риск развития ИМН, ее клиническую и серологическую активность, особенности ответа на терапию. Результаты проведенного исследования могут стать инструментом для выделения среди пациентов с ИМН группы с повышенным генетическим риском и послужить обоснованием персонифицированного подхода к их ведению.

Клинико-генетическое обследование с идентификацией изученных маркеров может иметь значение для прогнозирования течения ИМН и ответа на лечение, обоснования применения в группах повышенного генетического риска таргетных препаратов, подавляющих выработку АТ к PLA2R.

Методология и методы исследования

Для оценки генетического риска развития ИМН проведено наблюдательное поперечное исследование «случай-контроль». Для анализа характера течения и ответа на иммуносупрессивную терапию (ИСТ), оценки почечной выживаемости проведено ретроспективное наблюдательное исследование. В ходе проведения работы использованы теоретический анализ, наблюдение и сравнение с последующей статистической обработкой материала.

Положения, выносимые на защиту

1. Носительство аллеля *A* и генотипа *A/A* полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1*, кодирующего подоцитарный рецептор PLA2R, и аллеля *A* и генотипа *A/A* полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1*, ответственного за синтез антител к рецептору PLA2R, ассоциируется с повышенным риском развития ИМН. Наиболее высокую вероятность развития ИМН имеют носители комбинации 3-х или 4-х аллелей риска генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*).
2. У пациентов с ИМН носительство аллелей риска полиморфных маркеров *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*) определяет течение заболевания с более высокой серологической и клинической активностью.
3. У пациентов с ИМН, являющихся носителями генотипа *A/A* гена *HLA-DQA1* (*rs2187668*) или комбинации 3-х или 4-х аллелей риска генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*), для индукции ремиссии ИМН (полной или частичной) необходима более агрессивная и длительная иммуносупрессивная терапия.

4. Почечная выживаемость у пациентов с ИМН зависит не столько от генетической предрасположенности к развитию заболевания, сколько от наличия у пациента традиционных факторов риска прогрессирования ХГН.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и выводов исследования обеспечивается однородностью (в исследуемой группе только пациенты с ИМН) и достаточностью выборки, применением современных методов диагностики и статистической обработки материала.

Апробация диссертации состоялась 16 апреля 2021 г. на заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (протокол №6).

Материалы диссертации представлены на 56-м Международном конгрессе Европейского общества нефрологов и Европейской ассоциации диализа и трансплантации (ERA-EDTA) (Венгрия, 2019 г.), IX съезде Научного общества нефрологов России (Москва, 2019 г.).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно разработан план, определены цель и задачи исследования, выполнены основные этапы диссертационной работы (поиск литературы, сбор, анализ и обобщение материала), сформулированы выводы и подготовлены практические рекомендации. Автором самостоятельно проводилась подготовка биологического материала пациентов для дальнейшего генетического исследования. Автор принимала непосредственное участие в определении тактики ведения пациентов с ИМН, госпитализированных в нефрологическое отделение клиники ревматологии, нефрологии и профпатологии им. Е.М. Тареева Университетской клинической больницы № 3 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Внедрение в практику

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в работе нефрологического отделения клиники ревматологии, нефрологии и профпатологии имени Е.М. Тареева Университетской клинической больницы № 3, в учебном процессе на кафедре внутренних, профессиональных болезней и ревматологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский

университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения и результаты исследования соответствуют формуле специальности 14.01.21 Нефрология. Диссертационная работа соответствует области исследования специальности, в частности пунктам 3, 5, 6 паспорта специальности 14.01.21 Нефрология.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные научные работы в отечественных изданиях, из которых 1 статья в журнале, входящем в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных Scopus, и 2 статьи в журналах, входящем в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на **121** страницах машинописного текста и состоит из введения, **4** глав, заключения и выводов, практических рекомендаций, списка литературы, иллюстрирована **58** таблицами и **40** рисунками. Библиография включает **139** источников (**15** – отечественных, **124** – зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В ходе проведения работы обследовано 210 взрослых индивидуумов, включая 70 пациентов с морфологически подтвержденной ИМН, 40 пациентов с другими морфологическими вариантами хронического гломерулонефрита (ХГН) и 100 доноров крови (контрольная группа). Все пациенты в 2016–2019 гг. проходили стационарное или амбулаторное обследование в клинике ревматологии, нефрологии и профпатологии имени Е.М. Тареева Университетской клинической больницы № 3 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). Диагноз ИМН устанавливали при исключении вторичных причин МН в ходе стандартного общеклинического обследования и с помощью определения в сыворотке крови уровня специфичных для ИМН антител.

У пациентов с ИМН анализировали особенности клинической картины заболевания с учетом демографических характеристик, клинических синдромов в дебюте ИМН и на момент нефробиопсии, определяли уровни АТ к PLA2R, оценивали эффективность ИСТ и наличие прогрессирования почечной дисфункции.

Клиническая характеристика российских пациентов соответствовала литературным данным, описывающим типичную популяцию больных ИМН [Shiiki H., 2004, Rihova Z., Troyanov S., 2006] (таблица 1, таблица 2).

Таблица 1 – Клинические характеристики пациентов с ИМН

Показатели	n	Значение
Пол, м/ж, n(%)	70	40 (57,1)/30 (42,9)
Возраст на момент дебюта МН, лет	60	46,6±15,1
Частота нефротического синдрома в дебюте ИМН, %	62	85,5
Протеинурия, г/сут	56	4,9 [1,4; 16,5]
Общий белок в крови, г/л	56	46,0 [32; 76]
Альбумин в крови, г/л	55	25 [20,0; 30,5]
Общий холестерин в крови, ммоль/л	48	8,7 [6,9; 11,4]
САД, мм рт. ст.	59	130 [110; 200]
ДАД, мм рт. ст.	59	80 [70; 100]
Степень АГ, I/II/III, %	35	40,0/34,3/25,7
Креатинин в крови, мкмоль/л	56	83,5 [51; 218]
СКФ, мл/мин/1,73м ²	56	81,5 [29; 133]
Нарушение функции почек, в %	56	23,2
Стадия ХБП, 1/2/3, в %	56	42,9/33,9/23,2
Стадия МН, I/II/III, в %	46	13,1/65,2/21,7
Время, прошедшее от дебюта до выполнения биопсии почки, мес	56	7,4 [0; 114]
Данные представлены в виде частоты (%), медианы и межквартильных размахов Me [25;75] %, среднего ± стандартного отклонения		

Уровни АТ к PLA2R определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческой тест-системы компании Euroimmun (Германия). Титры АТ к PLA2R менее 1:10 рассматривали как референсные значения [Нохха Е. и соавт., 2012].

У всех включенных в исследование лиц (n = 210) идентифицировали аллели и генотипы полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием аллель-специфичных TagMan-зондов в научно-производственной компании «СИНТОЛ» (таблица 2).

В результате для полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* идентифицированы аллели *A* и *G* и генотипы *A/A*, *A/G* и *G/G*, а для полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* — аллели *G* и *A* и генотипы *G/G*, *G/A* и *A/A*.

Генетическую предрасположенность к ИМН оценивали путем сравнения распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* у пациентов с ИМН, пациентов с другими формами хронического гломерулонефрита и доноров крови.

Таблица 2 – Идентификация аллелей и генотипов исследуемых вариантов генов

Ген (полиморфный маркер)	Праймеры	Генотипы
<i>PLA2R1</i> (<i>rs4664308</i>)	<i>PLA2R1-up</i> TCCACAGGAGCAATTTTCTGA; <i>PLA2R1-low</i> GGCTTAATCAGGGGCAGGTA; <i>PLA2R1-wt (FAM)-ttggtcactttagaAtaagaatggt-(RTQ1)</i> <i>PLA2R1-m (R6G)-accattcttaCtctaaagtaccaa-(BHQ2)</i>	<i>A/A</i>
		<i>A/G</i>
		<i>G/G</i>
Ген (полиморфный маркер)	Праймеры	Генотипы
<i>HLA-DQA1</i> (<i>rs2187668</i>)	<i>HLA-DQA1-F2</i> TGGCACAGGTGGGGAGTG <i>HLA-DQA1-RTCACTATTTACAAAGCTTAGCC</i> <i>HLA-DQA1-wt (FAM)-agctgagagtaaGtgaggac-(RTQ1)</i> <i>HLA-DQA1-m (R6G)-gctgagagtaaAtgaggacca-(BHQ2)</i>	<i>G/G</i>
		<i>G/A</i>
		<i>A/A</i>

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ Excel из пакета Microsoft Office 2013 (IBM SPSS Statistic 26.0 (IBM Corporation, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Количественные переменные приведены в виде средних значений и стандартных отклонений (при нормальном распределении) или медианы и межквартильного размаха (при отклонении распределения от нормального); качественные показатели – в виде абсолютных частот и долей в процентах. Значимость различий

между количественными показателями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или ANOVA-теста (при нормальном распределении) или U-критерия Манна-Уитни или теста Краскала-Уоллиса (при распределении, отличавшемся от нормального). Для проверки статистической значимости различий частотных показателей использовали критерий χ^2 по Пирсону и точный критерий Фишера. Прогрессирование почечной дисфункции оценивали методом Каплана-Майера и регрессии Кокса. Кривые выживаемости разных групп пациентов сравнивали с помощью теста logrank. Различия считали значимыми при $p < 0,05$; значение $0,05 \leq p < 0,1$ рассматривали как наличие тенденции.

Результаты исследования

Анализ ассоциации полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* с развитием ИМН

При сравнительном анализе распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* выявлено статистически значимое увеличение частоты аллеля *A* и генотипа *A/A* у пациентов с ИМН по сравнению с контролем, что ассоциировалось с повышением риска развития ИМН в 2,9 и 3,9 раза соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* у пациентов с ИМН и в контрольной группе

Аллель/генотип	Пациенты с ИМН (n=70)	Контрольная группа (n=100)	ОШ (95% ДИ)	p
<i>A</i> , n (%)	114 (81,4)	119 (59,5)	2,98 (1,79-4,98)	< 0,001
<i>G</i> , n (%)	26 (18,6)	81 (40,5)	0,33 (0,20-0,56)	
<i>A/A</i> , n (%)	47 (67,1)	34 (34,0)	3,97 (2,08-7,58)	< 0,001
<i>A/G</i> , n (%)	20 (28,6)	51 (51,0)	0,38 (0,20-0,74)	0,326
<i>G/G</i> , n (%)	3 (4,3)	15 (15,0)	0,25 (0,07-0,91)	0,020

Аналогичная закономерность наблюдалась при сравнении распределения частот аллелей и генотипов данного полиморфного маркера у пациентов с ИМН и другими морфологическими формами ХГН (таблица 4).

Таблица 4 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* у пациентов с ИМН и другими формами ХГН

Аллель/генотип	Пациенты с ИМН (n=70)	Пациенты с другими формами ХГН (n=40)	ОШ (95% ДИ)	p
<i>A</i> , n (%)	114 (81,4)	53 (66,3)	4,62 (1,72-12,39)	0,001
<i>G</i> , n (%)	26 (18,6)	27 (33,7)	0,22 (0,08-0,58)	
<i>A/A</i> , n (%)	47 (67,1)	17 (42,5)	2,76 (1,25-6,09)	0,010
<i>A/G</i> , n (%)	20 (28,6)	19 (47,5)	0,44 (0,20-0,99)	0,037
<i>G/G</i> , n (%)	3 (4,3)	4 (10,0)	0,40 (0,08-1,90)	0,216

Анализ ассоциации полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с развитием ИМН

Статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов у пациентов с ИМН и здоровых лиц наблюдались и в отношении полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1*: в группе ИМН частота аллеля *A* и генотипа *A/A* оказалась выше, при этом риск развития ИМН увеличивался почти в 5 и 10 раз соответственно (таблица 5).

Таблица 5 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* у пациентов с ИМН и в контрольной группе

Аллель/генотип	Пациенты с ИМН (n=70)	Контрольная группа (n=100)	ОШ (95% ДИ)	p
<i>G</i> , n (%)	107 (76,4)	189 (94,5)	0,19 (0,09-0,39)	< 0,001
<i>A</i> , n (%)	33 (23,6)	11 (5,5)	5,30 (2,57-10,91)	
<i>G/G</i> , n (%)	49 (70,0)	91 (91,0)	0,23 (0,10-0,54)	<0,001
<i>G/A</i> , n (%)	9 (12,9)	7 (7,0)	1,96 (0,69-5,54)	0,154
<i>A/A</i> , n (%)	12 (17,1)	2 (2,0)	10,14 (2,19-46,90)	0,001

При сравнении пациентов с ИМН и пациентов с другими формами ХГН получены сходные данные: повышенный риск ИМН оказался ассоциирован с аллелем *A* и генотипом *A/A* (таблица 6).

Таблица 6 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* у пациентов с ИМН и другими формами ХГН

Аллель/генотип	Пациенты с ИМН (n=70)	Пациенты с другими формами ХГН (n=40)	ОШ (95% ДИ)	p
<i>G</i> , n (%)	107 (76,4)	75 (93,8)	0,21 (0,08-0,58)	0,002
<i>A</i> , n (%)	33 (23,6)	5 (6,3)	4,63 (1,73-12,40)	
<i>G/G</i> , n (%)	49 (70,0)	36 (90,0)	0,26 (0,08-0,82)	0,012
<i>G/A</i> , n (%)	9 (12,9)	3 (7,5)	1,82 (0,14-2,16)	0,298
<i>A/A</i> , n (%)	12 (17,1)	1 (2,5)	8,06 (1,01-6,67)	0,018

Таким образом, у пациентов с ИМН в российской популяции установлена ассоциация полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с предрасположенностью к ИМН и выявлены аллели и генотипы повышенного риска (аллель *A* и генотип *A/A* для двух исследуемых полиморфных маркеров).

Генетическое взаимодействие между полиморфными маркерами *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*

В связи с малым числом носителей определенных генотипов исследуемых полиморфных маркеров для дальнейшего анализа пациенты были объединены следующим образом (рисунок 1):

- группы *A/A* (носители генотипа *A/A*) и *A/G+G/G* (пациенты с генотипами *A/G* и *G/G*) для полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* и
- группы *G/G* (носители генотипа *G/G*) и *G/A+A/A* (пациенты с генотипами *G/A* и *A/A*) для полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1*.

n, ИМН		PLA2R1 (<i>rs4664308</i>)		
		A/A	A/G	G/G
HLA-DQA1 (<i>rs2187668</i>)	G/G	31	17	1
	G/A	7	2	0
	A/A	9	1	2

n, ИМН		PLA2R1 (<i>rs4664308</i>)	
		A/A	G/G u A/G
HLA-DQA1 (<i>rs2187668</i>)	G/G	31	18
	G/A u A/A	16	5

Высокого риска
 Среднего риска
 Низкого риска

Рисунок 1 – Выделение групп риска развития ИМН в зависимости от комбинации генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*

У носителей сочетания генотипа *A/A* полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* и аллеля *A* полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* риск заболевания возростал почти в 18 раз (рисунок 2).

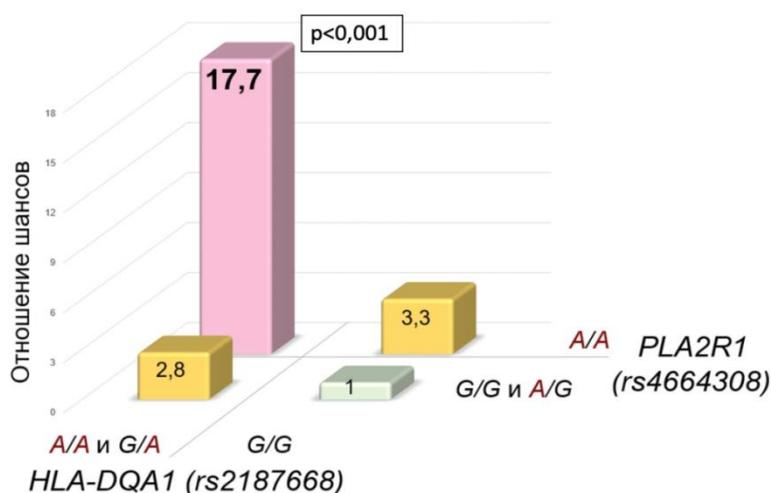


Рисунок 2 – Риск развития ИМН в зависимости от сочетания аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*

Таким образом, определились группы низкого (комбинация генотипов *G/G* или *A/G* гена *PLA2R1* и генотипа *G/G* гена *HLA-DQA1*), среднего (комбинация генотипов *G/G* или *A/G* гена *PLA2R1* и генотипов *A/A* или *G/A* гена *HLA-DQA1* и комбинация генотипов *A/A* гена *PLA2R1* и генотипа *G/G* гена *HLA-DQA1*) и высокого риска (комбинация генотипов *A/A* гена *PLA2R1* и генотипов *A/A* или *G/A* гена *HLA-DQA1*).

Полученные результаты подтверждают правомерность высказанного ранее предположения о том, что именно взаимодействие вариантов генов, кодирующих белки иммунной системы и структурные белки компонентов почечных клубочков, формирует основу для развития ИМН.

Анализ ассоциации полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с уровнем АТ к *PLA2R*

Уровни АТ к *PLA2R* до начала иммуносупрессивной терапии исследованы у 34 пациентов с ИМН. В 76,5% случаев получен положительный результат, что согласуется с данными литературы о частоте выявления АТ к *PLA2R* при ИМН. Более чем у 2/3 пациентов титры данных антител составили от 1:80 до 1:640.

При анализе частоты выявления АТ к *PLA2R* в зависимости от генотипов исследуемых генов у пациентов с генотипом *A/A* гена *PLA2R1* (*rs4664308*) антитела к рецептору обнаруживали чаще по сравнению с носителями аллеля *G* (87,0% и 54,5% соответственно) (рисунок 3).

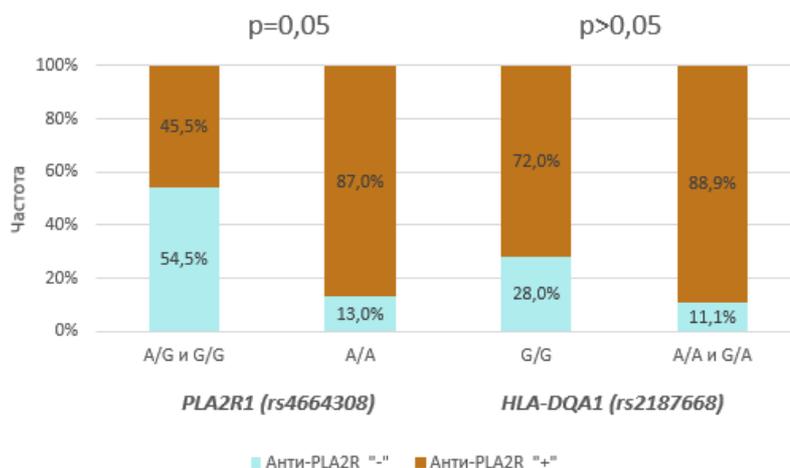


Рисунок 3 – Частота выявления АТ к *PLA2R* (в %) в зависимости от генотипов полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1*

Дополнительным свидетельством вклада вариантов гена *PLA2R1* (*rs4664308*) в изменение структуры и/или функции рецептора и выработку АТ к нему могут служить результаты сравнительного анализа вероятности развития ИМН у пациентов с генотипом *A/A* гена *PLA2R1* по группе в целом и в группе только анти-*PLA2R*-позитивных пациентов (n=26). У

анти-PLA2R-позитивных носителей генотипа *A/A* риск развития ИМН оказался почти в 2 раза выше, чем в общей группе, однако различия не достигали порога статистической значимости. (рисунок 4).

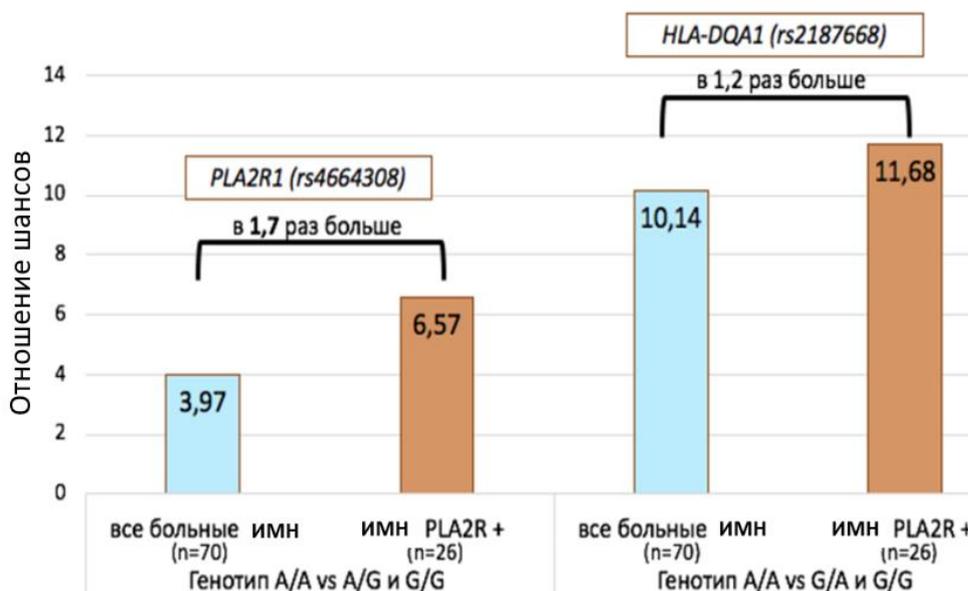


Рисунок 4 – Риск развития ИМН по группе в целом (n=70) и у анти-PLA2R-позитивных пациентов ИМН (n=26)

Детальный анализ распределения уровней АТ к PLA2R в зависимости от генотипов исследуемых генов показал, что у носителей аллеля А полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* (ассоциированного с повышенным риском ИМН) независимо от генотипа гена *HLA-DQA1*, преобладали повышенные титры АТ (умеренно высокие 1:80-1:160 и высокие $\geq 1:160$), что также косвенно отражает генетическую детерминированность выработки АТ к PLA2R, участвующих в развитии ИМН (рисунок 5).

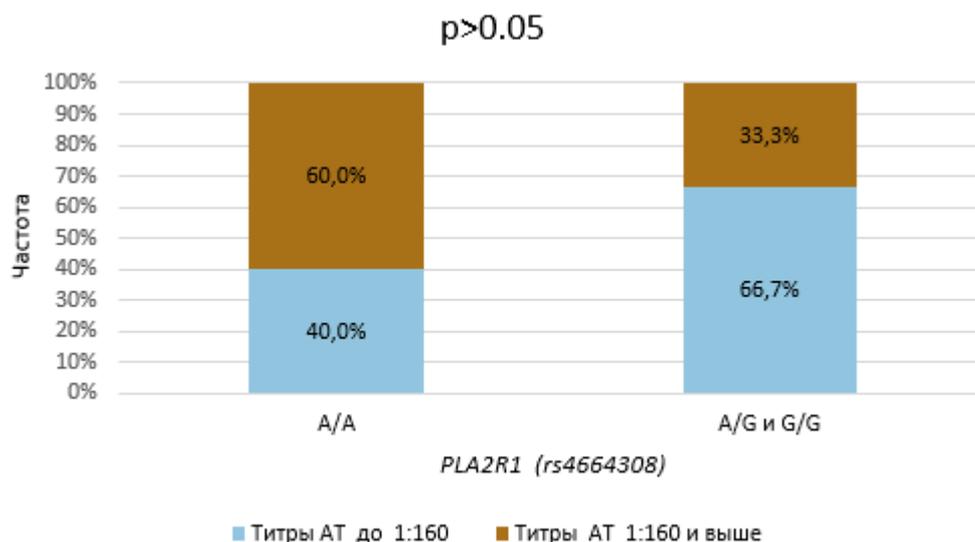


Рисунок 5 – Частота выявления умеренно высоких и высоких титров АТ к PLA2R в зависимости от генотипов полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1*

**Клиническая характеристика ИМН в зависимости от генотипов
полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1***

В группах пациентов с ИМН, выделенных в зависимости от вариантов генов *PLA2R1* (*rs4663208*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*), возраст манифестации ИМН не различался, однако среди носителей генотипа A/A полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* и в группах среднего и высокого риска преобладали пациенты, у которых ИМН дебютировала в возрасте старше 50 лет, т.е. наблюдалась тенденция к началу заболевания в более позднем возрасте (рисунок 6).

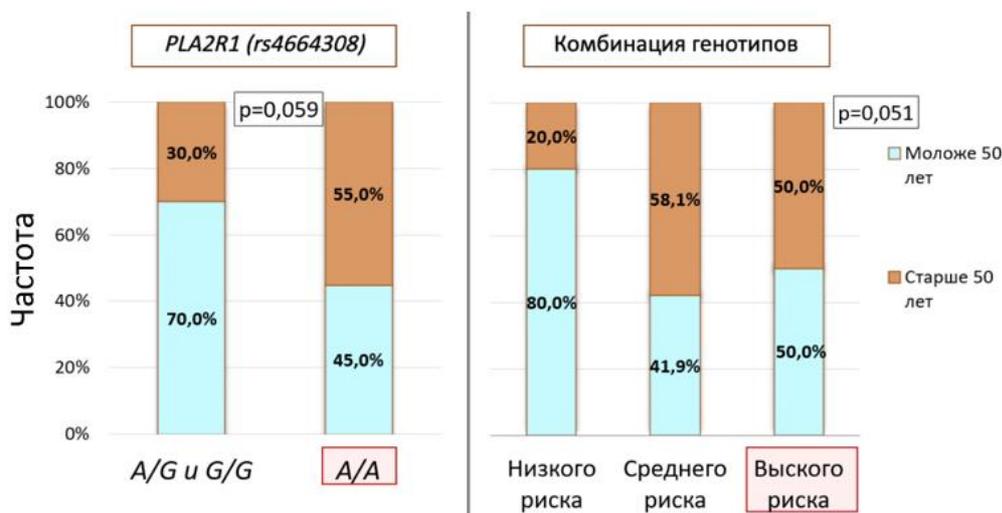


Рисунок 6 – Частота дебюта ИМН в возрасте до или после 50 лет в зависимости от генотипа гена *PLA2R1* (*rs4664308*) и комбинаций генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*

У пациентов с генотипом A/A полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* наблюдалась бóльшая выраженность нефротического синдрома на момент установления диагноза, о чем свидетельствуют статистически значимо более высокий уровень протеинурии, а также тенденция к бóльшей выраженности гипоальбуминемии и гиперхолестеринемии (таблица 7).

Таблица 7 – Лабораторные показатели, отражающие выраженность НС, в зависимости от генотипа полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* ()

Показатель	n	<i>PLA2R1</i> (<i>rs4664308</i>)		p
		A/A	A/G+G/G	
Протеинурия, г/сут	56	5,4 [2,4; 16,5]	3,8 [1,4; 12,0]	0,048
Альбумин в крови, г/л	55	25 [20,0; 30,5]	26 [20,2; 31,0]	0,092
Холестерин в крови, ммоль/л	48	8,7 [6,9; 11,4]	8,6 [6,9; 10,9]	0,090

Данные представлены в виде частоты (%), медианы и межквартильных размахов Me [25;75]

У носителей генотипов риска полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*, а также их комбинации отмечалось статистически значимое увеличение частоты ПУ ≥ 4 г/сут - одного из критериев среднего и высокого риска прогрессирования МН (рисунок 7).

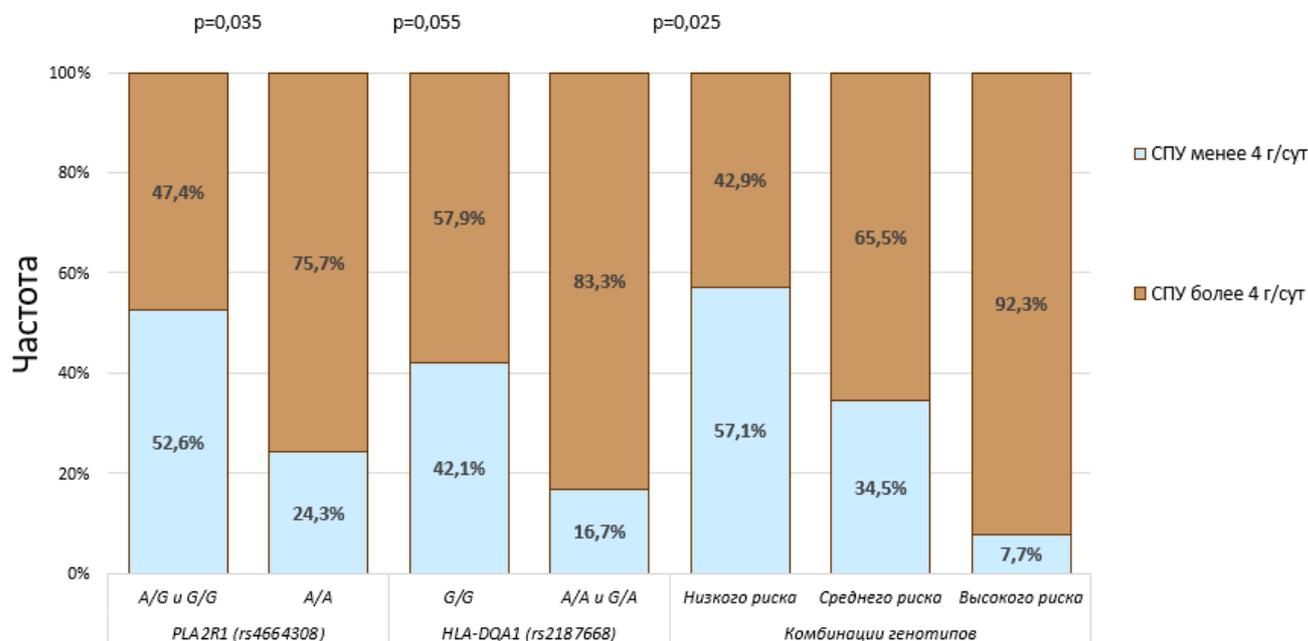


Рисунок 7 – Частота (%) выявления СПУ ≥ 4 г/сут в зависимости от генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и их комбинаций

Анализ ассоциации полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с эффективностью иммуносупрессивной терапии

Ответ на ИСТ в зависимости от носительства определенных вариантов генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*) оценили у 40 пациентов с ИМН. Большинство получали сочетанные «пульсы» циклофосфана и преднизолона или циклоспорин в сочетании с низкими дозами глюкокортикостероидов. У 31 пациента была констатирована полная или частичная ремиссии НС.

Частота развития ремиссии (полной или частичной) в группах, выделенных в зависимости от генотипов исследуемых генов, оказалась сопоставимой и составила от 74% до 89%. Однако у носителей аллеля риска А полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1*, а также комбинации 3-х и более аллелей риска исследуемых генов ремиссия была достигнута только после применения 2-х и более режимов иммуносупрессии (рисунок 8).

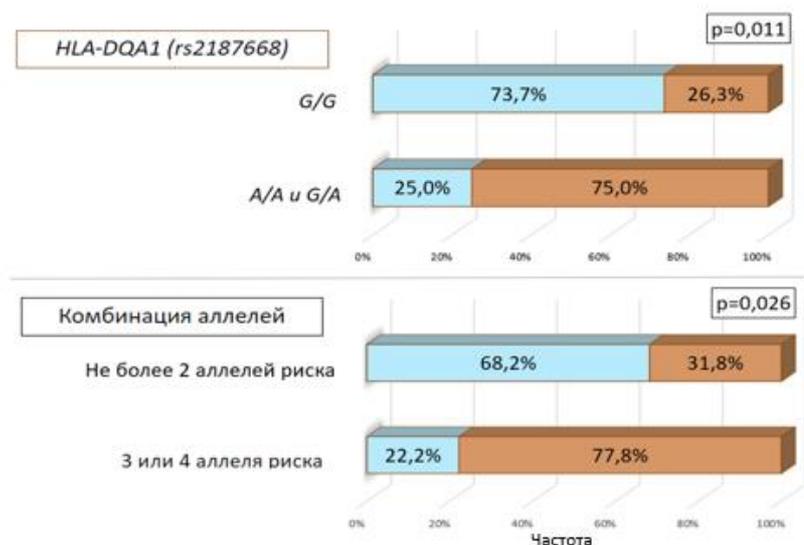


Рисунок 8 – Объем иммуносупрессивной терапии, потребовавшийся для достижения ремиссии ИМН, в зависимости от генотипа полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и носительства аллелей риска генов *PLA2R1 (rs4664308)* и *HLA-DQA1 (rs2187668)*

Кроме того, у носителей аллеля риска *A* полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1*, а также комбинации 3-х и более аллелей риска исследуемых генов длительность лечения до достижения ремиссии чаще превышала 1 год (рисунок 9).

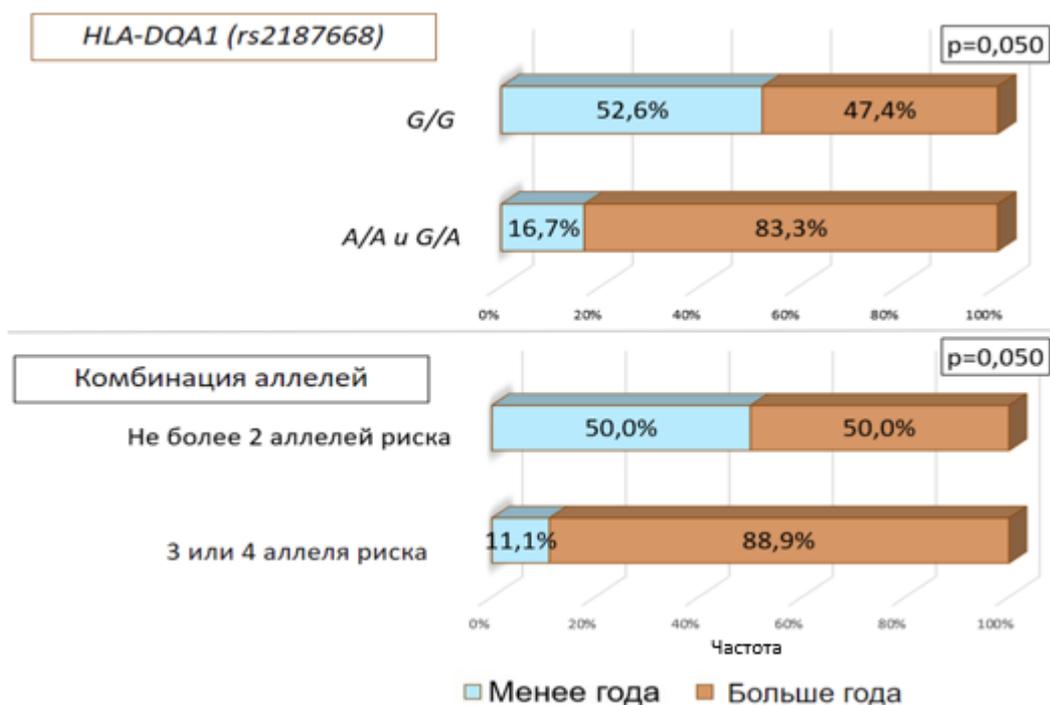


Рисунок 9 – Частота развития ремиссии ИМН в первый год лечения в зависимости от генотипа полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* и носительства аллелей риска генов *PLA2R1 (rs4664308)* и *HLA-DQA1 (rs2187668)*

Анализ ассоциации полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* с прогрессированием почечной дисфункции

Функцию почек в динамике оценили у 53 пациентов с ИМН. Прогрессирование, под которым понимали переход хронической болезни почек (ХБП) в более продвинутую стадию, наблюдалось у 14 пациентов.

Скорость прогрессирования дисфункции почек в группах, выделенных в зависимости от генотипов исследуемых вариантов генов и их комбинаций, статистически значимо не различалась (рисунок 10), что, по-видимому, указывает на более значимый вклад в прогрессирование ИМН других, негенетических факторов.

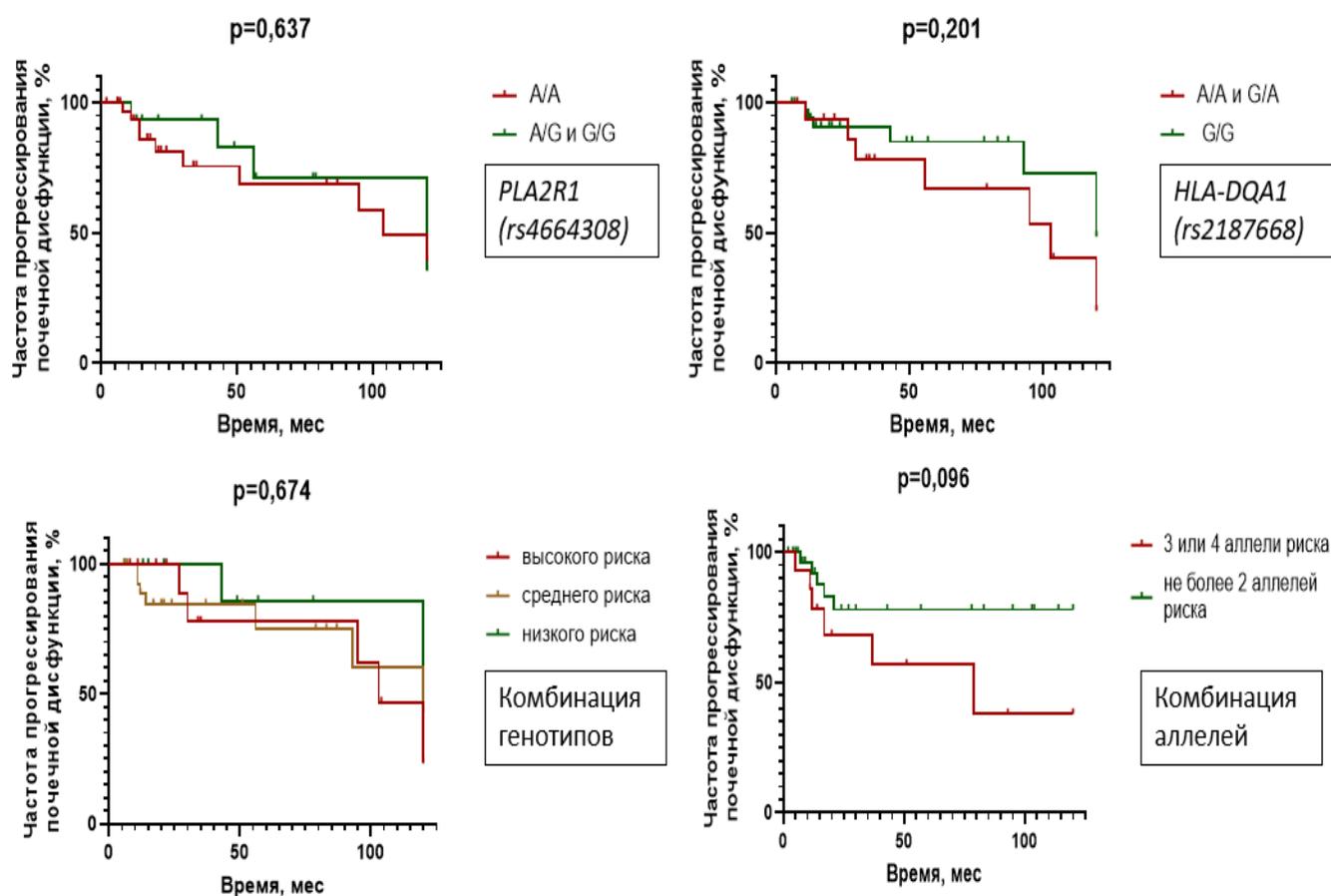


Рисунок 10 – Прогрессирование почечной дисфункции у пациентов с ИМН в зависимости от генотипов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1*, а также их комбинаций

И действительно, многофакторный анализ показал, что, несмотря на генетическую предрасположенность к развитию ИМН, на почечную выживаемость значимое влияние оказывали такие традиционные факторы риска прогрессирования ХГН, как более старший возраст дебюта заболевания, длительное (более 6 месяцев) персистирование высокой протеинурии и снижение функции почек на момент установления диагноза (таблица 8), что указывает на необходимость своевременного контроля модифицируемых факторов риска и

применения современных средств нефропротекции с целью снижения протеинурии и торможения развития фиброза в почке.

Таблица 8 – Многофакторный анализ влияния ряда клинических факторов на почечную выживаемость у пациентов с ИМН (регрессионная модель Кокса)

Фактор	Exp(B)	95% ДИ	p
Начало заболевания старше 50 лет	10,53	1,10-100,00	0,041
Персистирование ПУ более 6 месяцев	79,35	1,76-3690,59	0,026
Отсутствие ответа на терапию	6,36	0,92-44,00	0,060
Нарушение функции почек на момент постановки диагноза	11,51	1,02-129,23	0,048
- 2 logLG = 31,94, $\chi^2=16,30$, p=0,003			

Выводы

1. Генетическая предрасположенность к развитию ИМН ассоциирована с вариантами генов, потенциально ответственных за синтез специфического подоцитарного антигена — рецептора фосфолипазы А2 М-типа (ген *PLA2R1*) и антител к нему (ген главного комплекса гистосовместимости *HLA-DQA1*). Риск развития ИМН у носителей аллеля *A* и генотипа *A/A* полиморфного маркера *rs4664308* гена *PLA2R1* повышается в 2,98 и 5,30 раза соответственно, а у носителей аллеля *A* и генотипа *A/A* полиморфного маркера *rs2187668* гена *HLA-DQA1* в 3,97 и 10,14 раза соответственно. При носительстве комбинации аллелей повышенного риска (аллель *A* гена *HLA-DQA1* и генотип *A/A* гена *PLA2R1*) риск развития ИМН возрастает почти в 18 раз.
2. Подтверждена генетическая детерминированность продукции АТ к рецептору фосфолипазы А2 (PLA2R): у пациентов с ИМН и генотипом *A/A* гена *PLA2R1* (ассоциированным с высоким риском развития ИМН), АТ к PLA2R обнаруживаются статистически значимо чаще по сравнению с носителями аллеля *G* (87,0% и 54,5% случаев соответственно), причем среди носителей аллеля *A* гена *PLA2R1* преобладают средние (от 1:80 - 1:160) и высокие ($\geq 1:160$) титры этих антител.
3. Определены особенности клинической картины ИМН, ассоциированные с вариантами генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*): протеинурия ≥ 4 г/сут, соответствующая клиническим критериям среднего и высокого риска прогрессирования ИМН, значительно чаще выявляется у носителей генотипа *A/A* гена *PLA2R1* (75,7% по сравнению с 47,4% у пациентов с генотипами *A/G* и *G/G*), аллеля *A* гена *HLA-DQA1* (83,3% по сравнению с носителями генотипа *G/G*) или комбинации генотипов высокого риска (92,3% по сравнению с 42,9% у носителей комбинации низкого риска).
4. Установлена ассоциация исследуемых вариантов генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*) с характером ответа на патогенетическую терапию: для достижения ремиссии нефротического синдрома носителям аллеля риска *A* гена *HLA-DQA1* чаще, чем носителями генотипа *G/G*, требуется более длительное лечение и проведение нескольких курсов иммуносупрессии (в 75% и 26,3% случаях соответственно).
5. Не выявлена взаимосвязь между скоростью прогрессирования дисфункции почек при ИМН и вариантами исследуемых генов *PLA2R1* (*rs4664308*) и *HLA-DQA1* (*rs2187668*). Ведущее значение в прогрессировании ИМН имеют такие традиционные факторы риска, как более старший возраст начала заболевания, персистирование высокой протеинурии и нарушение функции почек на момент установления диагноза.

Практические рекомендации

1. Пациентам с ИМН и высокой клинической и серологической активностью заболевания, не отвечающим на стандартные схемы иммуносупрессивной терапии, может быть рекомендовано исследование вариантов полиморфных маркеров *rs4664308* гена *PLA2R1* и *rs2187668* гена *HLA-DQA1* для выявления аллелей и генотипов риска, носительство которых может предрасполагать к такому течению ИМН и служить обоснованием более длительной и агрессивной иммуносупрессии.
2. Всем пациентам с ИМН независимо от генетической предрасположенности к ее развитию для снижения темпов падения СКФ и отдаления развития терминальной почечной недостаточности рекомендуется максимальная коррекция традиционных факторов риска прогрессирования ХБП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Горелова (Бобылева) И.А., Кахсуруева П.А., Филатова Е.Е. Генетические детерминанты развития и течения мембранозной нефропатии // **Терапевтический архив**. 2018; Т. 90. № 6. С. 105-111. DOI: 10.26442/terarkh2018906105-111 [**Scopus**]
2. **Бобылева И.А.**, Кахсуруева П.А., Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Захарова Е.В., Борисов А.Г., Филатова Е.Е., Рощупкина С.В., Ли О.А., Кучиева А.М., Горностаева Е.Ю. Изучение ассоциации вариантов гена рецептора фосфолипазы А2 М-типа (PLA2R1) с предрасположенностью к развитию идиопатической мембранозной нефропатии // **Клиническая фармакология и терапия**. 2019. Т. 28. № 3. С. 29-33. DOI: 10.32756/0869-5490-2019-3-29-33
3. **Бобылева И.А.**, Кахсуруева П.А., Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Ли О.А., Кучиева А.М., Филатова Е.Е., Захарова Е.В., Борисов А.Г. Клинико-генетические особенности идиопатической мембранозной нефропатии у российских пациентов // **Клиническая нефрология**. 2019. Т. 23. № 3. С. 57-58. DOI: 10.18565/nephrology
4. **Бобылева И.А.**, Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Кахсуруева П.А., Захарова Е.В., Борисов А.Г., Филатова Е.Е. Взаимодействие между вариантами полиморфных маркеров генов рецептора фосфолипазы А2 М-типа (PLA2R1) и главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DQA1) ассоциировано с развитием идиопатической мембранозной нефропатии в Российской популяции // **Нефрология**. 2019. Т. 23 (приложение 1). С. 57-58. DOI: 10.36485/1561-6274-2019-23-5-55-74 [**Scopus**]
5. **Bobyleva I.**, Kamyshova E., Bobkova I., Filatova E. Autoantibodies to M-type phospholipase A2 receptor: individualized serology-based approach to membranous nephropathy // *Nephrol Dial Transplan*. Volume 34, Supp 1 1, June 2019, gfz106.FP120

Список сокращений

АТ – антитела

ДИ – доверительные интервалы

ИМН – идиопатическая мембранозная нефропатия

ИСТ – иммуносупрессивная терапия

МН – мембранозная нефропатия

НС – нефротический синдром

ОШ – отношение шансов

ХБП – хроническая болезнь почек

ХГН – хронический гломерулонефрит

HLA (Human Leukocyte Antigens) – главный комплекс гистосовместимости человека

PLA₂R (Phospholipase A2 Receptor) – рецептор фосфолипазы A2

