

Katarzyna Zaorska

**Analiza zmian w sekwencjach genów
SOCS1, SOCS3 i SOCS5
u dzieci ze steroido-opornym zespołem nerczycowym**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n.med. Prof. UM Michał Nowicki

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel

Poznań 2012

Pragnę złożyć podziękowania
Panu dr hab.n.med. prof. UM Michałowi Nowickiemu
za umożliwienie mi realizacji pracy doktorskiej, pomoc i życzliwość
Panu Prof. dr hab.n.med. Maciejowi Zabłowi
za stworzenie warunków do prowadzenia prac badawczych
i umożliwienie mi rozwoju naukowego
Pracownikom Kat. i Zak. Histologii i Embriologii, Koleżankom i Kolegom
za nieocenioną pomoc, wyrozumiałość i serdeczną atmosferę
oraz Rodzicom
za pomoc, wsparcie i zapewnienie możliwości realizacji
moich małych i wielkich celów i marzeń...

Spis treści

Wykaz Skrótów.....	6
1. Wstęp	11
1.1. Zaburzenia genetyczne.....	11
1.1.1. Podział i rodzaje wariantów genetycznych.....	11
1.1.2. Mechanizmy powstawania zaburzeń genetycznych.....	13
1.1.3. Diagnostyka chorób genetycznych.....	14
1.1.3.1. Diagnostyka dużych wariantów strukturalnych.....	14
1.1.3.2. Diagnostyka małych wariantów strukturalnych.....	16
1.1.3.3. Diagnostyka chorób genetycznych w oparciu o polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP).....	17
1.1.4. Epigenetyka chorób genetycznych.....	19
1.2. Zespół nerczycowy (ZN).....	21
1.2.1. Definicja i epidemiologia zespołu nerczycowego.....	21
1.2.2. Etiopatologia zespołu nerczycowego.....	21
1.2.3. Podłoże histopatologiczne zespołu nerczycowego.....	23
1.2.4. Idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN).....	25
1.2.4.1. Epidemiologia IZN.....	25
1.2.4.2. Etiopatologia IZN.....	26
1.2.5. Steroido-oporność w zespole nerczycowym.....	28
1.2.5.1. Steroido-oporność jako czynnik prognostyczny w ZN.....	28
1.2.5.2. Markery steroido-oporności.....	30
1.2.5.2.1. Czynnik immunologiczny w steroido-oporności.....	30
1.2.5.2.2. Czynnik genetyczny w steroido-oporności.....	31
1.2.5.2.3. Ścieżka sygnalizacyjna receptora GR.....	32
1.2.6. Ścieżka sygnalizacyjna Jak/Stat.....	33
1.2.6.1. Negatywna regulacja ścieżki Jak/Stat.....	34
1.2.6.2. Białka SOCS.....	34
1.2.6.2.1. Budowa białek SOCS.....	34

1.2.6.2.2. Rola wybranych SOCS w chorobach nerek.....	35
2. Cel.....	37
3. Materiał i Metody.....	38
3.1. Pacjenci.....	38
3.1.1. Grupa badana.....	38
3.1.2. Grupa kontrolna.....	45
3.1.3. Materiał do badań.....	45
3.2. Metody.....	46
3.2.1. Charakterystyka genów <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> , <i>SOCS5</i>	46
3.2.2. Izolacja całkowitego genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej.....	46
3.2.3. Pomiar stężenia i czystości DNA.....	48
3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	48
3.2.5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.....	52
3.2.6. Oczyszczanie produktów reakcji PCR.....	53
3.2.7. Pomiar stężenia i czystości oraz rozcieńczenie produktów reakcji PCR.....	54
3.2.8. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR.....	55
3.2.9. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania.....	57
3.2.10. Elektroforeza kapilarna produktów reakcji sekwencjonowania.....	58
3.2.11. Analiza bioinformatyczna.....	59
3.2.11.1 Analiza mutacji.....	61
3.2.11.2. Analiza polimorfizmów.....	62
3.2.11.3. Określenie struktury genów.....	63
4. Wyniki.....	64
4.1. Wyniki izolacji genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej.....	64
4.2. Wyniki reakcji PCR.....	66
4.3. Analiza zmian w sekwencjach genów <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> i <i>SOCS5</i>	67
4.3.1. Analiza mutacji punktowych w genach <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> i <i>SOCS5</i>	67
4.3.2. Analiza polimorfizmów SNP w genach <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> i <i>SOCS5</i>	68
4.3.2.1. Analiza częstości genotypów i alleli.....	70

4.3.2.2. Analiza wartości ilorazu szans dla genotypów i alleli.....	77
4.3.2.3. Analiza struktury genów <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> i <i>SOCS5</i>	80
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	84
6. Wnioski.....	108
7. Piśmiennictwo.....	109
8. Streszczenie.....	122
9. Abstract	125
Spis Rysunków.....	128
Spis Tabel.....	129
Spis Załączników.....	131
Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych.....	132
Załącznik 2. Informacja dla opiekunów pacjenta i formularz świadomej zgody na badania.....	135
Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym.....	137
Załącznik 4. Ankieta dla pacjentów grupy kontrolnej.....	140
Załącznik 5. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS1</i> dla grupy SOZN.....	141
Załącznik 6. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS1</i> dla grupy SWZN.....	142
Załącznik 7. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS1</i> dla grupy kontrolnej.....	143
Załącznik 8. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS3</i> dla grupy SOZN.....	144
Załącznik 9. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS3</i> dla grupy SWZN.....	145
Załącznik 10. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS3</i> dla grupy kontrolnej.....	146
Załącznik 11. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS5</i> dla grupy SOZN.....	147
Załącznik 12. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS5</i> dla grupy SWZN.....	148
Załącznik 13. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie <i>SOCS5</i> dla grupy kontrolnej.....	149

Wykaz Skrótów

5'/3'UTR - niekodujący region leżący po stronie 5'/3' transkryptu, ang. *5'/3'-Untranslated Region*

ABCB1 - gen P-glikoproteiny

ACE - gen konwertazy angiotensyny

ACTN4 - gen alfa aktyniny-4

α -SMA - alfa-aktyna mięśni gładkich, ang. *Smooth Muscle Actin-alpha*

AngII - angiotensyna II

AP-1 - czynnik transkrypcyjny, ang. *Activator Protein-1*

CD2AP - gen białka łącznikowego podocytów

CF - Cyklofosfamid

CGH - wielkoskalowa porównawcza hybrydyzacja genomowa, ang. *Comparative Genomic Hybridization*

CIS - białko zawierające domenę SH2, wzbudzone przez cytokiny, ang. *Cytokine-Inducible SH2 Domain-Containing Protein*

CNF - rodzinny dziedziczny zespół nerczycowy typu fińskiego, ang. *Congenital Nephrotic Syndrome Finnish type*

CNP - polimorfizm ilości kopii, ang. *Copy Number Polymorphism*

CNV - wariant ilości kopii, ang. *Copy Number Variation*

CsA - Cyklosporyna A

CYP3A5 - gen cytochromu P450

DMP - zmiana mezangialno-rozplemowa, ang. *Diffuse Mesangial Proliferative Glomerulonephritis*

dNTP - trifosforan deoksyrybonukleotydu, ang. *Deoxyribonucleotide Triphosphate*

ddNTP - trifosforan dideoksyrybonukleotydu, ang. *Dideoxynucleotide Triphosphate*

EDTA - kwas edetynowy/kwas wersenowy, ang. *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*

ERK - zewnątrzkomórkowa kinaza, ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

eSNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu zlokalizowany w części niekodującej genu, ang. *expression SNP*

EtBr - bromek etydyny, ang. *Ethidium Bromide*

FcγR - receptor dla fragmentu Fc przeciwciał, ang. *Fragment crystallizable gamma Receptor*

FRNS - często nawracający zespół nerczycowy, ang. *Frequent Relapsing Nephrotic Syndrome*

FSGS - ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków, ang. *Focal Segmental Glomerulosclerosis*

FoSTeS - blokowanie widełek i przełączanie matrycy, *Fork Stalling and Template Switching*

Gk - glikokortykosteroidy

GR - receptor glikokortykosteroidowy, ang. *Glucocorticoid Receptor*

Grb/Ras - ścieżka używająca czynników Grb i Ras, ang. *Growth Factor Receptor-Bound Protein/Rat Sarcoma Factor(Pathway)*

GS - stwardnienie kłębuszków nerkowych, ang. *Glomerulosclerosis*

HGMD - baza danych dla mutacji ludzkich, ang. *Human Gene Mutation Database*

HWE - rozkład Hardy-Weinberga (prawo H-W), ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*

IC - kompleks immunologiczny, ang. *Immunological Complex*

ICAM-1 - cząstka adhezyjna, ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IFN-γ - interferon gamma, ang. *Interferon gamma*

IL - interleukina, ang. *Intrleukin*

IL-4R - receptor dla interleukiny 4, ang. *Intrleukin-4 Receptor*

IgE - przeciwciało klasy E, ang. *Immunoglobulin E*

IgG - przeciwciało klasy G, ang. *Immunoglobulin G*

IgM - przeciwciało klasy M, ang. *Immunoglobulin M*

INS - Idiopatyczny zespół nerczycowy, ang. *Idiopathic Nephrotic Syndrome*

IRF4 - czynnik regulujący interferony, ang. *Interferon Regulatory Factor-4*

IZN - Idiopatyczny zespół nerczycowy

ins/del - mutacja typu insercja/delecja, ang. *insertion/deletion*

ISKDC - ang. *International Study of Kidney Disease in Children*

JAB - białko wiążące kinazę Jak, ang. *JAK-Binding Protein*)

Jak - kinaza Jak, ang. *Janus kinase*

JNK - kinaza jądrowa Jun, ang. *Jun Nuclear Kinase*

KIR - region inhibicji kinaz, ang. *Kinase Inhibitory Region*

KNN - krańcowa niewydolność nerek

LAMB2 - gen lamininy beta-2

LCR - powtórzenia małej liczby kopii, ang. *Low Copy Repeats*

LCV - wielko-segmentowe warianty kopii, ang. *large-segment copy variation*

LD - niezrównoważenie sprzężeń, ang. *Linkage Disequilibrium*

LINE - długie rozproszone elementy, ang. *Long Interspersed Nuclear Elements*

Lys-6 - lizyna jako szósty aminokwas w łańcuchu białkowym, ang. *Lysine-6*

MAPK - kinaza białkowa aktywowana mitogenem, ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCD - zmiana o charakterze minimalnym , ang. *Minimal Change Disease*

MCP-1 - cytokina chemotaktyczna dla monocytów, ang. *Monocyte Chemotactic Protein-1*

MMF - Mykofenolan mofetylu

MP - zmiany w typie mezangialnej proliferacji, ang. *Mesangial Proliferation*

MPGN - błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek, ang. *Membranoproliferative Glomerulonephritis*

mtDNA – DNA mitochondrialne, ang. *mitochondrial DNA*

mRNA - matrycowe RNA, ang. *messenger RNA*

miRNA - mikro RNA, ang. *micro RNA*

N - cecha niedojrzałości w biopsji nerki

NAHR - niealleliczna rekombinacja homologiczna, ang. *Nonallelic Homologous Recombination*

NF-κB – jądrowy czynnik Kappa B, ang. *Nuclear Factor Kappa B*

NHEJ - niehomologiczne łączenie końców, ang. *Nonhomologous End Joining*

NPHS1 - gen nefryny

NPHS2 - gen podocyny

NS - Zespół nerczycowy, ang. *Nephrotic Syndrome*

OR - iloraz szans, ang. *Odds Ratio*

PBMC - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction*

PDGF - płytkowy czynnik wzrostu, ang. *Platelet-Derived Growth Factor*

PF - krążący osoczowy czynnik przepuszczalności naczyń, ang. *Permeability Factor*

Pf - plazmafereza

PIAS - białkowy inhibitor aktywowanych czynników STAT, ang. *Protein Inhibitor of Activated STATs*

PLCE1 - gen fosfolipazy C epsilon-1

RANTES - cytokina prozapalna wydzielana przez limfocyty T, ang. *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

RNAi - interferujące RNA, ang. *RNA interference*

Rtx - Rituksimab

SD - segmentalne duplikacje, ang. *Segmental Duplication*

SDNS - steroido-zależny zespół nerczycowy, ang. *Steroid Dependent Nephrotic Syndrome*

SH2 - domena wiążąca reszty fosfotyrozyny, ang. *Src-homology 2 domain*

SHP - białkowa fosfataza tyrozynowa zawierająca domenę SH2, ang. *Scr-homology2-containing Protein Tyrosine Phosphatase*

SINE - krótkie rozproszone powtórzone elementy, ang. *Short Interspersed Nuclear Elements*

SLE - toczeń rumieniowaty układowy, ang. *Systemic Lupus Erythematosus*

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*

SOCS - supresor sygnalizacji cytokin, ang. *Suppressor of Cytokine Signaling*

SOZN - steroido-oporny zespół nerczycowy

SR - steroido-oporny, ang. *Steroid Resistant*

SS - steroido-wrażliwy, ang. *Steroid Sensitive*

SSI-1 - inhibitor czynnika STAT, aktywowany przez STAT, ang. *STAT-Induced STAT Inhibitor*

STAT - czynnik transkrypcyjny, transduktor sygnału i aktywator, ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*

STRP - krótkie tandemowo powtórzone sekwencje, ang. *Short-Tandem-Repeat Polymorphism*

SWZN - steroido-wrażliwy zespół nerczycowy

T_{eff} - limfocyt T efektorowy, ang. *effector T lymphocyte*

TGF-β - transformujący czynnik wzrostu-beta, ang. *Transforming Growth Factor-beta*

Th - limfocyt T pomocniczy, ang. *T-helper lymphocyte*

TLR - receptor, ang. *Toll-like Receptor*

TNFα - czynnik martwicy guza-alfa, ang. *Tumor Necrosis Factor-alpha*

T_{reg} - limfocyt T regulatorowy, ang. *regulatory T lymphocyte*

TRPC6 - gen błonowego kanału jonowego (wapniowego)

ZN - Zespół nerczycowy

WT1 - gen supresorowy guza Wilmsa

1. Wstęp

1.1. Zaburzenia genetyczne

Fenotypowa różnorodność pomiędzy osobnikami jest efektem współdziałania genomu i czynników środowiskowych. Projekt sekwencjonowania genomu ludzkiego ujawnił nie tylko, iż część kodująca stanowi zaledwie 1% genomu, ale również, że aż około 5% genomu występuje w formie powtórzonej co najmniej dwukrotnie (148), zaś część uległa delecji (91). Jednostki różniące dwa osobniki w obrębie tego samego gatunku określa się mianem wariantów genetycznych.

1.1.1. Podział i rodzaje wariantów genetycznych

Ich klasyfikacja zachodzi na podstawie rozważanych cech wariantów. Z klinicznego punktu widzenia najważniejsza wydaje się istotność wariantów pod względem powodowanych przez nie zmian w genomie. Zmiany te mogą być neutralne, łagodne lub też prowadzić do zaburzeń strukturalnych w postaci schorzeń i nazywane są wtedy zaburzeniami genomowymi (ang. *genomic disorders*) (148). Zaburzenia te określają stan, w którym zmieniony fenotyp jest konsekwencją nieprawidłowej, zmienionej dawki genu lub rozregulowania na skutek rearanzacji struktury genu (92).

Zasadniczym kryterium podziału zaburzeń genetycznych jest ilość nieprawidłowości genetycznych, powodujących chorobę. Szacuje się, iż ponad 8000 chorób jest spowodowana defektem w pojedynczych genach i są to tzw. choroby monogenowe. Są one jednak stosunkowo rzadkie i stanowią zaledwie 1% w populacji (88). Większość chorób genetycznych charakteryzuje się bardziej złożonym mechanizmem powstawania poszczególnych wariantów genetycznych.

Ogólna klasyfikacja tychże wariantów dokonuje się na podstawie dwóch kryteriów: ich genetycznego składu oraz frekwencji w populacji. Jako warianty częste określa się te, których częstość w populacji jest większa niż 5%, zaś jako warianty rzadkie – których częstość w populacji nie przekracza 5% (118). Z reguły zaburzenia genomowe pojawiają się z podobną częstością, niemniej obserwowane są różnice w ich częstości w zależności od populacji (148). W zależności od kompozycji wariantów, rozróżnia się warianty sekwencyjne i strukturalne (118). Małe warianty sekwencyjne stanowią insercje i delecje o zasięgu do 1kb (91). Większe zmiany, nazwane wariantami strukturalnymi o wielkości od 1kb do nawet powyżej 5Mb, obejmują zarówno duplikacje, inwersje, tranzycje, jak i translokacje (92, 118). Stanowią one

jedynie 22% wszystkich wariantów, jednakże obejmują do 74% nukleotydów różniących dwa osobniki w populacji (118). Mogą być one związane z zaburzeniami w funkcjonowaniu białka lub z dawką genu. Jeżeli nie są zrównoważone genomowymi inwersjami czy wyrównawczymi translokacjami, powodują zmianę ilości kopii genu. Warianty takie noszą nazwę wariantów ilości kopii (CNV, ang. *Copy Number Variation*), wielko-segmentowych wariantów kopii (LCV, ang. *Large-Segment Copy Variation*) lub polimorfizmów ilości kopii (CNP, ang. *Copy Number Polymorphism*) (91). Co więcej, przypuszcza się, że niektóre, nawet zbalansowane inwersje genomowe, które nie prowadzą do powstania CNV, również mogą istotnie przyczynić się do lokalnej niestabilności genomu (140).

Ostatnie badania ujawniły istnienie 11 700 CNV, obejmujących ponad 1000 genów, co stanowi 13% ludzkiego genomu (148). Warianty te występują preferencyjnie w okolicach centromerowych i telomerowych chromosomów, a więc w regionach wyjątkowo podatnych i znanych z licznych duplikacji segmentalnych (32). Warianty CNV mogą podlegać zarówno dziedziczeniu, jak i powstawać spontanicznie. Prawdopodobnie to duże, powstałe *de novo* elementy CNV są w największym stopniu odpowiedzialne za generowanie chorób na tle genetycznym, jednakże ostateczny efekt CNV nie jest jednoznaczny i zależy od genów czy sekwencji regulatorowych, podlegających rearanzacji (148). Także nie do końca jasne jest w jakim zakresie elementy CNV są odpowiedzialne za choroby Mendelowskie i złożone schorzenia, czy też reprezentują jedynie łagodną różnorodność polimorficzną (92).

Szacuje się, iż więcej niż połowa genomu ludzkiego zawiera rozproszone powtórzone elementy, takie jak SINE (ang. *Short Interspersed Nuclear Elements*) czy LINE (ang. *Long Interspersed Nuclear Elements*), stanowiące odpowiednio 10% i 20% genomu (147), przy czym najbardziej rozpowszechnioną grupę elementów w genomie stanowią krótkie mobilne elementy *Alu*. Występują one w ilości nawet miliona kopii, co sprawia, że stopień amplifikacji niezbędny do osiągnięcia takiej wartości generuje potencjalnie ogromną ilość mutacji. Elementy *Alu* wprowadzają zatem dużą ilość nowych miejsc splicingowych, powodując modyfikacje transkryptów RNA. Przyczyniają się również do niestabilności genomu poprzez insercje, rekombinacje i nierównomierny crossing-over (90).

Inni badacze sugerują jednakże, że niestabilność genomowa prowadząca do chorób jest w dużo większym stopniu efektem innego rodzaju powtórzeń, określanymi jako powtórzenia małej liczby kopii (LCR, ang. *Low Copy Repeats*) lub jako segmentalne duplikacje (SD, ang. *Segmental Duplication*) (148). Są to specyficzne regiony w obrębie DNA, mające wielkość od

10 do 100kb i charakteryzujące się nawet ponad 97% homologią sekwencji. Stanowią one od 5% do 10% genomu występującego co najmniej w dwóch kopiach. Warianty LCR powodują lokalną niestabilność genomu oraz pośredniczą lub nawet stymulują powstawanie elementów CNV. Są także związane z wariantami polimorficznymi w populacji. Przypuszcza się, iż zmienność ilości kopii jest nawet w większym stopniu niż polimorfizmy SNP odpowiedzialna za mechanizmy ewolucyjne, różnorodność genetyczną a także stale powiększającą się pulę chorób i czynników decydujących o podatności na schorzenia (147, 148).

1.1.2. Mechanizmy powstawania zaburzeń genetycznych

Rearanżacje DNA mogą powstawać zarówno w wyniku homologicznej, jak i niehomologicznej rekombinacji, przy czym pierwszy wariant leży u podstawy większości rearanżacji genomowych (92). Poznanie mechanizmu ich powstawania może przyczynić się do lepszego rozumienia przyczyny i natury przekształceń genomowych leżących u podstawy wielu złożonych chorób. Wyróżniamy trzy główne mechanizmy powstawania rearanżacji DNA: niealleliczna rekombinacja homologiczna (NAHR, ang. *Nonallelic Homologous Recombination*), niehomologiczne łączenie końców (NHEJ, ang. *Nonhomologous End Joining*) oraz blokowanie widełek i przełączanie matrycy (FoSTeS, ang. *Forsk Stalling and Template Switching*) (148).

Warunkiem koniecznym do zajścia NAHR jest co najmniej 97% homologia sekwencji odcinków oraz ich położenie w odległości nie większej niż 10Mb (148). Rekombinacja ta może zachodzić pomiędzy wariantami LCR leżącymi na chromosomach, chromatydach siostrzanych lub w obrębie jednej chromatydy (147). Stopień rearanżacji zależy od wielkości odcinków homologicznych i odległości je dzielącej – im większa odległość pomiędzy dwoma LCR, tym większa jest wymagana długość i homologia sekwencji, aby zaszło NAHR (32, 90). Mechanizm ten prowadzi przede wszystkim do niezrównoważonego crossing-over, generując w efekcie delecje, duplikacje lub inwersje fragmentów chromosomów. Efekt może dotyczyć powtórzenia genów lub odległych regionów zawierających sekwencje regulatorowe, fizyczne połączenia genów ze sobą i genów z pseudogenem, a także odwrócone powtórzenia (90). Najczęściej substratami NAHR są elementy LCR, charakteryzujące się wysokim stopniem homologii, wykazano jednak, że również elementy nie podlegające zazwyczaj rekombinacji homologicznej, takie jak fragmenty *Alu*, mogą ulegać NAHR na skutek jego nieprawidłowego przebiegu, prowadząc do delecji lub duplikacji fragmentów DNA (83).

Mechanizm NHEJ obecny jest w komórce jako klasyczny mechanizm naprawczy podwójnych pęknięć w helisie DNA. W przeciwieństwie do NAHR, nie wymaga jednak homologii odcinków i stymulowany jest samą architekturą genomu (148). Produkt naprawy nici DNA na drodze NHEJ posiada charakterystyczną „molekularną bliznę” w postaci dodatkowych nukleotydów. Mechanizm odpowiada za większość generowanych na drodze mutacji nowych wariantów strukturalnych, również duplikacji i delecji, choć może też powodować łączenie się elementów LCR ze sobą lub z pseudogenami, zwiększając tym samym częstość zachodzenia NAHR (147). Pojawia się tym samym rzadziej, z częstością mniejszą niż 10^{-7} na pokolenie, w danym *locus* (32).

Trzeci mechanizm, FoSTeS, w przeciwieństwie do NAHR i NHEJ, jest to mechanizm złożony, generujący, oprócz duplikacji i delecji, także inwersje. Działa on podczas replikacji DNA i wynika z błędów zachodzących w trakcie tego procesu. Powoduje opóźnienie przesuwania widełek replikacyjnych i przełączenie powstającej opóźnionej nici do nowych widełek, leżących w pobliżu. Może także prowadzić do zamiany nici wiodącej i opóźnionej w nowych widełkach, determinując przyłączanie odcinka do matrycy w poprawnej lub odwróconej orientacji, generując inwersję (148). FoSTeS jest najbardziej złożonym mechanizmem, mogącym powtarzać się skokowo w następujących po sobie cyklach, generującym najbardziej skomplikowane w swej strukturze rearanżacje genomowe (83).

1.1.3. Diagnostyka chorób genetycznych

1.1.3.1. Diagnostyka dużych wariantów strukturalnych

Zaawansowany w ostatnich latach rozwój nowych metod technologicznych, w głównej mierze opartych na technikach mikromacierzy i screeningu, przyczynił się do wysokiej jakości analiz ludzkiego genomu. Umożliwiły one wykrycie szczególnie podatnych na rearanżacje architektonicznych miejsc w genomie oraz regionów, które mogą mieć największe znaczenie kliniczne i stanowić pomocny element w zrozumieniu natury samej choroby, a także oszacowanie ryzyka czy ulepszenie metod leczenia (107). Wprowadzenie bakteryjnych i sztucznych chromosomów, a także zastosowanie oligonukleotydowych sond immobilizowanych w ogromnej ilości na niewielkich powierzchniach w postaci mikromacierzy, umożliwiło wielkoskalową porównawczą hybrydyzację genomową (CGH, ang. *Comparative Genomic Hybridization*). Jest ona dziś potężnym i niezwykle obiecującym

narzędziem uzupełniającym rutynowe testy diagnostyczne w cytogenetyce klinicznej (146). Obecnie w użyciu znajdują się setki testów diagnostycznych a kolejne są rozwijane i udoskonalane. Szybko rozwijająca się wiedza na poziomie molekularnym dostarcza nie tylko nowych informacji odnośnie patogenez wielu złożonych chorób, ale również umożliwia wczesną diagnozę oraz rozwój nowych leków. Wiele lat intensywnych badań wyłoniło szereg czynników – biomarkerów, pomocnych w wyjaśnieniu patomechanizmu choroby czy kierunku rozwoju terapii. Mimo to, choć literatura zawiera około 150 tysięcy raportów odnośnie markerów molekularnych związanych z chorobami, niewiele z nich pozostaje zwalidowanych i ma zastosowanie kliniczne (107). Dlatego też podejmuje się wysiłki w kierunku jeszcze lepszej identyfikacji potencjalnych markerów, a tym samym indywidualnej diagnozy, terapii i monitoringu. Powstają w tym celu nowoczesne platformy, mające na celu oszacowanie faktycznych powiązań wariantów czy genów z chorobą oraz interakcji pomiędzy samymi genami czy całymi ścieżkami, eliminując tym samym czynniki fałszywie pozytywne (123). Postęp w technologii ma zatem na celu nie tylko bardziej czułe i doskonalsze jakościowo metody analizy DNA, ale też ulepszenie metodologii, konstrukcji i kwalifikacji nowych markerów, a tym samym rozwój farmakogenomiki (107).

Choroby monogenowe, zapewniające silny związek genotyp-fenotyp, dające prawie 100% ryzyko zachorowania i pozwalające na diagnostykę prenatalną, mają ogromną wartość diagnostyczną i prognostyczną. Niekiedy stanowią one jednak tylko pozornie prosty cel diagnostyczny. W przypadku dziedziczenia dominującego może nastąpić zjawisko tzw. niepełnej penetracji, spowodowane pominięciem fenotypu w pokoleniu lub różnicą w ekspresji, co sprawia trudności w diagnozie niektórych chorób, jak np. zespołu nerek policystycznych (62).

Dzięki technologicznemu postępowi, poza widocznymi i stosunkowo łatwo rozpoznawalnymi aberracjami chromosomowymi, jak trisomia 21. chromosomu w postaci zespołu Downa czy monosomia chromosomu X u kobiet w postaci zespołu Turnera, poznanych i opisanych zostało wiele zespołów chorobowych, opartych na duplikacjach, delecjach czy rearanżacjach dotyczących elementów CNV czy LCR, flankujących kodujące fragmenty genów, jak np.: dystrofia mięśniowa Duchenne’a, schizofrenia, choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera (83, 148). Szereg badań wykazał także związek pewnych wariantów CNV z podatnością na zakażenie wirusem HIV, na chorobę Crohna, łuszczycę, schorzenia z grupy glomerulopatii, a także z procesami nowotworzenia (147, 148).

1.1.3.2. Diagnostyka małych wariantów strukturalnych

Mniejsze warianty strukturalne (1-10kb) są najtrudniejsze do oszacowania na podstawie większości istniejących obecnie platform badawczych, zaś najmniejsze, punktowe zmiany w genomie, byłyby praktycznie niewykrywalne bez metod opartych na sekwencjonowaniu (32). Dodatkową trudność w przypadku chorób monogenowych stanowi również niepełna penetracja alleli. Wśród około 2600 chorób Mendlowskich ogromna większość spowodowana jest przez rzadkie mutacje, z których 85% zlokalizowana jest w regionach kodujących lub miejscach splicingowych i powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu białka (31). Zidentyfikowanych zostało wprawdzie ponad 250 tzw. „częstych wariantów”, które mają związek z allelami ryzyka a tym samym mogą mieć udział w chorobie, jednak obecnie przypuszcza się, że ich efekt jest raczej nieistotny lub neutralny. Znaczący związek z ryzykiem wystąpienia choroby i potencjalne znaczenie kliniczne przypisuje się natomiast tzw. „rzadkim wariantom”, z których większość występuje w regionach kodujących (31).

Dlatego też sekwencjonowane są całe regiony kodujące genów-kandydatów, a następnie porównywane z sekwencjami osób zdrowych lub pomiędzy samymi chorymi, jako że nawet subtelne zmiany w sekwencji mogą mieć znaczące efekty czynnościowe. Technika ta nosi nazwę sekwencjonowania eksomów i zyskuje obecnie ogromne znaczenie w diagnostyce i praktyce klinicznej (31, 156). Co więcej, uważa się, że jest to podejście właściwe zarówno, gdy gen odpowiedzialny za chorobę jest już znany, jak i w przypadku gdy podłoże genetyczne nie jest ustalone lub gdy podejrzewa się zaangażowanie wielu genów w patofizjologię schorzenia (31, 129). Istotną zaletę technik sekwencjonowania stanowi możliwość wykrywania nie tylko mutacji powstających *de novo*, ale także rzadkich polimorfizmów SNP, niewykrywanych w standardowych platformach mikromacierzy. Istnieje jednakże możliwość, iż „rzadkie warianty” zlokalizowane są w regionach niekodujących genów, a tym samym zostaną pominięte w trakcie sekwencjonowania. Niemniej, genotypowanie części kodujących pozostaje elementem priorytetowym, jako że dostarcza istotnych informacji odnośnie ewentualnych mutacji powodujących efekty funkcjonalne w białku, jak również stanowi ogromną oszczędność czasu i kosztów w porównaniu z sekwencjonowaniem całego genomu (31).

Ograniczenie w ten sposób ilości uzyskanych danych nadal nastęrcza potencjalne trudności w ich analizie i właściwej interpretacji. Dlatego też, m.in. z tego powodu, w 1996 roku powstała ogólnoswiatowa baza danych dotycząca mutacji w ludzkim genomie – The

Human Gene Mutation Database (HGMD) (151). Baza ta zawiera informacje o dziedzicznych zmianach pojedynczego nukleotydu, powodujących substytucję aminokwasową, w regionach kodujących, splicingowych i regulatorowych, także o mikrodelecjach, mikroinsercjach, powtórzeniach oraz dużych zmianach i złożonych rearanżacjach genomu. Analogicznymi bazami danych odnośnie mutacji somatycznych i mutacji genomu mitochondrialnego są odpowiednio baza COSMIC i MITOMAP (151).

1.1.3.3. Diagnostyka chorób genetycznych w oparciu o polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP)

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) są najprostszą formą polimorfizmu genetycznego i obejmują 90% wszystkich polimorfizmów DNA ludzkiego, stanowiąc tym samym najczęstsze źródło zmienności genetycznej (118, 162). SNP definiowany jest jako zmiana pojedynczego nukleotydu w DNA, występująca z częstością nie mniejszą niż 1% w populacji (93). Zmiany te rozproszone są w całym genomie i wzdłuż całych autosomów, natomiast chromosomy płci charakteryzuje wyraźnie mniejsza zmienność sekwencji. SNP-y występują z częstością 1/300-1000pz, co potencjalnie daje liczbę nawet 10 mln SNP w całym genomie, przy czym ilość SNP występujących z częstością większą niż 10% sięga nawet 5 milionów (45).

Szybkość pojawiania się nowych SNP w populacji jest stosunkowo niska i wynosi 10^{-8} – 10^{-9} na pokolenie, co czyni je wyjątkowymi i unikatowymi zmianami w genomie (117). Tym samym, stanowią one również atrakcyjny obiekt badań jako narzędzia, służące do identyfikacji zarówno genów związanych potencjalnie z chorobą, jak i do poznania niezidentyfikowanych do tej pory części genomu. Pomimo, że część SNP-ów stanowi tzw. „ciche mutacje”, nie powodujące zmiany w sekwencji genu, niekiedy mogą one powodować zmianę w poziomie ekspresji, zmiany w sygnalizacji kodowanych czynników oraz ich aktywności biologicznej czy łączeniu z innymi białkami, co tłumaczyć może odmienną podatność osobniczą na choroby (45). Polimorfizmom tym przypisuje się także warunkowanie odpowiedzi organizmu na patogeny, leki, szczepionki czy ksenobiotyki, dlatego też SNP-y uznawane są obecnie za klucz w rozwoju spersonalizowanej medycyny (162). Z drugiej jednak strony, same SNP-y tłumaczą jedynie część zmienności fenotypowej uwarunkowanej genotypem, dlatego, bardziej niż w kontekście przyczyny choroby, są one klinicznie istotne pod kątem oszacowania ryzyka i skuteczności terapii (93).

Warto zwrócić uwagę na fakt, że polimorfizmy w niekodujących częściach genomu również mogą mieć wpływ na potranskrypcyjne składanie eksonów, przyłączanie czynników transkrypcyjnych czy sekwencji niekodującego regulatorowego RNA. SNP-y takie określane są jako eSNP (ang. *expression SNP*), a zależne od nich zmiany mogą dotyczyć zarówno podwyższonej jak i obniżonej ekspresji genu (151). Szacuje się, że większość występujących w genomie SNP-ów zlokalizowana jest wprawdzie w regionach nieprzepisywanych na białko (5, 35), jednak około 55% SNP-ów leżących w częściach kodujących powoduje niesynonimiczne zmiany kodonów, co potencjalnie może stanowić związek z chorobą (151). Co więcej, wykazano, iż nawet jeśli SNP-y nie prowadzą do substytucji aminokwasowej, mogą wpływać na strukturę mRNA i późniejsze fałdowanie białka, a nawet powodować wyłączenie całych genów poprzez indukcję mechanizmu przeskakiwania i omijania miejsc splicingowych (171).

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu są zazwyczaj bialleliczne, przez co łatwe w identyfikacji na drodze większości technik opartych na sekwencjonowaniu (129). Jednakże pomimo ogromnego potencjału SNP-ów jako narzędzi w nowoczesnej spersonalizowanej medycynie, trudno jest przetłumaczyć wiedzę o pojedynczych zmianach na klinicznie jednoznaczny i użyteczny test (35). Jednym z powstałych w tym celu „modeli” przełożenia języka SNP-ów na bardziej zrozumiały i dający się zastosować w praktyce klinicznej, jest niezrównoważenie sprzężeń (LD, ang. *Linkage Disequilibrium*) (117). Określa ono stopień powiązania SNP-ów ze sobą i jest obecnie swoistym ilościowym kluczem w genetyce człowieka. Pozwala przewidzieć lokalizację wariantów leżących u podstawy fenotypowych różnic, w tym również chorób, oraz określić wielkoskalowe sprzężenia pomiędzy pojedynczymi polimorfizmami. W toku badań nad naturą SNP-ów odkryto, iż najczęściej nie funkcjonują one pojedynczo, ale w powiązaniu z innymi, czego miarą jest LD. Odpowiednio silne powiązania pomiędzy SNP-ami lokują je w tzw. haplotypy, czyli zestawy SNP-ów w obrębie jednego chromosomu, które w sposób kontrolowany wspólnie segregują do komórek potomnych (45).

Wykazano także istnienie powiązania występowania SNP-ów z większymi zmianami strukturalnymi genomu w postaci krótkich tandemowo powtórzonych sekwencji (STRP, ang. *Short-Tandem-Repeat Polymorphism*) czy elementami CNV (117). Wartości LD pomiędzy SNP-ami a wariantami CNV są najczęściej mniejsze niż pomiędzy samymi SNP-ami (32), natomiast powiązania pomiędzy SNP-ami a STRP znacznie je przewyższają. Jednak ze względu na ogromną szybkość zachodzenia mutacji w obrębie sekwencji STRP, wynoszącą

10^{-3} do 10^{-5} na pokolenie, są one trudniejsze do oszacowania i wymagają skomplikowanych analiz w celu wykazania istotnego statystycznie niezrównoważenia sprzężeń, przez co wykazują nikłą przydatność jako specyficzne markery genetyczne (117).

Próby oszacowania faktycznych oddziaływań i powiązań pomiędzy poszczególnymi SNP-ami, mogącymi wpływać na rozwój chorób czy efektywność terapii, doprowadziły do stworzenia unikatowej międzynarodowej bazy danych HapMap. Platforma ta stanowi kontynuację projektu sekwencjonowania genomu ludzkiego i jest swoistym przewodnikiem genetycznym po złożonych chorobach w kontekście subtelnych zmian pojedynczych nukleotydów w genomie (93). Nawet niewielka ilość SNP-ów może teoretycznie prowadzić do powstania ogromnej ilości możliwych zestawów haplotypowych, w rzeczywistości jednak w populacji obserwuje się jedynie kilka kombinacji zawierających określone nukleotydy. Dzięki temu baza HapMap umożliwia mapowanie SNP-ów w znacznie ograniczonych rejonach genomu poddawanego sekwencjonowaniu, bez konieczności identyfikacji poszczególnych wariantów funkcjonalnych (129). Tak ukierunkowane genotypowanie SNP wspomaga rozwój testów analitycznych i metod diagnostycznych, stanowiąc dokładniejsze narzędzie do identyfikacji nowych celów terapeutycznych.

Projekt HapMap napotyka na pewne ograniczenia i trudności, jak np. duża liczba wymaganych prób czy brak możliwości szacowania związku „rzadkich wariantów” oraz dużych wariantów strukturalnych z chorobą. Niemniej, stworzenie bazy pozwoliło na identyfikację jak dotąd prawie 100 różnych *loci* związanych z niemal 40 złożonymi schorzeniami i fenotypami chorobowymi (93). Oszacowano m.in. związek występowania określonych wariantów z podatnością na choroby takie jak: cukrzyca typu 1 i 2, nowotwory, otyłość i choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby z grupy nieswoistego zapalenia jelit czy choroby autoimmunologiczne. Ponadto, dowiedziono roli SNP-ów w mechanizmie odrzucania przeszczepów (2, 35, 93, 94).

1.1.4. Epigenetyka chorób genetycznych

Pomimo, iż wykazano związek szeregu polimorfizmów, mikro-zmian czy dużych rearanżacji strukturalnych w genomie z podatnością na choroby o skomplikowanym i nie do końca wyjaśnionym podłożu, genetyczne postawy wyjaśniają jedynie część ich udziału w etiopatologii tych schorzeń (37). W odróżnieniu od chorób monogenowych, wykazujących

prawie 100% ryzyko zachorowania i charakteryzujących się silnym związkiem genotypu z fenotypem, w przypadku chorób poligenowych oraz schorzeń złożonych związek ten jest dużo słabszy, zaś zmiany strukturalne występują zazwyczaj w wielu genach. W związku z tym oszacowane może być jedynie relatywne ryzyko wynikające z udziału genotypu w chorobie (62). Co więcej, jako że choroby te wykazują mniejszą odziedziczalność, do ujawnienia się defektu często niezbędny jest udział czynników środowiskowych współdziałających z genomem (88). Efektem ich oddziaływania są rearanżacje epigenetyczne, które nie prowadzą wprawdzie do zmian w sekwencji nukleotydowej DNA, powodują jednak funkcjonalne zmiany genomu.

W trakcie rozwoju komórki przechodzą ogromne przeprogramowanie epigenetyczne, charakteryzujące się określonym wzorem modyfikacji epigenetycznej dla poszczególnych tkanek (37). W ostatnich 20 latach wzrosło zainteresowanie wpływem epigenetyki na regulację ekspresji genów nie tylko w kontekście fizjologicznego rozwoju, ale także ze względu na osobnicze różnice epigenetyczne, mogące mieć odzwierciedlenie w odmiennej podatności na choroby, jak również odpowiedzi na leczenie.

Jedną z podstawowych modyfikacji epigenetycznych genomu są zmiany w poziomie metylacji DNA. Obejmują one zarówno hipermetylację, powodującą obniżenie ekspresji genu lub jego całkowite wyłączenie, jak i hipometylację, indukującą niestabilność DNA poprzez generowanie tzw. „miejsc kruchych” w chromosomach. Do pozostałych mechanizmów epigenetycznych należą zmiany w poziomie acetylacji białek histonowych, wpływające na ekspresję genu, a także małe interferujące RNA (RNAi) i mikro RNA (miRNA), które obniżają stabilność mRNA i wpływają na obniżenie efektywności, z jaką mRNA jest przepisywane na białko (37). W toku badań wykazano, iż sama struktura genomu i jego warianty genetyczne mogą decydować o wrażliwości określonych miejsc w DNA na wpływ czynników środowiskowych i predysponować je do ulegania zmianom epigenetycznym (37).

Badania dowodzą udziału zmian epigenetycznych m.in. w nowotworach, schorzeniach metabolicznych jak cukrzyca czy otyłość, a także w chorobach z grupy glomerulopatii (148).

1.2. Zespół nerczycowy (ZN)

1.2.1. Definicja i epidemiologia zespołu nerczycowego

Zespół nerczycowy (NS, ang. *Nephrotic Syndrome*) jest schorzeniem złożonym, przewlekłym i niezwykle heterogennym (173). Stanowi najczęstszą postać chorób kłębuszkowych, tzw. glomerulopatii, wieku dziecięcego. Pierwszym i głównym objawem zespołu nerczycowego jest silny białkomocz w wielkości powyżej 50 mg/kg/dzień, przekraczający zdolności kompensacyjne ustroju. W przypadku dziecięcego ZN jest to przeważnie białkomocz selektywny, na który składają się głównie albuminy (11). Dlatego też, poza białkomoczem, do pozostałych objawów zespołu nerczycowego należy hipalbuminemia, w wielkości <30 g/l, a także związane z nią hiperlipidemia i obrzęki ciała (64).

Zespół nerczycowy pozostaje chorobą rzadką, a częstość jego występowania zależna jest od wieku, płci, geograficznego i etnicznego pochodzenia oraz środowiska życia. Szacuje się, iż ogólna zachorowalność na ZN wynosi 12-16/100.000 rocznie, u dzieci zaś częstość ta wynosi 2-7/100.000, w skali ogólnoswiatowej (64). Notuje się jednak 6-krotnie wyższą częstość występowania ZN u dzieci azjatyckich w porównaniu z rejonem europejskim (57), również częściej diagnozuje się zespół nerczycowy u chłopców niż u dziewczynek, a stosunek ten wynosi 3:2 (64).

1.2.2. Etiopatologia zespołu nerczycowego

W 95% przypadków ZN podstawę jego wystąpienia stanowią glomerulopatie pierwotne (26). Jednak pomimo wielu lat badań etiologia zespołu nerczycowego u dzieci nadal pozostaje niewyjaśniona.

Ponieważ zarówno pierwszym objawem ZN, jak i czynnikiem, wedle którego rozpatruje się skuteczność terapii w kontekście nawrotów i remisji, jest białkomocz, uwaga badaczy skupia się na patomechanizmie uszkadzającym barierę filtracyjną kłębuszków nerkowych. Błona szczelinowa jest to wysoce dynamiczna struktura, w której najistotniejszy element stanowią komórki blaszki trzewnej torebki kłębuszka nerkowego - podocyty. Charakteryzują się one wysokimi zdolnościami adaptacyjnymi do zmieniających się stale warunków środowiska (173), jednakże błona szczelinowa wydaje się być szczególnie delikatną strukturą

i to właśnie w niej zachodzą pierwsze patologiczne zmiany, prowadzące w efekcie do białkomoczu, niezależnie od wywołującego je bodźca (14). Co więcej, podocyty jako jedyny rodzaj wyspecjalizowanych komórek w obrębie kłębuszka nerkowego nie posiadają zdolności do proliferacji, co uniemożliwia ich rekompensatę po utracie z moczem (116, 139). Według najnowszych doniesień podocyturia jest czynnikiem niezależnym od białkomoczu, dlatego też nawet silny białkomocz nie musi być jednoznaczny z poziomem nieodwracalności patologicznych zmian w kłębuszku nerkowym. Tym samym, miara utraty podocytów z moczem stanowić może lepszy wskaźnik nawrotu choroby niż sam białkomocz (144).

Zidentyfikowano jak dotąd szereg genów, kodujących białka stanowiące integralne elementy podocytów i błony szczelinowej, w których mutacje i polimorfizmy powiązano z różnymi postaciami zespołu nerczycowego. Początkowo około 90% przypadków rodzinnego dziedzicznego ZN typu fińskiego (ang. *Congenital Nephrotic Syndrome Finnish type*) przypisano dwu mutacjom w genie nefryny (*NPHS1*), określanym terminem Fin major i Fin minor (160). Jednakże w ostatnich latach liczba nowych mutacji i polimorfizmów zlokalizowanych w dowolnym miejscu w genie nefryny wzrosła wśród pacjentów na całym świecie i przypisuje się im zarówno rolę czynników przyczynowych w ZN, jak i wpływających na łagodniejsze formy fenotypowe choroby (84).

Wśród pozostałych genów błony szczelinowej, w których mutacje powiązano z wystąpieniem pierwotnego ZN u dzieci, znajdują się: podocyna (*NPHS2*) (73), gen supresorowy guza Wilmsa (*WT1*) (110), gen białka łącznikowego w podocytach *CD2AP* (74), czy gen kanału jonowego *TRPC6* (166). Co ciekawe, w przypadku genu α -aktyliny-4 (*ACTN4*), ulegającemu ekspresji również w innych poza podocytami komórkach ciała, stwierdzono mutacje organo-specyficzne, pojawiające się u chorych z ZN tylko w obrębie kłębuszków nerkowych. Opisane mutacje w genach podocytów i błony szczelinowej obejmują zarówno formy autosomalne dominujące, jak i recesywne, homo- i heterozygoty (163).

Pierwotny zespół nerczycowy będący efektem mutacji w którymś z wymienionych genów ujawnia się najczęściej w ciągu pierwszego roku życia dziecka, jako forma wrodzona do 3. miesiąca życia, lub jako forma młodzieńcza, występująca między 4. a 12. miesiącem życia. W większości przypadków wrodzony ZN jest oporny na leczenie immunosupresyjne, charakteryzuje się na ogół brakiem spontanicznych remisji, zaś jego prognozy są słabe, bez względu na podłoże histopatologiczne schorzenia (96). Forma ta objawia się ponadto silnym

białkomoczem już w okresie noworodkowym lub prenatalnym i określana jest obecnie jako idiopatyczny zespół nerczycowy, ze względu na nie do końca jasną etiopatologię (23).

Poza czynnikiem genetycznym, coraz większe poparcie zyskuje także hipoteza o udziale nieprawidłowości w działaniu układu immunologicznego w patogenezie ZN. Wymienia się tu m.in. zaburzenia w funkcjonowaniu poszczególnych frakcji limfocytów T (47), a tym samym zaburzenia w profilu ekspresji cytokin prozapalnych oraz chemokin i ich receptorów (6), dysfunkcje składników układu dopełniacza (19), a także nieprawidłowości w rozmieszczeniu negatywnych ładunków na błonie podstawnej kłębuszka nerkowego (64), czy zmiany w przepuszczalności jego naczyń krwionośnych, co zmienia funkcjonowanie i selektywność podocytów (11).

W ostatnich latach uwagę wielu badaczy zwróciły też towarzyszące zespołowi nerczycowemu liczne defekty genomu mitochondrialnego, dotyczące działania poszczególnych elementów łańcucha oddechowego i mitochondriów występujących lokalnie w kłębuszkach nerkowych, co stanowić może dodatkowy patomechanizm skutkujący białkomoczem (53, 66, 143).

1.2.3. Podłoże histopatologiczne zespołu nerczycowego

Rozpoznanie histopatologiczne w zespole nerczycowym stanowią głównie zmiany o charakterze minimalnym (MCD, ang. *Minimal Change Disease*), stanowiące 77-90% rozpoznań (21, 144), zaś pozostałe 20% stanowi heterogenna grupa, obejmująca ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków (FSGS, ang. *Focal Segmental Glomerulosclerosis*), zmiany mezangialno-rozplemowe (DMP, ang. *Diffuse Mesangial Proliferative Glomerulonephritis*) oraz błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (MPGN, ang. *Membranoproliferative Glomerulonephritis*) i inne (64). Notuje się, że u 5-10% dzieci u podstawy ZN leży nefropatia IgA, jednakże jej rozwój i przebieg są powolne, a prognozy sprzeczne i niejasne (101).

Istota właściwej oceny histopatologicznej pacjentów z ZN jest kluczowa w długoterminowym rokowaniu i podlega znacznemu zróżnicowaniu w zależności od wieku, płci i pochodzenia etnicznego (21). Zmiany o typie MCD notuje się najczęściej pomiędzy 2. a 6. rokiem życia i występują one około 6-krotnie częściej u Azjatów niż u dzieci rasy kaukaskiej. MCD związane jest z reguły z pozytywną odpowiedzią na leczenie

kortykosteroidowi i dobrą prognozą (64). Patogeneza schorzenia nie jest do końca poznana i wyjaśniona, jednak większość badaczy jest zgodna co do niewątpliwej roli układu immunologicznego i zaburzeń we frakcjach limfocytów T. Jako pierwszy opisał to zjawisko Shalhoub w latach 70-tych XX wieku sugerując, iż ZN na podłożu zmian minimalnych jest schorzeniem systemowym, charakteryzującym się dysfunkcją limfocytów T z pobudzeniem odpowiedzi typu komórkowego (138). Od tego czasu trwają wysiłki badaczy, by zidentyfikować konkretne cytokiny oraz zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za wzrost ich ekspresji i działanie patogenne. Za hipotezę, mówiącą o nasileniu odpowiedzi typu limfocytów Th₁ w patogenezie MCD, przemawia wiele faktów, m.in. dobra i zazwyczaj szybka odpowiedź pacjentów na leczenie immunosupresyjne, często towarzyszące ZN infekcje górnych dróg oddechowych, a także samorzutne remisje białkomoczu w trakcie odry i innych chorób, w trakcie których naturalna odporność komórkowa jest upośledzona (122, 168). Co więcej, coraz powszechniej przyjmuje się, iż zmiany w typie MCD to schorzenie immunologiczne, objawiające się najsilniej w obrębie nerek, a nie schorzenie typowo nerkowe (133).

W przeciwieństwie do MCD, rozpoznanie w typie FSGS stanowi dużo bardziej niejednorodną i często niejednoznaczną grupę zmian trudnych w ocenie nawet u jednego pacjenta w czasie, obejmującą wiele podtypów i różnorodnych wariantów histologicznych. Początkowo MCD i FSGS traktowano jako morfologiczne formy tej samej przypadłości o różnym stopniu zaawansowania. Obecnie jednak, wg ustaleń ISKDC (ang. *International Study of Kidney Disease in Children*), międzynarodowego konsorcjum do spraw chorób nerek u dzieci, są one odrębnymi schorzeniami w obrębie zespołu nerczycowego (157). Zmiany histologiczne w przypadku FSGS obejmują większe uszkodzenie kanalików nerkowych oraz zwłóknienie, pomimo, że stopień białkomoczu w obydwu formach jest porównywalny. FSGS, w odróżnieniu od MCD, charakteryzuje się jednak nieselektywnym białkomoczem, na ogół steroido-opornością oraz postępującą niewydolnością nerek (68). Szacuje się, iż FSGS jest przyczyną utraty funkcji nerek u 5% dorosłych i 15-20% dzieci ze schyłkową niewydolnością narządu (163). Wedle ostatnich obserwacji, proces ten następuje jednak szybciej w populacji dzieci pochodzenia hiszpańskiego i afrykańskiego niż w grupie kaukaskiej (132), podobnie też szacuje się częstość występowania FSGS w tych grupach etnicznych (21). Prawdopodobnie może to być wynikiem częstszego wykonywania biopsji u pacjentów opornych na zastosowane standardowo leczenie, a więc tych, u których statystycznie notuje się gorszy histologicznie typ zmian. Jednak przypuszcza się też, że rosnący odsetek

rozpoznać FSGS wiąże się ze zmieniającym się klinicznie obrazem zespołu nerczycowego m.in. na skutek wzrastającej otyłości i schorzeń szczególnie predysponujących do zwiększonego ryzyka uszkodzeń i chorób nerek (21).

Niektórzy autorzy donoszą też o roli czynnika genetycznego w rozwoju FSGS, w postaci mutacji i polimorfizmów w genach białek błony podstawnej kłębuszka nerkowego oraz podocytów i błony szczelinowej (67, 171), a także o powiązaniu mutacji w mtDNA i dysfunkcji mitochondriów podocytowych z występowaniem FSGS i ostrych form ZN (89).

Statystyki i badania odnośnie pozostałych form histologicznych są ograniczone, ale przypuszcza się, że zmiany o charakterze rozplemowym mogą być spontanicznie rozwijającą się formą dziecięcego ZN (161). Przypuszcza się także, iż mechanizmy patogenne w odrębnych typach histologicznych są odmienne, pomimo, że w każdym z nich obserwowane jest uszkodzenie podocytów, skutkujące białkomoczem (42). Z reguły jednak, bez względu na patomechanizm uszkodzenia, to cięższe rozpoznania histologiczne rokuje najgorzej i są trudniejsze w leczeniu (11).

1.2.4. Idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN)

Pomimo identyfikacji wciąż rosnącej liczby mutacji w genach strukturalnych związanych z podocytami i błoną szczelinową, zespół nerczycowy o genetycznie uwarunkowanym podłożu dysfunkcji bariery filtracyjnej nadal stanowi niewielką część glomerulopatii pierwotnych u dzieci. Formę przeważającą w tej grupie schorzeń nerkowych stanowi idiopatyczny zespół nerczycowy (INS, ang. *Idiopathic Nephrotic Syndrome*) (163), występujący pomiędzy 3. miesiącem a 16. rokiem życia, a charakteryzuje go brak wyraźnych wskazań parametrów laboratoryjnych czy pierwotnej przyczyny genetycznej (29).

1.2.4.1. Epidemiologia IZN

Dokładne dane dotyczące epidemiologii IZN u dzieci są ograniczone, a częstość występowania zależy od wieku, grupy etnicznej oraz płci (98), przy czym wiek wydaje się być czynnikiem o kluczowym znaczeniu w przebiegu choroby oraz odpowiedzi na leczenie steroidowe. Wykazano, że im później IZN się manifestuje, tym większe jest ryzyko rozpoznania FSGS, co z kolei wiąże się z cięższym przebiegiem choroby i steroido-

opornością u 25-62% pacjentów oraz szybszym postępowaniem do stadium schyłkowej niewydolności nerek. Natomiast młodszy wiek w chwili rozpoznania IZN stanowi większą szansę na łagodne zmiany typu MCD, a tym samym lepsze prognozy (29). Z drugiej jednakże strony, Trompeter i in. wykazali odwrotną proporcję czasu trwania choroby w zależności od wieku. U dzieci, u których IZN wystąpił ok. 2. r.ż., choroba trwała średnio 11,5 roku, zaś manifestowanie się IZN ok. 14. r.ż. skracało czas trwania choroby do 1,5 roku (76). Według danych statystycznych IZN rzadko występuje zaraz po urodzeniu, najczęściej natomiast w ciągu 1. r.ż. dziecka, a większość z nich wykazuje steroido-oporność i stopniową utratę funkcji nerek w ciągu 5-10 lat (105, 132).

1.2.4.2. Etiopatologia IZN

W 1974 roku po raz pierwszy wysunięto hipotezę, iż u podłoża ZN o typie łagodnych zmian leżą nieprawidłowości immunologiczne w postaci zaburzeń we frakcji krążących limfocytów T (138). Teoria ta jest do dzisiejszego dnia weryfikowana, a dzięki nowoczesnym metodom eksperymentalnym, w tym możliwości wykorzystania zwierząt modelowych, badacze są w stanie prześledzić mechanizmy proliferacji konkretnych subpopulacji komórek krążących, jak również zbadać profile zmian w ekspresji poszczególnych cytokin. Jednakże, pomimo rozwoju coraz bardziej czułych i dokładnych technik immunologicznych, badania cytokin dostarczają wciąż niejednoznacznych czy nawet mylących danych (172).

W patogenezie IZN wielu autorów zwraca uwagę na istotną rolę właściwego zrównoważenia subpopulacji limfocytów T efektorowych i regulatorowych, co pociąga za sobą zaburzenia mechanizmów równowagi immunologicznej. W tym kontekście, szczególnie często dokumentowanym zjawiskiem u pacjentów z IZN jest przesunięcie odpowiedzi immunologicznej kierunku frakcji limfocytów Th₂, kosztem zredukowania fenotypu Th₁ (7, 81, 172). W efekcie prowadzi to do wzmożonej ekspresji i wydzielania cytokin określonego rodzaju, najczęściej w sposób ciągły, niezależny od fizjologicznych mechanizmów regulatorowych (25, 163). Szereg autorów potwierdza udział zwiększonej subpopulacji limfocytów Th₂ w przebiegu IZN, wskazując tym samym na towarzyszące często zespołowi nerczycowemu reakcje atopowe i alergiczne, będące charakterystycznymi objawami powiązаныmi z tym fenotypem limfocytów (26, 40, 136). Kolejnym potwierdzeniem roli limfocytów Th₂ w patologii IZN jest hamowanie sygnalizacji cytokin i ich receptorów, będących markerami biologicznymi fenotypu Th₁, co sugeruje wczesną aktywację limfocytów

CD4⁺ w kierunku Th₂ (23). Za ich udziałem w chorobie przemawia również zaburzony profil przeciwciał w trakcie nawrotów IZN, jako że limfocyty Th₂ pełnią wraz z wytwarzanymi cytokinami funkcję przełączników klas przeciwciał, produkowanych przez limfocyty B i komórki plazmatyczne (71).

Dysfunkcja immunologiczna nie ogranicza się jednak tylko do populacji limfocytów Th, ale przypuszczalnie wpływa też na pozostałe podtypy limfocytów T i B oraz monocyty (56). Niektórzy badacze wiążą występowanie IZN z przewlekłymi hemopatiami limfoidalnymi oraz z hiperlipidemią, które mogą zmieniać aktywność systemu immunologicznego (23). Jednak, pomimo wielu badań poświęconych dysfunkcji mechanizmów układu immunologicznego, nadal nie udało się jednoznacznie ustalić, czy zmiany w profilu ekspresji cytokin i nieprawidłowości dotyczące limfocytów T stanowią przyczynę IZN, czy też jego skutek, będąc jedynie naturalnymi reakcjami na wywołujący je bodziec.

Przez lata uważano, że bodźcem tym jest krążący osoczowy czynnik przepuszczalności naczyń (PF, ang. *Permeability Factor*), co potwierdziły obserwacje nawrotu białkomoczu po przeszczepie nerki oraz skuteczność zabiegu plazmaferezy. Niekiedy przypisywano mu też rolę czynnika związanego z przeciwciałami klasy IgG, czy białka o dodatnim ładunku, uszkadzającego błonę podstawną kłębuszka nerkowego (23, 50). Nie wszyscy jednak potwierdzają te hipotezę. Wśród pozostałych czynników o przypuszczalnej roli w patogenezie IZN, znajdują się czynniki wywodzące się z limfocytów T takie jak: IL-2, IL-8, czynnik martwicy guza α (TNF α) czy płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) (50, 97).

W ostatnich latach, podobnie jak w przypadku FSGS, rozpatruje się możliwe podłoże genetyczne w rozwoju IZN w postaci polimorfizmów genów związanych z dojrzewaniem i różnicowaniem limfocytów T, a także modyfikacje epigenetyczne (42). Szczególne zainteresowanie budzą geny zaangażowane przypuszczalnie w patogenezę IZN, a których funkcjonowanie może być rozregulowane do pewnego niezauważalnego stopnia już od urodzenia. Stan taki jest jednak tolerowany przez komórkę, opóźniając tym samym wystąpienie choroby, ale też decydując o częstych nawrotach czy samorzutnych remisjach, co jest obserwowane w trakcie leczenia pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym.

1.2.5. Steroido-oporność w zespole nerczycowym

1.2.5.1. Steroido-oporność jako czynnik prognostyczny w ZN

Podstawę leczenia immunosupresyjnego w zespole nerczycowym stanowią glikokortykosteroidy (Gk), a opracowane w latach 60-tych XX wieku przez ISKDC protokoły terapii są z niewielkimi modyfikacjami stosowane do dzisiaj (64). Odpowiedź na Gk mierzona jest wielkością białkomoczu i w zależności od tego wyróżniono 2 główne grupy terapeutyczne. Pacjenci, którzy w ciągu pierwszych 28 dni od rozpoczęcia terapii uzyskują całkowitą remisję, definiowaną jako co najmniej 3 następujące po sobie dni, w trakcie których nie obserwuje się białkomoczu, określani są mianem steroido-wrażliwych (ang. SS, *Steroid Sensitive*). Drugą grupę stanowią pacjenci steroido-oporni (ang. SR, *Steroid Resistant*), u których nie udaje się uzyskać remisji w trakcie 28 dni terapii.

Pacjenci charakteryzujący się cięższym rozpoznaniem histologicznym w typie FSGS czy DMP wykazują w większości przypadków steroido-oporność, zaś ZN w typie zmian minimalnych oznacza najczęściej dobre prognozy i pozytywną reakcję na leczenie. Jednak histopatologiczna ocena nie zawsze jest trafna i jednoznaczna. Ze względu na różne umiejscowienie zmian w typie segmentalnego szkliwienia niekiedy mogą one zostać nierozpoznane, gdy biopłat pochodzi z innej części nerki (144). Ponadto, biopsja może w ogóle nie wykazać początkowo zmian sklerotycznych, a fakt, iż u większości dzieci u podstawy zespołu nerczycowego leży MCD, skłania ku odejściu od biopsji jako rutynowego postępowania (97, 132). Co więcej, coraz więcej ekspertów zaleca wykonanie biopsji dopiero po 2-3 latach od rozpoczęcia leczenia w celu monitorowania jego neurotoksyczności, zwłaszcza w kwestii decyzji co do kontynuowania terapii (11). Nie zawsze też nawet precyzyjna ocena histologiczna jest równoznaczna z odpowiedzią na leczenie steroidowe i to właśnie ta ostatnia jest obecnie głównym czynnikiem prognostycznym w leczeniu ZN (64, 167).

U 10-20% pacjentów z IZN nie uzyskuje się remisji białkomoczu, zaś u około 70% spośród pacjentów steroido-wrażliwych następują nawroty (171). Co więcej, dzieci, u których częste nawroty białkomoczu występują już w ciągu pierwszych 6 miesięcy, są w największej grupie ryzyka nawrotów w ciągu następnych 18 miesięcy (64). Taką postać ZN o częstych nawrotach (FRNS, ang. *Frequently Relapsing Nephrotic Syndrome*) u dzieci charakteryzuje 25% szans na samoistne, spontaniczne remisje i występują one częściej w przypadku IZN zdiagnozowanego po 4. miesiącu życia w porównaniu z formą wrodzoną ZN (96). Nadal

jednak około 50-60% pacjentów z spośród FRNS charakteryzują utrzymujące się nawroty i w efekcie rozwijają oni steroido-zależność (SDNS, ang. *Steroid Dependent Nephrotic Syndrome*) (11). Ponadto, szacuje się, iż do 20% dzieci steroido-wrażliwych nawet po długotrwałej remisji może mieć nawroty występujące aż do 20. r.ż. (64).

Istotnym czynnikiem w odpowiedzi na steroidy wydaje się być czas uzyskania pierwszej remisji od zastosowania leczenia. Pacjenci, u których remisja białkomoczu nastąpiła najszybciej, tzn. w ciągu pierwszych 7 dni, mają największą szansę na osiągnięcie trwałej remisji. U tych chorych, u których redukcja białkomoczu obserwowana była w drugim tygodniu leczenia, występują częste nawroty i wymagają oni zazwyczaj przedłużenia leczenia do 4-6 miesięcy (164). Także inni autorzy potwierdzają, iż przedłużenie stosowania immunosupresji o minimum 3 miesiące w I rzucie IZN zapobiega nawrotom (11, 161). Najtrudniejszą zaś kategorię kliniczną spośród reagujących na leczenie stanowią pacjenci, u których remisja następuje po czasie dłuższym niż 14 dni. Grupę tę charakteryzują nawroty, jeszcze w trakcie leczenia pierwszego rzutu, dlatego wymagana jest tu z reguły dodatkowa alternatywna terapia lub zintensyfikowana i wydłużona terapia steroidowa (164). To właśnie w tej grupie najwięcej pacjentów rozwija FRNS lub SDNS, a tym samym narażonych jest na wysokie dawki i długotrwałe leczenie steroidowe wraz z jego efektami ubocznymi (17, 61). Jednak, pomimo, że średnio połowę pacjentów SSNS dotyczą częste nawroty i rozwój steroido-zależności, nadal ryzyko progresji do schyłkowej niewydolności nerek jest w tej grupie minimalne (11).

Największym wyzwaniem terapeutycznym i klinicznym, zarówno pod względem samego leczenia, jak i wczesnych czynników prognostycznych odpowiedzi na terapię steroidową, są pacjenci steroido-oporni. Stanowią oni około 20% wszystkich pacjentów z IZN oraz 75-80% pacjentów z rozpoznaniem FSGS (12, 161, 168). Jedynie 5% chorych z początkową wrażliwością na steroidy w wyniku nawrotów rozwija steroido-oporność. Co ciekawe, większość z nich ponownie zaczyna odpowiadać na leczenie, a głównie pacjenci z rozpoznaniem FSGS pozostają oporni na dalszą terapię (64). Pacjenci z grupy steroido-opornego zespołu nerczycowego stanowią największą grupę ryzyka głównie ze względu na rozwinięcie schyłkowej niewydolności nerek. W przeciwieństwie do pacjentów steroido-wrażliwych, którzy nawet po wielu nawrotach nadal mają pomyślne prognozy, około 30-60% pacjentów steroido-opornych rozwija schyłkową niewydolność nerek w ciągu 1-4 lat od rozpoczęcia leczenia (11). W efekcie, ostatecznie co najmniej 20% pacjentów z IZN wymaga hemodializ lub/i transplantacji nerki (81). Steroido-oporny idiopatyczny zespół nerczycowy

pozostaje jedną z najbardziej opornych na leczenie chorób kłębuszkowych u dzieci i związany jest z 30-50% ryzykiem nawrotu po transplantacji, co prowadzi do ostatecznej utraty przeszczepu od kilku godzin do kilku miesięcy po zabiegu (23).

1.2.5.2. Markery steroido-oporności

Pomimo wielu badań, patofizjologia IZN u dzieci pozostaje niewyjaśniona, co nie pozwala na opracowanie w pełni skutecznych terapii, umożliwiających trwałą remisję bez efektów ubocznych, którymi obarczone są wszystkie stosowane obecnie schematy postępowania (64). Największą grupę ryzyka stanowią pacjenci steroido-oporni, którzy pomimo braku odpowiedzi na leczenie steroidowe nadal narażeni są na jego skutki uboczne, związane ze szczególnie dużymi dawkami leku i długotrwałym jego stosowaniem (17, 59). Poszukiwanie wczesnych markerów odpowiedzi na leczenie ma więc na celu nie tylko uniknięcie niepotrzebnego leczenia, ale także powinno zapewnić diagnostykę rodzinom o podwyższonym ryzyku (171).

1.2.5.2.1. Czynniki immunologiczne w steroido-oporności

Brak jest obecnie klinicznych predyktorów odpowiedzi na steroidową terapię w IZN. Zarówno pacjenci steroido-wrażliwi jak i -oporni charakteryzują się takimi samymi objawami i nie ma wskaźników laboratoryjnych, które pozwoliłyby na ich jednoznaczne rozróżnienie (174). Ponieważ istnieje wiele przesłanek świadczących o tym, iż patofizjologia IZN powiązana jest prawdopodobnie z dysfunkcją układu immunologicznego, wielu badaczy skupia uwagę na poszczególnych jego elementach i ich odmiennym funkcjonowaniu w różnych grupach chorych. Próby rozróżnienia pacjentów steroido-wrażliwych i steroido-opornych obejmowały m.in. ustalenie profilu cytokinowego dla obydwu grup poprzez pomiar ekspresji poszczególnych czynników w moczu pacjentów (167, 168). Ujawniono różnice w ekspresji niektórych cytokin i hormonów wzrostu, charakterystycznych dla stanu zapalnego i postępującego procesu włóknienia w nerce, pomiędzy pacjentami o odmiennej reakcji na steroidy. Jednak różnice te bardziej odpowiadały rozpoznaniom histologicznym aniżeli związane były z mechanizmem steroido-oporności. Podobnie, próby rozróżnienia badanych grup pacjentów na podstawie badania czynników krążących we krwi nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Mimo iż udało się zidentyfikować pewne molekuly, większość z

nich korelowała na ogół z histologią i szybkością postępu do stadium schyłkowej niewydolności nerek, niż bezpośrednio z odpowiedzią na steroidy (12). Prowadzono też próby określenia różnic w odpowiedzi na leczenie na podstawie odmiennej echogeniczności nerki w obydwu grupach chorych (52). Są to jednak mało pewne i nie do końca uniwersalne wskaźniki. Eksperymentalnie wykazano natomiast, że infuzja pewnych cytokin do żyły nerkowej zwierząt modelowych powoduje zwiększoną sekrecję albumin do moczu (50, 51). Potwierdzają to badania *in vitro* (68), jednak inni badacze sugerują, iż ilość poszczególnych cytokin w moczu chorych słabo koreluje z ich ekspresją w tkance, w związku z czym nie jest adekwatnym odwzorowaniem procesu zapalnego toczącego się w nerce (167).

1.2.5.2.2. Czynniki genetyczne w steroido-oporności

Wraz z rozwojem coraz doskonalszych metod genotypowania, zidentyfikowano szereg genów, w większości związanych podocytami błoną szczelinową, w których mutacje i polimorfizmy nie tylko stanowią genetyczny czynnik patomechanizmu rozwoju samego zespołu nerczycowego, ale też działają jak specyficzne modyfikatory klinicznego fenotypu choroby (152, 163). Zidentyfikowano m.in. mutacje w genie podocyny i nefryny, występujące u 10-30% dzieci ze sporadycznym steroido-opornym ZN (63, 128) oraz w genie nefryny w steroido-opornym ZN typu fińskiego (171). Co ciekawe, podobnie jak w przypadku mutacji kausatywnych w genach podocytowych, także mutacje, które wydają się być związane z poszczególnymi typami ZN oraz jego steroido-opornym fenotypem, wykazują zróżnicowaną częstość w zależności od wieku oraz pochodzenia etnicznego. Hinkes i in. wykazali, iż kombinacja 2 recesywnych alleli w genie podocyny determinuje wiek wystąpienia ZN oraz jego leko-oporność, a tym samym prędkość osiągnięcia stanu schyłkowej niewydolności nerek (63). Mutacje te także częściej występują u dzieci w populacji europejskiej i amerykańskiej, zaś sporadycznie lub wcale w populacji azjatyckiej (171).

Niemniej, pomimo iż scharakteryzowano wiele nieprawidłowości genetycznych w składnikach błony szczelinowej podocytów, szacuje się, że większość pacjentów z IZN, których charakteryzuje brak odpowiedzi na leczenie, nie posiada opisanych mutacji lub występują one jedynie w nielicznych przypadkach (23). Zidentyfikowano również mutacje w poszczególnych składnikach układu dopełniacza, ale wydają się one być związane bardziej z profilem histologicznym lub wielkością białkomoczu, aniżeli z odpowiedzią na steroidy (19). W ostatnich latach znaleziono dodatkowo mutację w genie fosfolipazy C (*PLCE1*),

występującą u niewielu pacjentów z IZN, ale wyłącznie w grupie steroido-opornych (159). Szeroko opisano także mutacje typu ins/del w genie konwertazy angiotensyny (*ACE*), jednak w przypadku tego genu wyniki różnią się istotnie w zależności od geograficznego pochodzenia populacji badanej i są niekiedy sprzeczne z pozostałymi doniesieniami, co podważa jego rolę jako potencjalnego markera steroido-oporności w IZN (46, 132, 174).

1.2.5.2.3. Ścieżka sygnalizacyjna receptora GR

Złożoność zjawiska steroido-oporności, obserwowanego w przypadku wielu chorób o niejednoznacznej etiologii i zróżnicowanej odpowiedzi pacjentów na leczenie immunosupresyjne, skierowała uwagę badaczy na ścieżkę sygnalizacyjną samego receptora glikokortykosteroidowego (GR, ang. *Glucocorticoid Receptor*), odpowiedzialną za efekt terapeutyczny endogennych leków steroidowych. Badania te dostarczyły informacji rzucających nowe światło na zagadnienie problemu steroido-oporności.

Zidentyfikowano m.in. różnice w ilości receptorów GR w komórce i ich zdolności wiązania cząsteczki leku, nieprawidłowości w aktywacji kompleksu GR-ligand i jego translokacji do jądra komórkowego, a także dysfunkcje w działaniu GR w jądrze, objawiające się głównie upośledzonym oddziaływaniem receptora z odpowiednimi sekwencjami w DNA genów docelowych dla działania leku (15, 27, 60). Co ciekawe, niewystarczający poziom aktywnych GR nie wydaje się wynikać z obniżonej ekspresji receptora, a z podwyższonej ekspresji jego nieaktywnej formy, tzw. GR β , wykazującej działanie inhibicyjne, lub też z nieprawidłowości w oddziaływaniach sygnalizacyjnych molekuł na samej ścieżce (36). Zaburzenie tych oddziaływań i upośledzenie przekazywania sygnału przez GR potwierdza wielu autorów (13, 54, 56, 141), przy czym największe poparcie zyskują w ostatnich latach hipotezy odnośnie interakcji pomiędzy ścieżką GR a innymi ścieżkami sygnalizacyjnymi, aktywowanymi w komórce w trakcie procesu zapalnego (54, 126). Prowadzone są obecnie intensywne badania mające na celu poznanie mechanizmu powiązań pomiędzy elementami kaskady GR, a ścieżkami prozapalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B czy AP-1. Czynniki te są powszechnie znane jako aktywatory stanu zapalnego, wykazano również ich wysoką ekspresję w komórkach kanalików proksymalnych i cewek nerkowych aktywowanych białkomoczem (26), co dowodzi ich udziału w patomechanizmie uszkodzenia nerki. W procesie tym opisano zaangażowanie wielu rodzajów cytokin oraz chemokin i hormonów wzrostu, z których większość regulowana jest transkrypcyjnie za pomocą NF- κ B i

AP-1 (6, 26). Natomiast jednym z głównych mechanizmów sygnalizacyjnych dla większości cytokin w komórce jest ścieżka Jak/Stat, a zakłócenia jej negatywnych mechanizmów regulujących są przypuszczalnie jedną z przyczyn zaburzeń w sygnalizacji cytokin w IZN.

Istnieją również doniesienia o odmiennym wzorze metylacji GR oraz zaburzonej acetytacji histonów w rejonach promotorowych genów docelowych dla działania glikokortykoidów w badaniach modelowych, co wskazuje na możliwy udział czynników epigenetycznych w rozwoju steroido-oporności w idiopatycznym zespole nerczycowym (42).

1.2.6. Ścieżka sygnalizacyjna Jak/Stat

Ścieżka Jak/Stat stanowi jeden z najlepiej poznanych wewnątrzkomórkowych mechanizmów, zapewniający cytokinom różnego rodzaju właściwą sygnalizację oraz kontrolujący czas i intensywność ich działania (34, 113). Aktywacja ścieżki następuje w ściśle określonym czasie, zależnym od działającego czynnika, i polega na wzbudzeniu kolejnych jej elementów w sposób kaskadowy.

Po przyłączeniu cytokiny do zewnątrzkomórkowych elementów odpowiedniego receptora następuje aktywacja jego domen, leżących po cytoplazmatycznej stronie membrany komórkowej, a tym samym rekrutacja wewnątrzkomórkowych kinaz. Są nimi tyrozynowe kinazy Janus, występujące u ssaków w postaci 4 rodzajów: Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2 (85). Na aktywację kinaz składa się ich wzajemna autofosforylacja, a następnie przyłączanie do określonych miejsc w domenach receptora i fosforylacja odpowiednich reszt tyrozynowych jego białkowych łańcuchów. Powoduje to z kolei rekrutację znajdujących się w cytoplazmie białkowych czynników transkrypcyjnych STAT (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*), przyłączających się do ściśle określonych regionów domen receptora, stanowiących specyficzne punkty wiązania dla elementów STAT. Znanych jest 7 białek STAT, określanych jako: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6. Ich rekrutacja do receptora jest etapem niezbędnym, warunkującym ich fosforylację za pomocą związanych uprzednio z receptorem kinaz Jak. W formie ufosforylowanej, czyli aktywnej, czynniki STAT łączą się w cytoplazmie w pary z innymi i w formie homo- lub heterodimerów ulegają translokacji do jądra komórkowego. Tam działają jak typowe czynniki transkrypcyjne i wywołują efekt zależny od genów docelowych ich działania, do sekwencji promotorowych których się przyłączają (34, 100).

1.2.6.1. Negatywna regulacja ścieżki Jak/Stat

Sygnalizacja Jak/Stat pośredniczy działaniu większości cytokin oraz czynników wzrostu w komórce. Ponieważ cytokiny biorą udział w wielu podstawowych procesach biologicznych, obejmujących m.in. rozwój zarodkowy, różnicowanie i proliferację komórek, hematopoezę czy mechanizmy odporności, niezwykle istotny jest również system negatywnej regulacji ścieżki, ograniczający zarówno czas, jak i intensywność działania cytokin, co warunkuje ochronę komórek i tkanek przed nadmierną ekspozycją na te czynniki (61, 80, 149).

Znane są obecnie 3 klasy negatywnych regulatorów ścieżki Jak/Stat: białka PIAS (ang. *Protein Inhibitor of Activated STATs*), białka SHP (ang. *Scr-homology2-containing Protein Tyrosine Phosphatase*) oraz białka SOCS (ang. *Suppressor of Cytokine Signaling*) (150). Najlepiej poznaną i opisaną, a także o potencjalnie największym znaczeniu w regulacji sygnalizacji cytokin stanowi rodzina SOCS. Składa się ona z 8 czynników: CIS (ang. *Cytokine-Inducible SH2 Domain-Containing Protein*) oraz SOCS1-7. Białka SOCS stanowią jedną z grup genów docelowych dla działania czynników STAT i ulegają ekspresji w odpowiedzi na aktywację samej ścieżki (34). W zależności od poszczególnych białek SOCS działają one na różnych etapach kaskady, hamując ją na zasadzie klasycznego mechanizmu sprzężenia zwrotnego (3). Ponieważ sygnalizacja prawie wszystkich cytokin, których udział w progresji chorób nerek jest znany i udokumentowany, odbywa się na drodze aktywacji ścieżki Jak/Stat, to właśnie zakłócenia w mechanizmach jej inhibicji są przypuszczalnie odpowiedzialne za zwiększoną aktywację mediatorów zapalnych i ich udział w patofizjologii ZN oraz różnorodność jego klinicznych postaci (6, 80, 163).

1.2.6.2. Białka SOCS

1.2.6.2.1. Budowa białek SOCS

Czynniki SOCS, znane również pod nazwą JAB (ang. *JAK-Binding Protein*) lub SSI-1 (ang. *STAT-Induced STAT Inhibitor*), stanowią rodzinę białek o konserwatywnej budowie wśród wszystkich ssaków. Białka CIS i SOCS, pomimo, iż posiadają w większości jednakowe domeny, są do siebie podobne bardziej w parach, aniżeli do pozostałych członków rodziny. Białko CIS wykazuje zatem największe podobieństwo w budowie i działaniu do białka SOCS2, SOCS1 do SOCS3, SOCS4 do SOCS5 i SOCS6 do SOCS7 (80, 149). Wszystkie zawierają centralną domenę SH2 (ang. *Src-homology 2 domain*) o długości ok. 95

aminokwasów, oraz konserwatywną domenę SOCS-box o długości 40 aminokwasów, znajdującą się na końcu C łańcucha białkowego (49). Domena SH2 warunkuje właściwości inhibicyjne czynnikiem SOCS, zaś fragment SOCS-box odpowiedzialny jest za ich kierowanie na szlak degradacji proteolitycznej i nie jest niezbędny do interakcji SOCS z pozostałymi elementami ścieżki. Ponadto, białka SOCS1 i SOCS3 zawierają charakterystyczną domenę na końcu N łańcucha białkowego – tzw. region KIR (ang. *Kinase Inhibitory Region*), który działa jak pseudosubstrat dla kinaz Jak i zapewnia dodatkowe zdolności hamowania ich aktywności (3, 49).

W komórce wykrywalny jest podstawowy, choć minimalny, poziom SOCS, zależny m.in. od płci, wieku czy tkanki, który wzrasta gwałtownie w odpowiedzi na sygnalizację cytokin. Każdy z czynników SOCS może hamować sygnalizację większej ilości cytokin niż te, które pierwotnie doprowadziły do aktywacji ścieżki. Co więcej, różne białka SOCS mogą być specyficzne dla różnych kinaz lub ich rodzin, dlatego też przypuszcza się, iż mogą one działać bardziej jak uniwersalne regulatory, łączące wiele ścieżek ze sobą (61, 80, 149).

1.2.6.2.2. Rola wybranych SOCS w chorobach nerek

Na drodze aktywacji ścieżki Jak/Stat przez szereg cytokin i czynników układu immunologicznego białka SOCS zaangażowane są w wiele schorzeń, przebiegających z nieprawidłową aktywnością immunologiczną, w tym chorób nerek (154).

Rola czynników SOCS jako regulatorów równowagi cytokinowej jest szczególnie istotna w kontekście modulacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku fenotypu limfocytów Th₁ lub Th₂. W szczególności zwraca się uwagę na białka: CIS, SOCS1, SOCS3 i SOCS5, które odgrywają istotną rolę w regulacji działania cytokin, warunkujących aktywację poszczególnych subpopulacji limfocytów (33). Badania *in vivo* i *in vitro* dowiodły szczególnej roli dwóch białek SOCS w dojrzewaniu i proliferacji limfocytów T, mianowicie SOCS3 i SOCS5. Ponieważ proliferujące w kierunku Th₁ limfocyty wykazują istotnie wysoki poziom ekspresji SOCS5, zaś limfocyty Th₂ charakteryzują się ok. 30-krotnie wyższym poziomem ekspresji SOCS3, przy minimalnym lub niewykrywalnym poziomie SOCS5, czynniki te określone zostały specyficznymi markerami biologicznymi dla poszczególnych linii limfocytów T, odpowiednio SOCS3 dla frakcji Th₂ i SOCS5 dla linii Th₁ (40, 135, 154).

Wiele jest prac dokumentujących udział czynnika immunologicznego w patofizjologii ZN, głównie na drodze uszkodzenia nerek w procesie nacieku makrofagów i limfocytów, a także zaburzonej homeostazy poszczególnych subpopulacji komórek krążących. Ponadto, istnieją doniesienia o przesunięciu immunologicznym w kierunku Th₁ u pacjentów ze steroido-opornym fenotypem ZN, co sugeruje zaburzone działanie białek SOCS, jako głównych regulatorów tego procesu (27, 40, 145). Za udziałem SOCS w patofizjologii IZN silnie przemawiają też badania dokumentujące nadmierną aktywację ścieżki Jak/Stat, zarówno u pacjentów z ZN (25, 102, 106), jak i w zwierzęcych modelach choroby (86, 87), oraz fakt, iż inhibicja ścieżki *in vivo* wyraźnie spowalniała włóknienie nerki i uszkodzenie kłębuszków nerkowych, a także skutkowała obniżeniem białkomoczu (86).

Białku SOCS1 również przypisuje się rolę regulatora w utrzymaniu właściwej równowagi pomiędzy populacją limfocytów Th₁ i Th₂ (39). Choć jego rola w tym procesie nie jest do końca jasna, jest ono prawdopodobnie łącznikiem pomiędzy czynnikami SOCS3 i SOCS5, działającym głównie poprzez charakterystyczne dla nich cytokiny (154). Co więcej, SOCS1 i SOCS3 opisane zostały jako potencjalne czynniki ryzyka i markery chorób układu krążenia u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (121). Opisano też zaburzoną ekspresję czynników SOCS1, SOCS3 i SOCS5 m.in. w insulino-oporności, cukrzycy typu 1 i 2, otyłości oraz zespole metabolicznym, przypuszcza się więc, że białka te mogą odgrywać rolę w schorzeniach nerek, wywołanych nieprawidłową gospodarką glukozy w organizmie (65, 82, 95, 104).

Intensywne badania ścieżki Jak/Stat w ostatnich latach dowiodły ponadto jej wielokierunkowych interakcji z innymi ścieżkami sygnalizacyjnymi, m.in. ze ścieżką GR. Wykazano silną interakcję pomiędzy receptorem GR a czynnikami STAT, i choć efekt tych oddziaływań nie jest do końca jasny, przypuszcza się, że mogą one odgrywać rolę w indukcji lub/i podtrzymaniu steroido-oporności u pacjentów z ZN (169). Co ciekawe, opisano ostatnio także istotnie wyższy poziom ekspresji czynników SOCS3 i SOCS5, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, u pacjentów steroido-opornych w porównaniu ze steroido-wrażliwymi, przy braku różnic w ekspresji pozostałych elementów ścieżki Jak/Stat (112). Przypuszcza się zatem, iż czynniki te mogą stanowić markery steroido-opornego fenotypu w ZN, związanego najprawdopodobniej z zakłóceniami homeostazy poszczególnych subpopulacji komórek krążących.

2. Cel

Steroido-oporny idiopatyczny zespół nerczycowy stanowi obecnie najtrudniejsze w leczeniu schorzenie kłębuszkowe u dzieci. Brak użytecznych markerów biologicznych, które pozwoliłyby przewidzieć efekt terapii steroidowej, stanowiącej podstawowe leczenie, jest jednym z największych wyzwań diagnostyki klinicznej IZN. Nawet co piąty pacjent wciąż wykazuje steroido-oporność, co w efekcie prowadzi do osiągnięcia schyłkowej niewydolności nerek. Intensywne badania ostatnich lat niezbiecie dowodzą udziału układu immunologicznego w patofizjologii IZN, a w szczególności dysfunkcji mechanizmów regulatorowych, kontrolujących sygnalizację cytokin i progresję stanu zapalnego. Na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza białka SOCS, będące inhibitorami ścieżki sygnalizacyjnej Jak/Stat, pełniące rolę jednego z głównych przekaźników sygnałów immunologicznych w komórce. Szereg doniesień o udziale wybranych białek SOCS w wielu schorzeniach kłębuszkowych, w tym w zespole nerczycowym, a także ich przypuszczalnej roli w patomechanizmie steroido-oporności, skłoniły do zbadania genetycznej podstawy ich zaburzeń w tej grupie chorych.

Celem niniejszej pracy były:

- 2.1. analiza mutacji w sekwencjach trzech genów supresorowych ścieżki Jak/Stat – *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*, w grupie dzieci ze steroido-opornym i steroido-wrażliwym zespołem nerczycowym oraz w grupie kontrolnej,
- 2.2 analiza znanych i opisanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* w ww. grupach,
- 2.3. określenie struktury badanych genów oraz różnic w układzie genotypów pomiędzy trzema badanymi grupami,
- 2.4 określenie wpływu ewentualnych zmian genetycznych w badanych genach na steroido-oporny fenotyp zespołu nerczycowego u dzieci.

3. Materiał i Metody

3.1. Pacjenci

Na przeprowadzenie badań do niniejszej pracy uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr119/11, Załącznik 1). Badania przeprowadzone zostały w sumie na 101 pacjentach, z czego 71 stanowiła grupa pacjentów z zespołem nerczycowym, a 30 – grupę pacjentów bez objawów ZN, stanowiących grupę kontrolną. Przed pobraniem krwi obwodowej i przystąpieniem do badań opiekunowie prawni pacjentów z obydwu grup zostali poinformowani zarówno o celu badań, jak i o możliwych korzyściach płynących z nich dla pacjentów z zespołem nerczycowym. Informacja taka została przekazana opiekunom prawnym każdego pacjenta, w formie pisemnej, umieszczonej na oświadczeniu świadomej zgody na udział w badaniu genetycznym. Kopia takiego oświadczenia została załączona do niniejszej pracy (Załącznik 2).

3.1.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 71 pacjentów z zespołem nerczycowym, pochodzących z populacji polskiej, z województwa wielkopolskiego, hospitalizowanych w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupa obejmowała 58% chłopców (n=41) i 42% dziewcząt (n=30), u których rozpoznanie ZN nastąpiło w wieku od 3 miesięcy do 16 lat (średnia 4,1 lat). Wszyscy pacjenci z rozpoznaniem ZN poddani zostali terapii steroidowej w dawce 2mg/kg mc, do dawki maksymalnej 2x30mg/kg mc. Rozpoznanie kliniczne pozwoliło na wyodrębnienie 2 grupa badanych. Pacjenci, którzy odpowiedzieli na leczenie w ciągu 6-8 tygodni, zakwalifikowani zostali do grupy steroido-wrażliwych, przy czym większość pacjentów z tej grupy uzyskiwała remisję białkomoczu już po 2-4 tygodniach. Natomiast pacjenci, którzy w ciągu 8 tygodni nie uzyskali remisji, zakwalifikowani zostali do grupy steroido-opornej.

Pierwszą grupę stanowiło 41 pacjentów ze steroido-opornym fenotypem zespołu nerczycowego (SOZN). Grupa ta obejmowała 61% chłopców (n=25) i 39% dziewcząt (n=16), u których rozpoznanie ZN nastąpiło w wieku od 3 miesięcy do 15 lat (średnia 4,1 lat). Biopsja

wykonana została u 31 pacjentów, u 9 pacjentów biopsji nie wykonano, zaś u jednego pacjenta nie udało się ocenić biopci (oznaczenie „nieudana biopsja”). U pacjentów, u których wykonano biopsję, wykazano obecność zmian minimalnych (MCD), ogniskowego segmentalnego szkliwienia kłębuszków (FSGS), błoniasto-rozplemowego kłębuszkowego zapalenia nerek (MPGN), zmian w postaci mezangialnej proliferacji (MP), stwardnienia kłębuszków (GS), czy rozproszonego rozplemu (DMP) oraz obecność cech niedojrzałości w biopocie nerki (N). Zastosowano zróżnicowane leczenie, które obejmowało: glikokortykosteroidy (GK), po których włączono do terapii inne leki, takie jak: leki alkilujące - cyklofosfamid (CF) i chlorambucil, mykofenolan mofetylu (MMF), cyklosporynę A (CsA), rituksimab (Rtx), leukeran, a także zabiegi plazmaferezy (Pf). W efekcie zastosowanego leczenia u 22 pacjentów (53,7%) uzyskano remisję, u 4 pacjentów (9,7%) wystąpił kolejny rzut zespołu nerczycowego (oznaczenie „ZN”), 14 pacjentów (34,2%) cechowała obecność białkomoczu o charakterze nie nerczycowym, zaś w przypadku jednego pacjenta (2,4%) nastąpił zgon. Ponadto, u 24 pacjentów (58,5%) występowały dodatkowe schorzenia, m.in. cukrzyca insulinozależna (typu I), alergie, astma oskrzelowa, niskorosłość, otyłość czy osteoporoza. Informacje o stanie zdrowia pacjentów z grupy SOZN przedstawia Tabela 1.

Drugą grupę badawczą stanowiło 30 pacjentów ze steroido-wrażliwym zespołem nerczycowym (SWZN), która liczyła 53% chłopców (n=16) i 47% dziewcząt (n=14), u których ZN został zdiagnozowany w wieku od 18 miesięcy do 16 lat (średnia 4,07). Podobnie jak w grupie SOZN, leczenie obejmowało glikokortykosteroidy (GK) oraz leki dodatkowe, takie jak: leki alkilujące - cyklofosfamid (CF), chlorambucil, cyklosporynę A CsA, mykofenolan mofetylu (MMF), rituksimab (Rtx) i zabiegi plazmaferezy (Pf). Z uwagi na dobrą odpowiedź na zastosowane leczenie biopsję wykonano jedynie u 10 pacjentów (33,3%), i wykazała ona obecność zmian minimalnych (MCD), a u pojedynczych pacjentów także nefropatię toczniową, zmiany w typie mezangialnej proliferacji (MP), ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków (FSGS) oraz cechy niedojrzałości w biopocie nerki (N). W wyniku zastosowanego leczenia u 25 pacjentów (83,3%) uzyskano remisję, u 2 (6,7%) wystąpił kolejny rzut zespołu nerczycowego, zaś w przypadku jednego pacjenta (3,3%) obecny był białkomocz pochodzenia nie nerczycowego. Ponadto, 7 pacjentów (23,3%) rozwinęło steroido-zależność (SZZN), z czego w wyniku zastosowanego dodatkowego leczenia u 6 nastąpiła remisja, zaś u 1 pacjenta obecny był białkomocz pochodzenia nie nerczycowego. U 13 pacjentów (43,3%) występowały schorzenia współistniejące z zespołem nerczycowym,

m.in. osteopenia, niskorosłość czy osteoporoza. Stan kliniczny pacjentów z grupy SWZN przedstawia Tabela 2.

Ponadto, wśród wszystkich pacjentów przeprowadzony został wywiad medyczny w postaci ankiety, stworzonej na potrzeby badania na podstawie kwestionariusza prof. dr Friedhelma Hildebrandta. Kopia ankiety została załączona do niniejszej pracy (Załącznik 3). Ankieta pozwoliła na uzyskanie informacji odnośnie stanu klinicznego pacjenta w momencie przyjęcia do szpitala, wieku pacjenta, w którym nastąpił pierwszy rzut zespołu nerczycowego, wyniku biopsji – o ile została ona przeprowadzona, a także podjętego leczenia i odpowiedzi na nie. W ankiecie znalazły się również pytania o schorzenia dodatkowe, wybrane jako powiązane z zespołem nerczycowym. Dlatego też pytania obejmowały pacjentów oraz członków rodziny, w celu jak najpełniejszego ustalenia historii choroby i mogących towarzyszyć jej dziedzicznych schorzeń genetycznych.

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie	Wiek rozpozn.	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące
1.	K77	K	SOZN	21	N, MP	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	91	cukrzyca typu I, ch. Hashimoto
2.	K94	M	SOZN	31	MCD, N	GK, CF, CsA, MMF	remisja	111	osteoporoza, stan po złamaniu kręgów L3 i L4
3.	K100	M	SOZN	21	nie wykonano	GK, CF, CsA	białkomocz	151	brak
4.	K103	K	SOZN	3 m	FSGS	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	221	naczyniak wątroby
5.	K115	K	SOZN	21	MP	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	211	brodawczak
6.	K119	K	SOZN	11	FSGS	GK, CsA	zgon	nie dotyczy	brak
7.	K123	M	SOZN	21	FSGS	GK, CF, CsA	remisja	211	brak
8.	K128	M	SOZN	21	nie wykonano	GK, CF	białkomocz	61	astma oskrzelowa, alergia
9.	K132	M	SOZN	3 m	nie wykonano	GK, CsA	remisja	31	schyłkowa niewydolność nerek, stan po Tx nerki
10.	K72	M	SOZN	5 m	MP, GS	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	121	niskorosłość
11.	K162	M	SOZN	21	MCD, N	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	51	brak
12.	K98	M	SOZN	71	MP	GK, CF, CsA, MMF	białkomocz	201	WZW C
13.	K42	M	SOZN	21	FSGS	GK, CsA, MMF, Rtx	remisja	161	otyłość, niskorosłość
14.	K75	M	SOZN	61	MP	GK, CsA, MMF, Rtx	remisja	141	padaczka
15.	K82	K	SOZN	91	MCD	GK, CsA, MMF, Rtx	remisja	121	brak
16.	K102	M	SOZN	151	MP	GK, CsA, MMF, Rtx	ZN	201	brak
17.	K108	M	SOZN	131	MP	GK, CsA, MMF	białkomocz	161	łuszczyca
18.	K109	K	SOZN	31	DMP	GK, CsA, MMF, Rtx	remisja	121	łojotokowe zapalenie skóry
19.	K126	M	SOZN	111	MP	GK, CsA, MMF, Rtx	remisja	131	cukrzyca typu I, niedoczynność tarczycy typu zapalenia Hashimoto.
20.	K134	M	SOZN	51	MP	GK, CsA, CF, MMF	remisja	181	schyłkowa niewydolność nerek, stan po Tx nerki
21.	K84	K	SOZN	151	MPGM	GK, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	201	brak
22.	K139	M	SOZN	21	nie wykonano	GK, CF	białkomocz	41	brak
23.	K142	K	SOZN	41	DMP	GK, CF, CsA, Chlorambucil, Rtx	remisja	111	nawracające infekcje w drogach oddechowych, otyłość
24.	K160	M	SOZN	21	MP	GK, CF, CsA	remisja	71	brak

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie	Wiek rozpozn.	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące
25.	K169	M	SOZN	21	MP	GK, Leukeran, CsA	remisja	121	astma oskrzelowa, ASD II z przeciekiem L-P i przerostem prawego przedsionka
26.	K170	K	SOZN	21	MP	GK, CF, CsA, Rtx	białkomocz	161	brak
27.	K175	M	SOZN	21	nieudana biopsja	GK	remisja	191	zespół krótkiego jelita
28.	K177	K	SOZN	21	FSGS	GK, CsA	białkomocz	111	brak
29.	K183	K	SOZN	31	nie wykonano	GK, CsA, CF, Pf	ZN	51	brak
30.	K207	M	SOZN	21	nie wykonano	GK, CsA, Pf	remisja	31	stenoza aortalna, stan po udarze niedokrwiennym mózgu
31.	K51	M	SOZN	21	MP z przybytkiem macierzy	GK, CF, Chlorambucil, CsA, Rtx	remisja	151	PChN
32.	K217	K	SOZN	121	MCD z przybytkiem macierzy	GK, CsA	remisja	151	brak
33.	K202	M	SOZN	51	MP	GK, CsA, Rtx	remisja	161	nadciśnienie tętn., bradykardia, osteoporoza, II etap PChN
34.	K214	K	SOZN	21	nie wykonano	GK, CsA	ZN	41	ASD II (stan po op.), stan po udarze niedokrwiennym mózgu, trombofilia
35.	K258	K	SOZN	31	FSGS	GK, CsA, Pf	ZN	41	brak
36.	K146	M	SOZN	31	DMP, N	GK, CF, CsA	remisja	91	ch. Leśniowskiego-Crohna, nadwaga, cytomegalia
37.	K193	M	SOZN	21	FSGS	GK, CF, CsA	remisja	161	PChN – stan po Tx nerki, ch. Leśniowskiego-Crohna
38.	K199	K	SOZN	61	FSGS	GK, CF, CsA, Chlorambucil, Pf	białkomocz	191	padaczka, upośledzenie umysłowe
39.	K262	M	SOZN	41	nie wykonano	GK, CsA	białkomocz	111	wodogłowie wrodzone, zesp. wad wrodzonych, hipoplazja płuca lewego, padaczka
40.	K259	K	SOZN	31	MCD	GK, CF, CsA, Rtx	białkomocz	51	brak
41.	K265	M	SOZN	21	nie wykonano	GK, CF	remisja	21	brak

Tab.1. Przebieg kliniczny choroby u pacjentów ze steroido-opornym zespołem nerczycowym (SOZN) (skrót: K - kobieta, M - mężczyzna, GK - Glikokortykosteroidy, CF - Cyklofosfamid, CsA - Cyklosporyna A, Pf - Plazmafereza, Rtx - Rituksimab, MMF - Mykofenolan mofetylu, Tx - transplantacja, WZW C - Wirusowe zapalenie wątroby typu C, ASD - ubytek przegrody międzyprzedsionkowej, PChN - Przewlekła choroba nerek)

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie	Wiek rozpozn.	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące
1.	K43	M	SWZN (SZZN)	2 l	MCD, rozplem mezangium	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	7 l	brak
2.	K127	K	SWZN (SZZN)	3 l	MCD, N	GK, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	14 l	niskorosłość, osteoporoza, próchnica
3.	K130	M	SWZN	16 l	nefropatia toczniowa	GK, CF, Pf	remisja	19 l	toczeń układowy
4.	K131	K	SWZN	2 l	nie wykonano	GK, CF	remisja	6 l	nawracające ZUM
5.	K133	M	SWZN	5 l	nie wykonano	GK	remisja	7 l	brak
6.	K136	M	SWZN	2 l	nie wykonano	GK, CF, CsA	remisja	6 l	brak
7.	K168	M	SWZN	3 l	MCD/MP	GK	remisja	19 l	osteoporoza
8.	K161	M	SWZN (SZZN)	2 l	nie wykonano	GK, CF, CsA	remisja	5 l	brak
9.	K140	K	SWZN, rodzinny ZN	6 l	MCD	GK, CF, CsA	remisja	8 l	matka dziecka -SNN, st. po Tx nerki
10.	K191	K	SWZN (SZZN)	7 l	DMP	GK, CF, CsA	remisja	11 l	brak
11.	K198	M	SWZN (SZZN)	20 m	nie wykonano	GK, CF, CsA, Rtx	remisja	7 l	brak
12.	K254	M	SWZN	2 l	MP	GK, CF	ZN	9 l	krótkowzroczność, stan po ONN w przebiegu ZN
13.	K256	K	SWZN	5 l	nie wykonano	GK	remisja	6 l	nadreaktywność oskrzeli o typie atopii
14.	K101	K	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	12 l	brak
15.	K111	K	SWZN	3 l	nie wykonano	GK, CsA	remisja	5 l	brak
16.	K154	K	SWZN	2 l	MCD	GK, CF	remisja	10 l	cytomegalia
17.	K156	M	SWZN	6 l	nie wykonano	GK	remisja	9 l	brak
18.	K179	K	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	5 l	brak
19.	K180	M	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	12 l	stan po op. przepukliny pachwinowej prawostronnej
20.	K182	M	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	5 l	brak

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie	Wiek rozpozn.	Biopsja	Leczenie immunosupresyjne	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące
21.	K186	M	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	ZN	5 l	osteopenia
22.	K189	K	SWZN	5 l	nie wykonano	GK	remisja	12 l	brak
23.	K263	K	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	4 l	brak
24.	K266	M	SWZN	3 l	nie wykonano	GK	remisja	5 l	brak
25.	K267	M	SWZN	18 m	nie wykonano	GK, CsA	remisja	11 l	ch. Recklinghausena, osteopenia, niskorosłość, nadciśnienie tętnicze
26.	K269	K	SWZN	2 l	nie wykonano	GK	remisja	6 l	brak
27.	K272	M	SWZN (SZZN)	4 l	MCD	GK, CF, CsA, Rtx	remisja	18 l	cukrzyca typu I
28.	K273	K	SWZN (SZZN)	13 l	nie wykonano	GK	białkomocz	14 l	brak
29.	K279	M	SWZN	6 l	nie wykonano	GK	remisja	6 l	brak
30.	K280	K	SWZN	2 l	FSGS	GK, CF	remisja	15 l	niskorosłość, osteoporoza, próchnica

Tab.2. Stan kliniczny pacjentów ze steroido-wrażliwym zespołem nerczycowym (SWZN) (skrót: SZZN - steroido-zależny ZN, GK - Glikokortykosteroidy, CF - Cyklofosfamid, CsA - Cyklosporyna A, Pf - Plazmafereza, Rtx - Rituksimab, MMF - Mykofenolan mofetylu, ZUM - zakażenia układu moczowego, SNN - schyłkowa niewydolność nerek, ONN - ostra niewydolność nerek)

Zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych, dane pacjentów zostały zakodowane w momencie otrzymania próbki z krwią, na drodze nadania im odpowiedniego numeru. Kodem tym oznaczano następnie próbki na wszystkich kolejnych etapach analiz.

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowili pacjenci populacji polskiej, z województwa wielkopolskiego, hospitalizowani na Oddziale Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę stanowiło 63% chłopców (n=19) i 37% dziewcząt (n=11), w wieku od 4 do 18 lat (średnia 9,7). Pacjenci zostali przyjęci na oddział w celu przeprowadzenia zabiegu usunięcia migdałków. Wśród pacjentów grupy kontrolnej przeprowadzona została ankieta, stanowiąca wersję zmodyfikowaną ankiety dla pacjentów grupy badanej. Pozwoliła ona na uzyskanie informacji odnośnie schorzeń nefrologicznych oraz chorób dziedzicznych powiązanych z zespołem nerczycowym wśród pacjentów oraz członków ich rodzin. Opiekunowie prawni pacjentów grupy kontrolnej również poinformowani zostali o badaniu i jego celu oraz podpisali formularz świadomej zgody na udział w badaniu. Kopia ankiety dla grupy kontrolnej załączona została do niniejszej pracy (Załącznik 4), natomiast świadoma zgodna na udział w badaniu stanowiła pisemną informację o treści analogicznej do tej przedstawionej pacjentom grupy badanej (Załącznik 2).

3.1.3. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiła pełna krew obwodowa, pobrana w trakcie rutynowych badań od pacjentów grup badanych i grupy kontrolnej, pobrana odpowiednio na Oddziale Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej i Oddziale Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Krew pobrana została do próbek typu monoweta ze złożem EDTA, co miało istotne znaczenie, ze względu na to, iż alternatywne złoża stosowane w tego typu próbkach, np. heparyna, są inhibitorami reakcji PCR i uniemożliwiłyby lub ograniczyły w znacznym stopniu wykorzystanie wyizolowanego DNA do prowadzonych analiz.

3.2. Metody

Wszystkie etapy analiz laboratoryjnych przeprowadzone zostały w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

3.2.1. Charakterystyka genów *SOCS1*, *SOCS3*, *SOCS5*

Gen *SOCS1* leży na ramieniu krótkim chromosomu 16-ego (16p13.13). Składa się z dwóch eksonów, z których ekson1 stanowi element niekodujący (UTR, ang. *Untranslated Region*), zaś kodujący ekson2 ma długość 630pz i podlega jest przepisywany na łańcuch aminokwasów w białku.

Gen *SOCS3* położony jest na ramieniu długim chromosomu 17-ego (17q25.3). Składa się z dwóch eksonów, z których ekson1 stanowi element niekodujący (UTR), natomiast kodujący ekson2, mający długość 678pz, podlega translacji.

Gen *SOCS5* leży na ramieniu krótkim chromosomu 2-ego (2p21). Złożony jest z dwóch eksonów, przy czym ekson1 stanowi odcinek niekodujący (UTR), zaś kodujący ekson2 o długości 1611pz jest przepisywany na białko.

3.2.2. Izolacja całkowitego genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej

W celu izolacji całkowitego genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej pacjentów z obydwu grup badanych oraz grupy kontrolnej wykorzystano dostępny komercyjnie system kolumnowy z krzemionkowym złożem QIAamp DNA Mini Blood Kit firmy Qiagen. Wszystkie etapy izolacji przeprowadzone zostały w temperaturze pokojowej.

Probówki z krwią, do momentu izolacji, przechowywane były w temperaturze - 80°C. Po wyjęciu z zamrażarki, probówki rozmrażane były w temperaturze pokojowej. Na dno probówki typu Eppendorf, o pojemności 1,5 ml, dodawano 20 µl Proteinazy K. Następnie dodawano 200 µl krwi oraz 200 µl buforu lizującego AL. Probówkę umieszczano na mieszadle typu vortex na 15 sekund, w celu wymieszania wszystkich składników. Następnie, w celu lizy erytrocytów i białek związanych z DNA, probówkę umieszczano na bloku grzejnym i inkubowano w temperaturze 56°C przez 10 minut. Zmiana koloru mieszaniny z czerwonego na brunatno-zielony świadczyła o prawidłowo przeprowadzonej lizie. Probówkę

wirowano przez kilka sekund w wirówce laboratoryjnej w celu usunięcia mieszaniny z wieczka. Następnie dodawano 200 µl czystego etanolu o stężeniu 96-100% i mieszano probówkę na mieszadle typu vortex przez 15 sekund. Ponownie wirowano probówkę przez kilka sekund w celu usunięcia mieszaniny z wieczka i przenoszona jej zawartość pipetą na kolumnę do izolacji DNA, umieszczoną w próbówce odbierającej. Kolumnę umieszczano w wirówce i wirowano przy prędkości 8000 rpm przez 1 minutę. W trakcie wirowania DNA zatrzymane zostało na złożu kolumny przy odpowiednim pH, zaś rozpuszczalnik przechodził przez złożę do próbówki odbierającej. Po zakończeniu wirowania, kolumnę umieszczano w nowej próbówce odbierającej, zaś zużytą wyrzucano do pojemnika na odpady biologiczne w celu ich utylizacji. Na kolumnę nanoszono 500 µl buforu płuczającego AW1 w celu usunięcia zanieczyszczeń i wirowano przy prędkości 8000 rpm przez 1 minutę. Kolumnę umieszczano w nowej próbówce odbierającej, a zużytą wyrzucano do pojemnika na odpady. Na kolumnę nanoszono 500 µl buforu płuczającego AW2 i ponownie wirowano przy prędkości 14000 rpm przez 3 minuty. Następnie kolumnę umieszczano w nowej próbówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i dodawano na złożę 200 µl buforu elucyjnego AE. Kolumnę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut w celu zmiany pH złoża krzemionkowego i umożliwienia wymycia związanego z nim DNA. Po upływie 5 minut kolumnę wirowano przy prędkości 8000 rpm przez 1 minutę. Kolumnę wyrzucano do pojemnika na odpady, zaś otrzymana w ten sposób zawartość próbówki Eppendorf stanowiła materiał wyjściowy do dalszych analiz i nie wymagała dodatkowego oczyszczania. Izolaty DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Skład buforów użytych do izolacji zastrzeżony jest przez producenta patentem. Wykaz odczynników użytych do izolacji DNA przedstawia Tabela 3.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Zestaw do izolacji DNA genomowego (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	Qiagen	51106
Proteinaza K (Protease Solvent)		1045099
Bufor lizujący (Lysis buffer)		1014604
Bufor płuczający AW1 (Wash buffer AW1)		1014795
Bufor płuczający AW2 (Wash buffer AW2)		1014577
Bufor elucyjny AE (Elution buffer AE)		1014591
Alkohol etylowy, bezwodny, 99,8%	POCH	396480111

Tab.3. Odczynniki wykorzystane do izolacji całkowitego genomowego DNA

3.2.3. Pomiar stężenia i czystości DNA

Po wyizolowaniu całkowite genomowe DNA poddane zostało analizie ilościowej i jakościowej na drodze pomiaru spektrofotometrycznego. Wykorzystano w tym celu urządzenie Nano-Drop ND-1000 firmy NanoDrop ThermoScientific. Ilość mierzonego DNA wyrażona została w jednostce ng/ μ l, zaś jego czystość wyrażała się w stosunku wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm do długości fali 280 nm. Stosunek ten powinien mieścić się w granicach 1,8-2,0. Wartości wykraczające poza wskazane ramy świadczą o zanieczyszczeniu izolatu białkami lub solami.

W celu pomiaru stężenia i czystości DNA, po uruchomieniu urządzenia i oprogramowania komputerowego, na punkt pomiarowy nanoszono 1 μ l wody wolnej od nukleaz firmy Ambion w celu kalibracji urządzenia. Następnie, po przetarciu miejsca pomiarowego ligniną, w celu wykonania ślepej, zerowej próby i ustalenia wielkości tła pomiaru, na punkt pomiarowy nanoszono 1 μ l rozpuszczalnika, w którym zawieszono izolat DNA. W tym wypadku był to bufor elucyjny AE. Po pomiarze ślepej próby i przetarciu punktu pomiarowego ligniną, nanoszono kolejno po 1 μ l izolatu DNA po czym odczytywano wielkość jego stężenia oraz stosunek absorbancji przy długości fali 260 nm / 280 nm, wyrażającego czystość mierzonej próbki.

3.2.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

W celu amplifikacji odcinków kodujących zastosowano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (reakcję PCR). Odcinki kodujące (eksony) wybranych do analizy genów – *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*, określone zostały na podstawie informacji dostępnej w bazie danych NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: woda wolna od nukleaz firmy Ambion, 10x bufor reakcyjny z dodatkiem $MgCl_2$, 5x bufor GC, 0,24 mM mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP), 0,6 jednostki (5U/ μ l) polimerazy FastStart Taq oraz startery specyficzne w postaci 0,5 μ M mieszaniny starterów w obydwu orientacjach (Forward i Reverse) – po 0,5 μ M każdego ze starterów na całą objętość mieszaniny. Wykaz odczynników użytych do przeprowadzenia reakcji PCR zawiera Tabela 4, zaś ilości poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej w przeliczeniu na pojedynczą próbkę przedstawia Tabela 5.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Woda (Nuclease-Free Water, not DEPC-treated)	Ambion	AM 9930
Bufor + Mg (PCR buffer 10x, with MgCl ₂)	Roche	11441400
Bufor GC (GC-Rich Solution 5x)	Roche	10939000
dNTP (PCR Grade Nucleotide Mix, 10mM)	Roche	13154900
Polimeraza (Fast Start Taq DNA Polymerase, 1000 U)	Roche	13539700
Startery	Oligo, IBB PAN, Warszawa	Zamówienie indywidualne

Tab.4. Odczynniki wykorzystane do reakcji PCR

Odczynnik	ilość/1 próbę
Woda	5,53 µl
Bufor + Mg Cl ₂ 10x	1,25 µl
Bufor GC 5x	2,5 µl
dNTP Mix 5mM	0,6 µl
Startery (Mix F+R) 12,5µM	0,5 µl
Polimeraza FastStart Taq	0,12 µl
Genomowy DNA	2 µl
Całkowita objętość reakcji PCR	12,5 µl

Tab.5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Startery do reakcji PCR zaprojektowane zostały przy użyciu komercyjnego programu Primer3 v. 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), a zamówienie zrealizowano w firmie IBB PAN w Warszawie, poprzez ogólnodostępną stronę <http://oligo.pl/>. Startery dostarczono w postaci liofilizowanej. Ze względu na wielkość eksonów analizowanych genów (*SOCS1* – 630 pz, *SOCS3* – 678 pz, *SOCS5* – 1611 pz), zostały one podzielone odpowiednio na 3 (dla genu *SOCS1*), 3 (dla genu *SOCS3*) i 6 (dla genu *SOCS5*) odcinków, zachodzących na siebie fragmentami o długości pomiędzy 100 i 150pz, amplifikowanych w oddzielnych reakcjach PCR. Postępowanie to miało na celu optymalizację długości odcinków matryc poddawanych w kolejnych etapach reakcji sekwencjonowana, w zależności od długości kapilar sekwenatora (36 cm). W Tabeli 6 znajdują się sekwencje wraz z temperaturami topnienia dla każdego ze starterów oraz długości fragmentów poddanych amplifikacji.

Gen	Nazwa startera	Sekwencja startera	T topnienia	Długość fragmentu
<i>SOCS1</i>	SOCS1a_F	5' GACTTGGTGCTCCGTGCT 3'	61.11°C	429 pz
	SOCS1a_R	5' AGGGGCCCCCAGTAGAAT 3'	61.11°C	
	SOCS1b_F	5' ACTTCCGCACATTCCGTTC 3'	61.06°C	308 pz
	SOCS1b_R	5' CGCCACGTAGTGCTCCAG 3'	61.63°C	
	SOCS1c_F	5' GCCCTTAGCGTGAAGATGG 3'	60.75°C	373 pz
	SOCS1c_R	5' CACATGGTTCCAGGCAAGTA 3'	59.57°C	
<i>SOCS3</i>	SOCS3a_F	5' AGGGTTCCGGGCACTCAA 3'	63.98°C	410 pz
	SOCS3a_R	5' CAGGTTCTTGGTCCAGACT 3'	59.15°C	
	SOCS3b_F	5' TTCTACTGGAGCGCAGTGAC 3'	59.19°C	398 pz
	SOCS3b_R	5' AACACCAGGGGGATCTTCTC 3'	60.31°C	
	SOCS3c_F	5' GCCACCTACTGAACCCTCCT 3'	60.51°C	360 pz
	SOCS3c_R	5' TCTCCTGGTTGGCTTCTTGT 3'	59.84°C	
<i>SOCS5</i>	SOCS5a_F	5' CTGAAATTCTGGACGGGAAG 3'	59.66°C	441 pz
	SOCS5a_R	5' TCGTGCAAGTCTTGTTCCCTG 3'	60.02°C	
	SOCS5b_F	5' AACTGGGATTAAGCCCTTCG 3'	60.44°C	407 pz
	SOCS5b_R	5' GAGAGGCTTTGACTGCTTGC 3'	60.29°C	
	SOCS5c_F	5' TGGACAGTGTTTCCAGCAGA 3'	60.44°C	353 pz
	SOCS5c_R	5' ATTGGGAGGGGGATCAAC 3'	59.52°C	
	SOCS5d_F	5' CTGTGAGCCCACATTCAACA 3'	60.72°C	397 pz
	SOCS5d_R	5' GGCACGAGGCAGTGTATGTA 3'	59.75°C	
	SOCS5e_F	5' GGCAGAAGCAGCGTCAGATA 3'	61.63°C	354 pz
	SOCS5e_R	5' GTCCCGTTACAGTGGAGGAG 3'	59.57°C	
	SOCS5f_F	5' CGCCGCTACAACAGATCC 3'	60.38°C	439 pz
	SOCS5f_R	5' AACTGCTACGTGTGCTTGC 3'	60.13°C	

Tab.6. Wykaz sekwencji starterów, temperatur ich topnienia oraz długości amplifikowanego fragmentu

Do każdej próbki dodawano odpowiednie matryce DNA dla polimerazy. Stanowiły one izolaty DNA, otrzymane z pełnej krwi obwodowej pacjentów z ZN i pacjentów grupy kontrolnej. Do reakcji używano matryc w ilości 20 -150 ng na 1 próbkę.

W przypadku każdej reakcji PCR, oprócz próbek badanych, wykonywano także negatywną próbę kontrolną, zawierającą wodę zamiast matrycy DNA i stanowiącą potwierdzenie czystości wykorzystywanych odczynników.

Wszystkie reakcje PCR wykonane zostały w oparciu o taki sam skład ilościowy mieszaniny reakcyjnej, różniące się jedynie zawartością mieszaniny odpowiednich par starterów dla amplifikowanych odcinków. Reakcje PCR przeprowadzone zostały przy użyciu termocyklera RealPlex Mastercycler epgradientS firmy Eppendorf, przy zastosowaniu programów amplifikacyjnych, różniących się temperaturą topnienia danej pary starterów oraz długością etapu namnażania (amplifikacji) produktu. Dane dotyczące poszczególnych etapów reakcji PCR dla wykorzystanych starterów znajdują się w Tabeli 7.

Fragment genu	Etap reakcji PCR (Temp./czas)					
	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing	Elongacja	Liczba cykli	Amplifikacja
SOCS1a	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS1b	94°C/4 min	95°C/30 sek	61°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS1c	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS3a	94°C/4 min	95°C/30 sek	63°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS3b	94°C/4 min	95°C/30 sek	63°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS3c	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5a	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5b	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5c	94°C/4 min	95°C/30 sek	57°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5d	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5e	94°C/4 min	95°C/30 sek	61°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min
SOCS5f	94°C/4 min	95°C/30 sek	60°C/60 sek	72°C/60 sek	35	72°C/7 min

Tab.7. Etapy reakcji PCR dla każdego z namnażanych fragmentów 3 badanych genów

3.2.5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Po zakończeniu reakcji PCR produkty były rozdzielane w 1,5% żelu agarozowym w celu uwidocznienia zajścia reakcji oraz zweryfikowania jakościowego i ilościowego produktu. W tym celu, w kolbie szklanej, rozpuszczano agarozę w buforze 1x TBE i ogrzewano do wrzenia i całkowitego rozpuszczenia w kuchence mikrofalowej przez 3 minuty. Następnie, po schłodzeniu zawartości kolby pod zimnym strumieniem wody do około 50°C, do roztworu dodawano 1,5 µl bromku etydyny (EtBr) w celu uwidocznienia rozdzielanych w żelu produktów w świetle UV. Zawartość kolby wylewano do uprzednio przygotowanej podstawki, pozwalającej na uformowanie żelu. Po jego zastygnięciu (około 20 – 30 minut), podstawkę z żelem umieszczano w aparacie do elektroforezy Mupid-One firmy Takara. Jako bufor elektrodowy wykorzystywano bufor 1x TBE. W celu właściwego osadzenia produktów reakcji PCR w dołkach żelu, przygotowano mieszaninę z dodatkiem buforu obciążającego. Skład mieszaniny nanoszonej na żel przedstawia Tabela 8.

Odczynnik	Ilość/1 próbę
Mieszanina dla próby badanej	
Woda	8 µl
6x Bufor obciążający	2 µl
Produkt reakcji PCR	2 µl
Całkowita objętość	12 µl
Mieszanina dla markera wielkości	
Woda	9,5 µl
6x Bufor obciążający	2 µl
Marker wielkości 1kb	0,5 µl
Całkowita objętość	12 µl

Tab.8. Skład mieszanin dla produktu reakcji PCR i dla markera wielkości, nakładanych na żel agarozowy

W trakcie rozdziału cząsteczki bromku etydyny interkalowały pomiędzy zasady w podwójnej helisie DNA, co umożliwiło późniejsze zlokalizowanie produktów reakcji PCR w żelu. Aby określić ich długości, zastosowano wzorec ciężaru cząsteczkowego DNA - marker wielkości, DNA Ladder 1kb firmy Fermentas. Po zakończeniu rozdziału

elektroforetycznego żel umieszczano w urządzeniu GelDoc-It Imaging System firmy UVP i poddawano świeceniu lampy UV, która umożliwiała uwidocznienie migrujących w żelu cząsteczek DNA. Do obserwacji wyniku rozdziału elektroforetycznego wykorzystano program Launch VisionWorksLS. Prążki DNA znajdowały się na różnych wysokościach ścieżek migracyjnych, w zależności od ich ciężaru cząsteczkowego, którego miarą była wielkość produktu PCR dla poszczególnych odcinków badanych genów. Wzorzec stanowił zastosowany marker wielkości. Rozdział elektroforetyczny pozwolił także na ocenę jakości zamplifikowanych produktów – dodatkowe prążki w obrębie ścieżki, powyżej lub poniżej właściwego produktu, świadczyłyby o zanieczyszczeniu któregoś ze składników mieszaniny reakcyjnej, zaś smier wokół prążka byłby oznaką bardzo złej jakości lub degradacji matrycy DNA, użytej do reakcji PCR. Brak prążka dla kontrolnej próby negatywnej świadczył o czystości użytych odczynników. Odczynniki użyte do przygotowania i przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego przedstawia Tabela 9.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Agaroza (Agarose)	Lab Empire	AGA001.500
Bromek Etydyny (Ethidium Bromide, solution 10mg/ml)	Sigma	E1510
Marker ciężaru cząsteczkowego (Gene Ruler 1kb DNA Ladder 0,5 µg/µl)	Fermentas	SM0311
Bufor obciążający (6x Loading Dye)	Fermentas	R0611
Bufor TBE		
Tris (Trizma Base)	Sigma	T-6066
Kwas borowy (Boric acid)	Sigma	B7901
EDTA 0,5M, pH=8,0	Sigma	E0399

Tab.9. Odczynniki wykorzystane do przygotowania żelu agarozowego i do rozdziału elektroforetycznego

3.2.6. Oczyszczanie produktów reakcji PCR

W celu zastosowania produktów namnożonych podczas reakcji PCR do sekwencjonowania, ostateczny produkt PCR, po weryfikacji na żelu agarozowym, został oczyszczony z pozostałości mieszaniny reakcyjnej w postaci wolnych, niewykorzystanych dNTP-ów oraz starterów. Do oczyszczenia użyto płytki 96-dołkowe MultiScreen Filter Plates firmy Millipore. Po wykorzystaniu 2 µl z całkowitej objętości produktu reakcji PCR do

rozdziálu elektroforetycznego, oczyszczeniu poddawano pozostałe 10,5 µl. W tym celu, do każdej próbki dodawano po 200 µl wody wolnej od nukleaz firmy Ambion i mieszano zawartość poprzez kilkukrotne pipetowanie. Następnie pipetą przenoszono całą zawartość (210,5 µl) do dołków na płytce zaopatrzonej w membranę, przepuszczalną dla cząsteczek DNA mniejszych niż 100pz, zaś pozwalającą na zatrzymanie właściwego produktu reakcji PCR. Płytkę umieszczano w wirówce na kawałku ligniny i wirowano przy prędkości 800 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu wirowania wilgotną ligninę z osadzonymi na niej wodą i zanieczyszczeniami wyrzucano, a do każdego dołka dodawano po 20 µl wody wolnej od nukleaz. Poprzez kilkakrotne pipetowanie przepłukiwano powierzchnię membrany w każdym dołku w celu rozpuszczenia w wodzie jak największej frakcji produktu PCR osadzonego na membranie. Odzyskany produkt umieszczano w nowych probówkach typu Eppendorf o pojemności 0,2 ml lub na płytce 96-dołkowej.

3.2.7. Pomiar stężenia i czystości oraz rozcieńczenie produktów reakcji PCR

Po zakończeniu procedury oczyszczania ponownie mierzono stężenie i czystość produktu PCR przy użyciu urządzenia NanoDrop. Sposób pomiaru był analogiczny do pomiaru stężenia i czystości całkowitego genomowego DNA izolowanego z krwi obwodowej pacjentów. Dokonywano również pomiaru kontroli negatywnej, niezawierającej produktu DNA, ale zawierającej niewykorzystane startery i dNTP-y. Z tego powodu wynik pomiaru dla próby negatywnej zawsze wskazywał pewną wartość dodatnią, która odejmowano od wyników pomiaru prób badanych. Otrzymywano w ten sposób właściwe stężenie produktu reakcji PCR, pozbawione tła.

Produkt reakcji PCR stanowił materiał wyjściowy do kolejnego etapu analiz, którym była reakcja sekwencjonowania. Ponieważ właściwy przebieg tej reakcji zależy od ilości użytej matrycy DNA, kolejnym krokiem po oczyszczeniu produktu PCR i pomiarze stężenia, było jego rozcieńczenie. Ostateczne stężenie matrycy DNA było różne dla każdego z odcinków analizowanych genów, w zależności od długości fragmentów poddanych sekwencjonowaniu. Wartości stężeń docelowych dla poszczególnych odcinków umieszczono w Tabeli 10.

Fragment genu	Stężenie matrycy do reakcji sekwencjonowania
SOCS1a	8 ng/μl
SOCS1b	6 ng/μl
SOCS1c	7 ng/μl
SOCS3a	8 ng/μl
SOCS3b	8 ng/μl
SOCS3c	7 ng/μl
SOCS5a	8 ng/μl
SOCS5b	8 ng/μl
SOCS5c	7 ng/μl
SOCS5d	8 ng/μl
SOCS5e	7 ng/μl
SOCS5f	8 ng/μl

Tab.10. Wartości stężeń docelowych matryc DNA dla poszczególnych odcinków analizowanych genów

3.2.8. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR

W celu identyfikacji mutacji i polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w sekwencjach kodujących badanych genów zastosowano technikę sekwencjonowania DNA, stanowiącą modyfikację klasycznej reakcji PCR. Do reakcji sekwencjonowania użyto tych samych starterów oligonukleotydowych, które weszły w skład mieszaniny pierwszej reakcji PCR, jednak do reakcji sekwencjonowania użyto tylko jednego z pary starterów – w orientacji Forward lub Reverse. Ze względu na to, iż długość poszczególnych odcinków badanych genów nie przekraczała 600pz, możliwe było przeprowadzenie reakcji tylko w jednym kierunku, w tym przypadku wybrano orientację 5'→3' (starter Forward). Oprócz startera i matrycy DNA o odpowiednim stężeniu, w skład mieszaniny reakcyjnej weszła również woda wolna od nukleaz firmy Ambion oraz BigDye Reaction Mix, zawierający polimerazę, wolne trifosforany deoksynukleotydów (dNTP) oraz zmodyfikowane trifosforany dideoksynukleotydów (ddNTP). Różnią się one od podstawowych dNTP-ów tym, że w pozycji 3' węgla dezoksyrybozy zamiast grupy hydroksylowej (OH) posiadają atom wodoru (H), co uniemożliwia dołączanie kolejnych dNTP-ów w trakcie reakcji, a tym samym kończy dalsze wydłużanie łańcucha DNA. Podobnie jak w przypadku dNTP-ów, wyróżnia się 4

rodzaje ddNTP-ów w zależności od zasady azotowej: ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP. Ponadto, są one wyznakowane fluorescencyjnie, przy czym każda z cząsteczek wyznakowana jest innym fluorochromem. Dzięki temu, że każdy barwnik posiada inne widmo absorpcji i emisji światła, możliwa jest detekcja odmiennych sygnałów w przypadku każdej z zasad azotowych, co z kolei umożliwi odczytanie sekwencji badanego DNA. Ilość wolnych dNTP-ów oraz wyznakowanych ddNTP-ów w mieszaninie umożliwia losowe ich wbudowywanie do powstającego łańcucha w sposób generujący odcinki różnej długości, przy czym każdy zakończony jest wyznakowaną cząsteczką. Po zakończeniu reakcji, w mieszaninie znajdują się więc odcinki w zakresie wielkości od długości startera + 1 do maksymalnej liczby par zasad w sekwencji. Wykaz odczynników wykorzystanych do reakcji sekwencjonowania znajduje się w Tabeli 11, natomiast skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 12.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Woda (Nuclease-Free Water, not DEPC-treated)	Ambion	AM9930
Bufor (BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer)	Applied Biosystems	4336697
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337455
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	Applied Biosystems	4336911
Starter specyficzny (Forward)	Oligo, IBB PAN, Warszawa	Zamówienie indywidualne

Tab.11. Odczynniki użyte do reakcji sekwencjonowania

Odczynnik	ilość/1 próbę
Woda	6,8 μ l
Bufor (BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer)	1 μ l
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0,2 μ l
Starter specyficzny	1 μ l
Oczyszczony produkt reakcji PCR	1 μ l
Całkowita objętość reakcji PCR	10 μ l

Tab.12. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania

Reakcja sekwencjonowania prowadzona była na płytce 96-dołkowej MicroAmp Optical Reaction Plate firmy Applied Biosystems z wykorzystaniem termocyklera Verti 96 Well Thermal Cycler firmy Applied Biosystems. Dla wszystkich odcinków zastosowano jednolity program amplifikacji, dzięki obniżeniu temperatury annealingu do 52°C niezależnie od temperatury topnienia używanego startera. Wykaz temperatur i czasu trwania poszczególnych etapów reakcji sekwencjonowania zamieszczono w Tabeli 13.

Etap reakcji sekwencjonowania	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing	Elongacja	Liczba cykli
Temp./czas	96°C/1 min	96°C/10 sek	52°C/5 sek	60°C/4 min	25

Tab.13. Parametry programu reakcji sekwencjonowania

3.2.9. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania

Etap oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania jest istotny ze względu na oczyszczenie produktów reakcji nie tylko z niewykorzystanych starterów ale też z niezwiązanych wyznakowanych fluorescencyjnie trifosforanów dideoksynukleotydów, które w dalszych etapach analiz mogą stanowić tło odczytu i zostać mylnie zidentyfikowane jako niewłaściwe nukleotydy w sekwencji badanego DNA.

W tym celu płytkę z produktami reakcji sekwencjonowania, zaraz po zakończeniu reakcji i wyjęciu z termocyklera, wirowano przez kilka sekund aby usunąć mieszaninę z wieczka folii przykrywającej płytkę. Umieszczano ją w temperaturze pokojowej i po odklejeniu folii na dno każdego dołka starannie dodawano 2,5 µl 125 mM EDTA. Następnie dodawano do dołków po 30 µl 99,8% etanolu o temperaturze pokojowej, a całą zawartość studzienek mieszano poprzez 4-krotne pipetowanie. Płytkę ponownie zaklejono folią samoprzylepną i inkubowano pod przykryciem folii aluminiowej przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Ochrona produktów reakcji sekwencjonowania przed nadmiernym działaniem światła jest istotna ze względu na możliwe szybsze wyświecenie się fluorochromów związanych z użytymi ddNTP-ami. Po upływie 15 minut płytkę umieszczano w wirówce i wirowano przy prędkości 1450 rpm przez 30 minut w temperaturze 4°C. Po upływie 30 minut i po osadzeniu się wytrąconych produktów, z płytki odklejano folię i pozbywano się mieszaniny poprzez odwrócenie płytki i kilkukrotne strząśnięcie jej nad zlewem. Do osadu dodawano po 30 µl 70% etanolu o temperaturze pokojowej, po czym

ponownie zaklejano płytkę folią. Wirowano przy prędkości 1350 rpm przez 15 minut w temperaturze 4°C, a następnie pozbywano się mieszaniny poprzez odwrócenie i strząśnięcie płytki nad zlewem. W celu pełnego usunięcia resztek etanolu z brzegów studzienek, płytkę umieszczono w wirówce w pozycji odwróconej, na ligninie, a następnie wirowano przez kilka sekund. Do osuszonych osadów dodawano po 20 µl 100% formamidu i denaturowano produkty w temperaturze 96°C przez 3 minuty w celu uzyskania pojedynczych nici DNA. Po upływie tego czasu natychmiast umieszczano płytkę na bloku chłodzącym, w celu zatrzymania procesu denaturacji. Po całkowitym schłodzeniu, płytkę wirowano przez kilka sekund w celu usunięcia kropel zawartości dołków z ich ścianek i folii. Tak przygotowany produkt reakcji sekwencjonowania stanowił materiał wyjściowy do etapu rozdziału elektroforetycznego. Wykaz odczynników użytych do oczyszczania produktu reakcji sekwencjonowania przedstawia Tabela 14.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Alkohol etylowy, bezwodny, 99,8%	POCH	396480111
EDTA	Sigma	E0399
Formamid (Hi-Di Formamide)	Applied Biosystems	4311320

Tab.14. Odczynniki wykorzystane do oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania

3.2.10. Elektroforeza kapilarna produktów reakcji sekwencjonowania

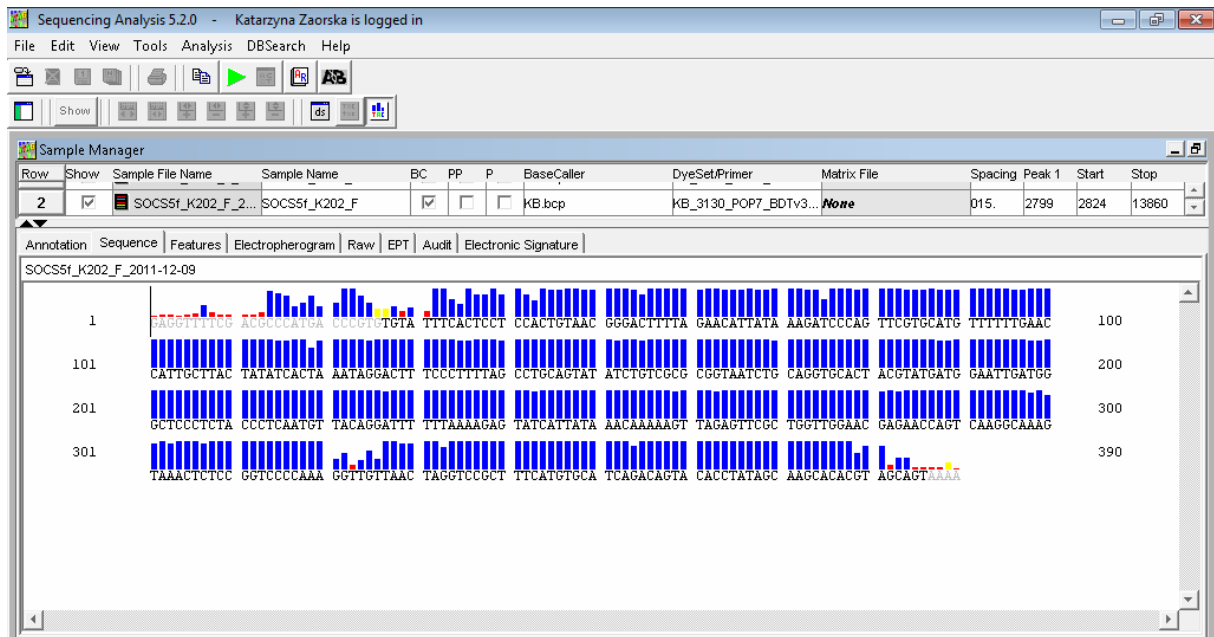
Oczyszczone produkty reakcji sekwencjonowania w kolejnym etapie poddawane były odczytowi sekwencji. Wykorzystano w tym celu sekwenator ABI Prism 3130 firmy Applied Biosystems. Umożliwił on przeprowadzenie rozdziału produktów reakcji sekwencjonowania na drodze elektroforezy kapilarnej, będącej modyfikacją klasycznego rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym. W tym przypadku rozdział prowadzony był w kapilarach o długości 36cm, w żelu poliakrylamidowym. Po umieszczeniu płytki z oczyszczonymi produktami reakcji sekwencjonowania w sekwenatorze dobierano odpowiednie parametry rozdziału, uwzględniające metodę oczyszczania oraz typ użytych odczynników. Podczas rozdziału fragmenty DNA, posiadające znaczniki fluorescencyjne, migrowały w żelu z szybkością zależną od ich długości. Pod wpływem wzbudzenia światłem lasera barwniki fluorescencyjne generowały różne sygnały, odczytywane przez urządzenie i przetwarzane na obraz charakterystycznych pików na ekranie komputera. Wykaz odczynników wykorzystanych do elektroforezy kapilarnej przedstawia Tabela 15.

Odczynnik	Producent	Nr kat. produktu
Polimer (POP-7 Polymer for 3130)	Applied Biosystems	4363785
Bufor EDTA (Buffer 10x with EDTA)	Applied Biosystems	402824

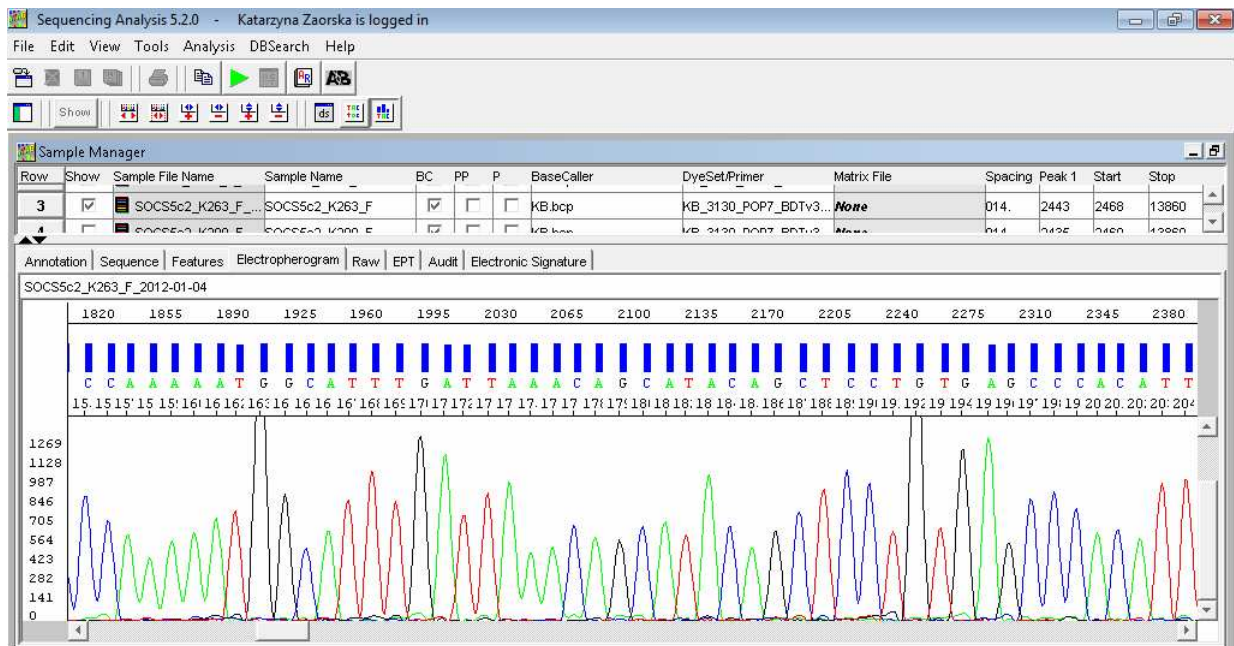
Tab.15. Odczynniki wykorzystane do elektroforezy kapilarnej

3.2.11. Analiza bioinformatyczna

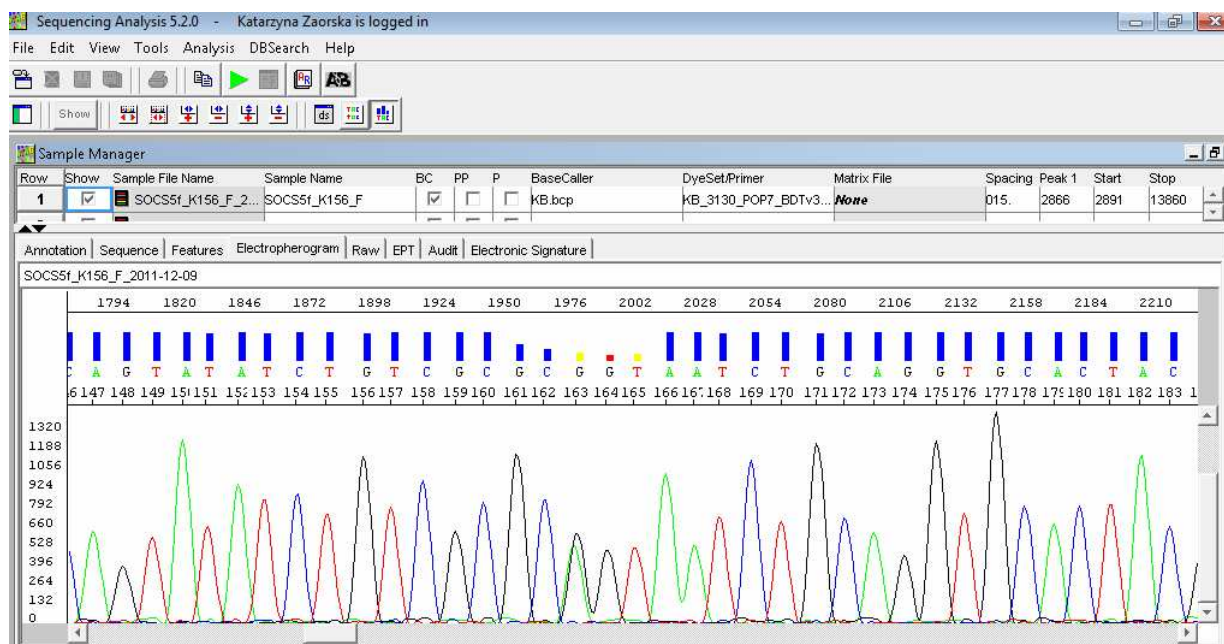
Po zakończeniu rozdzału elektroforetycznego otrzymano pliki, zawierające odczyty sekwencji analizowanego DNA. Do odczytu elektroforegramów wykorzystano program SequencingAnalysis v. 5.2 firmy Applied Biosystems. Program umożliwił odczyt sekwencji zarówno w formie tekstowej, jak i w formie pików w elektroforegramie w celu sprawdzenia jakości otrzymanych odczytów. Rysunek 1 przedstawia przykładowy odczyt sekwencji w formie tekstowej, zaś Rysunek 2 – przykładowy odczyt w formie pików. Sekwencja w formie tekstowej podzielona była na bloki liczące po 10 nukleotydów, przy czym przy każdym z nich widniał słupek odpowiedniego koloru, informujący o jakości odczytu. Kolor niebieski oznaczał odczyt bardzo dobrej jakości, kolor żółty – średnią jakość, zaś kolor czerwony świadczył o odczycie słabej jakości. Kolory żółty i czerwony wynikały ze słabego sygnału fluorescencyjnego lub były obrazem nakładania się więcej niż jednego sygnału w danym miejscu w sekwencji, co jest charakterystyczne dla układów heterozygotycznych. Przykładowy elektroforegram z układem heterozygotycznym pików przedstawia Rysunek 3.



Rys.1. Przykładowa sekwencja w formie tekstowej



Rys.2. Przykładowa sekwencja w formie pików (elektroforegram)



Rys.3. Przykładowy elektroforegram z układem heterozygotycznym pików

3.2.11.1 Analiza mutacji

Analiza otrzymanych sekwencji posłużyła do poszukiwania mutacji oraz genotypowania znanych i opisanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), a także nowych punktowych zmian w sekwencji DNA. W tym celu analizie poddano całe zamplifikowane odcinki badanych genów. W obrębie analizowanych fragmentów sekwencji były więc zarówno całe odcinki kodujące badanych genów – eksony, jak i fragmenty odcinków niekodujących, tj. nieprzepisywanych na białko, w tym przypadku były to fragmenty 5'UTR i 3'UTR. Wynikało to ze sposobu, w jaki zaprojektowano startery do reakcji PCR, tzn. tak, aby obejmowały cały region kodujący oraz części flankujących go regionów regulatorowych genu.

Analiza sekwencji odcinków badanych genów w kierunku identyfikacji mutacji zachodziła na drodze porównania sekwencji otrzymanej z sekwencją referencyjną, pochodzącą z ogólnodostępnej bazy danych NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Porównania dokonywano z wykorzystaniem ogólnodostępnego narzędzia na stronie FASTA (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare). W przypadku znalezienia zmiany w sekwencji badanej, identyfikowano miejsce jej wystąpienia i nadawano odpowiednie oznaczenie, według przyjętego wzoru (http://www.medicine.mcgill.ca/nephros/name_rules.html).

3.2.11.2. Analiza polimorfizmów

Analiza badanych sekwencji pod kątem genotypowania polimorfizmów zachodziła w sposób analogiczny do poszukiwania i analizy mutacji. Informacje odnośnie znanych i opisanych polimorfizmów SNP pochodziły z ogólnodostępnych baz danych: SNPper (<http://snpper.chip.org/>) i dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Analizie poddawano całe sekwencje otrzymane na drodze analiz, ze szczególnym uwzględnieniem miejsc polimorficznych. W celu zestawienia genotypów wszystkich analizowanych polimorfizmów SNP w obrębie badanych grup, w programie Microsoft Office Excel utworzono tabele, zawierające dane dotyczące pary alleli w miejscach polimorficznych w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*, w trzech badanych grupach. Tabele zawierały dane genotypowania zarówno polimorfizmów heterozygotycznych, jak i homozygotycznych.

Otrzymane genotypy pozwoliły na obliczenie częstości występowania genotypów oraz alleli w poszczególnych grupach (SOZN, SWZN, grupa kontrolna). Dla wszystkich polimorfizmów określono zgodność z rozkładem Hardy-Weinberga (HWE, ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*). Kolejnym etapem analizy statystycznej było sprawdzenie, czy różnice w częstości występowania określonych alleli i genotypów obserwowane pomiędzy trzema badanymi grupami są związane z grupą. Posłużono się w tym celu testem dokładnym Fishera, ze względu na małe liczebności niektórych alleli i genotypów w poszczególnych grupach. Ponadto, wyliczono wartość ilorazu szans (OR, ang. *Odds Ratio*), który wskazywał na wielokrotność, z jaką dany allel czy genotyp występował w danej grupie w porównaniu z inną. Wartość OR w przybliżeniu równa 1 oznaczała występowanie alleli niezwiązane z grupą. Wartość OR znacznie większa od 1 wskazywała, iż ten wariant polimorfizmu związany jest z podwyższonym ryzykiem fenotypu choroby dla pacjentów z grupy, zaś wartość OR znacznie mniejsza od 1 świadczyła o wariacie ochronnym względem fenotypu grupy. Zastosowano 95% przedział ufności (95% CI, ang. *Confidence Interval*). Wartości OR dla alleli i genotypów zostały określone i porównane pomiędzy każdą z trzech grup oddzielnie oraz dla grupy pacjentów ujętych wspólnie (pacjenci SOZN i SWZN) względem grupy kontrolnej.

3.2.11.3. Określenie struktury genów

W celu identyfikacji i wyznaczenia siły sprzężeń pomiędzy określonymi polimorfizmami SNP w każdym z badanych genów określono strukturę genów z użyciem programu Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). Program wykorzystuje 3 różne algorytmy: algorytm Gabriel et al., Regułę 4 gamet (*Four gamete rule*) i Rdzeń niezrównoważenia sprzężeń (*Solid spine of Linkage Disequilibrium*) (18). W niniejszej pracy posłużono się algorytmem Gabriel et al., ponieważ jest on najbardziej wymagający i wiarygodny dla analizowanych polimorfizmów SNP, generując najmniej wyników fałszywie pozytywnych. Wzajemne relacje pomiędzy polimorfizmami wyrażone są w postaci kilku matematycznych wartości, przy czym w pracy wykorzystano wartość R^2 , której miarą jest niezrównoważenie sprzężeń (LD). Wartość ta informuje o tym, w jakim stopniu każde dwa SNP-y są ze sobą powiązane i czy wspólnie segregują. W celu wizualizacji otrzymanych wyników wartości R^2 przedstawiono w postaci skali szarości, gdzie kolor biały oznaczał brak powiązań pomiędzy danymi dwoma SNP-ami, zaś kolor czarny świadczył o silnej kosegregacji danej pary polimorfizmów. Kolorom przypisano ponadto wartości liczbowe, odpowiadające procentowi osób w danej grupie, u których określone dwa polimorfizmy kosegregują wspólnie. Szacuje się, iż wartość ta powinna wynosić około 70% (0,7).

4. Wyniki

4.1. Wyniki izolacji genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej

Po izolacji całkowitego genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej pacjentów obydwu badanych grup oraz pacjentów grupy kontrolnej wyniki zestawiono w tabeli. Wartości stężenia izolatów mieściły się w granicach od 10,9 do 97,3 ng/ μ l, co stanowiło ilość adekwatną do reakcji PCR. Czystości, będące wartościami stosunku absorbancji A_{260}/A_{280} , w przypadku 77 prób mieściły się w granicach 1,80 a 2,0, zaś w przypadku pozostałych 24 prób wartości te wykroczyły nieznacznie poza granice normy (najmniejsza wartość wynosiła 1,66, najwyższa 2,07), co wskazywało na obecność zanieczyszczeń w postaci białek lub soli. Jednak wartości te nadal umożliwiały zastosowanie izolatów jako matrycy do reakcji PCR. Wartości otrzymanych stężeń i czystości prób dla trzech grup pacjentów przedstawia Tabela 16.

L.p.	Kod pacjenta	Stężenie [ng/ μ l]	Czystość [A_{260}/A_{280}]
Grupa SOZN			
1	K77	25,6	1,99
2	K94	26,3	2,0
3	K100	23,1	1,90
4	K103	42,4	1,76
5	K115	26,0	1,79
6	K119	10,9	1,85
7	K123	24,0	1,81
8	K128	74,0	1,91
9	K132	47,9	1,90
10	K72	19,9	1,86
11	K162	41,1	1,90
12	K98	23,6	1,74
13	K42	22,2	1,84
14	K75	10,5	2,07
15	K82	31,2	1,87
16	K102	28,5	1,81
17	K108	17,7	1,93
18	K109	21,6	1,73
19	K126	22,9	1,79
20	K134	29,0	1,80
21	K84	67,4	1,87
22	K139	24,7	1,83
23	K142	29,1	1,87
24	K160	16,6	1,99
25	K169	25,1	1,76
26	K170	37,3	1,81
27	K175	19,6	1,96
28	K177	21,8	1,81

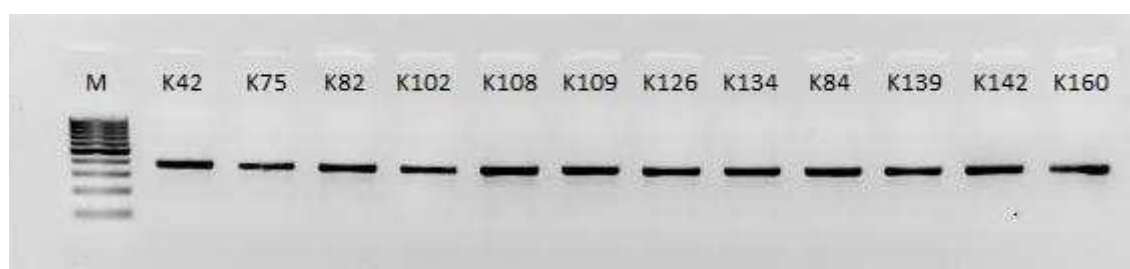
29	K183	22,3	1,88
30	K207	54,7	1,80
31	K51	53,1	1,97
32	K201	46,8	1,74
33	K202	18,3	1,75
34	K214	44,6	1,81
35	K258	89,7	1,87
36	K146	15,6	1,76
37	K193	32,1	1,91
38	K199	22,8	1,78
39	K262	40,3	1,81
40	K259	24,1	1,83
41	K265	18,2	1,77
Grupa SWZN			
42	K43	32,3	1,93
43	K127	24,6	1,74
44	K130	45,2	1,93
45	K131	16,0	1,84
46	K133	20,7	1,88
47	K136	29,2	1,95
48	K168	74,6	1,88
49	K161	97,3	1,93
50	K140	68,7	1,85
51	K191	19,4	1,90
52	K198	38,5	1,91
53	K203	51,9	1,94
54	K256	24,8	1,85
55	K101	42,6	1,90
56	K111	14,8	1,95
57	K154	49,8	1,82
58	K156	18,4	1,77
59	K179	61,1	1,85
60	K180	24,3	1,90
61	K182	28,9	1,88
62	K186	18,8	1,91
63	K189	17,5	1,72
64	K263	11,4	1,70
65	K266	26,6	1,71
66	K267	75,4	1,91
67	K269	28,2	1,92
68	K272	39,0	1,89
69	K273	30,3	1,87
70	K279	25,6	1,93
71	K280	20,9	2,04
Grupa kontrolna			
72	C8	16,5	1,87
73	C11	26,8	1,72
74	C12	19,7	1,68
75	C13	19,7	1,70
76	C14	27,6	1,87
77	C15	35,4	1,83
78	C36	23,4	1,99
79	C39	18,4	1,77
80	C51	21,3	1,66
81	C52	29,5	1,92
82	C53	60,0	1,84

83	C54	24,4	1,88
84	C68	38,5	1,83
85	C69	32,9	1,84
86	C70	27,6	1,80
87	C71	26,5	1,83
88	C73	32,8	1,90
89	C74	43,5	1,88
90	C75	31,6	1,96
91	C76	26,8	1,91
92	C208	50,0	1,82
93	C209	36,8	1,80
94	C210	32,2	1,75
95	C211	41,3	1,83
96	C212	36,1	1,81
97	C213	48,0	1,82
98	C5	23,6	1,84
99	C6	17,7	1,91
100	C24	23,2	1,93
101	C25	48,6	1,87

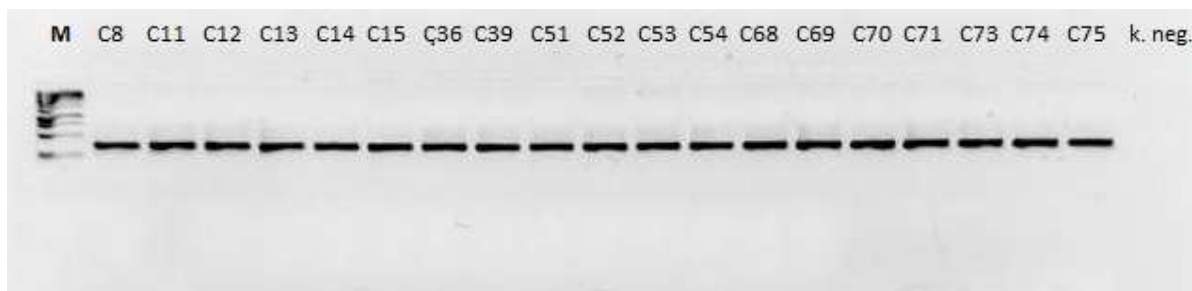
Tab.16. Wartości stężeń i czystości izolatów DNA

4.2. Wyniki reakcji PCR

Na drodze reakcji PCR otrzymano fragmenty kodujące genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji pozwolił na ich wizualizację w postaci prążków. Przykładowe obrazy rozdziału produktów PCR w żelu agarozowym dla pacjentów z zespołem nerczycowym oraz dla pacjentów z grupy kontrolnej przedstawiają odpowiednio Rysunek 4 i Rysunek 5.



Rys.4. Efekt rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym, fragment *SOCS1c*, wielkość 373 pz, matryce DNA wybranych pacjentów z ZN, M-marker wielkości



Rys.5. Efekt rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym, fragment SOCS5e, wielkość 354 pz, matryce DNA wybranych pacjentów z grupy kontrolnej, wraz z kontrolą negatywną, M-marker wielkości

4.3. Analiza zmian w sekwencjach genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Na podstawie danych otrzymanych po rozdzieleniu produktów reakcji sekwencjonowania w na drodze elektroforezy kapilarnej przeanalizowano sekwencje otrzymane w postaci plików tekstowych oraz elektroforegramów. Sekwencje te porównano z sekwencjami referencyjnymi, zarówno pod kątem poszukiwania mutacji, jak i genotypowania polimorfizmów typu SNP oraz nowych, niezidentyfikowanych zmian nukleotydowych w badanych genach.

4.3.1. Analiza mutacji punktowych w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Nie zidentyfikowano mutacji w genach *SOCS1* i *SOCS5* w grupie pacjentów SOZN, SWZN, ani w grupie kontrolnej. Zidentyfikowano jedną mutację w genie *SOCS3* u jednego pacjenta z grupy SOZN, oznaczonego jako K98. Mutacja miała status heterozygoty i położona była w rejonie niekodującym genu, w odcinku 3'UTR w odległości 53pz od ostatniego nukleotydu w eksonie2, w związku z czym nie miała wpływu na zmianę kodonu ani aminokwasu w łańcuchu białkowym. Zgodnie z uniwersalną zasadą nazewnictwa mutacji, określono ją jako ekson2+53 C>A. Informacje odnośnie zidentyfikowanej mutacji przedstawia Tabela 17.

L.p.	Kod pacjenta/grupa	Nazwa mutacji	Gen	Lokalizacja	Typ zmiany	Status mutacji
1.	K98/SOZN	ekson2+53 C>A	<i>SOCS3</i>	3'UTR	niekodująca	heterozygota

Tab.17. Informacje o mutacji zidentyfikowanej w genie *SOCS3*

4.3.2. Analiza polimorfizmów SNP w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Uzyskane genotypy pozwoliły na przeanalizowanie w sumie 31 polimorfizmów typu SNP, z czego 8 SNP w genie *SOCS1*, 5 SNP w genie *SOCS3* i 18 SNP w genie *SOCS5*.

W przypadku genu *SOCS1* 5 SNP-ów zlokalizowanych było w części kodującej eksonu 2, zaś 3 SNP-y – w częściach niekodujących. W przypadku 4 SNP-ów leżących w części kodującej (rs182726276, rs147807471, rs61753383, rs139221703) ewentualna zmiana allelu była synonimiczna (nie powodowała zmiany aminokwasu w białku), a polimorfizmy te występowały w formie homozygotycznej we wszystkich 3 badanych grupach. 1 SNP (rs11549428) znajdował się zaś w 2 wariantach allelicznych (G lub C) w grupie pacjentów SOZN i w grupie kontrolnej, natomiast w grupie pacjentów SWZN posiadał status homozygoty. Zmiana allelu G na C była missensowna i powodowała zastąpienie w łańcuchu białkowym glutaminy histydyną. Spośród SNP-ów części niekodującej genu, 2 SNP-y występowały w intronie 1, przy czym 1 SNP (rs27829) posiadał status homozygoty, zaś drugi SNP (rs188754154) był zróżnicowany w grupach pacjentów SOZN i SWZN, i homozygotyczny w grupie kontrolnej. Trzeci SNP (rs1801729) zlokalizowany w części niekodującej znajdował się w obrębie regionu 3'UTR genu i posiadał status homozygoty we wszystkich 3 badanych grupach.

W przypadku genu *SOCS3* tylko jeden polimorfizm (rs72899753) był zróżnicowany - w grupie pacjentów SOZN, zaś w grupie SWZN i w grupie kontrolnej występował w formie jednoallelicznej i był to SNP leżący w obrębie regionu 3'UTR genu. Pozostałe 4 SNP-y znajdowały się w obrębie regionu kodującego eksonu2, z czego w przypadku trzech (rs111889212, rs1061489, rs17849241) zmiana allelu powodowała zmianę aminokwasu w białku, a 1 SNP (rs12059) był synonimiczny. W niniejszej pracy wszystkie 4 SNP-y występowały jednak w jednym wariantcie allelicznym we wszystkich trzech badanych grupach pacjentów.

W przypadku genu *SOCS5* 14 SNP-ów zlokalizowanych było w części kodującej eksonu 2, zaś 4 SNP-y w części niekodującej, w obrębie regionu 3'UTR. Spośród SNP-ów leżących w eksonie 2, 9 SNP-ów było synonimicznych (rs150449336, rs41395245, rs17853110, rs6738426, rs41489952, rs41449044, rs17771838, rs61740036, rs147136060), natomiast 5 pozostałych SNP-ów (rs56047066, rs138131726, rs61746760, rs3768721, rs17853109) było missensownych, jednakże występowały one w formie homozygotycznej we wszystkich grupach badanych. W przypadku 6 zróżnicowanych SNP-ów (rs6738426,

rs41489952, rs17771838, rs3768720, rs41379147 i rs41432848) w genie *SOCS5*, zmiana allelu była synonimiczna.

Wykaz genotypów dla wszystkich analizowanych polimorfizmów dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* w grupach pacjentów SOZN, SWZN i w grupie kontrolnej znajduje się w Załącznikach, odpowiednio 5-13. Wykaz wszystkich poddanych analizie polimorfizmów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* wraz z informacjami na temat ich lokalizacji, alleli oraz statusu, bez rozróżnienia na poszczególne grupy badane, przedstawia Tabela 18.

Gen	Nazwa SNP	Lokalizacja SNP	Allel(e)	Zmiana aminokwasu w białku	Status
<i>SOCS1</i>	rs27829	Intron1	G/T	-	homozygota
	rs188754154	5'UTR	A/T	-	heterozygota
	rs182726276	Ekson2	C/A	CGA/AGA; Arg/Arg	homozygota
	rs147807471	Ekson2	C/G	CGC/CGG; Arg/Arg	homozygota
	rs61753383	Ekson2	G/T	GTG/GTT; Val/Val	homozygota
	rs139221703	Ekson2	C/T	GTC/GTT; Val/Val	homozygota
	rs11549428	Ekson2	G/A/C	CAG/CAA; Gln/Gln CAG/CAC; Gln/His	heterozygota
	rs1801729	3'UTR	A/C/G	-	homozygota
<i>SOCS3</i>	rs12059	Ekson2	G/A	CAG/CAA; Gln/Gln	homozygota
	rs111889212	Ekson2	A/C/T	GAG/GCG; Glu/Ala GAG/GTG; Glu/Val	homozygota
	rs1061489	Ekson2	C/T	CAC/TAC; His/Tyr	homozygota
	rs17849241	Ekson2	C/A	TTC/TTA; Phe/Leu	homozygota
	rs72899753	3'UTR	G/A	-	heterozygota
<i>SOCS5</i>	rs150449336	Ekson2	A/G	GGA/GGG; Gly/Gly	homozygota
	rs41395245	Ekson2	C/T	TTC/TTT; Phe/Phe	homozygota
	rs56047066	Ekson2	C/T	CCT/TCT; Pro/Ser	homozygota
	rs17853110	Ekson2	C/G	ACC/ACG; Thr/Thr	homozygota
	rs138131726	Ekson2	G/C	AGA/ACA; Arg/Thr	homozygota
	rs6738426	Ekson2	A/G	ACA/ACG; Thr/Thr	heterozygota
	rs61746760	Ekson2	G/C	AGA/ACA; Arg/Thr	homozygota
	rs41489952	Ekson2	C/G	ACC/ACG; Thr/Thr	heterozygota
	rs3768721	Ekson2	G/A	GGG/AGG; Gly/Arg	homozygota

rs41449044	Ekson2	C/A	CCC/CCA; Pro/Pro	homozygota
rs17853109	Ekson2	G/T	AGG/ATG; Arg/Met	homozygota
rs17771838	Ekson2	G/A	GCG/GCA; Ala/Ala	heterozygota
rs61740036	Ekson2	C/T	ATC/ATT; Ile/Ile	homozygota
rs147136060	Ekson2	C/G	CCC/CCG; Pro/Pro	homozygota
rs182123759	3'UTR	C/T	-	homozygota
rs3768720	3'UTR	G/T	-	heterozygota
rs41379147	3'UTR	C/T	-	heterozygota
rs41432848	3'UTR	C/T	-	heterozygota

Tab.18. Wykaz analizowanych polimorfizmów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

4.3.2.1. Analiza częstości genotypów i alleli

Na podstawie otrzymanych genotypów, dla każdego z polimorfizmów, zarówno dla wariantów jednoallelicznych, jak i zróżnicowanych, oszacowano częstość występowania każdego z genotypów oddzielnie w grupie pacjentów SOZN, pacjentów SWZN i w grupie kontrolnej, a także w grupie pacjentów SOZN i SWZN ujętych wspólnie. Częstości genotypów i alleli dla analizowanych polimorfizmów w badanych grupach dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* przedstawiają odpowiednio: Tabela 19, Tabela 20 i Tabela 21.

L.p	Nazwa SNP	Ilość (częstość) genotypów				Ilość (częstość) alleli			
		grupa SOZN (n=41)	grupa SWZN (n=30)	grupa ZN (SO+SW) (n=71)	grupa kontrolna (n=30)	grupa SOZN (n=82)	grupa SWZN (n=60)	grupa ZN (SO+SW) (n=142)	grupa kontrolna (n=60)
1.	rs27829	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
2.	rs188754154	aa 40 (0,98) at 1 (0,02)	aa 29 (0,97) at 1 (0,03)	aa 69 (0,97) at 2 (0,03)	aa 30 (1,0)	A 81 (0,99) T 1 (0,01)	A 59 (0,98) T 1 (0,02)	A 140 (0,99) T 2 (0,01)	A 60 (1,0)
3.	rs182726276	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
4.	rs147807471	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
5.	rs61753383	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G=1,0	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
6.	rs139221703	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
7.	rs11549428	gg 40 (0,98) gc 1 (0,02)	gg 30 (1,0)	gg 70(0,98) gc 1(0,02)	gg 28(0,93) gc 2 (0,07)	G 81 (0,99) C 1 (0,01)	G 60 (1,0)	G 141 (0,99) C 1 (0,01)	G 58 (0,97) C 2 (0,03)
8.	rs1801729	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)

Tab.19. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS1*

L.p	Nazwa SNP	Ilość (częstość) genotypów				Ilość (częstość) alleli			
		grupa SOZN (n=41)	grupa SWZN (n=30)	grupa ZN (SO+SW) (n=71)	grupa kontrolna (n=30)	grupa SOZN (n=82)	grupa SWZN (n=60)	grupa ZN (SO+SW) (n=142)	grupa kontrolna (n=60)
1.	rs12059	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
2.	rs111889212	aa 41 (1,0)	aa 30 (1,0)	aa 71 (1,0)	aa 30 (1,0)	A 82 (1,0)	A 60 (1,0)	A 142 (1,0)	A 60 (1,0)
3.	rs1061489	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
4.	rs17849241	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
5.	rs72899753	gg 40 (0,98) ag 1 (0,02)	gg 30 (1,0)	gg 71(0,98) ag 1 (0,02)	gg 30 (1,0)	G 81 (0,99) A 1 (0,01)	G 60 (1,0)	G 141 (0,99) A 1 (0,01)	G 60 (1,0)

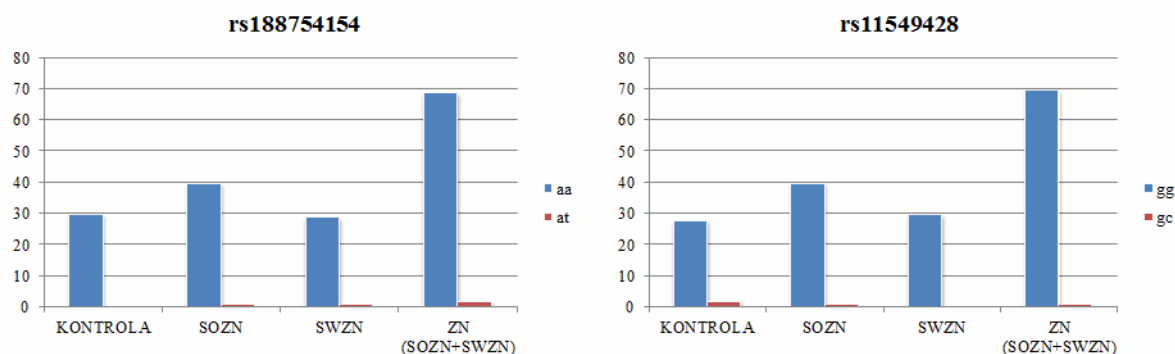
Tab.20. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS3*

L.p	Nazwa SNP	Ilość (częstość) genotypów				Ilość (częstość) alleli			
		grupa SOZN (n=41)	grupa SWZN (n=30)	grupa ZN (SO+SW) (n=71)	grupa kontrolna (n=30)	grupa SOZN (n=82)	grupa SWZN (n=60)	grupa ZN (SO+SW) (n=142)	grupa kontrolna (n=60)
1.	rs150449336	aa 41 (1,0)	aa 30 (1,0)	aa 71 (1,0)	aa 30 (1,0)	A 82 (1,0)	A 60 (1,0)	A 142 (1,0)	A 60 (1,0)
2.	rs41395245	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
3.	rs56047066	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
4.	rs17853110	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
5.	rs138131726	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
6.	rs6738426	aa 21 (0,51) ag 13 (0,32) gg 7 (0,17)	aa 12 (0,4) ag 13 (0,43) gg 5 (0,17)	aa 33(0,47) ag 26(0,36) gg 12(0,17)	aa 10(0,33) ag 16(0,54) gg 4 (0,13)	A 55 (0,67) G 27 (0,33)	A 37 (0,62) G 23 (0,38)	A 92 (0,65) G 50 (0,35)	A 36 (0,6) G 24 (0,4)
7.	rs61746760	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
8.	rs41489952	cc 31 (0,76) cg 9 (0,22) gg 1 (0,02)	cc 23 (0,77) cg 7 (0,23)	cc 54 (0,76) cg 16(0,23) gg 1 (0,01)	cc 25 (0,84) cg 4 (0,13) gg 1 (0,03)	C 71 (0,87) G 11 (0,13)	C 53 (0,88) G 7 (0,12)	C 124 (0,87) G 18 (0,13)	C 54 (0,9) G 6 (0,1)
9.	rs3768721	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
10.	rs41449044	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
11.	rs17853109	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)
12.	rs17771838	gg 36 (0,88) ag 5 (0,12)	gg 26 (0,87) ag 4 (0,13)	gg 62(0,87) ag 9 (0,13)	gg 28(0,93) ag 2 (0,07)	G 77 (0,94) A 5 (0,06)	G 56 (0,93) A 4 (0,07)	G 133 (0,94) A 9 (0,06)	G 58 (0,97) A 2 (0,03)
13.	rs61740036	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
14.	rs147136060	cc 41 (1,0)	cc 30 (1,0)	cc 71 (1,0)	cc 30 (1,0)	C 82 (1,0)	C 60 (1,0)	C 142 (1,0)	C 60 (1,0)
15.	rs182123759	gg 41 (1,0)	gg 30 (1,0)	gg 71 (1,0)	gg 30 (1,0)	G 82 (1,0)	G 60 (1,0)	G 142 (1,0)	G 60 (1,0)

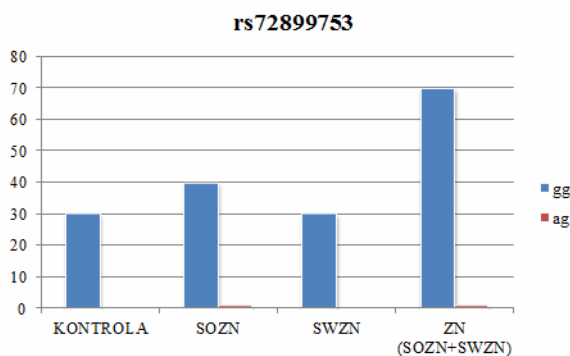
16.	rs3768720	gg 16 (0,39) gt 18 (0,44) tt 7 (0,17)	gg 9 (0,3) gt 15 (0,5) tt 6 (0,2)	gg 25(0,35) gt 33 (0,47) tt 13 (0,18)	gg 11(0,37) gt 13 (0,43) tt 6 (0,2)	G 50 (0,6) T 32 (0,4)	G 33 (0,55) T 27 (0,45)	G 83 (0,58) T 59 (0,42)	G 35 (0,54) T 25 (0,42)
17.	rs41379147	cc 34 (0,83) ct 7 (0,7)	cc 27 (0,9) ct 3 (0,1)	cc 61 (0,86) ct 10 (0,14)	cc 26 (0,87) ct 3 (0,1) tt 1 (0,03)	C 75 (0,91) T 7 (0,09)	C 57 (0,95) T 3 (0,05)	C 132 (0,93) T 10 (0,07)	C 55 (0,92) T 5 (0,08)
18.	rs41432848	cc 34 (0,83) ct 7 (0,7)	cc 27 (0,9) ct 3 (0,1)	cc 61 (0,86) ct 10 (0,14)	cc 26 (0,87) ct 3 (0,1) tt 1 (0,03)	C 75 (0,91) T 7 (0,09)	C 57 (0,95) T 3 (0,05)	C 132 (0,93) T 10 (0,07)	C 55 (0,92) T 5 (0,08)

Tab.21. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS5*

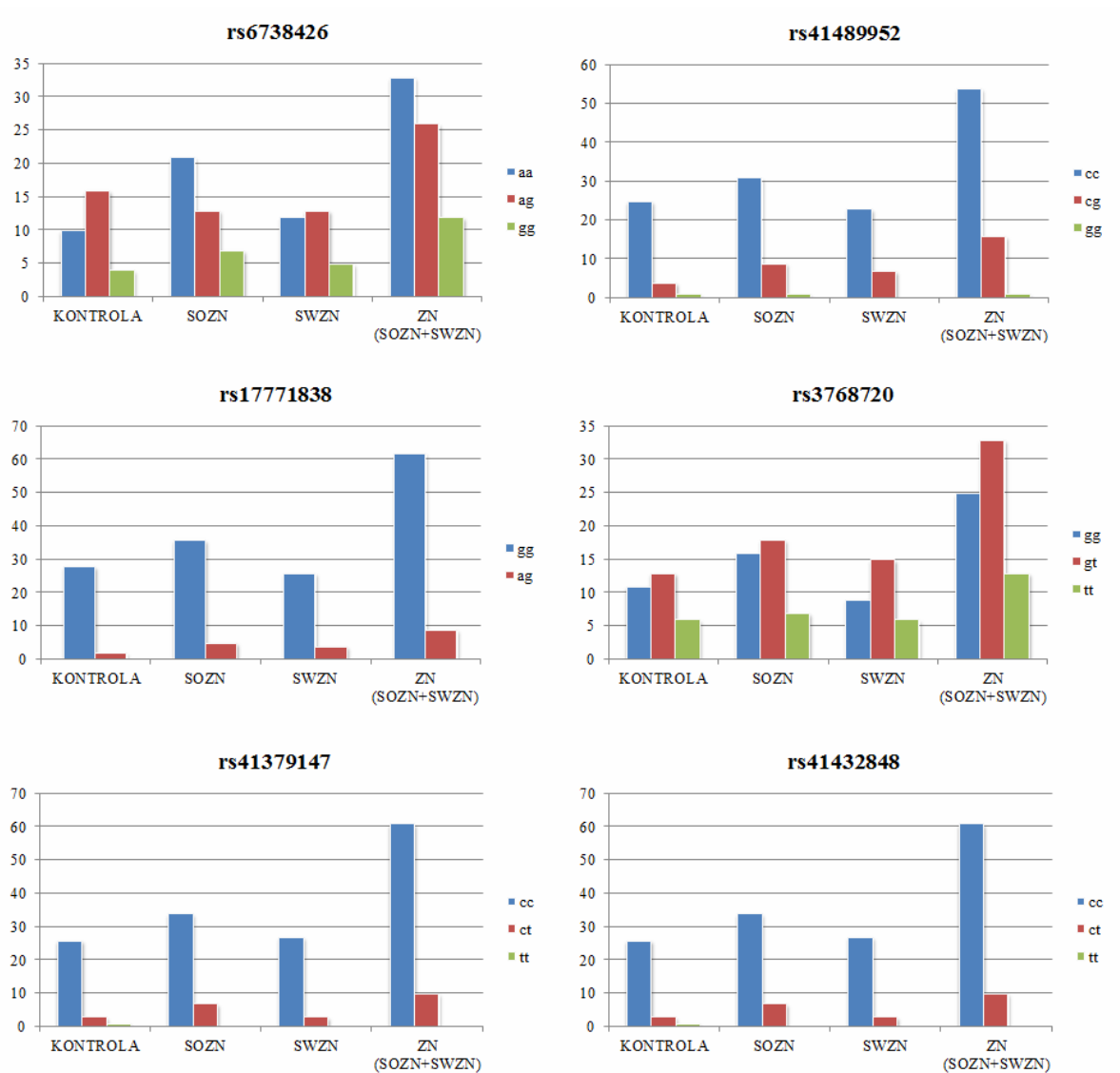
Dodatkowo, ilości poszczególnych genotypów i alleli dla badanych genów, w trzech grupach osobno oraz w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym ujętych wspólnie, przedstawiono graficznie w postaci wykresów. Wykresy dla ilości genotypów dla polimorfizmów zróżnicowanych w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* przedstawiają kolejno: Rysunek 6, Rysunek 7 i Rysunek 8, natomiast wykresy przedstawiające ilości alleli dla polimorfizmów zróżnicowanych w genach: *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* znajdują się kolejno na: Rysunku 9, Rysunku 10 i Rysunku 11.



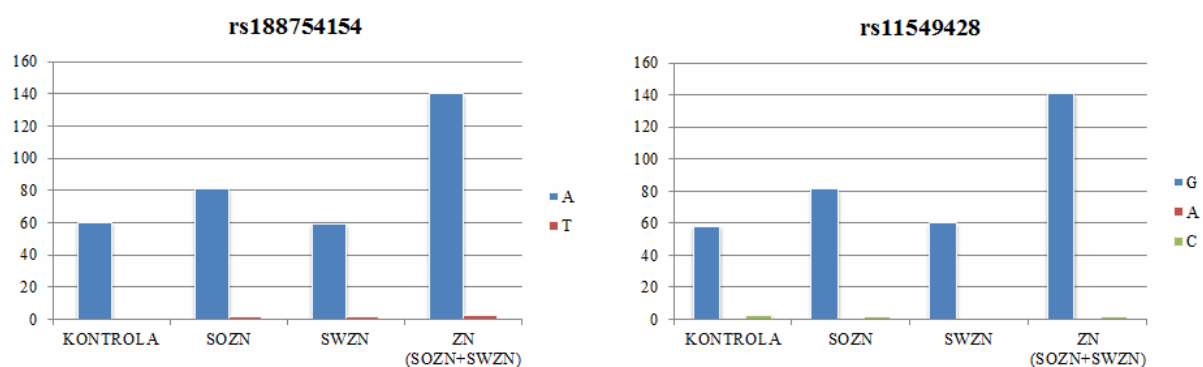
Rys.6. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów zróżnicowanych w genie *SOCS1*



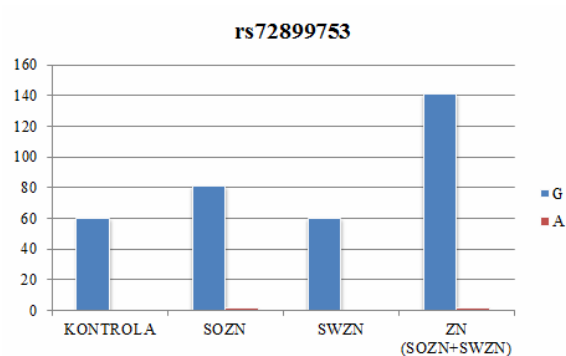
Rys.7. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów zróżnicowanych w genie *SOCS3*



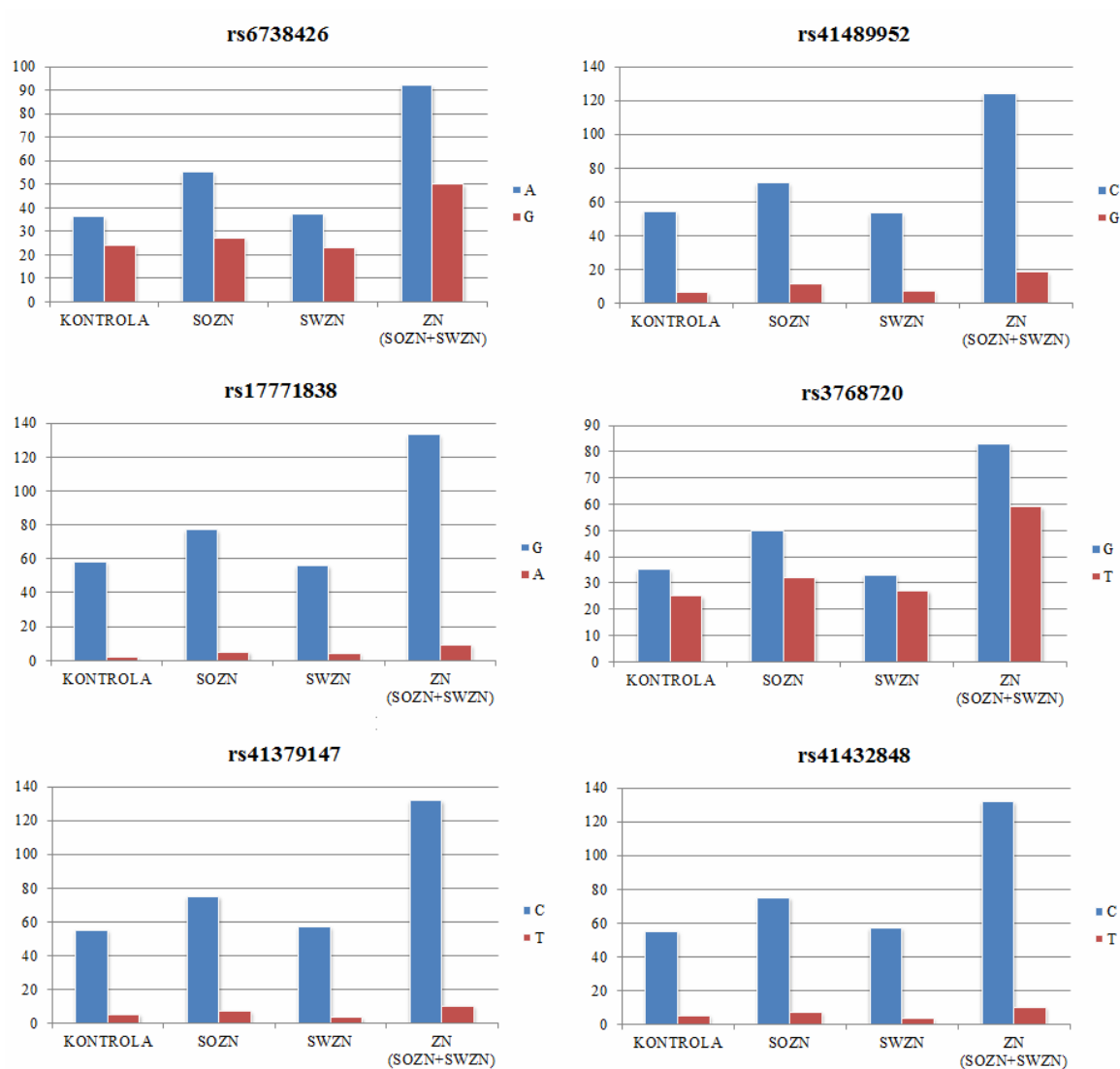
Rys.8. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów zróżnicowanych w genie *SOCS5*



Rys.9. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS1*



Rys.10. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS3*



Rys.11. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS5*

Na podstawie uzyskanych częstości genotypów określono, czy ich rozkład w badanych grupach jest zgodny z rozkładem Hardy-Weinberga. Ze względu na to, iż część badanych SNP-ów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* występowała w jednym wariacie allelicznym we wszystkich trzech lub tylko wybranych grupach pacjentów, nie było możliwe określenie zgodności z prawem H-W. W przypadku pozostałych, zróżnicowanych polimorfizmów, zgodność z rozkładem H-W została zachowana. Wartości liczbowe testu chi-kwadrat (χ^2) dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* przedstawiają odpowiednio: Tabela 22, Tabela 23 i Tabela 24.

L.p.	Nazwa SNP	Grupa pacjentów	χ^2 test P value	χ^2	Zgodność z prawem H-W
1.	rs27829	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
2.	rs188754154	SOZN	0,937	0,0062	Tak
		SWZN	0,926	0,0086	Tak
		Grupa kontrolna	-	-	-
3.	rs182726276	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
4.	rs147807471	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
5.	rs61753383	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
6.	rs139221703	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
7.	rs11549428	SOZN	0,937	0,0062	Tak
		SWZN	0,8502	0,0357	Tak
		Grupa kontrolna	-	-	-
8.	rs1801729	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			

Tab.22. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS1*

L.p.	Nazwa SNP	Grupa pacjentów	χ^2 test P value	χ^2	Zgodność z prawem H-W
1.	rs12059	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
2.	rs111889212	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
3.	rs1061489	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
4.	rs17849241	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
5.	rs72899753	SOZN	0,937	0,0062	Tak
		SWZN	-	-	-
		Grupa kontrolna	-	-	-

Tab.23. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS3*

L.p.	Nazwa SNP	Grupa pacjentów	χ^2 test P value	χ^2	Zgodność z prawem H-W
1.	rs150449336	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
2.	rs41395245	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
3.	rs6047066	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
4.	rs17853110	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
5.	rs138131726	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
6.	rs6738426	SOZN	0,0708	3,2641	Tak
		SWZN	0,6477	0,2088	Tak
		Grupa kontrolna	0,5428	0,3704	Tak
7.	rs61746760	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
8.	rs41489952	SOZN	0,7244	0,1243	Tak
		SWZN	0,4694	0,5233	Tak
		Grupa kontrolna	0,1556	2,0165	Tak
9.	rs3768721	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			

10.	rs41449044	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
11.	rs17853109	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
12.	rs17771838	SOZN	0,6776	0,1729	Tak
		SWZN	0,6956	0,1531	Tak
		Grupa kontrolna	0,8502	0,0357	Tak
13.	rs61740036	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
14.	rs147136060	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
15.	rs182123759	SOZN	-	-	-
		SWZN			
		Grupa kontrolna			
16.	rs3768720	SOZN	0,6197	0,2463	Tak
		SWZN	0,9559	0,0031	Tak
		Grupa kontrolna	0,5521	0,3536	Tak
17.	rs41379147	SOZN	0,5501	0,3572	Tak
		SWZN	0,7731	0,0831	Tak
		Grupa kontrolna	0,0585	3,5802	Tak
18.	rs41432848	SOZN	0,5501	0,3572	Tak
		SWZN	0,7731	0,0831	Tak
		Grupa kontrolna	0,0585	3,5802	Tak

Tab.24. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS5*

4.3.2.2. Analiza wartości ilorazu szans dla genotypów i alleli

Ze względu na charakter porównawczy prowadzonych analiz do dalszych obliczeń wyselekcjonowano jedynie zróżnicowane polimorfizmy, posiadające przynajmniej u jednego pacjenta, w przynajmniej jednej z trzech porównywanych grup, status heterozygoty. W przypadku genu *SOCS1* były to zatem 2 polimorfizmy (rs188754154, rs11549428), genu *SOCS3* – 1 SNP (rs72899753), i genu *SOCS5* – 6 SNP-ów (rs6738426, rs41489952, rs17771838, rs3768720, rs41379147, rs41432848).

Kolejnym etapem analiz było oszacowanie, czy i w jakim stopniu konkretny genotyp lub allel jest związany z daną grupą, czy też pojawia się w populacji niezależnie od rozważanych cech grupy. W tym celu posłużono się testem dokładnym Fishera a wynik przedstawiono w postaci wartości prawdopodobieństwa, z jakim dany genotyp lub allel

występował w konkretnej grupie w porównaniu z inną. Miarą tego prawdopodobieństwa była wartość ilorazu szans (OR) dla danego genotypu lub allelu. Porównano w ten sposób grupę pacjentów SOZN z grupą pacjentów SWZN, grupę SOZN z grupą kontrolną i grupę SWZN z grupą kontrolną, a także grupę pacjentów SOZN i SWZN ujętych wspólnie jako grupa pacjentów z zespołem nerczycowym (grupa ZN) z grupą kontrolną. Wartości OR dla trzech badanych genów dla genotypów przedstawia Tabela 25, natomiast dla alleli – Tabela 26.

Gen	Nazwa SNP	SOZN vs. SWZN		SOZN vs. Gr. kontrolna		SWZN vs. Gr. kontrolna		ZN (SOZN+SWZN) vs. Gr. kontrolna	
		OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
SOCS1	rs188754154	aa: OR=1,38 at: OR=0,72	p=1,0 p=1,0	aa: OR=0,44 at: OR=2,26	p=1,0 p=1,0	aa: OR=0,32 at: OR=3,01	p=1,0 p=1,0	aa: OR=0,46 at: OR=2,19	p=1,0 p=1,0
	rs11549428	gg: OR=0,44 gc: OR=2,26	p=1,0 p=1,0	gg: OR=2,86 gc: OR=0,35	p=0,5696 p=0,5696	gg: OR=5,35 gc: OR=0,19	p=0,4915 p=0,4915	gg: OR=5,0 gc: OR=0,20	p=0,2097 p=0,2097
SOCS3	rs72899753	gg: OR=0,44 ag: OR=2,26	p=1,0 p=1,0	gg: OR=0,44 ag: OR=2,26	p=1,0 p=1,0	-	-	gg: OR=0,77 ag: OR=1,30	p=1,0 p=1,0
SOCS5	rs6738426	aa: OR=1,57 ag: OR=0,61 gg: OR=1,11	p=0,4705 p=0,33195 p=1,0	aa: OR=2,10 ag: OR=0,41 gg: OR=1,34	p=0,1533 p=0,0887 p=0,7498	aa: OR=1,33 ag: OR=0,67 gg: OR=1,2	p=0,7892 p=0,6058 p=1,0	aa: OR=1,74 ag: OR=0,51 gg: OR=0,79	p=0,2736 p=0,1292 p=0,7718
	rs41489952	cc: OR=0,99 cg: OR=0,92 gg: OR=2,26	p=1,0 p=1,0 p=1,0	cc: OR=1,62 cg: OR=1,83 gg: OR=0,73	p=0,5599 p=0,5359 p=1,0	cc: OR=0,66 cg: OR=1,98 gg: OR=0,32	p=0,7480 p=0,5062 p=1,0	cc: OR=0,64 cg: OR=1,90 gg: OR=0,41	p=0,5985 p=0,4141 p=0,5079
	rs17771838	gg: OR=1,11 ag: OR=0,90	p=1,0 p=1,0	gg: OR=0,514 ag: OR=1,94	p=0,6908 p=0,6908	gg: OR=0,46 ag: OR=2,15	p=0,6707 p=0,6707	gg: OR=0,49 ag: OR=2,03	p=0,4989 p=0,4989
	rs3768720	gg: OR=1,49 gt: OR=0,78 tt: OR=0,82	p=0,4626 p=0,6379 p=0,7657	gg: OR=1,1 gt: OR=1,02 tt: OR=0,82	p=1,0 p=1,0 p=0,7657	gg: OR=0,74 gt: OR=1,31 tt: OR=1,0	p=0,7847 p=0,7961 p=1,0	gg: OR=0,94 gt: OR=1,14 tt: OR=0,90	p=1,0 p=0,8292 p=1,0
	rs41379147	cc: OR=0,54 ct: OR=1,85	p=0,5018 p=0,5018	cc: OR=0,75 ct: OR=1,85	p=0,7498 p=0,5018	cc: OR=1,39 ct: OR=1,0	p=1,0 p=1,0	cc: OR=0,94 ct: OR=1,48	p=1,0 p=0,7499
	rs41432848	cc: OR=0,54 ct: OR=1,85	p=0,5018 p=0,5018	cc: OR=0,75 ct: OR=1,85	p=0,7498 p=0,5018	cc: OR=1,39 ct: OR=1,0	p=1,0 p=1,0	cc: OR=0,94 ct: OR=1,48	p=1,0 p=0,7499

Tab.25. Wartości OR dla genotypów, dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Gen	Nazwa SNP	SOZN vs. SWZN		SOZN vs. Gr. kontrolna		SWZN vs. Gr. kontrolna		ZN (SOZN+SWZN) vs. Gr. kontrolna	
		OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
SOCS1	rs188754154	A: OR=1,37 T: OR=0,73	p=1,0 p=1,0	A: OR=0,45 T: OR=2,23	p=1,0 p=1,0	A: OR=0,33 T: OR=3,05	p=1,0 p=1,0	A: OR=0,46 T: OR=2,15	p=1,0 p=1,0
	rs11549428	G: OR=0,45 C: OR=2,23	p=1,0 p=1,0	G: OR=2,8 C: OR=0,36	p=0,5735 p=0,5735	G: OR=5,17 C: OR=0,19	p=0,4958 p=0,19	G: OR=4,86 C: OR=0,21	p=0,2110 p=0,2110
SOCS3	rs72899753	G: OR=0,45 A: OR=2,23	p=1,0 p=1,0	G: OR=0,45 A: OR=2,23	p=1,0 p=1,0	-	-	G: OR=0,78 A: OR=1,30	p=1,0 p=1,0
SOCS5	rs6738426	A: OR=1,27 G: OR=0,79	p=0,5942 p=0,5942	A: OR=1,36 G: OR=0,74	p=0,479 p=0,479	A: OR=1,07 G: OR=0,93	p=1,0 p=1,0	A: OR=1,23 G: OR=0,82	p=0,5268 p=0,5268
	rs41489952	C: OR=0,85 G: OR=1,17	p=0,8042 p=0,8042	C: OR=0,72 G: OR=1,39	p=0,6085 p=0,6085	C: OR=0,84 G: OR=1,19	p=1,0 p=1,0	C: OR=0,77 G: OR=1,30	p=0,8122 p=0,8122
	rs17771838	G: OR=1,1 A: OR=0,91	p=1,0 p=1,0	G: OR=0,53 A: OR=1,88	p=0,6989 p=0,6989	G: OR=0,48 A: OR=2,07	p=0,6794 p=0,6794	G: OR=0,51 A: OR=1,96	p=0,512 p=0,512
	rs3768720	G: OR=1,28 T: OR=0,78	p=0,4952 p=0,4952	G: OR=1,12 T: OR=0,9	p=0,8626 p=0,8626	G: OR=0,87 T: OR=1,15	p=0,854 p=0,854	G: OR=1,0 T: OR=0,99	p=1,0 p=1,0
	rs41379147	C: OR=0,56 T: OR=1,77	p=0,5186 p=0,5186	C: OR=0,97 T: OR=1,03	p=1,0 p=1,0	C: OR=1,73 T: OR=0,58	p=0,717 p=0,717	C: OR=1,2 T: OR=0,83	p=0,7724 p=0,7724
	rs41432848	C: OR=0,56 T: OR=1,77	p=0,5186 p=0,5186	C: OR=0,97 T: OR=1,03	p=1,0 p=1,0	C: OR=1,73 T: OR=0,58	p=0,717 p=0,717	C: OR=1,2 T: OR=0,83	p=0,7724 p=0,7724

Tab.26. Wartości OR dla alleli, dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

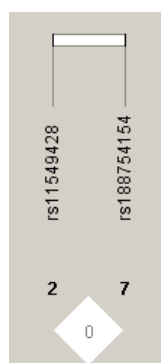
W przypadku jednego polimorfizmu w genie *SOCS3* – rs72899753, porównanie grupy pacjentów SWZN z grupą kontrolną nie było możliwe, ze względu na obecność tylko jednego allelu u wszystkich osobników obu grup. Wartości OR znacząco większe od jednośc zaznaczono w tabelach kolorem czerwonym, zaś znacząco mniejsze od jednośc – kolorem zielonym. Pomimo otrzymania wartości ilorazu szans mogących świadczyć o wariancie ryzyka lub ochronnym danego genotypu czy allelu w przypadku niektórych polimorfizmów, wartości „p” były jednak większe niż 0,05, co oznaczało, iż wartości OR były niezwiązane z

grupą. Ponadto, w większości przypadków oscylowały one wokół wartości 1, zarówno w przypadku genotypów, jak i alleli, co oznaczało, iż ich występowanie w danej grupie pacjentów ma charakter losowy.

4.3.2.3. Analiza struktury genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Kolejnym i ostatnim etapem analizy polimorfizmów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* było określenie ich struktury przy użyciu narzędzia Haploview. Na podstawie otrzymanych na drodze sekwencjonowania genotypów utworzono strukturę genu dla każdej z grup badanych oraz dla grupy pacjentów steroido-opornych i steroido-wrażliwych ujętych wspólnie, jako grupa pacjentów z zespołem nerczycowym. Struktura genu w formie schematu blokowego, stworzonego w oparciu o algorytm Gabriel et al., przedstawiała stopień powiązania analizowanych polimorfizmów heterozygotycznych w danym genie. Powiązanie to wyrażało się w wartości liczbowej, będącej procentem pacjentów w konkretnej grupie, u których dane dwa polimorfizmy SNP segregowały wspólnie.

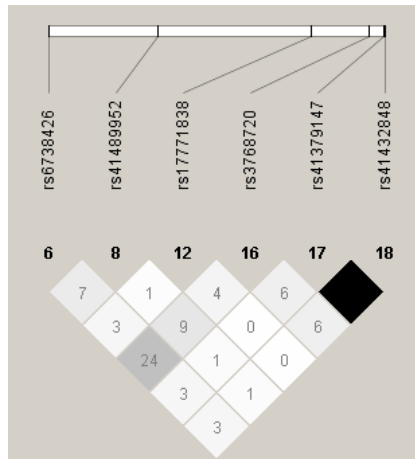
W przypadku genu *SOCS1* utworzenie struktury genu w grupie SWZN oraz w grupie kontrolnej nie było możliwe ze względu na to, iż wszystkie analizowane w obrębie genu *SOCS1* SNP-y występowały w tych grupach w formie jednoallelicznej. Struktura genu w grupie pacjentów SOZN nie wykazała natomiast wzajemnych powiązań pomiędzy dwoma analizowanymi polimorfizmami. Strukturę genu *SOCS1* dla grupy pacjentów SOZN przedstawia Rysunek 12. Ponieważ program Haploview zawierał dane odnośnie wszystkich analizowanych polimorfizmów, a więc także niezróżnicowanych, widoczna na obrazach struktury genów numeracja polimorfizmów odpowiada jedynie kolejnym SNP-om heterozygotycznym.



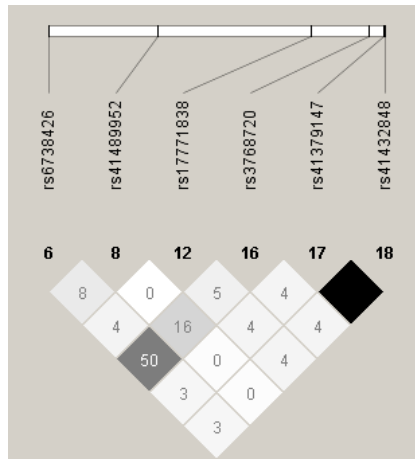
Rys.12. Struktura genu *SOCS1* dla grupy pacjentów SOZN

Utworzenie struktury dla genu *SOCS3* nie było możliwe, ponieważ w przypadku każdej z trzech porównywanych grup otrzymano tylko jeden polimorfizm zróżnicowany.

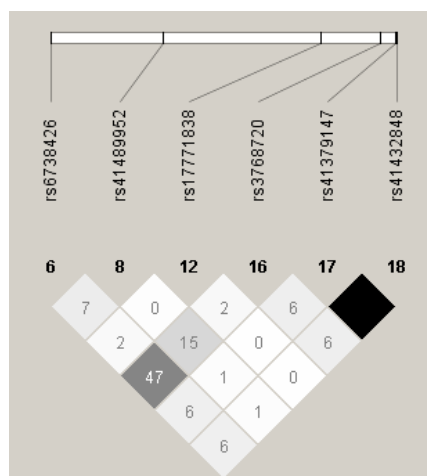
W przypadku genu *SOCS5* utworzono strukturę dla grupy pacjentów SOZN, SWZN i grupy kontrolnej oraz dla grupy pacjentów steroido-opornych i steroido-wrażliwych ujętych wspólnie. Struktura genu *SOCS5* dla wszystkich grup przedstawiała zależności pomiędzy sześcioma SNP-ami, które w każdej z grup pacjentów posiadały status heterozygot. W przypadku każdej z trzech grup pacjentów uzyskano 100%-owe powiązanie dwóch polimorfizmów (rs41379147 i rs41432848), co oznaczało, iż u każdego osobnika w grupie SOZN, SWZN oraz w grupie kontrolnej, dane dwa SNP-y segregowały wspólnie. Obydwa SNP-y położone były w regionie regulatorowym 3'UTR genu *SOCS5*. Ponadto, w żadnej z porównywanych grup nie uzyskano wartości R^2 dla niezrównoważenia sprzężeń (LD) większej lub równej 70, co oznaczało, iż wspólna segregacja polimorfizmów w tych grupach miała charakter losowy. Pomimo braku istotności statystycznej, na podstawie otrzymanych wartości liczbowych oraz oceny wizualnej ich skali szarości wykazano, iż powiązania pomiędzy polimorfizmami rs3768720 i rs6738426 oraz pomiędzy rs3768720 i rs41489952 były o około 50% słabsze w grupie SOZN niż w grupie SWZN (odpowiednio 24 vs. 50 i 9 vs. 16). Wartości dla tych samych powiązań pomiędzy danymi SNP-ami w grupie kontrolnej były zbliżone do wartości w grupie pacjentów SWZN (odpowiednio 47 vs. 50 i 15 vs. 16). Ponadto, w grupie pacjentów z ZN ujętych wspólnie analiza struktury genu wykazała istnienie jednego bloku haplotypowego, w skład którego weszły dwa SNP-y: rs41379147 i rs41432848, obydwa leżące w obrębie regionu 3'UTR genu *SOCS5*. Jednakże genotypy w obydwu polimorfizmach segregowały wspólnie u 100% pacjentów w każdej z badanych grup oraz w grupie kontrolnej. Rysunek 13, Rysunek 14 i Rysunek 15 przedstawiają strukturę genu *SOCS5* odpowiednio dla grupy pacjentów SOZN, pacjentów SWZN i dla grupy kontrolnej, natomiast strukturę genu dla grupy pacjentów z zespołem nerczycowym przedstawia Rysunek 16.



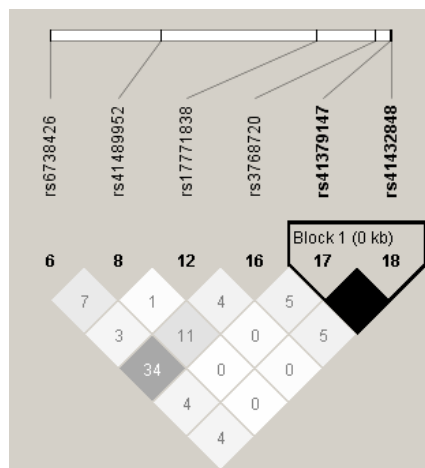
Rys.13. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów SOZN



Rys.14. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów SWZN



Rys.15. Struktura genu *SOCS5* dla grupy kontrolnej



Rys.16. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów steroido-opornych i steroido-wrażliwych ujętych wspólnie

5. Omówienie wyników i dyskusja

Według najnowszych danych idiopatyczny zespół nerczycowy jest obecnie najczęściej występująca formą ZN u dzieci (30). Pomimo wielu lat badań, nadal nie do końca wyjaśniona jest zarówno patofizjologia IZN, jak i różnorodna odpowiedź pacjentów na terapię glikokortykosteroidową. Nawet do 20% pacjentów z ZN charakteryzuje brak odpowiedzi na leczenie steroidowe, co prowadzi do osiągnięcia stanu krańcowej niewydolności nerek (KNN), utraty narządu, a nawet śmierci (171). Szacuje się, iż średnio połowa pacjentów ze steroido-opornym ZN osiąga stadium KNN w ciągu 1-4 lat od rozpoznania, zaś co najmniej co piąty z nich wymaga ostatecznie hemodializ lub transplantacji (27, 81). Coraz częściej obserwuje się występowanie zjawiska steroido-oporności także w innych chorobach, jednak trudno je jednoznacznie oszacować, głównie z powodu różnic w definicji czy zmienności w czasie, także w obrębie tej samej jednostki chorobowej, a nawet jednego chorego (16, 17). Ponadto, ZN należy do chorób rzadkich i stosunkowo niewiele badań nad steroido-opornością dotyczy właśnie tego schorzenia. Co więcej, zmienia się profil kliniczny samej choroby, w tym też częstość gorzej rokujących rozpoznań histopatologicznych, co sprawia, że pacjenci z IZN stanowią niezwykle heterogenną grupę, zaś steroido-oporny IZN pozostaje jedną z najtrudniejszych w leczeniu chorób kłębuszkowych u dzieci (21, 62).

Pacjenci steroido-oporni nadal pozostają jednak narażeni na efekty uboczne terapii, wynikające z przedłużającego się leczenia i wysokich dawek steroidów, przy czym to właśnie odpowiedź na leczenie i czas uzyskania remisji – wg szeregu autorów – wydają się być najlepszymi i najskuteczniejszymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z IZN (11, 164, 168). Co więcej, początkowa odpowiedź na leczenie ma znaczenie także w prognozowaniu nawrotów białkomoczu w przyszłości czy przeżywalności nerki po przeszczepie (23, 101, 108), nie stanowi jednak wczesnego markera odpowiedzi na terapię. Pomimo, że Banaszak i in. obserwowali większą częstość występowania krwinkomoczu oraz wyższy poziom mocznika w grupie pacjentów steroido-opornych w porównaniu z pacjentami steroidowrażliwymi, w momencie przyjęcia do szpitala (12), nie były to jednak cechy typowe dla ZN, jako że objawy kliniczne choroby są takie same w obydwu grupach chorych. Nadal brak jest więc cech swoistych, mogących pełnić rolę wczesnych markerów steroido-oporności, a tym samym pozwalających na wstępną selekcję pacjentów w celu uniknięcia nieskutecznego leczenia (12, 174). Podjęte w niniejszej rozprawie zagadnienie zbadania potencjalnych

czynników w steroido-oporności w grupie pacjentów z IZN oraz zastosowana technika sekwencjonowania regionów kodujących genów-kandydatów wpisują się zatem zarówno w potrzeby diagnostyki klinicznej schorzenia, jak i trendy współczesnej nauki.

Według Chiou i in. różnorodna odpowiedź pacjentów z IZN na terapię steroidową jest dowodem na odmienne podłoże choroby w poszczególnych grupach chorych (30). Także Woroniecki i wsp., na podstawie porównania poziomu i profilu cytokin w moczu pacjentów steroido-opornych i steroido-wrażliwych, zasugerowali odmienną etiologię tych dwóch fenotypów zespołu nerczycowego (168). Wielu autorów wskazuje na powiązanie dobrej odpowiedzi na leczenie i pomyślnego rokowania z łagodnymi zmianami histopatologicznymi w biopsji nerki, w postaci zmian o charakterze minimalnym (MCD) (64, 168). Analogicznie, steroido-oporność u pacjentów z IZN kojarzona jest często z bardziej zaawansowanymi zmianami histopatologicznymi, najczęściej w typie FSGS lub rozplemu mezangialnego, i związana jest z gorszymi prognozami dla pacjenta (11, 12, 64). Komórkami, które mają największe i decydujące znaczenie w patofizjologii kłębuszka nerkowego, są podocyty, zaś utrata podocytów z moczem jest głównym czynnikiem w rozwoju FSGS (23). Według Spadło i in. podocyturia stanowi nawet lepszy wskaźnik stopnia zmian patologicznych w kłębuszku nerkowym aniżeli białkomocz (144). Jednak część autorów podkreśla, iż wszystkie formy histologiczne w rozpoznaniu IZN charakteryzują się uszkodzeniami podocytów, a czynnikiem rozróżniającym je są przypuszczalnie odmienne mechanizmy, leżące u podstawy tych uszkodzeń (11, 23, 42). Szereg innych badaczy także wskazuje na niedokładność w prognozowaniu o efektach terapii steroidowej na podstawie rozpoznania histologicznego, jako że 70% pacjentów z rozpoznaniem MCD charakteryzują częste nawroty i mogą oni rozwijać steroido-zależność bądź steroido-oporność, zaś zmiany o charakterze gorzej rokującym nie zawsze mogą zostać prawidłowo rozpoznane w biopsji nerki (21, 132, 144, 168, 174). Przypuszcza się, iż to sama forma kliniczna zmieniającego się na przestrzeni lat zespołu nerczycowego decyduje o fenotypie leko-opornym, a czynnikiem bardziej od histopatologii istotnym w prognozowaniu jest wiek ujawnienia się schorzenia (29, 96, 174). Wielu autorów donosi, iż wrodzona forma ZN, ujawniająca się w pierwszych 3 miesiącach życia lub jeszcze w życiu płodowym, jest z reguły oporna na terapię immunosupresyjną, w tym steroidową, a prognozy dla pacjentów są niepomyślne, bez względu na zmiany histopatologiczne w nerkach (96, 105, 108). IZN manifestuje się jednak najczęściej po ukończeniu 1. roku życia (105), natomiast, jak pokazują badania Elie i wsp., czas trwania choroby wykrytej w wieku 14 r.ż. jest ponad 7-krotnie krótszy, w porównaniu z

ZN manifestującym się w wieku 2 lat (42). Z drugiej strony, według Chang i in., wraz z wiekiem rośnie ryzyko wystąpienia ciężkich zmian histopatologicznych w nerkach i steroido-oporności, zaś im młodszy wiek, tym większa jest szansa, iż u podstaw choroby leżą łagodne zmiany o charakterze minimalnym (29). W badanej grupie chorych SOZN u 3 pacjentów nastąpiło rozpoznanie ZN w wieku poniżej 1 roku życia (u 2 pacjentów w wieku 3 miesięcy, u 1 w wieku 5 miesięcy), z czego u jednego z nich uzyskano remisję, zaś u dwóch pozostałych wystąpił białkomocz o charakterze nie nerczycowym i charakteryzowały ich cięższe rozpoznania histologiczne w typie FSGS i zmian w typie mezangialnej proliferacji (MP). Wśród 22 pacjentów z grupy SOZN, u których osiągnięto remisję białkomoczu, u 3 rozpoznanie histopatologiczne obejmowało zmiany w typie FSGS, u 8 – zmiany typu MP, u 3 zmiany w typie DMP, zaś u 4 – zmiany minimalne (MCD). W grupie SWZN u 2 pacjentów rozpoznanie IZN nastąpiło najwcześniej po 1 r. ż. (w wieku 18 i 20 miesięcy), zaś średnia wieku rozpoznania w tej grupie (4,96) nie odbiegała od średniej wieku rozpoznania IZN w grupie SOZN (4,15). Zaledwie u 2 pacjentów SWZN, u których rozpoznanie nastąpiło w wieku 2 i 3 lat, wystąpił kolejny rzut zespołu nerczycowego, zaś u 1 pacjenta, u którego ZN rozpoznano w wieku 13 lat, wystąpił białkomocz o nie nerczycowym charakterze. U pozostałych 25 pacjentów w tej grupie, niezależnie od rozpoznania histopatologicznego, nastąpiła remisja białkomoczu. Warto również zauważyć, iż 3 pacjentów SOZN i 1 pacjent SWZN, u których wykonana została transplantacja nerki, osiągnęło remisję.

Glikokortykoidy (Gk) to powszechnie stosowane w leczeniu zespołu nerczycowego leki o działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym (16, 75). Wykazują rolę m.in. w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, zwiększaniu syntezy czynników przeciwzapalnych, a według ostatnich badań odgrywają także bezpośrednią rolę w stabilizacji struktury podocytów (120, 134). Pomimo wciąż niejasnej etiologii samego schorzenia oraz podłoża steroido-oporności, dzięki wielokierunkowym i szerokim zakresom działania steroidów, autorzy wielu prac nadal zalecają je jako podstawę w terapii zespołu nerczycowego, nawet u pacjentów steroido-opornych, gdzie szczególnie agresywna terapia immunosupresyjna niezbędna jest, aby nie dopuścić do utraty funkcji nerek (29). Niezależnie natomiast od patofizjologii IZN, nawracający białkomocz oraz zmiany postępujące w obrębie nerek związane są z pobudzeniem układu immunologicznego i obecnością stanu zapalnego. Szereg badaczy potwierdza aktywację lokalnych makrofagów oraz naciek monocytów, neutrofilów i limfocytów do kłębuszków nerkowych, a także produkcję i wydzielanie dużych ilości cytokin prozapalnych wraz ze wzmożoną ekspresją receptorów dla tych czynników (6,

124). Wśród czynników dominujących w moczu pacjentów z IZN znajdowały się m.in. IL-6 o charakterze prozapalnym i IL-8, będąca czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów, także RANTES, MCP-1 i ICAM-1, stanowiące czynniki prozapalne, przyciągające i kierujące monocyty i leukocyty do miejsca zapalnego, oraz transformujący czynnik wzrostu TGF- β (6, 68, 106). TGF- β produkowany jest głównie przez makrofagi i stymuluje komórki mezangium do proliferacji i syntezy składników macierzy pozakomórkowej, przyczyniając się w ten sposób do nadmiernego rozrostu obszaru międzykanalikowego kłębuszka i do procesu włóknienia (125). Według niektórych autorów (14, 87) aktywacja TGF- β związana jest z progresją do przewlekłej niewydolności nerek w grupie pacjentów steroido-opornych, a ścieżka aktywacji tego czynnika stanowi kluczowy mechanizm zaangażowany w patomechanizm szkliwienia i włóknienia śródmiąższowego nerki. Woroniecki i wsp. (168) badali ilości wybranych cytokin, m.in. TGF- β , w moczu pacjentów steroido-opornych i -wrażliwych, próbując ustalić charakterystyczny profil cytokinowy dla obydwu grup. Pomimo różnic w ekspresji badanych czynników pomiędzy grupami, autorzy nie otrzymali wartości istotnie wpływających na ich rozróżnienie. Poziom TGF- β 1 w moczu był podniesiony w obydwu badanych grupach i w większym stopniu rozróżniał stopień zaawansowania zmian histopatologicznych w typie FSGS od MCD, podobnie, poziom ICAM-1 w moczu był porównywalny w obydwu grupach i słabo korelował z poziomem ekspresji tego czynnika w tkance nerki. Nie znaleziono również korelacji pomiędzy poziomem badanych czynników a obecnością i wielkością białkomoczu. Wcześniejsze badania tego samego zespołu (167), dotyczące określenia profilu białkowego moczu z wykorzystaniem spektroskopii w celu potencjalnego rozróżnienia pacjentów steroido-opornych od -wrażliwych, pozwoliły na zaobserwowanie w grupie pacjentów steroido-opornych dodatkowego sygnału, pochodzącego od niezidentyfikowanego białka o masie 41 kDa. Jednak dalsze badania wykazały, iż białko to może albo pojawiać się dopiero w trakcie terapii, albo też może być obecne w obydwu grupach przed rozpoczęciem leczenia i zanikać wybiórczo w grupie pacjentów steroido-wrażliwych, co uniemożliwia zastosowanie go jako markera wczesnej odpowiedzi na terapię steroidową. Według niektórych autorów (7, 172) trudno jednak określić jednoznaczny i uniwersalny profil cytokinowy nie tylko dla pacjentów steroido-opornych i -wrażliwych, ale też w ogóle dla chorych z IZN. Co więcej, Zachwieja i wsp. (172) uważają, iż badania poziomu cytokin są zazwyczaj niejednoznaczne i mylące. Niemniej, zarówno oni, jak i inni badacze donoszą o nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej, zaburzeniach w dystrybucji poszczególnych komórek krążących i wydzielanych przez nie czynników prozapalnych, których poziom jest podwyższony podczas nawrotów białkomoczu i które zwiększają

przepuszczalność kłębuszka nerkowego dla białek (7, 25, 172). Nadal nie wiadomo jednak, czy obecność białkomoczu to pierwotna przyczyna czy też efekt wtórny nadmiernej aktywności układu immunologicznego (26). Jak pokazuje szereg badań *in vivo* i *in vitro*, albuminy są aktywatorami wielu ścieżek sygnalizacyjnych, wykorzystywanych jednocześnie przez większość mediatorów zapalnych w komórce. Nakajima i in. (102) donoszą, iż albuminy są bezpośrednimi aktywatorami ścieżki sygnalizacyjnej Jak/Stat i że aktywacja ta następuje niezależnie od rodzaju albumin. Ci sami autorzy wykazali, iż obecność białkomoczu w kanalikach bliższych aktywuje w ich komórkach czynniki transkrypcyjne STAT1 i STAT5 w ciągu 15 minut, zaś STAT3 w ciągu 4 godzin. Inne badania pokazują (1, 103), iż komórki kanalika proksymalnego w hodowli *in vitro* inkubowane z białkami osocza od chorych z IZN pobudzane są do wydzielania endoteliny-1 (ET-1), powodującej naciek monocytów i będącej mediatorem produkcji matrix pozakomórkowej oraz postępującego uszkodzenia nerek. Badania wykazały również, iż komórki kanalika przeładowane białkiem produkują czynniki prozapalne takie jak: MCP-1, RANTES, IL-8, fraktalkinę, a także powodują aktywację reaktywnych form tlenu, ścieżki zapalnej NF-κB oraz aktywację czynników STAT. Co więcej, ci sami autorzy wysunęli przypuszczenie, iż albuminy mogą zachowywać się jak cytokiny i w analogiczny sposób aktywować ścieżki właściwe dla tych ostatnich. Wykazano ponadto, iż albuminy w hodowlach *in vitro* stymulują komórki nabłonka kanalika proksymalnego także do ekspresji angiotensyny II (AngII), która w efekcie działania wzmacnia aktywność ścieżki Jak/Stat, powodując ciągłą aktywację jej elementów, nawet gdy szczyt białkomoczu już minął (86). Istnieją przypuszczenia, iż to nie same albuminy, ale dołączone do wolne kwasy tłuszczowe generują efekt toksyczny dla komórek kanalików nerkowych (1), zaś inni badacze sugerują związek IZN z towarzyszącą nadmiernej utracie albumin hiperlipidemią, modulującą aktywność układu immunologicznego (23). Szkodliwość białkomoczu objawia się również w postaci indukcji apoptozy w komórkach kanalikowych i cewkowych (1). Wprawdzie Huang i in. (68) także wykazują, iż obecność albumin w kanalikach nerkowych pobudza produkcję cytokin i aktywację ścieżki MAPK/ERK, jednak zwracają uwagę na fakt, iż stężenia albumin używane niekiedy w doświadczeniach *in vitro* przekraczają stężenia albumin obecne nawet w ciężkich nefropatiach w warunkach *in vivo*, co świadczyć może o małej wiarygodności niektórych badań. Co więcej, ci sami autorzy zauważyli, iż zastosowanie różnych inhibitorów ścieżki MAPK/ERK powodowało zmniejszenie ekspresji wybranych czynników tylko w grupie pacjentów z FSGS, nie wpływając na ich poziom u pacjentów z MCD, lub w obu grupach jednocześnie, co świadczyć może z kolei o aktywacji różnych czynników sygnalnych ścieżek, a tym samym

odmiennej patofizjologii obydwu schorzeń. Jest to istotne tym bardziej, że poszczególne elementy różnych ścieżek wraz z czynnikami zapalnymi mogą aktywować się nawzajem i stanowić bardziej skomplikowany układ sygnalizacyjny, utrudniający skuteczną ingerencję farmakologiczną. Jak pokazują badania, aktywacja wiążąca się z fosforylacją kinaz Jak1, Jak2 i Tyk2 powoduje nie tylko przenoszenie sygnału w obrębie samej ścieżki Jak/Stat, ale też aktywację ścieżek ERK i JNK (68), zaś aktywne czynniki STAT aktywują ścieżkę MAPK (4). Ponadto, same czynniki STAT mogą być aktywowane na drodze pobudzenia receptorów innych niż dla cytokin (44, 111). Aktywacja ścieżki Jak/Stat, stanowiącej podstawowy mechanizm sygnalizacji większości cytokin w komórce (81, 87), związana jest nie tylko z procesem zapalnym, ale też odpowiedzialna jest za postępujące włóknienie i sklerotyzację kłębuszkową w FSGS (87). W badaniach *in vitro* wykazano, że zastosowanie selektywnych inhibitorów poszczególnych elementów ścieżki Jak/Stat powoduje spadek białkomoczu, obniżenie ekspresji alfa-aktyny mięśni gładkich α -SMA, będącej markerem fenotypu miofibroblastycznej komórki i której obecność uznawana jest za punkt kluczowy w rozwoju chronicznego włóknienia, a także zmniejszenie nacieku limfocytów i makrofagów, w czasie do 2 tygodni. Obserwowano też hamowanie ekspresji kolagenów, TGF- β 1, MCP-1, RANTES i ICAM-1, przy czym MCP-1 i ICAM-1 były aktywowane przez ścieżkę Jak/Stat bezpośrednio, jako że promotory ich genów zawierają obszary wiązania dla czynników STAT (86). Hamowanie nadmiernej aktywności ścieżki spowalniało więc progresję choroby kłębuszkowej w sposób bezpośredni, ograniczając naciek komórek zapalnych i hamując ekspresję wydzielanych przez nich mediatorów stanu zapalnego i włóknienia nerki, a tym samym pośrednio obniżało poziom białkomoczu.

Naturalnymi inhibitorami sygnałów przenoszonych przez ścieżkę Jak/Stat w komórce są białka SOCS i stanowią one klasę czynników o najszerszym działaniu hamującym spośród wszystkich inhibitorów ścieżki (150). Podobnie jak w przypadku pozostałych elementów ścieżki, działanie białek SOCS rozciąga się poza kaskadę Jak-Stat. Wykazano m.in., iż niektóre receptory cytokinowe mogą indukować SOCS bez udziału czynników STAT, co więcej, ekspresja mRNA czynników SOCS może być wzbudzana również przez receptory nie należące do rodziny receptorów cytokinowych, np. przez lipopolisacharyd, ligandy wiążące się z receptorami TLR, czy poprzez receptor Fc γ R dla klasy przeciwciał IgG (43, 55, 80, 82). Inni badacze donoszą, iż SOCS mogą rekrutować w obrębie kinaz Jak białka spoza ścieżki (150), zaś odcinki na końcu N łańcucha białkowego SOCS warunkują rozpoznanie odpowiednich domen innych czynników i umożliwiają im interakcję z innymi ścieżkami,

m.in. ze ścieżką działania insuliny, ścieżką NF-κB, ścieżką MAPK i ścieżką Grb/Ras (28, 55, 82, 150). Uważa się, iż białka SOCS są istotnymi regulatorami sygnalizacji i dróg aktywacji wielu wewnątrzkomórkowych ścieżek działania cytokin (121, 122). Dlatego też zaburzenia w działaniu czynników SOCS mogą odgrywać szczególnie istotną rolę zarówno w działaniu samej ścieżki Jak/Stat i regulacji procesu zapalnego, jak i działania szeregu innych ścieżek, a przez to utrzymaniu homeostazy i fizjologicznego stanu pobudzenia i reaktywności komórki.

Znanych jest wiele przykładów schorzeń, w których białka SOCS pełnią istotną rolę w przebiegu choroby. Wykazano m.in., iż SOCS3 może pełnić funkcję czynnika ochronnego w przypadku miażdżycy, zapalenia okrężnicy i innych chorób zapalnych (49, 104, 122), zaś hamowanie działania SOCS1 i SOCS3 w nerkach powodowało zaostrzenie choroby, powodując zwiększoną wrażliwość i odpowiedź komórek na działanie mediatorów zapalnych (61). Także Egan i in. (39) wykazali zaangażowanie SOCS1 w regulację zapalenia stawów w mysim modelu choroby, w którym całkowity knock-out genu korelował z bardziej surowym przebiegiem choroby. Co więcej, obserwuje się również wycieszenie ekspresji niektórych białek SOCS w wielu nowotworach, w tym obniżenie poziomu ekspresji SOCS1 w guzach litych i nowotworach hematologicznych (28) oraz w raku szyjki macicy, na skutek nadmiernej metylacji promotora SOCS1, przy czym stopień hipermetylacji promotora postępował wraz z zaawansowaniem choroby (142). Dowiedziono również roli ochronnej SOCS3 i SOCS1 w raku okrężnicy, a także zwiększonej metylacji promotora SOCS1 w szpiczaku mnogim i promotora SOCS3 w raku płuc (170).

Większość badań skupia się jednak nad rolą SOCS jako czynników ofensywnych w wielu schorzeniach. Wykazano m.in. podwyższony poziom SOCS1 i SOCS3 w komórkach krążących u chorych z krańcową niewydolnością nerek (122) oraz w reumatoidalnym zapaleniu stawów (28) i toczniu rumieniowatym (SLE) (104), a także związek podwyższonego poziomu SOCS2 i SOCS3 w oporności na hormon wzrostu i upośledzeniu wzrostu u dzieci (44, 154). Inni badacze (82, 121) zasugerowali z kolei, iż podwyższona ekspresja SOCS1 i SOCS3 w wątrobie prowadzi do nietolerancji glukozy i systemowej oporności na insulinę, zaś u chorych z przewlekłą chorobą nerek obserwowano podwyższoną ekspresję SOCS3 w monocytach i SOCS1 w limfocytach, przy czym poziom obydwu czynników korelował z pogorszeniem stanu nerek (121, 137). Na podstawie innych badań, prowadzonych na szczurzym modelu FSGS, badacze wskazali na związek wysokiej ekspresji mRNA i białka STAT1 z uszkodzeniem podocytów oraz podwyższonego poziomu STAT3 i jego ufosforylowanej aktywnej formy w komórkach kanalików nerkowych, zaś zmianom w

poziomie obydwu czynników transkrypcyjnych towarzyszyły zmiany w poziomie białek SOCS1 i SOCS3 (87). Sugeruje to, iż kanaliki nerkowe i podocyty mogą być pierwotnym miejscem powstawania odpowiednio STAT3 i STAT1, a tym samym aktywacji ścieżki Jak/Stat w nerce. Ponadto, wysoki poziom ekspresji STAT3 i SOCS3 korelował z ostrością takich chorób jak: choroba Crohna i zespół wrzodziejącego jelita, astma, atopowe zapalenie skóry czy alergie (3, 78, 113). Wykazano również ciągłą ekspresję SOCS3 w przewlekłej białaczce mieloidalnej i chłoniaku, co czyni białka SOCS doskonałym celem dla leków w kierunku regulacji aktywności ścieżek sygnalizacyjnych, a także rozumienia mechanizmów samej choroby (3). Niewątpliwie jest zaangażowanie ścieżki Jak/Stat w patomechanizmy i progresję wielu chorób nerek, w tym nefropatii cukrzycowej czy toczniowej, przewlekłej choroby nerek, krańcowej niewydolności nerek czy idiopatycznego zespołu nerczycowego, zaś właściwa regulacja czasu i intensywności działania tej ścieżki warunkuje utrzymanie komórki w stanie fizjologicznego pobudzenia i hamowania sygnalizacji mediatorów wewnątrzkomórkowych.

Jak pokazują ostatnie badania (112), nieprawidłowa regulacja negatywna ścieżki Jak/Stat stanowić może również jeden z mechanizmów zaangażowanych w rozwój steroido-oporności u dzieci z IZN. Badacze zanotowali podwyższony poziom ekspresji elementów ścieżki, w tym kinaz Jak, czynników STAT i SOCS, a także szeregu czynników zapalnych, w tym interelukin, czynników wzrostu i receptorów w grupie pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną. Po 6-tygodniowej terapii steroidowej, pacjentów podzielono na grupę steroido-wrażliwych i steroido-opornych i zaobserwowano, iż w grupie SWZN poziom ekspresji wszystkich analizowanych czynników spadł do poziomu porównywanego z grupą kontrolną, sugerując normalizację procesu zapalnego, zaś w grupie pacjentów SOZN ekspresja czynników SOCS3 i SOCS5 utrzymywała się wciąż na wysokim poziomie, przy spadku ekspresji pozostałych elementów. Co więcej, zanotowano podwyższony poziom SOCS3 w monocytach i SOCS5 w leukocytach, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, zaś ekspresja tych czynników korelowała z utrzymującym się białkomoczem w badanej grupie chorych. Sugeruje to odmienną regulację ekspresji SOCS3 i SOCS5 w grupie pacjentów steroido-opornych, jako że poziom czynników transkrypcyjnych STAT dla tych inhibitorów znajdował się na fizjologicznym poziomie porównywalnym z grupą kontrolną. Mechanizmy regulacyjne dla ekspresji białek SOCS mogą obejmować przypuszczalnie zaangażowanie innych czynników indukujących bądź chroniących przed degradacją, a także zmiany w sekwencji samych genów *SOCS3* i *SOCS5*, wpływające na ciągłą ich ekspresję w

badanej grupie chorych. Szereg innych badań dowodzi, iż czynniki SOCS mogą być wzbudzone przez ligandy nie działające poprzez aktywację ścieżki Jak/Stat (28, 43, 115) oraz, że mogą one stanowić substraty dla enzymów działających poza tą ścieżką (53). Wykazano m.in., że SOCS3 jest substratem dla działania kinazy tyrozynowej indukowanej przez kompleksy immunologiczne (IC) w nerkach, co podtrzymuje aktywację ścieżki MAPK przez SOCS3, a tym samym czyni go niewrażliwym na działanie inhibitora syntezy białek, sugerując wczesną i szybką indukcję SOCS3 przez IC (55). Z drugiej strony, istnieją doniesienia (43, 78) o tym, iż fosforylacja SOCS3 przez kinazy powoduje spadek jego ilości i czasu półtrwania w komórce, zaś uprzednie związanie się nieufosforylowanego SOCS3 z elonginą-BC, w procesie kierowania elementów regulowanych przez SOCS3 na szlak ubiquitynacji, stabilizuje SOCS3 i chroni przed degradacją. Autorzy wykazali również, że ewentualna mutacja i brak Lys-6 w łańcuchu białkowym SOCS3 czyni go opornym na proteolityczną degradację. Dowiedziono także, iż SOCS2 może regulować degradację innych białek SOCS, w szczególności SOCS1 i SOCS3, przypuszczalnie poprzez oddziaływanie z odpowiednimi domenami pomiędzy białkami (43, 82). Analiza sekwencji części kodującej SOCS3 w niniejszej pracy nie wykazała jednak zmian mutacyjnych u pacjentów w żadnej z badanych grup, zaś u jednego pacjenta z grupy SOZN zidentyfikowano jedną mutację w części 3'UTR. Mutacja ta posiadała status heterozygoty i pozostała prawdopodobnie bez wpływu na podwyższony poziom ekspresji SOCS3 u tego pacjenta, jako że nie występowała u pozostałych pacjentów z grupy.

W związku z badaniami Ostalskiej-Nowickiej i wsp. (112) warto zauważyć, że także inni autorzy wskazują na czynniki SOCS3 i SOCS5 jako na potencjalne cele terapeutyczne w chorobach przebiegających z dysfunkcją immunologiczną (33, 43). Uważa się, że czynniki SOCS - ogólnie - są związane z aktywacją komórek jednojądrzastych (PBMC) w procesie zapalnym w chorobach nerek i uznawane są za główne czynniki regulujące i odpowiedzialne za przeżycie limfocytów i monocytów (122). Co ciekawe jednak, to właśnie czynniki SOCS3 i SOCS5 zostały wielokrotnie opisane jako swoiste markery dojrzewania i różnicowania dwóch odmiennych populacji limfocytów T pomocniczych (Th): Th₁ i Th₂. Wczesne etapy odpowiedzi immunologicznej inicjują aktywację m.in. limfocytów T i produkcję cytokin, które w odpowiedzi determinują dalsze różnicowanie limfocytów w kierunku Th₁ lub Th₂, wykazujących specyficzne profile cytokinowe (135). Niezróżnicowane limfocyty T (CD4+) produkują niewielkie ilości białek SOCS, ale ich różnicowanie w kierunku jednego z dwóch fenotypów pociąga za sobą znaczne zmiany w poziomie ekspresji odpowiednich typów

czynników SOCS. Komórki, które mają stać się limfocytami Th₁, produkują zwiększoną ilość SOCS5, zaś te, które różnicują się w kierunku limfocytów Th₂, produkują SOCS3 w ilościach ponad 20 razy większych, aniżeli ma to miejsce w limfocytach Th₁, przy czym ilości SOCS3 w komórkach Th₁ są praktycznie niewykrywalne (33, 40). Dlatego też SOCS3 jest markerem fenotypu charakterystycznego dla odpowiedzi typu humoralnego Th₂, zaś SOCS5 – dla fenotypu odpowiedzi typu komórkowego Th₁ (33, 40, 126). Pomiedzy limfocytami Th₁ i Th₂ istnieje pewien antagonizm, co oznacza, iż cytokiny i mechanizmy regulujące ich sygnalizację w jednym typie wpływają ujemnie na rozwój drugiego, a antagonizm tego oddziaływania wyklucza jednoczesne pobudzenie obydwu typów odpowiedzi (71). Subpopulacja Th₁ charakteryzuje się wydzielaniem dużych ilości m.in. IL-2 i IL-12, których sygnalizacja odbywa się na drodze aktywacji odpowiednio STAT5 i STAT4, natomiast fenotyp Th₂ pobudzany jest przez produkcję zwiększonych ilości IL-4, IL-5 i IL-13 (135). Regulacja pomiędzy fenotypami Th₁ i Th₂ nie jest jednak wynikiem obniżenia pierwotnej ekspresji interleukin, ale wynikiem funkcjonalnych zmian na drodze hamowania działania cytokin, regulowanego właśnie przez czynniki SOCS. Wykazano, że aktywacja STAT6 pod wpływem działania IL-4 jest selektywnie osłabiona w subpopulacji Th₁ wskazując na to, iż status receptora dla IL-4 (IL-4R) podczas początkowej indukcji różnicowania komórek ma decydujący wpływ na dojrzewanie limfocytów Th₁ (135). Badania pokazują, iż dzieje się to przypuszczalnie za sprawą SOCS5, który wiąże się bezpośrednio do cytoplazmatycznego regionu receptora IL-4R α , co sugeruje, że jest on specyficznym substratem dla SOCS5, a wiązanie to redukuje rekrutację kinazy Jak1 do receptora IL-4 i hamuje powstawanie fenotypu Th₂, promując odróżnicowanie limfocytów naiwnych w kierunku Th₁ (3). SOCS3 natomiast w głównej mierze blokuje sygnalizację IL-12, działającej przez STAT4, promując w ten sposób fenotyp Th₂ (43, 78).

Szereg badań ukazuje jednakże, że w utrzymaniu homeostazy pomiędzy obiema subpopulacjami komórek bierze również aktywny udział białko SOCS1, choć jego rola w tym procesie nie jest do końca jednoznaczna. W odróżnieniu od SOCS3 i SOCS5, ekspresja SOCS1 zachodzi zarówno w limfocytach Th₁, jak i Th₂, niemniej SOCS1 ulega szczególnie wysokiej ekspresji tylko we frakcji Th₁, regulując jej różnicowanie w sposób negatywny. Wykazano, iż SOCS1 hamuje specyficznie sygnalizację IFN- γ w limfocytach Th₁ nawet silniej niż SOCS3, co w efekcie, na drodze klasycznego sprzężenia zwrotnego, ogranicza także sygnalizację IL-12, aktywującej STAT1 - podobnie jak IFN- γ , choć sama jej sygnalizacja nie prowadzi pierwotnie do wzbudzenia SOCS1. Doświadczalnie wykazano

ponadto, że knock-out genu SOCS1 powoduje nadwrażliwość komórek zarówno na IFN- γ , jak i na IL-12, a tym samym przesunięcie równowagi w kierunku fenotypu Th₁ (43, 78). Inni badacze wykazali jednak, iż SOCS1 w pewnym stopniu może również promować różnicowanie komórek Th₁ na drodze hamowania w nich aktywacji STAT6, zależnej od IL-4. Wykazano bowiem, że SOCS5 hamuje aktywację STAT6 i sygnalizację IL-4 efektywnie i samodzielnie tylko w komórkach Th₂, zaś w komórkach Th₁ działanie to objawia się z mniejszą siłą, dlatego sugeruje się, iż to właśnie SOCS1 stanowi w tym procesie czynnik pomocny dla SOCS5. Oddziaływanie to potwierdziły badania Alexander i Hilton (3), którzy wykazali, iż podwójny knock-out SOCS1 i jednego z dwóch czynników STAT – STAT4 lub STAT6, regulowanych przez SOCS1, wykazuje efekt ochronny na komórki przed szkodliwym działaniem cytokin, wykorzystujących do sygnalizacji odpowiednie białka STAT. Innym mechanizmem bezpośredniej promocji fenotypu Th₂ przez SOCS1 jest sygnalizacja IL-6, wydzielanej w dużych ilościach przez same limfocyty Th₂. IL-6 indukuje w nich jednocześnie SOCS3 i SOCS1, który zwrotnie hamuje sygnalizację IFN- γ (78). Pomimo, iż wykazano, że nadmierna ekspresja SOCS3 może hamować zwrotnie sygnalizację IFN- γ , w odróżnieniu od SOCS1 nie jest jego specyficznym inhibitorem, zaś efekt pobudzenia jednego z nich nie może być zastąpiony przez pobudzenie drugiego (3). Istnieje również teoria o krzyżowym hamowaniu przez SOCS1 sygnalizacji zarówno IFN- γ , jak i IL-4, co dowodzi tego, iż SOCS1 działa jak łącznik pomiędzy dwoma odmiennymi typami komórek Th, łącząc ścieżki sygnalizacyjne cytokin, nawet tych o przeciwstawnych efektach działania (154). Ciekawym aspektem pobudzenia immunologicznego w kontekście regulacji działania cytokin jest również zjawisko steroido-oporności, jako że wykazano, iż to same cytokiny i ich wzajemne oddziaływania mogą indukować oporność na steroidy (25). Wykazano bowiem, iż współdziałanie IL-2 i IL-4 może powodować lokalną oporność na glikokortykosteroidy w postaci obniżonej zdolności wiązania leku przez receptor steroidowy (GR) w limfocytach T, przy czym żadna z tych cytokin pojedynczo nie indukuje takiego zjawiska. W tym samym badaniu dowiedziono, że analogiczny efekt, ale w monocytach, wywołuje IL-13 (16). Co więcej, inne badania sugerują (11), iż w podocytach dochodzi do ekspresji receptora dla IL-4 i IL-13, a ich aktywacja przez cytokiny może prowadzić do uszkodzenia błony szczelinowej i skutkować białkomoczem.

Pomimo, iż nadal nie jest do końca pewne, czy aktywacja limfocytów T stanowi skutek czy przyczynę choroby, skorelowano pobudzenie określonych frakcji limfocytów T w zależności od ostrości przebiegu IZN czy obecności nawrotów i remisji białkomoczu.

Niektórzy autorzy uważają, iż steroido-wrażliwość wiąże się z aktywacją limfocytów T i rozwojem procesu zapalnego, skutkującymi wyższym poziomem pobudzenia układu immunologicznego w porównaniu z pacjentami steroido-opornymi, ale jednocześnie dobrą odpowiedzią na klasyczne leczenie immunosupresyjne i pomyślną prognozą (167). Ci sami autorzy sugerują jednocześnie, że około 3-krotnie niższy poziom czynników zapalnych obecnych w moczu pacjentów steroido-opornych w porównaniu z -wrażliwymi świadczyć może o nieimmunologicznej etiologii SOZN. Duża część autorów podkreśla jednak rolę prawidłowego zrównoważenia populacji komórek efektorowych i regulatorowych w przebiegu IZN w kontekście rokowania dla pacjentów (7, 23, 81, 173), jako że upośledzone funkcjonowanie limfocytów T regulatorowych (T_{reg}) u pacjentów z MCD uniemożliwia właściwą regulację limfocytów T efektorowych (T_{eff}), a tym samym skutkuje wzmożoną produkcją cytokin. Co więcej, w trakcie nawrotów obserwowano - pomimo porównywalnych ilości - obniżoną zdolność limfocytów T_{reg} do hamowania limfocytów T_{eff} , przypuszczalnie za sprawą działania IL-10, produkowanej w dużych ilościach przez pobudzone komórki T_{reg} , a której ilość jest obniżona u pacjentów z MCD (7). Rolę IL-10, jako potencjalnego czynnika w steroido-oporności, wydzielanej głównie przez frakcję limfocytów Th_2 , potwierdzili też inni autorzy (17). Powszechna jest opinia, że immunosupresyjne działanie glikokortykosteroidów opiera się w głównej mierze na hamowaniu odpowiedzi typu Th_1 , a tym samym pośrednim promowaniu fenotypu Th_2 , bądź bezpośrednio na drodze promowania komórek naiwnych do odróżnicowywania się w kierunku Th_2 (119). Dlatego też zjawisko steroido-oporności może tłumaczyć zaburzenie homeostazy pomiędzy tymi dwoma frakcjami i przesunięcie równowagi w przeciwnym kierunku, z fenotypu Th_2 w kierunku Th_1 , pomimo stosowania steroidów (145). Badania (23) nad spektrum cytokin ulegających ekspresji w IZN dostarczyły informacji o przesunięciu odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th_1 u pacjentów z FSGS nie odpowiadających na leczenie steroidowe oraz w trakcie nawrotów, podczas gdy długotrwała remisja związana była fenotypem Th_2 . Podobną zależność notowali także inni autorzy (27, 145), którzy donieśli o dominacji fenotypu Th_2 u pacjentów steroido-wrażliwych i fenotypu Th_1 u pacjentów steroido-opornych, zaś Lama i in. (79) zalecają monitorowanie wzajemnego stosunku ilościowego obydwu frakcji jako wskaźnika odpowiedzi na terapię steroidową. Doniesienia te potwierdzają również badania Zachwieja i wsp. (172), którzy zaobserwowali rolę IL-2 w patogenezie IZN. Interleukina ta powodowała nieprawidłową ekspansję limfocytów Th_1 , które były przypuszczalnie źródłem krążących limfokin, mogących wpływać na przepuszczalność kłębuszkowej bariery dla białek (47). Ponadto, podwyższony poziom IL-2 był wyznacznikiem nawrotów białkomoczu i ostrych epizodów IZN u dzieci, zaś IL-4,

promująca fenotyp Th₂, łagodziła tworzenie pólksiężyców w nerkach i obniżała białkomocz (79, 158). W czasie nawrotów IZN obserwowana była też represja receptora dla IL-12, co sugeruje wczesną aktywację limfocytów CD4⁺ w kierunku fenotypu Th₂ (23). Wydaje się, że nawroty IZN i oporność na steroidy związane są z profilem Th₂ również ze względu na częste alergie i choroby atopowe towarzyszące IZN, a których markerem jest głównie czynnik SOCS3 (23, 40).

Zaburzenia w homeostazie limfocytów T wynikać mogą również z nieprawidłowej ich regulacji przez krążące limfocyty B i zakłóceń w komunikacji pomiędzy nimi, choć nadal to limfocyty T pozostają frakcją o decydującym znaczeniu dla patofizjologii schorzenia (42). Udział limfocytów B w patogenezie i oporności na steroidy w IZN potwierdza m.in. zastosowanie przeciwciała monoklonalnego anty-CD20, specyficznego dla antygeny obecnego wyłącznie na limfocytach B. Okazało się ono skuteczne nie tylko w leczeniu pacjentów steroido-opornych i steroido-zależnych, ale także w przypadku pacjentów, którzy nie odpowiadali na pozostałe leki immunosupresyjne (42). Także zmiany w ilości i rodzaju wytwarzanych przez limfocyty B immunoglobulin wpływają przypuszczalnie na fenotyp i przebieg choroby. Notowano spadek ilości przeciwciał klasy IgG, a także spadek stosunku IgG:IgM u pacjentów z częstymi nawrotami oraz opornymi na steroidy (127). Wykazano też, iż IL-4 i IL-5 wraz z czynnikiem transkrypcyjnym IRF4 (znanym też jako MUM1) pełnią rolę przełączników klasy przeciwciał z IgG na IgE, wytwarzanych przez limfocyty B, (23, 71, 172). Wykazano, że w proces ich dojrzewania zaangażowany jest m.in. czynnik SOCS1 (3, 99) oraz, że podniesiony poziom IgE towarzyszył nawrotom u pacjentów z IZN z rozpoznaniem MCD, co według autorów badań może służyć za marker nawrotów lub samej steroido-oporności (133). Pozostaje to w pewnej sprzeczności z większością doniesień o ochronnej roli IL-4 i dominacji fenotypu Th₂ u pacjentów wrażliwych na terapię steroidową. Z drugiej jednak strony świadczyć może o pobudzeniu obydwu typów odpowiedzi immunologicznej równocześnie, co sugeruje związek zarówno aktywności Th₁, jak i Th₂, z nawrotami białkomoczu i opornością na steroidy.

Teorię takiej jednoczesnej, pozornie wykluczającej się, aktywacji potwierdziły doniesienia innych autorów (8), według których patofizjologia IZN czy remisje nie zawsze charakteryzują się związkiem z frakcją komórek Th₂. Zasugerowali oni, iż za zmienny poziom ekspresji cytokin w surowicy nie zawsze odpowiadają tylko i wyłącznie limfocyty T, jako że może on być również wynikiem aktywności pozostałych typów komórek, w tym monocytów, komórek dendrytycznych i eozynofików, rodzajem mitogenu użytego do

stymulacji cytokin *in vitro*, a także czasem inkubacji. Ponadto, wykazali oni, iż brak jest jednego specyficznego profilu cytokinowego Th₁ lub Th₂ u pacjentów w remisji lub w nawrocie, a co więcej, zaobserwowali podwyższony poziom jednocześnie IFN- γ i IL-4 u niektórych pacjentów w trakcie remisji, co sugeruje obecność obydwu tych fenotypów równocześnie (8). Uzyskane przez Ostalską-Nowicką i wsp. (112) wyniki podwyższonej ekspresji SOCS3 i SOCS5, będących markerami przeciwstawnych frakcji limfocytów Th, u pacjentów steroido-opornych, świadczyć mogą zatem o zaburzeniach w trakcie pobudzenia układu immunologicznego i w jego regulacji w tej grupie chorych.

Wspomniana interakcja wydzielanych lokalnie cytokin pomiędzy sobą i sam stan zapalny mogą indukować zjawisko steroido-oporności, ale także bezpośrednio oddziaływanie cytokin na ścieżkę receptora GR dla leków steroidowych może interferować z jego translokacją do jądra komórkowego i zakłócać prawidłowe działanie (114). Wspomniany efekt indukcji steroido-oporności przez łączne działanie IL-2 i IL-4 zachodzi przypuszczalnie na drodze obniżenia zdolności wiązania glikokortykosteroidów (Gk) przez właściwy im receptor GR (72). Co ciekawe, badacze zauważyli, iż zjawisko to może być odwracalne, gdyż komórki PBMC, od pacjentów ze steroido-oporną astmą, hodowane *in vitro* w surowicy bez obecności IL-2 i IL-4 z powrotem uzyskują zdolność wiązania Gk przez GR. Warto też zwrócić uwagę, że w badanej grupie pacjentów ze steroido-oporną astmą obserwowano podwyższony poziom obydwu interleukin, co potwierdza jednoczesne pobudzenie odpowiedzi Th₁ i Th₂. Inni autorzy (54) zaobserwowali, iż kombinacja IL-2 i IL-4 u pacjentów ze steroido-oporną astmą indukuje w limfocytach T zwiększoną ekspresję GR β , będącego postacią nieaktywną receptora, powstającą na drodze alternatywnego splicingu, działającą jak dominująca forma negatywna dla fizjologicznej formy GR α . Wzrost ten jednak był zbyt mały, by móc indukować silny efekt steroido-oporności, musiały więc uczestniczyć w nim także inne mechanizmy (54). Z drugiej strony Bantel i in. (13) sugerują, iż nadmierna i wzajemnie napędzająca się ekspresja cytokin przy niewystarczającej ilości GR α są wystarczające w indukcji nawet silnej steroido-oporności.

Czynnikiem istotnym w kwestii pomiaru ilości aktywnego GR α i ekspresji cytokin wydają się być frakcje badanych komórek. Autorzy wskazują na to, iż u różnych pacjentów, w przypadku różnych chorób i ich steroido-opornych fenotypów, występują odmienne poziomy ekspresji receptora GR i jego zdolności wiązania leku w zależności od typu komórek (36). Golevai wsp. (54) obserwowali szczególnie wysoką ekspresję formy GR β w neutrofilach i 73-krotnie wyższy stosunek do GR α w porównaniu z komórkami PBMC, a

może to wynikać z podwyższonego poziomu IL-8 w neutrofilach, wspomagającej przetrwanie nieaktywnej formy GR β w trakcie stosowania leków steroidowych. Według Du i wsp. (36) wrażliwość GR na działanie Gk w przebiegu SLE może być odmienna w limfocytach i monocytach, a tym samym wpływać na ich efektywność. Inni autorzy sugerują zaś, iż steroido-oporność związana z limfocytami T jest nabyta i jest efektem funkcjonalnych zmian, jako że wszystkie komórki posiadają ten sam gen dla GR (72).

Stosunkowo niewiele jest doniesień na temat korelacji poziomu i zdolności wiązania cząsteczek leku przez GR u pacjentów z IZN oraz porównań tych danych pomiędzy pacjentami opornymi i wrażliwymi na działanie steroidów, zaś wyniki tych badań nie są jednoznaczne. Bagdasarova i in. (10) notowali obniżoną ilość receptorów GR u pacjentów SOZN w porównaniu z grupą SWZN, choć badania innego zespołu (27) nie potwierdziły tych wyników, nie otrzymując istotnych różnic w ilości GR i ich zdolności wiązania w grupie pacjentów steroido-opornych, -wrażliwych oraz grupie kontrolnej. Także zespół Harada i wsp. (60) nie obserwował różnic w ilości i zagęszczeniu receptorów GR na powierzchni komórek PBMC, choć średnia ilość receptorów była nieznacznie niższa w grupie chorych z zespołem nerczycowym. Nie notowali oni też korelacji ilości GR z obrazem histopatologicznym, choć według innych autorów (58) schorzenia leżące u podstawy IZN mogą być jedną z przyczyn w rozbieżności w wynikach. Do pozostałych należą m.in. podawanie leków steroidowych pacjentom przed badaniem, które mogą zakłócać ekspresję GR i wpływać na wynik, czy fakt, iż same glikokortykosteroidy mogą zmniejszać ilość GR komórce (16, 27). Wykazano, iż wysokie i przedłużające się dawki egzogennych steroidów mogą indukować steroido-oporność (58). Co więcej, bardziej wiarygodnym wskaźnikiem aniżeli ogólna liczba receptorów GR wydaje się być przeliczenie ich ilości na pojedynczą komórkę oraz poziom ich ekspresji, a tym samym efektywności, jako że wysoki poziom GR w komórce nie zawsze wskazuje na pozytywną odpowiedź na leczenie i dobrą prognozę (36).

Szereg doniesień na temat steroido-oporności w kontekście działania receptora GR dotyczy również zmian w samym receptorze i interakcji jego ścieżki z innymi kaskadami sygnalizacyjnymi w komórce. Wykazano, iż transkrypt dla GR ulegać może alternatywnej inicjacji translacji i, poza standardowo występującymi formami GR α i GR β , generować może dodatkowe izoformy, przypuszczalnie różne w zależności od tkanki czy rodzajów komórek (141). Inne badania dowiodły zaś obecności mutacji punktowej w genie dla GR w obrębie domeny wiążącej DNA, u pacjentów ze szpiczakiem mnogim, co skutkuje ekspresją skróconej formy GR o małej stabilności i wyraźnie niższej zdolności wiązania Gk (16).

Niemniej jednak, liczba genów w komórce, na które oddziałują glikokortykoidy, sięga nawet 100, a potencjalne współdziałanie na drogach ich sygnalizacji stwarzają okazje do skomplikowanych i nie zawsze jednoznacznych interakcji. Do ścieżek, z którymi oddziaływanie GR badane jest najczęściej w kontekście oporności na steroidy, należą m.in.: ścieżki pro-zapalne NF- κ B i AP-1, ścieżka MAPK, JNK i Jak/Stat. Wykazano, iż wraz z aktywacją ścieżek NF- κ B i AP-1 w komórce malał stopień wiązania aktywowanego GR do DNA u pacjentów z zespołem nerczycowym, zaś sama aktywność tych ścieżek była u pacjentów podwyższona i notowano zwiększone wiązanie obydwu czynników do DNA (26, 141). Ten sam zespół badawczy wykazał również, że stosowanie leków steroidowych hamowało działanie ścieżek NF- κ B i AP-1 zarówno już zaktywowanych, jak i transkrypcję nowych czynników. Notowano silną korelację pomiędzy stopniem aktywacji ścieżek NF- κ B i AP-1 z wielkością białkomoczu, jednak nie do końca wiadomo, czy białkomocz stanowi pierwotną czy wtórną przyczynę aktywacji prozapalnych ścieżek (26). Warto jednak zauważyć, iż większość cytokin zaangażowanych w proces zapalany i przypuszczalną indukcję steroido-oporności w IZN regulowana jest transkrypcyjnie przez obydwie ścieżki, a zwór ich aktywacji może być odmienny u pacjentów wrażliwych i opornych na steroidy (141). Jak wynika z badań, GR współzawodniczy w jądrze komórkowym z czynnikiem NF- κ B o wspólne koaktywatory (16, 114), choć istnieją również hipotezy, jakoby represja NF- κ B przez Gk była niezależna od koaktywatorów i zachodziła głównie poprzez zmiany w acetylacji histonów czynnika zapalnego. Zespół Bantel i wsp. (13) wykazał też zwiększony stopień wiązania GR z AP-1, u pacjentów ze steroido-oporną astmą w porównaniu z grupą reagującą na leczenie, co prawdopodobnie związane było ze zwiększoną ekspresją jednej z podjednostek białka AP-1 – c-Fos i zwiększoną fosforylacją innej podjednostki – c-Jun. Przypuszczalnie też synergistyczne działanie IL-2 i IL-4 w indukcji steroido-oporności wiązać się może z mechanizmem wzbudzania ekspresji AP-1, wiążącego i dezaktywującego GR (72). Ponadto, wykazano, iż u pacjentów z astmą sama IL-2 zapobiegała translokacji GR do jądra komórkowego (54, 20) indukując oporność na Dexametazon, zaś zastosowanie samej IL-4 nie obniżało wrażliwości na lek. Przypuszczalnym mechanizmem ograniczającego działania IL-2 na odpowiedź na steroidy jest pobudzanie STAT5 na drodze sygnalizacji tej cytokiny. Wielu autorów wykazało interakcję GR ze ścieżką Jak/Stat poprzez czynniki transkrypcyjne STAT, w tym głównie STAT5. Obserwowano, iż GR pełni funkcję koaktywatora dla STAT5, a formowanie przez nie heterodimerów w jądrze komórkowym wzmagало aktywność transkrypcyjną STAT5 oraz chroniło go przed de fosforylacją, zmniejszając tym samym podatność STAT5 na degradację i wydłużając jego czas półtrwania

(54, 169). Co ciekawe, GR łączy się także z innymi, powstałymi na drodze alternatywnego splicingu, formami STAT5, które wzbudzają transkrypcję genów docelowych tylko po związaniu z klasycznymi formami. Jednak w formie ufosforylowanej aktywnie łączą się one do DNA i oddziałują dłużej niż klasyczne formy, co może być tym bardziej zintensyfikowane przez łączenie z GR. Istotne w oddziaływaniu GR ze STAT5 jest nie tylko wspomaganie aktywności transkrypcyjnej STAT5 przez receptor, ale również fakt, iż silna interakcja pomiędzy nimi zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, powoduje wzmoczoną akumulację STAT5 w jądrze, co potencjalnie prowadzić może do zwiększonej ekspresji genów docelowych dla STAT5, w tym czynnika SOCS5. Co więcej, interakcja GR ze STAT5 może stanowić jedną z przyczyn niewrażliwości na G κ na drodze hamowania receptora przez STAT5 (54, 114). Jego oddziaływanie na GR obejmuje m.in. ograniczanie interakcji z G κ i rozbięcie łączenia GR z DNA. Obserwowano też interakcje pomiędzy GR a innymi czynnikami STAT, m.in. STAT1, STAT3 i STAT6, ale natura i efekt tych oddziaływań nie są do końca poznane, choć przypuszcza się, że jedynie łączenie ze STAT3 wspomaga działanie samego receptora i promuje jego wiązanie do DNA, natomiast interakcja ze STAT1 prowadzić może do regulacji transkrypcji białek pośrednich na ścieżkach obydwu czynników (54, 114, 126, 141, 169). Przypuszczalnie, poprzez oddziaływania z innymi ścieżkami, elementy te mogą rekrutować większą ich ilość i integrować je na poziomie czynników transkrypcyjnych. Znane są oddziaływania ścieżki GR m.in. ze ścieżkami MAPK czy JNK, hamującymi aktywację i działanie receptora prawdopodobnie poprzez jego fosforylację (13, 141).

Inni autorzy upatrują przyczyn niedostatecznej lub braku odpowiedzi na steroidy w IZN nie tylko w ścieżce działania samego receptora, ale także w nieprawidłowościach w farmakokinetyce działania i metabolizmie glikokortykosteroidów w organizmie (16, 108). Zanotowano jak dotąd ponad 50 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genie *ABCB1* dla P-glikoproteiny, związanych ze zmianami w jej ekspresji i funkcji (30), a jej podwyższona ekspresja, kontrolowana m.in. przez NF- κ B, korelowała u pacjentów z IZN z opornością na leki steroidowe, ale też na Cyklosporynę A i Cyklofosfamid. Badano też wpływ SNP-ów w genie *CYP3A5*, biorącym udział w metabolizmie steroidów i choć nie odnotowano statystycznych istotności w otrzymanych częstościach alleli, w jednym ze SNP-ów frekwencja allelu G, powodującego powstawanie krótszej alternatywnej splicingowej formy o mniejszej aktywności enzymu, była wyższa w grupie pacjentów opornych na steroidy w porównaniu z wrażliwymi (30).

Ze steroido-opornością oraz z formą kliniczną IZN powszechnie wiązano również mutacje w genach kodujących białka podocytów i składniki kłębuszkowej błony szczelinowej. Przede wszystkim wskazywano na mutacje w genie podocyny (*NPHS2*), które występowały u 10-28% dzieci z populacji kaukaskiej ze sporadycznym steroido-opornym ZN oraz związane były z występowaniem FSGS u dorosłych (171). Inni autorzy wykazali, iż kombinacja 2 recesywnych alleli w *NPHS2* determinuje wiek wystąpienia steroido-opornego ZN, mianowicie wystąpienie przynajmniej jednej mutacji powodującej skrócenie białka podocyny lub znanej homozygotycznej missensownej mutacji R138Q prowadzi do pojawienia się SOZN jeszcze przed 2 r.ż., ale już wystąpienie mutacji R138Q w formie heterozygoty wraz z inną heterozygotyczną mutacją w *NPHS2* determinuje wystąpienie SOZN w wieku doroslejszym (22, 62, 109). Także mutacje w genie podocyny, pojawiające się niekiedy u pacjentów z rodzinnym wrodzonym ZN, wiązane były ze steroido-opornością, choć w dużym stopniu ich obecność wydaje się zależna także od pochodzenia etnicznego, jako że w populacji japońskiej u pacjentów ze steroido-opornym ZN nie notowano obecności mutacji w *NPHS2*, zaś w populacji chińskiej posiadało je zaledwie 4% badanych z tej grupy (48, 171). Mutacje w innych genach białek czy czynników transkrypcyjnych, mających udział w budowie podocytów czy utrzymaniu prawidłowej struktury błony szczelinowej obejmują m.in. zmiany w genie nefryny (*NPHS1*), fofolipazay ϵ -1 (*PLCE1*) czy lamininy- β -2 (*LAMB2*), kojarzone z pojawieniem się SOZN w wieku dziecięcym, a także rzadkie mutacje w genach dla α -aktyliny-4 (*ACTN4*) czy błonowego kanału wapniowego (*TRPC6*), korelowane z wystąpieniem SOZN w wieku dorosłym. Ponadto, mutacje w genach podocyny, nefryny, lamininy czy czynnika guza Wilmsa (*WT1*) wiązane są z samym podłożem i patofizjologią zespołu nerczycowego, przy czym szacuje się, że ich obecność wyjaśnia ponad 90% przypadków wrodzonego ZN i 66% przypadków niemowlęcego ZN (24, 54, 62, 108). Sporadycznie obserwowano również defekty genetyczne w składnikach łańcucha oddechowego mitochondriów u pacjentów z rozpoznaniem FSGS, szczególnie u starszych dzieci i osób dorosłych, przy czym uważa się, iż mutacje w mitochondrialnym DNA powinny być brane pod uwagę zwłaszcza u osób bez mutacji w nefrynie, a także u pacjentów ze steroido-opornym ZN z FSGS lub przebiegającym ze szczególnie ciężkimi objawami (53, 89).

Badania nad podłożem steroido-oporności i w ogóle reakcji na zastosowane leczenie u pacjentów w wielu chorobach dowodzą, iż większą rolę odgrywają w tej kwestii modyfikacje genetyczne w postaci polimorfizmów, w tym SNP-ów, w genach bezpośrednio lub pośrednio zaangażowanych w przebieg schorzenia. Dowiedziono m.in. związek 2 SNP-ów genie *SOCS3*

za podatnością na atopowe zapalenie skóry (41), związek obecności polimorfizmów lub przypuszczalnych zmian w poziomie metylacji promotora *SOCS1* u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (28), a także powiązanie tzw. „odwróconego polimorfizmu”, powstającego na skutek inwersji większego fragmentu, z reakcją na wziewne glikokortykosteroidy u pacjentów z astmą (155). Innym potencjalnym biomarkerem odpowiedzi na steroidy w IZN jest gen konwertazy angiotensyny (*ACE*), w którym warianty polimorfizmu typu ins/del związane są z podwyższoną ekspresją genu, korelującą ze steroido-opornością. Jednak uzyskane wyniki nie są jednoznaczne i uzależnione są w dużej mierze od populacji i pochodzenia, a ponadto polimorfizm ten może być przypuszczalnie powiązany z innymi loci genów, mających udział w rozwoju steroido-oporności (46, 132, 174). Także częstsze występowanie allelu $\epsilon 2$ w genie apolipoproteiny E (*apoE*), zaangażowanej w patogenezę i progresję uszkodzeń tkanki nerek, u pacjentów ze steroido-opornym ZN z populacji tureckiej służyć może za potencjalny czynnik prognostyczny, wymaga to jednak zweryfikowania w innych grupach etnicznych (9). Ostatnie badania (130) prowadzone na drodze sekwencjonowania exomu u 3 spokrewnionych pacjentach SOZN ujawniły także punktowe zmiany w dwóch potencjalnych czynnikach w steroido-oporności: w genie miozyny 1E (*MYO1E*), kodującej białko cytoszkieletu podocytów, oraz w genie *NEIL1*, kodującym ludzką naprawczą endonukleazę DNA, choć badania te wymagają potwierdzenia u większej ilości chorych. Istnieją także doniesienia o wpływie polimorfizmów w genach samych cytokin i czynników zapalnych, zaangażowanych w przebieg procesu zapalnego w trakcie choroby. Akalin i Murphy (2) wykazali związek SNP-ów w *IL-10* i czynnika martwicy nowotworu (*TNF- α*), mających wpływ na zwiększoną ekspresję cytokin, w odrzuceniu przeszczepów nerki i steroido-opornym fenotypie infekcji, zaś Jafar i in. (69) obserwowali istotnie częstsze występowanie określonych alleli lub genotypów w *IL-4*, *IL-6* i *TNF- α* u pacjentów z IZN oraz ich powiązanie ze steroido-opornym fenotypem. Co ciekawe, autorzy, którzy wykazali zwiększoną ekspresję *SOCS3* i *SOCS5* u pacjentów SOZN, obserwowali także towarzyszący im podwyższony poziom zaledwie dwóch czynników: *IL-6* i *IL-20* (112). Zarówno *IL-6*, jak i *IL-20*, należąca do rodziny *IL-10*, indukują powstawanie *SOCS3* w dużej ilości w monocytach, w mniejszej w limfocytach, przy czym zwrotnie przez *SOCS3* hamowana jest tylko *IL-6* (43, 121). W badaniu nie obserwowano podwyższonego poziomu pozostałych czynników zapalnych ani elementów ścieżki Jak/Stat w tej grupie chorych, przypuszczalnie więc podwyższony poziom *SOCS3* i *SOCS5* może podlegać innym niż przez cytokiny mechanizmom regulacji w grupie steroido-opornej lub wynikać ze zmian genetycznych w sekwencjach tych genów.

Analiza sekwencji genów *SOCS3* i *SOCS5*, przeprowadzona w niniejszej pracy nie wykazała jednak mutacji punktowych, mogących mieć wpływ na fenotyp schorzenia, ani też istotnych różnic w częstości występowania alleli czy genotypów w obrębie badanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. W przypadku jedynego zróżnicowanego polimorfizmu SNP w genie *SOCS3* (rs72899753), leżącego w obszarze 3'UTR genu, otrzymano wysoką wartość ilorazu szans zarówno dla allelu A (OR=2,23), jak i dla genotypu AG (OR=2,26), dla grupy pacjentów SOZN w porównaniu z grupą SWZN oraz kontrolą, jednak w żadnym z przypadków nie otrzymano istotności statystycznej ($p=1,0$). Obecność alternatywnego allelu A może jednak wiązać się z fenotypem steroido-opornym, jako że allel ten był nieobecny zarówno w grupie pacjentów steroido-wrażliwych, jak i w grupie kontrolnej. W przypadku genu *SOCS5* większość wartości OR zarówno dla alleli, jak i dla genotypów, dla analizowanych SNP-ów oscylowała wokół neutralnej wartości „1” i, podobnie jak w przypadku genu *SOCS3*, nie otrzymano istotności statystycznych. Warto jednak zauważyć, że w przypadku SNP-u rs17771838 leżącego w części kodującej eksonu2 genu *SOCS5* obserwowano częstsze występowanie allelu A w obydwu grupach chorych z ZN (OR=1,94; $p=0,6908$ dla genotypu AG i OR=1,88, $p=0,6989$ dla allelu A w grupie steroido-opornej oraz OR=2,15; $p=0,6707$ dla genotypu AG i OR=2,07; $p=0,6794$ dla allelu A w grupie steroido-wrażliwej) w porównaniu z grupą kontrolną, co pomimo braku poziomu istotności statystycznej świadczyć może o związku wystąpienia rzadszego w populacji allelu A z podwyższonym ryzykiem wystąpienia zespołu nerczykowego (OR=2,03; $p=0,4989$ dla genotypu AG i OR=1,96; $p=0,512$ dla allelu A dla grupy ZN). Potwierdzenie tego wymagałoby jednakże przeprowadzenia analiz na liczniejszej grupie chorych.

Pomimo, iż w badaniach Ostalskiej-Nowickiej i wsp. nie obserwowano podwyższonego poziomu *SOCS1* w żadnej z badanych grup po zastosowaniu terapii steroidowej, ze względu na szeroko wykazany w literaturze udział *SOCS1* w etiologii wielu chorób o charakterze zapalnym i utrzymaniu homeostazy we frakcjach limfocytów Th, w niniejszej pracy poddano analizie sekwencję także tego genu. W przypadku jednego z dwóch SNP-ów zróżnicowanych, leżącego w obszarze niekodującym 5'UTR genu *SOCS1*, o nazwie rs188754154, otrzymano wysoką wartość ilorazu szans dla allelu T (OR=2,23) i genotypu AT (OR=2,26) dla grupy SOZN w porównaniu z grupą kontrolną, a także wysokie wartości OR dla allelu T (OR=3,05) i genotypu AT (OR=3,01) dla grupy SWZN w porównaniu z grupą kontrolną, ale także i w tym przypadku nie otrzymano wartości istotnych statystycznie ($p=1,0$). Niemniej, obecność allelu T w przypadku tego SNP-u korelowała w większym stopniu z obecnością zespołu

nerczycowego aniżeli z jego fenotypem opornym lub wrażliwym na leczenie (dla grupy ZN OR=2,15 dla allelu T i OR=2,19 dla genotypu AT), jako że alternatywny allel T nie występował w grupie kontrolnej, zaś pojawiał się w obydwu grupach badanych. Co więcej, uzyskano również szczególnie niskie wartości ilorazu szans w przypadku drugiego zróżnicowanego SNP-u w genie *SOCS1* (rs11549428), leżącego w kodującym obszarze eksonu2, dla obydwu grup z ZN: dla allelu C (OR=0,19; p=0,19) i dla genotypu GC (OR=0,19; p=0,4915) dla grupy SWZN w porównaniu z grupą kontrolną oraz dla grupy SOZN w porównaniu z grupą kontrolną (OR=0,36; p=0,5735 dla allelu C oraz OR=0,35, p=0,5696 dla genotypu GC), jednak bez poziomu istotności statystycznych. Pojawienie się allelu C w obrębie tego SNP-u w obydwu grupach pacjentów z ZN (OR=0,21; p=0,2110 dla allelu C i OR=0,2; p=0,2097 dla genotypu GC w grupie ZN) może być interpretowane jako wariant ochronny pod względem choroby, z drugiej jednak strony wysokie wartości ilorazu szans dla allelu G (OR=2,8; p=0,5735 dla grupy SOZN, OR=5,17; p=0,19 dla grupy SWZN oraz OR=4,86; p=0,211 dla grupy ZN, w porównaniu z grupą kontrolną) i genotypu GG (OR=2,86; p=0,5696 dla grupy SOZN, OR=5,35; p=0,4915 dla grupy SWZN oraz OR=5; p=0,2097 dla grupy ZN, w porównaniu z grupą kontrolną), stanowiących warianty przeważające w populacji - również w grupie kontrolnej, świadczą o niejednoznaczności tego stwierdzenia i wynikać mogą ze zbyt małej liczebności grup badanych. Należy przy tym zaznaczyć, iż grupę kontrolną stanowili pacjenci bez zespołu nerczycowego, niemniej o nieznany fenotypie odnośnie odpowiedzi organizmu na działanie leków steroidowych, i były to osoby wybrane losowo z populacji pod tym względem. Co ciekawe, występowanie wariantu C zamiast allelu G w tym polimorfizmie powodowało zmianę w kodowanym aminokwasie z glutaminy na histydynę, a SNP ten znajdował się w obrębie domeny SOCS-box białka *SOCS1*. Domena ta odpowiedzialna jest za interakcję z elonginą B i C w kontekście degradacji białek związanych z *SOCS*, zaś oddziaływanie to chroni samo białko *SOCS* przed degradacją. Allel C występował jednak zarówno w grupie pacjentów SOZN, jak i w grupie kontrolnej, bez istotności statycznych pomiędzy nimi (p=0,5735). Podważa to tym samym możliwość roli allelu C w tym SNP-ie zarówno odnośnie występowania ZN, jak i odpowiedzi na leczenie. Co więcej, analiza struktury genu *SOCS1* u pacjentów steroido-opornych ujawniła całkowity brak sprzężeń pomiędzy dwoma zróżnicowanymi polimorfizmami. Struktura genu *SOCS5* wykazała natomiast całkowite sprzężenie pomiędzy dwoma SNP-ami (rs41379147 i rs41432848), leżącymi w obszarze 3'UTR genu, we wszystkich 3 grupach badanych, oraz nieco słabsze powiązania pomiędzy pozostałymi analizowanymi SNP-ami

heterozygotycznymi w genie w grupie SOZN w porównaniu z grupą SWZN i grupą kontrolną, choć żadna z wartości nie osiągała istotnego dla sprzężenia poziomu 70%.

Uzyskane wyniki świadczą o braku istotnego wpływu genetycznego podłoża w postaci polimorfizmów SNP na fenotyp steroido-oporny ZN u dzieci z populacji Wielkopolski, na podstawie przedstawionych wyników otrzymanych w badanych grupach. Warto jednak nadmienić, iż według niektórych autorów SNP-y wyjaśniają jedynie część udziału w ryzyku, a na ostateczny efekt mają także wpływ czynniki środowiskowe, które wraz z czynnikami genetycznymi współdziałają na drodze zmian epigenetycznych w kontekście fenotypu i efektów terapeutycznych (37). Według innych (131), badanie związku SNP-ów z podatnością na chorobę czy efekt leczenia jest wysoce sensowne, zwłaszcza w przypadku genów, które wykazują udział w etiologii choroby czy jej postaci. Co więcej niektórzy autorzy (35, 70) sugerują, iż sama wysoka wartość ilorazu szans dla pewnych wariantów nie jest jednoznaczna z poprawą metod klasyfikacji ryzyka. Tłumaczenie języka genetyki na wartościowe testy stosowane w codziennej praktyce klinicznej przez pacjentów i właściwe oszacowanie ryzyka są skomplikowanym procesem, niemniej identyfikacja genów czy alleli potencjalnego ryzyka wpływa przede wszystkim na poznanie patomechanizmów samego schorzenia, a to z kolei przyczynia się do poszerzenia wiedzy naukowców i lekarzy na ten temat i daje potencjalne szanse na opracowanie nowych, skuteczniejszych metod leczenia (77, 165).

Wykazana podwyższona ekspresja genów *SOCS3* i *SOCS5* w grupie pacjentów SOZN może jednak stanowić bezpośrednie potwierdzenie na udział zaburzeń w działaniu układu immunologicznego w patomechanizmach powstawania steroido-opornego fenotypu schorzenia u dzieci. Jednoczesna obecność obydwu czynników: *SOCS3* w monocytach i *SOCS5* w limfocytach na wysokim poziomie, przy równocześnie nie obserwowanej podwyższonej ekspresji pozostałych elementów ścieżki Jak/Stat, świadczyć może o nieprawidłowej aktywacji subpopulacji limfocytów Th i utrzymującym się fenotypie Th₁, pomimo stosowania immunosupresji w postaci glikokortykosteroidów. Jest to zbieżne z wynikami badań innych autorów, sugerujących, iż steroido-oporność u pacjentów z IZN jest przypuszczalnie nabyta i dotyczy w głównej mierze frakcji limfocytów T. Przypuszczalnie też mechanizm ten zachodzi na drodze niezależnej od *SOCS1*, jako że jego poziom w obydwu badanych grupach (badania Ostalskiej-Nowiciej i wsp.) nie odbiegał od poziomu w grupie kontrolnej. Jak wykazują badania, wysoki poziom ekspresji *SOCS3* przy jednoczesnej niewystarczającej ekspresji *SOCS1* wywiera niekorzystny wpływ na funkcjonowanie frakcji limfocytów T_{reg} (33). Pomimo, iż zarówno *SOCS1*, jak i *SOCS3*, mogą być wzbudzone

wprawdzie przez te same cytokiny, oraz że mogą one działać poprzez czynniki transkrypcyjne STAT charakterystyczne dla obydwu tych białek SOCS, działanie SOCS1 i SOCS3 jest specyficzne i nie może być zastąpione przez drugi czynnik w przypadku nieobecności któregoś z nich (3). Jednakże przy braku obecności większości mediatorów zapalnych w grupie pacjentów SOZN, w tym cytokin charakterystycznych dla obydwu frakcji komórek Th, a także w kontekście wyników badań niniejszej pracy, sugerujących brak jednoznacznego wpływu polimorfizmów typu SNP na fenotyp steroido-oporny, mogących służyć jako jego specyficzne markery, przypuszczalnie jedną z przyczyn podwyższonej ekspresji genów *SOCS3* i *SOCS5* mogą być zmiany w obrębie promotorów obydwu genów. Na drodze przeprowadzonych badań zidentyfikowano dwie nowe, nieznane dotąd sekwencje w obrębie promotora dla *SOCS3*: region bogaty w pary nukleotydów GC oraz motyw bogaty w nukleotydy AT, których obecność silnie korelowała z aktywnością transkrypcyjną genu. Jednocześnie usunięcie z promotora fragmentu do tej pory uznawanego za istotny dla przyłączania czynników transkrypcyjnych STAT miało niewielkie znaczenie, zaś usunięcie obydwu nowo zidentyfikowanych elementów całkowicie znosiło aktywność promotora genu *SOCS3* (115). Z kolei inni autorzy (38) wykazali, iż region bogaty w GC stanowi miejsce przyłączania czynnika transkrypcyjnego Sp3, ale nie Sp1, co dodatkowo dowodzi udziału tego pierwszego w regulacji ekspresji *SOCS3*. Dowiedziono również związku określonych alleli w polimorfizmach SNP obecnych w promotorze genu *SOCS3* z reumatoidalnym zapaleniem stawów (153) i atopowym zapaleniem skóry (41). Wykazano także bezpośrednie działanie innych niż STAT czynników na potencjalne miejsca aktywacji w promotorze *SOCS3* (44), a nawet stymulację wysepek CpG w DNA promotorowym w aktywacji *SOCS1* i *SOCS3* w makrofagach (78). Zatem potencjalne zmiany mutacyjne lub różnice w strukturze samych SNP-ów w obrębie promotorów genów SOCS o przypuszczalnym udziale w steroido-oporności mogą być przyczyną odmiennej ich regulacji transkrypcyjnej lub wpływać na angażowanie dodatkowych czynników, poza ścieżką Jak/Stat, w mechanizm ich ekspresji.

Uzyskane wyniki oraz przeprowadzona dyskusja dowodzą potencjalnej roli wybranych czynników SOCS w zjawisku steroido-oporności w idiopatycznym zespole nerczycowym u dzieci, poprzez ich przypuszczalne zaangażowanie w dystrybucję i aktywację poszczególnych subtypów komórek krążących o udokumentowanym udziale w patofizjologii schorzenia. Pomimo braku istotności statystycznych, uzyskane wyniki wskazują na pewne różnice w strukturze polimorfizmów badanych genów pomiędzy grupą steroido-wrażliwych i -opornych pacjentów z IZN, co stanowi dodatkową informację dla badaczy i pole wyjścia do dalszych

badan nad podłożem steroido-oporności oraz samego IZN u dzieci. Co więcej, coraz powszechniej uważa się, iż badania genetyczne w nefrologii dziecięcej powinny stać się standardowym postępowaniem, ukierunkowanym na poznanie mechanizmów i podstaw steroido-oporności w przebiegu ZN, a tym samym wejść na stałe do diagnostyki w tym zakresie.

6. Wnioski

- 6.1. Brak mutacji w częściach kodujących genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* w grupie pacjentów steroido-opornych, steroido-wrażliwych oraz w grupie kontrolnej może wskazywać na brak podłoża genetycznego steroido-oporności w zespole nerczycowym w kontekście zmian mutacyjnych badanych genów. Mutacja heterozygotyczna, zidentyfikowana u pojedynczego pacjenta steroido-opornego, leżąca w rejonie 3'UTR genu *SOCS3* przypuszczalnie nie miała wpływu na oporny fenotyp schorzenia w tej grupie chorych.
- 6.2. Wysokie wartości ilorazu szans dla alleli i genotypów dla polimorfizmów w genach *SOCS3*, *SOCS5* i *SOCS1*, świadczyć mogą o potencjalnym związku allelu A w polimorfizmie rs 72899753 genu *SOCS3* ze steroido-opornością oraz o związku allelu A w SNP-ie rs17771838 genu *SOCS5* i allelu T w SNP-ie rs188754154 genu *SOCS1* z występowaniem zespołu nerczycowego w badanych grupach chorych. Ze względu na brak istotności statystycznych, SNP-y te nie mogą jednak służyć jako specyficzne markery steroido-oporności w badanej grupie pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym.
- 6.3. Słabsze powiązania pomiędzy polimorfizmami rs3768720 i rs6738426 oraz rs3768720 i rs41489952 wyrażone mniejszymi wartościami R^2 w genie *SOCS5* u pacjentów steroido-opornych w porównaniu z pacjentami steroido-wrażliwymi oraz grupą kontrolną świadczyć mogą o potencjalnym zaangażowaniu genu w zjawisko oporności na glikokortykosteroidy w tej grupie chorych.
- 6.4. Genetyczne podłoże steroido-oporności w IZN u dzieci badane w oparciu o zmiany pojedynczego nukleotydu w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* nie wykazało jednoznacznego związku tych zmian ze steroido-opornym fenotypem choroby. Jednakże udział badanych genów w mechanizmie oporności na glikokortykosteroidy w tej grupie chorych jest prawdopodobny, zaś podłoże genetyczne tego zjawiska może dotyczyć zmian w częściach promotorowych badanych genów.

7. Piśmiennictwo

1. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G: How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11):2974-2984.
2. Akalin E i Murphy B: Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Op Immunol*, 2001, 13:572-576.
3. Alexander WS i Hilton DJ: The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22:503-529.
4. Alexander SW, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile T, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ: Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(4):588-592.
5. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES: Genetic mapping in human disease. *Science*, 2008, 322(5903):881-888.
6. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D: Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*, 2003, 63(2):401-415.
7. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, Garin E: T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(9):1691-1698.
8. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, Garin EH: A case of unfulfilled expectations: cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2006, 21(5):603-610.
9. Attila G, Noyan A, Bayazit AK, Acarturk E, Anarat A: Apolipoprotein E polymorphism in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2002, 17:359-362.
10. Bagdasarova IV, Ivanov DD, Afanas'eva VV: The morphofunctional characteristics of the blood lymphocytes in steroid-sensitive and steroid-resistant glomerulonephritis. *Arkh Patol*, 1991, 53(5):28-32.
11. Bagga A i Mantan M: Nephrotic syndrome in children. *Indian J Med Res*, 2005, 122(1):13-28.
12. Banaszak B, Banaszak P, Adamczyk P, Ziora K: Pierwsze ujawnienie dziecięcego zespołu nerczycowego – charakterystyka kliniczna pacjenta steroidowrażliwego i steroidoopornego. *Przegląd pediatryczny*, 2011, 4(41):147-151.
13. Bantel H, Schmitz ML, Raible A, Gregor M, Schulze-Osthoff K: Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *Faseb J*, 2002, 16(13):1832-1834.
14. Barisoni L i Mundel P: Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol*, 2003, 23(5):353-360.

15. Barnes PJ: Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 120(2-3):76-85.
16. Barnes PJ: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, 1998, 94(6):557-572.
17. Barnes PJ i Adcock IM: Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 2009, 373(9678):1905-1917.
18. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005, 21(2):263-265.
19. Berger SP i Daha MR: Complement inglomerular injury. *Semin Immunopathol*, 2007, 29(4):375-384.
20. Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, Sturm M, Bertoglio J, Pallardy M: Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(7):1062-1076.
21. Borges FF, Shiraichi L, da Silva MP, Nishimoto EI, Nogueira PC: Is focal segmental glomerulosclerosis increasing in patients with nephrotic syndrome? *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(9):1309-1313.
22. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C: NPHS2 encoding the glomerular filtration protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000, 24(4):349-354.
23. Bruneau S i Dantal J: New insights into the pathophysiology of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Immunol*, 2009, 133(1):13-21.
24. Büscher AK, Konrad M, Nagel M, Witzke O, Kribben A, Hoyer PF, Weber S: Mutations in podocyte genes are a rare cause of primary FSGS associated with ESRD in adult patients. *Clin Nephrol*, 2012, 78(1):47-53.
25. Camici M: The nephrotic syndrome is an immunoinflammatory disorder. *Med Hypotheses*, 2007, 68(4):900-905.
26. Cao C, Lu S, Dong C, Zhao R: Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16(10):790-795.
27. Carlotti AP, Franco PB, Elias LL, Facincani I, Costa EL, Foss N, Moreira AC, de Castro M: Glucocorticoid receptors, in vitro steroid sensitivity, and cytokine secretion in idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2004, 65(2):403-408.
28. Chan HC, Ke LY, Liu CC, Chang LL, Tsai WC, Liu W, Yen JH: Increased expression of suppressor of cytokine signaling 1 mRNA in patients with rheumatoid arthritis. *Kaohsiung J Med Sci*, 2010, 26(6):290-298.
29. Chang JW, Tsai HL, Wang HH, Yang LY: Clinicopathological features and prognosis of Chinese children with idiopathic nephrotic syndrome between different age groups. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(10):1189-1194.

30. Chiou YH, Wang LY, Wang TH, Huang SP: Genetic polymorphisms influence the steroid treatment of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27:1511-1517.
31. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu S, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(45):19096-19101.
32. Conrad DF i Hurles ME: The population genetics of structural variation. *Nat Genet*, 2007, 39(7 Suppl):S30-36.
33. Daegelmann C, Herberth G, Roder S, Herbarth O, Giese T, Kramer U, Behrendt H, Borte M, Heinrich J, Emmrich F, Lehmann I: Association between suppressors of cytokine signaling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(3):438-448.
34. Douglas A. Harrison: The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4:a011205.
35. Drawz PE i Sedor JR: Translating associations between common kidney diseases and genetic variation into the clinic. *Semin Nephrol*, 2010, 30(2):195-202.
36. Du J, Li M, Zhang D, Zhu X, Zhang W, Gu W, Feng Y, Zhai X, Ling C: Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4):R108.
37. Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DS: Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2011, 79(1):23-32.
38. Ehrling C, Haussinger D, Bode JG: Sp3 is involved in the regulation of SOCS3 gene expression. *Biochem J*, 2005, 387:737-745.
39. Egan PJ, Lawlor KE, Alexander WS, Wicks IP: Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. *J Clin Invest*, 2003, 111(6):915-924.
40. Egwuagu CE, Yu CR, Li Z, Nussenblatt RB: SOCS5 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a potential bio-marker for monitoring response of uveitis to Daclizumab therapy. *J Autoimmun*, 2005, 24(1):39-46.
41. Ekelund E, Saaf A, Tengvall-Linder M, Melen E, Link J, Barker J, Reynolds NJ, Meggitt SJ, Kere J, Wahlgren CF, Pershagen G, Wickman M, Nordenskjold M, Kockum I, Bradley M: Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(6):1060-1065.
42. Elie V, Fakhoury M, Deschenes G, Jacqz-Aigrain E: Physiopathology of idiopathic nephrotic syndrome: lessons from glucocorticoids and epigenetic perspectives. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(8):1249-1256.
43. Elliott J i Johnston JA: SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol*, 2004, 25(8):434-440.

44. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E: SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2000, 275(27):15985-15991.
45. Erichsen HC i Chanock SJ: SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*, 2004, 90(4):747-751.
46. Fahmy ME, Fattouh AM, Hegazy RA, Essawi ML: ACE gene polymorphism in Egyptian children with idiopathic nephrotic syndrome. *Bratisl Lek Listy*, 2008, 109(7):298-301.
47. Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, Steele RW, Childress SH, Shirkey B: T-lymphocyte subsets in nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 1991, 40(5):913-916.
48. Frishberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, Raas-Rothschild A: Mutations in *NPHS2* encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2):400-405.
49. Fujimoto M i Naka T: Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol*, 2003, 24(12):659-666.
50. Garin EH: Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(8-9):872-878.
51. Garin EH, West L, Zheng W: Effect of interleukin-8 on glomerular sulfated compounds and albuminuria. *Pediatr Nephrol*, 1997, 11(3):274-279.
52. Gershen RS, Brody AS, Duffy LC, Springate JE: Prognostic value of sonography in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1994, 8(1):76-78.
53. Goldenberg A, Ngoc LH, Thouret MC, Cormier-Daire V, Gagnadoux MF, Chrétien D, Lefrançois C, Geromel V, Rötig A, Rustin P, Munnich A, Paquis V, Antignac C, Gubler MC, Niaudet P, de Lonlay P, Bérard E: Respiratory chain deficiency presenting as congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20(4):465-469.
54. Goleva E, Kisich KO, Leung DY: A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance. *J Immunol*, 2002, 169(10):5934-5940.
55. Gómez-Guerrero C, López-Franco O, Sanjuán G, Hernández-Vargas P, Suzuki Y, Ortiz-Muñoz G, Blanco J, Egido J: Suppressors of cytokine signaling regulate Fc receptor signaling and cell activation during immune renal injury. *J Immunol*, 2004, 172(11):6969-6977.
56. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D: Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(2):245-248.
57. Gulati S, Sharma AP, Sharma RK, Gupta A: Changing trends of histopathology in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 1999, 34(4):646-650.
58. Haack D, Scharer K, Asam-Tauscher A, Vecsei P: Glucocorticoid receptors in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1999, 13(8):653-656.
59. Hall AS, Thorley G, Houtman PN: The effects of corticosteroids on behavior in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(12):1220-1223.

60. Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto M, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M: Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4):491-496.
61. Hernandez-Vargas P, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Ruperez M, Ortiz-Munoz G, Suzuki Y, Aguado-Roncero P, Perez-Tejerizo G, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C: Suppressors of cytokine signaling regulate angiotensin II-activated Janus kinase-signal transducers and activators of transcription pathway in renal cells. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(6):1673-1683.
62. Hildebrandt F: Genetic kidney diseases. *Lancet*, 2010, 375(9722):1287-1295.
63. Hinkes B, Vlangos C, Heeringa S, Mucha B, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Ozaltin F, Hildebrandt F: Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2):365-371.
64. Holt RCL i Webb NJA: Management of nephrotic syndrome in childhood. *Curr Pediatr*, 2002, 12:551-560.
65. Hölter K, Wermter AK, Scherag A, Siegfried W, Goldschmidt H, Hebebrand J, Hinney A: Analysis of sequence variations in the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 gene in extremely obese children and adolescents. *BMC Medical Genetics*, 2007, 19(8):21.
66. Holthofer H, Kretzler M, Haltia A, Solin ML, Taanman JW, Schagger H, Kriz W, Kerjaschki D, Schlondorff D: Altered gene expression and functions of mitochondria in human nephrotic syndrome. *FASEB J*, 1999, 13(3):523-532.
67. Hruby Z: Ogniskowe szkliewięjące kłębuszkowe zapalenie nerek. *Nefrol Dial Pol*, 2006, 10:68-71.
68. Huang Z, Wen Q, Zhou SF, Yu XQ: Differential chemokine expression in tubular cells in response to urinary proteins from patients with nephrotic syndrome. *Cytokine*, 2008, 42(2):222-233.
69. Jafar T, Agrawal S, Mahdi AA, Sharma RK, Awasthi S, Agarwal GG: Cytokine gene polymorphism in idiopathic nephrotic syndrome children. *Ind J Clin Biochem*, 2011, 26(3):296-302.
70. Jakobsdottir J, Gorin MB, Conley YP, Ferrell RE, Weeks DE: Interpretation of genetics association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers. *PLoS Genet*, 2009, 5(2):e1000337.
71. Józefowicz G, Kuna P: Rola limfocytów Th1 i Th2 w chorobach atopowych. *Alergia Astma Immunologia*, 1998, 3(2):76-80.
72. Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY: Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol*, 1993, 151(7):3460-3466.
73. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1998, 1(4):575-582.

74. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS: CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*, 2003, 300(5623):1298-1300.
75. Kino T: Tissue glucocorticoid sensitivity: beyond stochastic regulation on the diverse actions of glucocorticoids. *Horm Metab Res*, 2007, 39:420-424.
76. Koskimies O, Vilks J, Rapola J, Hallman N: Long-term outcome of primary nephrotic syndrome. *Arch Dis Child*, 1982, 57(7):544-548.
77. Kraft P, Hunter DJ: Genetic risk prediction – are we there yet? *N Engl J Med*, 2009, 360(17):1701-1703.
78. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A: Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*, 2003, 4(12):1169-1176.
79. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Esposito Salsano M: T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 2002, 5(39):958-965.
80. Larsen L, Ropke C: Suppressors of cytokine signaling: SOCS. *APMIS*, 2002, 110(12):833-844.
81. Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, Smit H, Condamine T, Soulillou JP, Dantal J: Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(1):57-67.
82. Lebrun P, Van Obberghen E: SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192(1):29-36.
83. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR: A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 2007, 131(7):1235-1247.
84. Lenkkeri U, Männikkö M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet PM, Antignac CK, Kashtan CE, Homberg C, Olsen A, Kestilä M, Tryggvason K: Structure of the gene congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1):51-61.
85. Leonard WJ, O'Shea JJ: Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16:293-322.
86. Li R, Yang N, Zhang L, Huang Y, Zhang R, Wang F, Luo M, Liang Y, Yu X: Inhibition of Jak/STAT signaling ameliorates mice experimental nephrotic syndrome. *Am J Nephrol*, 2007, 27(6):580-589.
87. Liang Y, Jin Y, Li Y: Expression of JAKs/STATs pathway molecules in rat model of rapid focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(9):1661-1671.
88. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO: Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol*, 2008, 10(1-2):25-36.

89. Lowik MM, Hol A, Steenbergen EJ, Wetzels JF, van den Heuvel LP: Mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation in a patient with steroid-resistant nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(2):336-341.
90. Lupski JR: Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*, 1998, 14(10):417-422.
91. Lupski JR: Structural variation in the human genome. *N Eng J Med*, 2007, 1169-1171.
92. Lupski JR i Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 2005, 1(6): e49.
93. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS: A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*, 2008, 118(5):1590-1605.
94. Mardis ER i Wilson RK: Cancer genome sequencing a review. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R2):R163-168.
95. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC: Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(4):F762-768.
96. Mattoo TK, al-Sowailem AM, al-Harbi MS, Mahmood MA, Katawee Y, Hassab MH: Nephrotic syndrome in 1st year of life and the role of unilateral nephrectomy. *Pediatr Nephrol*, 1992, 6(1):16-18.
97. McCarthy E, Sharma M, Savin VJ: Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Am Soc Nephrol*, 2010, 5:2115-2121.
98. McKinney PA, Feltbower RG, Brocklebank JT, Fitzpatrick MM: Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16(12):1040-1044.
99. Metcalf D, Mifsud S, Di Rago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS: Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2):943-948.
100. Mohr A, Chatain N, Domszlai T, Rinis N, Sommerauer M, Vogt M, Muller-Newen G: Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signaling. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(6-7):524-532.
101. Motoyama O, Shigetomi Y, Iitaka K: Clinicopathological correlations in nephrotic children with IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2000, 4(4):318-322.
102. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Hamano T, Iwatani H, Sugaya T, Ito T, Hori M, Emai E: Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(2):276-285.
103. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Nagasawa Y, Kosugi A, Kawamoto S, Imai M, Hori M, Okubo K: Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int*, 2002, 61(5): 1577-1587.

104. Ni R, Ihara K, Miyako K, Takemoto M, Ishimura M, Kohno H, Matsuura N, Yoshimura A, Hara T: Association study of polymorphisms in SOCS family genes with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet*, 2006, 33(1):7-10.
105. Niaudet P: Congenital and infantile nephrotic syndrome. *Nephrol Ther*, 2005, 1(1):63-70.
106. Nighingale J, Patel S, Suzuki N, Buxton R, Takagi KI, Suzuki J, Sumi Y, Imaizumi A, Mason M, Zhang Z: Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1):21-32.
107. Novelli G, Ciccacci C, Borgiani P, Papaluca Amati M, and Abadie E: Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2008, 5(2):149-154.
108. Ogarek I, Drożdż D, Wierzchowska-Słowiacek E, Kwinta-Rybicka J, Wilkosz K, Moczulska A, Zachwieja K, Stec Z, Miklaszewska M, Drożdż T, Pietrzyk JA: Leczenie dzieci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym – doświadczenia jednego ośrodka na podstawie wieloletniej obserwacji. *Nefrol Dial Pol*, 2012, 16: 89-97.
109. Ohashi T, Uchida K, Uchida S, Sasaki S, Nihei H: Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119(3):257-264.
110. Orloff MS, Iyengar SK, Winkler CA, Goddard KA, Dart RA, Ahuja TS, Mokrzycki M, Briggs WA, Korbet SM, Kimmel PL, Simon EE, Trachtman H, Vlahov D, Michel DM, Berns JS, Smith MC, Schelling JR, Sedor JR, Kopp JB: Variants in the Wilms' tumor gene are associated with focal segmental glomerulosclerosis in the African American population. *Physiol Genomics*, 2005, 21(2):212-221.
111. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD: Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 2002, 109 Suppl:S121-131.
112. Ostalska-Nowicka D, Śmiech M, Jaroniec M, Zaorska K, Zawierucha P, Szaflarski W, Malinska A, Nowicki M: SOCS3 and SOCS5 mRNA expressions may predict initial steroid response in nephrotic syndrome children. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011, 49(4):719-728.
113. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC: Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol*, 2007, 44(10):2497-2506.
114. Pace TW, Hu F, Miller AH: Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(1):9-19.
115. Paul C, Seiliez I, Thissen JP, Le Cam A: Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids mRNA analysis and promoter characterization. *Eur J Biochem*, 2000, 267(19):5849-5857.
116. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 2003, 83(1):253-307.

117. Payseur BA, Place M, Weber JL: Linkage disequilibrium between STRPs and SNPs across the human genome. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(5):1039-1050.
118. Rahim NG, Harismendy O, Topol EJ, Frazer KA: Genetic determinants of phenotypic diversity in humans. *Genome Biol*, 2008, 9(4):215.
119. Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D: Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol*, 1996, 156(7):2406-2412.
120. Ransom RF, Lam NG, Hallett MA, Atkinson SJ, Smoyer WE: Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int*, 2005, 68(6):2473-2483.
121. Rastmanesh MM, Bluysen HA, Joles JA, Boer P, Willekes N, Braam B: Increased expression of SOCS3 in monocytes and SOCS1 in lymphocytes correlates with progressive loss of renal function and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Eur J Pharmacol*, 2008, 593(1-3):99-104.
122. Rastamanesh MM, Braam B, Joles JA, Boer P, Bluysen HA: Increased SOCS expression in peripheral blood mononuclear cells of end stage renal disease patients is related to inflammation and dialysis modality. *Eur J Pharmacol*, 2009, 602(1):163-167.
123. Raychaudhuri R, Plenge RM, Rossin EJ, Ng AC, Purcell SM, Sklar P, Scolnick EM, Xavier RJ, Altshuler D, Daly MJ: Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. *PLoS Genet*, 2009, 5(6):e1000534.
124. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest*, 2006, 116(2):288-296.
125. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA: Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*, 2008, 118(11):3522-3530.
126. Rogatsky I i Ivashkiv LB: Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens*, 2006, 68(1):1-12.
127. Roy RR, Roy E, Rahman MH, Hossain MM: Serum immunoglobulin G, M, and IgG:IgM ratio as predictors for outcome of childhood nephrotic syndrome. *World J Pediatr*, 2009, 5(2):127-131.
128. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakkaloglu A, Hildebrandt F: Patients with mutations in *NPHS2* (Podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(3):722-732.
129. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409(6822):928-933.

130. Sanna-Cherchi S, Burgess KE, Nees SN, Caridi G, Weng PL, Dagnino M, Bodria M, Carrea A, Allegretta MA, Kim HR, Perry BJ, Gigante M, Clark LN, Kisselev S, Cusi D, Gesualdo L, Allegri L, Scolari F, D'Agati V, Shapiro LS, Pecoraro C, Palomero T, Ghiggeri GM, Gharavi AG: Exome sequencing identified MYO1E and NEIL1 as candidate genes for human autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2011, 80(4):389-396.
131. Santana G, Bendicho MT, Santana TC, Dos Reis LB, Lemaire D, Lyra AC: The TNF- α -308 polymorphism may affect the severity of Crohn's disease. *Clinics*, 2011, 66(8):1373-1377.
132. Sasse B, Hailemariam S, Wuthrich RP, Kemper MJ, Neuhaus TJ: Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms do not predict the course of idiopathic nephrotic syndrome in Swiss children. *Nephrology (Carlton)*, 2006, 11(6):538-541.
133. Schnaper HW: The immune system in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1989, 3(1):101-110.
134. Schönenberger E, Ehrich JH, Haller H, Schiffer M: The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(1):18-24.
135. Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M: Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20):13003-13008.
136. Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M: SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med*, 2003, 9(8):1047-1054.
137. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA: Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278(16):13740-13746.
138. Shalhoub RJ: Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*, 1974, 2(7880):556-560.
139. Shankland SJ, Eitner F, Hudkins KL, Goodpaster T, D'Agati V, Alpers CE: Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation. *Kidney Int*, 2000, 58(2):674-683.
140. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW: Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5380 cases. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(17):2242-2251.
141. Smoak KA i Cidlowski JA: Mecjanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 2004, 125(10-11):697-706.

142. Sobti RC, Singh N, Hussain S, Suri V, Nijhawan R, Bharti AC, Bharadwaj M, Das BC: Aberrant promoter methylation and loss of suppressor of cytokine signaling-1 gene expression in the development of uterine cervical carcinogenesis. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(6):533-543.
143. Solin ML, Pitkanen S, Taanman JW, Holthofer H: Mitochondrial dysfunction in congenital nephrotic syndrome. *Lab Invest*, 2000, 80(8):1227-1232.
144. Spadło A, Wyka K, Kowalewska-Pietrzak M, Bodalski J: Ocena podocytów w osadzie moczu u dzieci z zespołem nerczycowym. *Pol Merk Lek*, 2007, XXII, 130, 254.
145. Stachowski J, Barth C, Michałkiewicz J, Krynicki T, Jarmoliński T, Runowski D, Lewandowska-Stachowiak M, Zaniew M, Warzywoda A, Bortkiewicz E, Dobosz M, Maciejewski J, Baldamus CA: Th1/Th2 balance and CD45-positive T cell subsets in primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14:779-785.
146. Stankiewicz P, Beaudet AL: Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(3):182-192.
147. Stankiewicz P, Lupski JR: Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(3):312-319.
148. Stankiewicz P i Lupski JR: Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*, 2010, 61:437-455.
149. Starr R i Hilton DJ: SOCS: suppressors of cytokine signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30:1081-1085.
150. Starr R i Hilton DJ: Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, 1999, 21(1):47-52.
151. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, Cooper DN: The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Med*, 2009, 1(1):13.
152. Stolte EH, Verburg van Kemenade BM, Savelkoul HFJ, Flik G: Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J Endocrinol*, 2006, 190:17-28.
153. Sun LP, Ma XL, Liu HX, Wang YS, Li XF: No association of polymorphisms in the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 with rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Genet Mol Res*, 2010, 9(3):1518-1524.
154. Tan JC, Rabkin R: Suppressors of cytokine signaling in health and disease. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20:567-575.
155. Tantisira KG, Lazarus R, Litonjua AA, Klanderman B, Weiss ST: Chromosome 17: association of a large inversion polymorphism with corticosteroid response in asthma. *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18(8):733-737.
156. Teer JK i Mullikin JC: Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R2):R145-151.

157. Thomas DB: Focal segmental glomerulosclerosis. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133:217-223.
158. Topaloglu R, Saatci U, Arıkan M, Canpmar H, Bakkaloglu A, Kansu E: T-cell subsets, interleukin-2 receptor expression and production of interleukin-2 in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1994, 8:649-652.
159. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J: Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 2006, 354:1387-1401.
160. Tryggvason K, Ruotsalainen V, Wartiovaara J: Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney. *Int J Dev Biol*, 1999,43(5):445-451.
161. Tune BM, Mendoza SA: Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(5):824-832.
162. Twyman RM: Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *Encyclopedia of Neurosci*, 2009, 8:881-885.
163. Vats AN: Genetics of idiopathic nephrotic syndrome. *Indian J Pediatr*, 2005, 72(9):777-783.
164. Vivarelli M, Moscaritolo E, Tsalkidis A, Massella L, Emma F: Time for initial response to steroids is a major prognostic factor in idiopathic nephrotic syndrome. *J Pediatr*, 2010, 156(6):965-971.
165. Ware JH: The limitations of risk factors as prognostic tools. *N Engl J Med*, 2006, 355(25):2615-2617.
166. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 2005, 308(5729):1801-1804.
167. Woroniecki RP, Orlova TN, Mendeleev N, Shatat IF, Hailpern SM, Kaskel FJ, Goligorsky MS, O'Riordan E: Urinary proteome of steroid-sensitive and steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol*, 2006, 26(3):258-267.
168. Woroniecki RP, Shatat IF, Supe K, Du Z, Kaskel FJ: Urinary cytokines and steroid responsiveness in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol*, 2008, 28(1):83-90.
169. Wyszomierski SL, Yeh J, Rosen JM: Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(2):330-343.
170. Xiong H, Du W, Zhang YJ, Hong J, Su WY, Tang JT, Wang YC, Lu R, Fang JY: Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells. *Mol Carcinog*, 2012, 51(2):174-184.

171. Yu Z, Ding J, Huang J, Yao Y, Xiao H, Zhang J, Liu J, Yang J: Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 29(5):902-908.
172. Zachwieja J, Bobkowski W, Dobrowolska-Zachwieja A, Lewandowska-Stachowiak M, Zaniew M, maciejewski J: Intracellular cytokines of peripheral blood lymphocytes in nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2002, 17(9):733-740.
173. Zenker M, Machuca E, Antignac C: Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(9):849-857.
174. Zhou TB, Qin YH, Su LN, Lei FY, Huang WF, Zhao YJ: ACE I/D gene polymorphism can't predict the steroid responsiveness in Asian children with idiopathic nephrotic syndrome: a meta-analysis. *PLoS One*, 2011, 6(5):e19599.

8. Streszczenie

Idiopatyczny steroido-oporny zespół nerczykowy stanowi obecnie jedną z najtrudniejszych w leczeniu chorób kłębuszkowych u dzieci. Średnio 20% z nich nie reaguje na zastosowane leczenie, co jest główną przyczyną utraty funkcji nerek i postępu do krańcowej niewydolności nerek. Nieznane jest podłoże steroido-oporności w IZN oraz brak jest specyficznych, wczesnych markerów odpowiedzi pacjentów na leczenie steroidowe.

W niniejszej pracy poddano analizie 3 geny supresorowe ścieżki sygnalizacyjnej Jak/Stat: *SOCS1*, *SOCS3*, *SOCS5*, o udokumentowanym udziale w etiologii samego IZN, jak i potencjalnym znaczeniu w patomechanizmie steroido-oporności. Badania przeprowadzono na 3 grupach pacjentów: grupie 30 pacjentów steroido-wrażliwych (SWZN), 41 pacjentach nie odpowiadających na zastosowane leczenie (SOZN) oraz na 30 pacjentach grupy kontrolnej. Podstawową techniką była metoda sekwencjonowania części kodujących, mająca na celu określenie sekwencji badanych genów w każdej z grup. Analiza obejmowała identyfikację mutacji punktowych, a także genotypowanie znanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz określenie różnic w występowaniu określonych alleli i genotypów pomiędzy badanymi grupami, a także oszacowanie związku tych różnic ze steroido-opornym fenotypem IZN.

Genotypowaniu poddano wszystkie znane i opisane SNP-y, znajdujące się w obrębie zaplifikowanych regionów genów, a więc zarówno SNP-y leżące w rejonach kodujących, jak i te znajdujące się w nietranskrybowanych rejonach regulatorowych. Analiza sekwencji badanych genów ujawniła obecność jednej heterozygotycznej mutacji w rejonie 3'UTR genu *SOCS3* (ekson2+53C>A) u jednego pacjenta z grupy SOZN, jednak przypuszczalnie bez wpływu na fenotyp grupy. Analiza polimorfizmów obejmowała natomiast 8 SNP-ów w genie *SOCS1*, 5 SNP-ów w genie *SOCS3* i 18 SNP-ów w genie *SOCS5*, z czego odpowiednio 2, 1 i 6 było zróżnicowanych, pozostałe zaś posiadały status homozygoty. Dla wszystkich SNP-ów heterozygotycznych uzyskano zgodność częstości genotypów z prawem Hardy-Weinberga.

Dla jednego ze SNP-ów zróżnicowanych (rs188754154), leżącego w obszarze niekodującym 5'UTR genu *SOCS1*, otrzymano wysoką wartość ilorazu szans dla allelu T (OR=2,23) i genotypu AT (OR=2,26) dla grupy SOZN oraz wysokie wartości OR dla allelu T (OR=3,05) i genotypu AT (OR=3,01) dla grupy SWZN, w porównaniu z grupą kontrolną, choć żadna z wartości nie była istotna statystycznie ($p=1,0$). Niemniej, obecność allelu T w

przypadku tego SNP-u korelowała w większym stopniu z obecnością zespołu nerczycowego aniżeli z jego fenotypem opornym lub wrażliwym na leczenie (OR dla grupy ZN=2,15 dla allelu T i OR=2,19 dla genotypu AT), jako że alternatywny allel T nie występował w grupie kontrolnej, zaś pojawiał się w obydwu grupach badanych. Uzyskano również szczególnie niskie wartości ilorazu szans dla drugiego zróżnicowanego SNP-u w genie *SOCS1* (rs11549428), leżącego w kodującym obszarze eksonu2, dla grupy SWZN w porównaniu z grupą kontrolną (OR=0,19; p=0,19 dla allelu C i OR=0,19; p=0,4915 dla genotypu GC) oraz steroido-opornej w porównaniu z grupą kontrolną (OR=0,36; p=0,5735 dla allelu C i OR=0,35; p=0,5696 dla genotypu GC). Pojawienie się allelu C w obrębie tego SNP-u w grupie pacjentów z ZN (OR=0,21; p=0,2110 dla allelu C i OR=0,2; p=0,2097 dla genotypu GC) może oznaczać wariant ochronny pod względem wystąpienia zespołu nerczycowego, choć wysokie wartości ilorazu szans dla przeważającego w populacji, również w analizowanej grupie kontrolnej, wariantu G pozostają niejednoznaczne odnośnie roli ochronnej rzadszego wariantu C i wymagają potwierdzenia na liczniejszej grupie pacjentów. Należy zaznaczyć, iż grupę kontrolną stanowili pacjenci bez zespołu nerczycowego, niemniej o nie znanym fenotypie odnośnie odpowiedzi organizmu na działanie leków steroidowych, zatem względem tej cechy są to osoby wybrane losowo z populacji. Co więcej, występowanie wariantu C zamiast G w tym polimorfizmie powodowało zmianę w kodowanym aminokwasie z glutaminy na histydynę, a SNP ten znajdował się w obrębie domeny SOCS-box białka *SOCS1*. Domena ta odpowiedzialna jest zarówno za interakcję z innymi czynnikami w kontekście degradacji białek związanych z *SOCS*, jak i chroni samo białko *SOCS* przed degradacją. Allel C występował jednak zarówno w grupie pacjentów SOZN, jak i w grupie kontrolnej, bez istotności statycznych pomiędzy nimi (p=0,5735).

W przypadku jedyne go zróżnicowanego polimorfizmu w genie *SOCS3* (rs72899753), leżącego w obszarze 3'UTR genu, otrzymano wysoką wartość ilorazu szans zarówno dla allelu A (OR=2,23; p=1,0), jak i dla genotypu AG (OR=2,26; p=1,0), dla grupy pacjentów SOZN w porównaniu z grupą SWZN oraz grupą kontrolną. Przepuszczalnie allel A może być związany ze steroido-opornością w tej grupie chorych.

W przypadku SNP-ów w genie *SOCS5* większość wartości OR dla alleli i genotypów oscylowała wokół neutralnej wartości „1”. Warto jednak zauważyć, iż w przypadku SNP-u rs17771838, leżącego w obszarze kodującym eksonu2, otrzymano wyższe wartości ilorazu szans dla rzadszego wariantu A dla obydwu grup badanych (OR=1,88; p=0,6989 dla allelu A i OR=1,94; p=0,6908 dla genotypu AG w grupie SOZN, OR=2,07; p=0,6794 dla allelu A i

OR=2,15; p=0,6707 dla genotypu AG w grupie SWZN oraz OR=1,96; p=0,512 dla allelu A i OR=2,03; p=0,4989 dla genotypu AG w grupie ZN) w porównaniu z grupą kontrolną, co świadczyć może o związku tego wariantu z wystąpieniem zespołu nerczykowego, wymaga jednak potwierdzenia na liczniejszej grupie pacjentów.

Analiza struktury genu *SOCS1* u pacjentów steroido-opornych ujawniła całkowity brak sprzężeń pomiędzy dwoma zróżnicowanymi polimorfizmami. Struktura genu *SOCS5* wykazała natomiast całkowite sprzężenie pomiędzy dwoma SNP-ami (rs41379147 i rs41432848), leżącymi w obszarze 3'UTR genu, we wszystkich 3 grupach badanych, oraz około 50% słabsze powiązania pomiędzy SNP-ami rs3768720 i rs6738426 oraz rs3768720 i rs41489952 w grupie SOZN w porównaniu z grupą SWZN i kontrolną (odpowiednio 24 v. 50 i 47 oraz 9 vs. 16 i 15). Może to wskazywać na nieco odmienny wzór segregacji wybranych polimorfizmów w tej grupie chorych.

Uzyskane wyniki wykazały brak jednoznacznego wpływu polimorfizmów SNP czy mutacji w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5* na podłoże steroido-opornego IZN, co uniemożliwia ich zastosowanie jako specyficznych markerów wczesnej odpowiedzi na leczenie w tej grupie chorych. Jednakże wyniki wskazują na pewne różnice w częstości alleli i genotypów poszczególnych polimorfizmów pomiędzy badanymi grupami, co świadczyć może o udziale badanych genów w skomplikowanym i wielopłaszczyznowym mechanizmie oporności na glikokortykosteroidy u dzieci z idiopatycznym zespołem nerczykowym. Tym samym stanowić to może potwierdzenie hipotezy o rozwoju steroido-oporności na drodze zaburzeń immunologicznych. Niewykluczony jest również wpływ zmian genetycznych i epigenetycznych w regionach promotorowych ww. genów, a także przypuszczalna interakcja z czynnikami działającymi poza kaskadą sygnalizacyjną białek SOCS i wpływającymi na ich odmienną sygnalizację w grupie pacjentów ze steroido-opornym IZN.

9. Abstract

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is one of the most resistant renal diseases in children. Approximately 20% of patients reveal steroid resistance, which is the main cause of end stage renal disease and loss of kidney. The basis of steroid resistance is currently unknown and there are no specific biological markers that could predict steroid responsiveness early in children with INS.

Three suppressor genes of the Jak/Stat pathway: *SOCS1*, *SOCS3* and *SOCS5* with documented involvement in the pathology of NS and steroid resistance, were examined in this study. Patients were divided into three groups: two study groups of 30 steroid-sensitive nephrotic syndrome patients (SSNS) and 41 steroid-resistant nephrotic syndrome patients (SRNS), and also one control group of 30 patients with no symptoms of NS or renal disease of any kind. Sequencing of coding regions and parts of flanking regions of genes *SOCS1*, *SOCS3* and *SOCS5* was performed. The aim of the study was to identify point mutations and known single nucleotide polymorphisms (SNP) and to investigate whether differences in allele and genotype frequencies between two study groups and control group are related to steroid resistance in INS.

All known SNPs were analyzed, including those in coding and non-coding regulatory regions of genes. The study revealed one point heterozygotic mutation in 3'UTR region of *SOCS3* gene (exon2+53C>A) in 1 SRNS patient, however presumably with no impact on steroid resistant phenotype of the disease. SNP analysis revealed 8 SNPs in *SOCS1* gene, 5 SNPs in *SOCS3* gene and 18 SNPs in *SOCS5* gene, of which 2, 1 and 6 were heterozygotic, respectively. Frequency distribution values of alleles and genotypes in three study groups were evaluated in terms of Hardy-Weinberg Equilibrium. Differences in genotype and allele frequencies between both study groups and control group were evaluated using Fisher's exact test. Additionally, odds ratio (OR) values were calculated, with 95% confidence interval (95% CI). Also the gene structure of analysed genes were performed using commercially available software HaploView, based on Gabriel et. al algorithm and the results were shown as R^2 values as a measure of linkage disequilibrium (LD).

One of two heterozygotic SNPs (rs188754154) in non-coding 5'UTR region of *SOCS1* gene had high odds ratio values for T allele (OR=2,23) and for AT genotype (OR=2,26) in SRNS group, and also high OR values for T allele (OR=3,05) and AT genotype (OR=3,01) in

SSNS group, in comparison with control group, however they did not reach statistical significance ($p=1,0$). The prevalence of T allele correlated more with appearance of NS than with steroid resistance (OR=2,15 for T allele and OR=2,19 for AT genotype, for NS group), as T allele was absent in control group and was present in both study groups. The study also revealed low OR values for other SNP in coding region of *SOCS1* gene (rs11549428) in SSNS and SRNS group in comparison with control group (OR=0,19; $p=0,19$ for C allele and OR=0,19; $p=0,4915$ for GC genotype, OR=0,36; $p=0,5735$ for C allele and OR=0,35; $p=0,5696$ for GC genotype, respectively). The presence of C allele regarding that SNP in NS group might stand for a protective variant for a disease, however high OR values for prevalent in the population (including control group) G allele (OR=4,86; $p=0,211$ for G allele and OR=5; $p=0,2097$ for GG genotype in NS group) are inconsistent with the hypothesis of protective role of C variant and require confirmation in a larger group of patients. It is noteworthy saying that control group comprised patients with no NS symptoms, however randomly chosen regarding steroid resistance. Moreover, the presence of C instead of G variant in that SNP caused amino acid change from glutamine to histidine and it was located in the SOCS-box domain of SOCS1 protein responsible for protein degradation and SOCS1 stabilization. However, C allele was present in both SRNS and control group, without statistical significance ($p=0,5735$).

There were high odds ratio values for the only one heterozygotic SNP in *SOCS3* gene (rs72899753), located in 3'UTR region (OR=2,23; $p=1,0$ for A allele and OR=2,26; $p=1,0$ for AG genotype) for SRNS group in comparison with both SSNS and control group. Presumably A allele may be associated with steroid resistance in this group of patients with NS.

Most of OR values for alleles and genotypes for SNPs in *SOCS5* gene oscillated in the vicinity of neutral '1' value and none of them reached statistical significance. However, it is noteworthy saying that in case of SNP rs17771838, located in coding region of exon2, higher OR values were obtained for rarer variant A for both study groups (OR=1,88; $p=0,6989$ for A allele and OR=1,94; $p=0,6908$ for AG genotype in SRNS group, OR=2,07; $p=0,6794$ for A allele and OR=2,15; $p=0,6707$ for AG genotype in SSNS group, OR=1,96; $p=0,512$ for A allele and OR=2,03; $p=0,4989$ for AG genotype in NS group) in comparison with control group, which may prove the relationship of this variant with the occurrence of NS, but it requires confirmation in a larger group of patients.

Structure analysis of *SOCS1* gene in SRNS patients revealed absence of linkage between two heterozygotic SNPs. *SOCS5* gene structure revealed complete linkage between two SNPs in 3'UTR region of gene (rs41379147 and rs41432848) in two study groups and in control group, define as haplotype block. Additionally, there were about 50% weaker linkage values in two pair of SNPs, between rs3768720 and rs6738426 and between rs3768720 i rs41489952, between SRNS group and both SSNS and control group (24 v. 50 and 47; 9 vs. 16 and 15, respectively), which may indicate a slightly different patterns of segregation of selected SNPs in this group of patients.

Presented results revealed lack of unequivocal influence of SNP polymorphisms or mutations in analyzed genes on steroid resistance in idiopathic nephrotic syndrome, so that they cannot be used as specific biological markers of early responsiveness to steroid treatment in these patients. However, the results show some differences in allele and genotype frequencies in chosen SNPs in analyzed genes between two study groups and control group, which might prove their contribution to complex mechanism of resistance to steroid treatment in children with INS. It might confirm the hypothesis of immunological dysregulation in steroid resistance, as well. Also genetic and epigenetic changes in promoter regions of analyzed genes or interactions with other elements beyond the Jak/Stat pathway could affect distinct signaling and biological action of SOCS proteins in steroid resistant patients with INS.

Spis Rysunków

- Rys.1. Przykładowa sekwencja w formie tekstowej
- Rys.2. Przykładowa sekwencja w formie pików (elektroforegram)
- Rys.3. Przykładowy elektroforegram z układem heterozygotycznym pików
- Rys.4. Efekt rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym, fragment SOCS1c, matryce DNA wybranych pacjentów z ZN
- Rys.5. Efekt rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym, fragment SOCS5e, matryce DNA wybranych pacjentów z grupy kontrolnej, wraz z kontrolą negatywną
- Rys.6. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów w genie *SOCS1*
- Rys.7. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów w genie *SOCS3*
- Rys.8. Wykresy przedstawiające ilości genotypów dla SNP-ów w genie *SOCS5*
- Rys.9. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS1*
- Rys.10. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS3*
- Rys.11. Wykresy przedstawiające ilości alleli dla SNP-ów heterozygotycznych w genie *SOCS5*
- Rys.12. Struktura genu *SOCS1* dla grupy pacjentów SOZN
- Rys.13. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów SOZN
- Rys.14. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów SWZN
- Rys.15. Struktura genu *SOCS5* dla grupy kontrolnej
- Rys.16. Struktura genu *SOCS5* dla grupy pacjentów steroido-opornych i steroido-wrażliwych ujętych wspólnie

Spis Tabel

- Tabela 1. Przebieg kliniczny choroby u pacjentów ze steroido-opornym zespołem nerczycowym (SOZN)
- Tabela 2. Stan kliniczny pacjentów ze steroido-wrażliwym zespołem nerczycowym (SWZN)
- Tabela 3. Odczynniki wykorzystane do izolacji całkowitego genomowego DNA
- Tabela 4. Odczynniki wykorzystane do reakcji PCR
- Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR
- Tabela 6. Wykaz sekwencji starterów, temperatur ich topnienia oraz długości amplifikowanego fragmentu
- Tabela 7. Etapy reakcji PCR dla każdego z namnażanych fragmentów 3 badanych genów
- Tabela 8. Skład mieszanin dla produktu reakcji PCR i dla markera wielkości, nakładanych na żel agarozowy
- Tabela 9. Odczynniki wykorzystane do przygotowania żelu agarozowego i do rozdziału elektroforetycznego
- Tabela 10. Wartości stężeń docelowych matryc DNA dla poszczególnych odcinków analizowanych genów
- Tabela 11. Odczynniki użyte do reakcji sekwencjonowania
- Tabela 12. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania
- Tabela 13. Parametry programu reakcji sekwencjonowania
- Tabela 14. Odczynniki wykorzystane do oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania
- Tabela 15. Odczynniki wykorzystane do elektroforezy kapilarnej
- Tabela 16. Wartości stężeń i czystości izolatów DNA
- Tabela 17. Informacje o mutacji zidentyfikowanej w genie *SOCS3*
- Tabela 18. Wykaz analizowanych polimorfizmów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*
- Tabela 19. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS1*
- Tabela 20. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS3*
- Tabela 21. Częstości obserwowane genotypów i alleli dla polimorfizmów w genie *SOCS5*
- Tabela 22. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS1*
- Tabela 23. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS3*

Tabela 24. Wartości testu χ^2 dla SNP-ów w genie *SOCS5*

Tabela 25. Wartości OR dla genotypów, dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Tabela 26. Wartości OR dla alleli, dla genów *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*

Spis Załączników

- Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych
- Załącznik 2. Informacja dla opiekunów pacjenta i formularz świadomej zgody na badania
- Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym
- Załącznik 4. Ankieta dla pacjentów grupy kontrolnej
- Załącznik 5. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy SOZN
- Załącznik 6. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy SWZN
- Załącznik 7. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy kontrolnej
- Załącznik 8. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy SOZN
- Załącznik 9. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy SWZN
- Załącznik 10. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy kontrolnej
- Załącznik 11. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy SOZN
- Załącznik 12. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy SWZN
- Załącznik 13. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy kontrolnej

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 119/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 17 lutego 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

dr hab. n. med. Michał Nowicki

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii UM w Poznaniu

Główny badacz: mgr inż. Katarzyna Zaorska

**Członkowie zespołu
badawczego:**

**dr Bartosz Kempisty
dr hab. med. Michał Nowicki
mgr Małgorzata Jaroniec**

Temat

**badan: "Analiza zmian w sekwencjach genów SOCS1, SOCS3i
SOCS5 u dzieci ze steroidoopornym zespołem
nerczycowym".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 119/11 z dnia 17.02.2011r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM

M. Krawczyński

dr hab. n. med. ROBERT SPACZYŃSKI

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI

prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI prof. UAM

dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA

BARBARA LIPIAK

KOMISJA BIOETYCZNA
 przy
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

17.02.2011r.

z dnia

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Szłuzewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. n. med. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański prof. UAM	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

INFORMACJA DLA RODZICÓW/OPIEKUNÓW PACJENTA

dotycząca badań genetycznych

Szanowna/y Pani/Panie,

Zespół lekarzy i współpracowników z Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i Zakładu Histologii i Embriologii UM w Poznaniu zaprasza Panią/Pana do udziału w anonimowych badaniach klinicznych, których celem jest zbadanie genów, które mogą przyczynić się do rozwoju zjawiska steroido-oporności w przebiegu idiopatycznego zespołu nerczycowego u dzieci. Badania te mogą okazać się istotne zarówno ze względów poznawczych, jak i z punktu widzenia leczenia, pozwalając na dobór zindywidualizowanej terapii, która pozwoliłaby na uniknięcie nieskutecznego leczenia i jego skutków ubocznych. W tym celu niezbędne jest wykonanie szeregu badań laboratoryjnych, które pozwolą na określenie zmian w sekwencjach wybranych genów.

Jeśli zaakceptuje Pan(i) naszą propozycję udziału w badaniu, informujemy, że zostanie wykorzystana próbka krwi Pana(i) dziecka (o objętości około 5 ml) pobrana w celu wykonania rutynowych badań morfologicznych, z której zostanie wyizolowany kwas dezoksyrybonukleinowy DNA. Zostanie on wyizolowany w celu analizy sekwencji wyselekcjonowanych genów. DNA będzie następnie przechowywany w odpowiednich warunkach w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Wszystkie dane personalne będą anonimowe.

W każdej chwili może Pan(i) wycofać się z badania, a taka decyzja nie pociągnie za sobą żadnego niekorzystnego dla Pana(i) postępowania ze strony zespołu badawczego.

**Formularz świadomej zgody rodziców/opiekunów pacjenta
na badania genetyczne**

Ja, niżej podpisany (*imię i nazwisko*)

dobrowolnie zgadzam się na udział mojego dziecka (*imię i nazwisko dziecka*)
....., PESEL w badaniu,
którego celem jest zbadanie genów, zaangażowanych w rozwój zjawiska steroido-oporności
w przebiegu idiopatycznego zespołu nerczycowego u dzieci.

Wyrażam zgodę na:

- pobranie krwi w celu izolacji DNA,
- przechowywanie DNA,
- wykonanie badań molekularnych wyselekcjonowanych genów,
- informowanie mnie o wynikach prowadzonych badań.

Zdaję sobie sprawę, że informacje dotyczące mojego dziecka są niezbędne do oceny wyników badania. Wyrażam zgodę na przetwarzanie tych danych osobowych dla potrzeb badania (zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych z dnia 29.08.1997, Dz.U. nr 133 poz. 883 z późn. zm.). W zamian nie będę rościł(a) praw do ograniczenia wykorzystania wyników uzyskanych podczas badania przeprowadzonych z moim udziałem.

Wiem, że mogę w każdej chwili wycofać się z uczestnictwa w badaniu bez żadnych konsekwencji dla mnie.

.....

Data i podpis lekarza

.....

Data i podpis rodziców pacjenta

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym

Idiopatyczny Zespół Nerczycowy

Ankieta mgr inż. Katarzyna Zaorska, listopad 2010 (według Prof. Dr. F. Hildebrandta)

Informacje ogólne o pacjencie			
Nazwisko: _____	Imię: _____	data ur.: ____/____/____ MM DD YYYY	
<input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> M	Wzrost: ____ cm	Waga przed chorobą: ____ kg	
Zespół nerczycowy wśród rodziców / krewnych	<input type="checkbox"/> Tak <input type="checkbox"/> Nie	<input type="checkbox"/> Matka <input type="checkbox"/> Brat	<input type="checkbox"/> Ojciec <input type="checkbox"/> Siostra
		<input type="checkbox"/> Inni: _____	
Pochodzenie:	<input type="checkbox"/> polskie	<input type="checkbox"/> Inne europejskie	<input type="checkbox"/> Inne _____

I. Wstępne badanie kliniczne: ____MM/____DD/____YYYY

1. Objawy (początkowe)

- wiek w chwili zachorowania (lata + miesiące).....
- ostry przypadek obrzęk (obwodowe/ płuc/ OUN)
- podczas rutynowego badania wysokie ciśnienie krwi (przed terapią steroidami)
- wymaga leczenia krwimocz
- inne objawy: _____

2. Wyniki laboratoryjne (początkowe)

- Badania krwi: Kreatyna: ____ mg/dl Analiza moczu: Białkomocz ____ mg/kg
mc/24h lub
 GFR: _____ ml/min/1.73m² białko mg/crea mg
- Białka surowicy: _____ g/l selektywne nie-selektywne
 Albumina: _____ g/l
- Nieprawidłowości immunologiczne Krwinkomocz
 (immunoglobuliny / składniki Tak Nie
 dopełniacza
- ANA ANCA dsDNA
 obniżony C₃ obniżony C₄

3. Biopsja nerki

	1 Biopsja /_____ MM/YYYY	2 Biopsja /_____ MM/YYYY
MCD (zmiany minimalne)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FSGS (ognisk. i segm. sklerotyzacja kłębuszków)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cechy niedojrzałości kłębuszków nerkowych	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mezangialna proliferacja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inne: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Wynik IF IgA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IgM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ig G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C ₃	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C ₄	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

II. Leczenie

1. Kortykosteroidy Tak Nie
- Steroido-wrażliwość Pełna odpowiedź
 Nawrót Tak Nie
- Częściowa odpowiedź
 Nawrót Tak Nie
- Steroido-oporność
2. Leki cytotoksyczne Tak Nie Nazwa leku: _____ + czas leczenia
- Odpowiedź (remisja) kliniczna: _____
- Odpowiedź (remisja) biochemiczna: _____
3. Cyklosporyna A (CsA) Tak Nie Czas leczenia CsA: _____
- Odpowiedź (remisja) kliniczna: _____
- Odpowiedź (remisja) biochemiczna: _____
4. Dializa / Transplantacja nerki MM / YYYY
- Data końcowej niewydolności nerek: ____ / ____
- 1' transplantacja: ____ / ____
- 2' transplantacja: ____ / ____
- Niepowodzenie transplantacji z powodu:
- Nawrotu
- Utraty przeszczepu z powodu:
- Nawrotu
- Odrzucenia
- Data niepowodzenia przeszczepu: ____ / ____

III. Dodatkowe informacje

Pacjent cierpi / cierpiał na następujące choroby:

- | | | |
|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> Głuchota | <input type="checkbox"/> Niski wzrost | <input type="checkbox"/> Anomalie przewodu mocz. |
| <input type="checkbox"/> Ślepota | <input type="checkbox"/> Dystrofia twarzy | <input type="checkbox"/> Anomalie serca (wady) |
| <input type="checkbox"/> Małogłowie | <input type="checkbox"/> Sześciopalczałość | <input type="checkbox"/> Alergie |
| <input type="checkbox"/> Opóźnienie | <input type="checkbox"/> Kręgowo-nasadowa dysplazja | <input type="checkbox"/> Nowotwory / guzki (Wilmsa) |
| <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ I | <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ II | <input type="checkbox"/> Choroby pęcherza mocz. |
| <input type="checkbox"/> Choroby immunologiczne (RZS, SLE, CU, ch. Crohna) | | <input type="checkbox"/> WZW |
| <input type="checkbox"/> Inne: | | |

Czy ktoś z bliskich pacjenta cierpi na wymienione wyżej choroby? Jeśli tak, kto i na jakie?

- 1.
- 2.
- 3.

IV. Uwagi

(opis biopsji, rozmazu, spostrzeżenia)

Załącznik 4. Ankieta dla pacjentów grupy kontrolnej

Idiopatyczny Zespół Nerczycowy - Populacja kontrolna Ankieta, mgr inż. Katarzyna Zaorska, listopad 2010 (według Prof. Dr. F. Hildebrandta)

Informacje ogólne o pacjencie

Nazwisko: _____ Imię: _____ data ur.: ____ / ____ / ____
MM DD YYYY

K M Wzrost: ____ cm

Zespół nerczycowy Tak Nie
wśród rodziców / krewnych Matka Brat
 Ojciec Siostra
 Inni: _____

Pochodzenie: polskie Inne europejskie Inne _____

Dodatkowe informacje

Czy cierpi / cierpiał Pani/ Pan na następujące choroby:

- | | | |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Głuchota | <input type="checkbox"/> Niski wzrost | <input type="checkbox"/> Anomalie przewodów mocz. |
| <input type="checkbox"/> Ślepota | <input type="checkbox"/> Dystrofia twarzy | <input type="checkbox"/> Anomalie serca |
| <input type="checkbox"/> Małogłowie | <input type="checkbox"/> Sześciopalczałość | <input type="checkbox"/> Alergie |
| <input type="checkbox"/> Opóźnienie | <input type="checkbox"/> Kręgowo-nasadowa dysplazja | <input type="checkbox"/> Nowotwory / guzki |
| <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ I | <input type="checkbox"/> Cukrzyca typ II | <input type="checkbox"/> Choroby pęcherza mocz. |
| <input type="checkbox"/> Choroby immunologiczne | <input type="checkbox"/> WZW | <input type="checkbox"/> Inne: |

Czy ktoś z bliskich pacjenta cierpi na wymienione wyżej choroby? Jeśli tak, kto i na jakie?

- 1.
- 2.
- 3.

Załącznik 5. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy SOZN

Kod pacjenta	rs27829	rs188754154	rs182726276	rs147807471	rs61753383	rs139221703	rs11549428	rs1801729
	5'UTR		Ekson 2					3'UTR
K77	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K94	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K100	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K103	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K115	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K119	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K123	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K128	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K132	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K72	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K162	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K98	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K42	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K75	gg	at	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K82	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K102	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K108	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K109	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K126	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K134	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K84	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K139	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K142	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K160	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K169	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K170	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K175	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K177	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K207	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K183	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K51	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K217	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K202	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K214	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K258	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K146	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K193	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K199	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K262	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K265	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K259	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc

Załącznik 6. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy SWZN

Kod pacjenta	rs27829	rs188754154	rs182726276	rs147807471	rs61753383	rs139221703	rs11549428	rs1801729
	5'UTR		Ekson 2					3'UTR
K43	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K110	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K130	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K131	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K133	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K136	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K168	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K161	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K140	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K191	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K198	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K254	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K256	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K101	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K111	gg	at	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K154	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K156	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K179	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K180	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K182	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K186	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K189	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K263	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K266	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K267	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K269	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K272	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K273	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K279	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc
K280	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gg	cc

Załącznik 7. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS1* dla grupy kontrolnej

Kod pacjenta	rs27829	rs188754154	rs182726276	rs147807471	rs61753383	rs139221703	rs11549428	rs1801729
	5'UTR		Ekson 2					3'UTR
C8	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C11	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C12	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C13	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C14	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C15	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C36	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C39	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C51	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C52	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C53	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C54	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C68	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C69	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C70	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C71	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C73	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C74	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C75	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C76	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C208	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C209	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C210	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C211	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C212	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C213	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C5	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C6	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C24	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc
C25	gg	aa	cc	cc	gg	cc	gc	cc

Załącznik 8. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy SOZN

Kod pacjenta	rs12059	rs11889212	rs1061489	rs17849241	rs72899753
	Ekson 2				3'UTR
K77	gg	aa	cc	cc	gg
K94	gg	aa	cc	cc	gg
K100	gg	aa	cc	cc	gg
K103	gg	aa	cc	cc	gg
K115	gg	aa	cc	cc	gg
K119	gg	aa	cc	cc	gg
K123	gg	aa	cc	cc	gg
K128	gg	aa	cc	cc	gg
K132	gg	aa	cc	cc	gg
K72	gg	aa	cc	cc	gg
K162	gg	aa	cc	cc	gg
K98	gg	aa	cc	cc	gg
K42	gg	aa	cc	cc	gg
K75	gg	aa	cc	cc	gg
K82	gg	aa	cc	cc	gg
K102	gg	aa	cc	cc	gg
K108	gg	aa	cc	cc	gg
K109	gg	aa	cc	cc	gg
K126	gg	aa	cc	cc	ag
K134	gg	aa	cc	cc	gg
K84	gg	aa	cc	cc	gg
K139	gg	aa	cc	cc	gg
K142	gg	aa	cc	cc	gg
K160	gg	aa	cc	cc	gg
K169	gg	aa	cc	cc	gg
K170	gg	aa	cc	cc	gg
K175	gg	aa	cc	cc	gg
K177	gg	aa	cc	cc	gg
K207	gg	aa	cc	cc	gg
K183	gg	aa	cc	cc	gg
K51	gg	aa	cc	cc	gg
K217	gg	aa	cc	cc	gg
K202	gg	aa	cc	cc	gg
K214	gg	aa	cc	cc	gg
K258	gg	aa	cc	cc	gg
K146	gg	aa	cc	cc	gg
K193	gg	aa	cc	cc	gg
K199	gg	aa	cc	cc	gg
K262	gg	aa	cc	cc	gg
K265	gg	aa	cc	cc	gg
K259	gg	aa	cc	cc	gg

Załącznik 9. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy SWZN

Kod pacjenta	rs12059	rs11889212	rs1061489	rs17849241	rs72899753
	Ekson 2				3'UTR
K43	gg	aa	cc	cc	gg
K110	gg	aa	cc	cc	gg
K130	gg	aa	cc	cc	gg
K131	gg	aa	cc	cc	gg
K133	gg	aa	cc	cc	gg
K136	gg	aa	cc	cc	gg
K168	gg	aa	cc	cc	gg
K161	gg	aa	cc	cc	gg
K140	gg	aa	cc	cc	gg
K191	gg	aa	cc	cc	gg
K198	gg	aa	cc	cc	gg
K254	gg	aa	cc	cc	gg
K256	gg	aa	cc	cc	gg
K101	gg	aa	cc	cc	gg
K111	gg	aa	cc	cc	gg
K154	gg	aa	cc	cc	gg
K156	gg	aa	cc	cc	gg
K179	gg	aa	cc	cc	gg
K180	gg	aa	cc	cc	gg
K182	gg	aa	cc	cc	gg
K186	gg	aa	cc	cc	gg
K189	gg	aa	cc	cc	gg
K263	gg	aa	cc	cc	gg
K266	gg	aa	cc	cc	gg
K267	gg	aa	cc	cc	gg
K269	gg	aa	cc	cc	gg
K272	gg	aa	cc	cc	gg
K273	gg	aa	cc	cc	gg
K279	gg	aa	cc	cc	gg
K280	gg	aa	cc	cc	gg

Załącznik 10. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS3* dla grupy kontrolnej

Kod pacjenta	rs12059	rs11889212	rs1061489	rs17849241	rs72899753
	Ekson 2				3'UTR
C8	gg	aa	cc	cc	gg
C11	gg	aa	cc	cc	gg
C12	gg	aa	cc	cc	gg
C13	gg	aa	cc	cc	gg
C14	gg	aa	cc	cc	gg
C15	gg	aa	cc	cc	gg
C36	gg	aa	cc	cc	gg
C39	gg	aa	cc	cc	gg
C51	gg	aa	cc	cc	gg
C52	gg	aa	cc	cc	gg
C53	gg	aa	cc	cc	gg
C54	gg	aa	cc	cc	gg
C68	gg	aa	cc	cc	gg
C69	gg	aa	cc	cc	gg
C70	gg	aa	cc	cc	gg
C71	gg	aa	cc	cc	gg
C73	gg	aa	cc	cc	gg
C74	gg	aa	cc	cc	gg
C75	gg	aa	cc	cc	gg
C76	gg	aa	cc	cc	gg
C208	gg	aa	cc	cc	gg
C209	gg	aa	cc	cc	gg
C210	gg	aa	cc	cc	gg
C211	gg	aa	cc	cc	gg
C212	gg	aa	cc	cc	gg
C213	gg	aa	cc	cc	gg
C5	gg	aa	cc	cc	gg
C6	gg	aa	cc	cc	gg
C24	gg	aa	cc	cc	gg
C25	gg	aa	cc	cc	gg

Załącznik 11. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy SOZN

Kod pacjenta	rs150449336	rs41395245	rs56047066	rs17853110	rs138131726	rs6738426	rs61746760	rs41489952	rs3768721	rs41449044	rs17853109	rs17771838	rs61740036	rs147136060	rs182123759	rs3768720	rs41379147	rs41432848
	Ekson 2															3'UTR		
K77	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K94	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K100	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K103	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K115	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K119	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K123	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K128	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K132	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K72	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K162	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K98	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K42	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K75	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K82	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K102	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K108	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K109	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K126	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K134	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K84	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K139	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K142	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K160	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K169	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K170	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K175	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K177	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K207	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K183	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K51	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K217	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K202	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K214	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	ct	ct
K258	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K146	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K193	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K199	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K262	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K259	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K265	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc

Załącznik 12. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy SWZN

Kod pacjenta	rs150449336	rs41395245	rs56047066	rs17853110	rs138131726	rs6738426	rs61746760	rs41489952	rs3768721	rs41449044	rs17853109	rs17771838	rs61740036	rs147136060	rs182123759	rs3768720	rs41379147	rs41432848
	Ekson 2															3'UTR		
K43	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K110	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K130	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K131	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K133	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K136	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K168	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K161	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K140	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K191	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K198	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K254	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K256	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K101	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K111	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K154	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K156	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K179	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K180	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K182	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K186	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K189	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K263	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K266	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
K267	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gg	ct	ct
K269	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K272	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
K273	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K279	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
K280	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	ct	ct

Załącznik 13. Wykaz genotypów dla analizowanych polimorfizmów SNP w genie *SOCS5* dla grupy kontrolnej

Kod pacjenta	rs150449336	rs41395245	rs56047066	rs17853110	rs138131726	rs6738426	rs61746760	rs41489952	rs3768721	rs41449044	rs17853109	rs17771838	rs61740036	rs147136060	rs182123759	rs3768720	rs41379147	rs41432848
	Ekson 2															3'UTR		
C8	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C11	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C12	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C13	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C14	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C15	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	tt	tt
C36	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C39	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C51	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C52	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
C53	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C54	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C68	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
C69	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C70	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C71	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C73	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C74	aa	cc	cc	cc	gg	gg	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C75	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C76	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C208	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C209	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C210	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cg	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	tt	cc	cc
C211	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C212	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	ct	ct
C213	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C5	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C6	aa	cc	cc	cc	gg	ag	gg	cc	gg	cc	gg	ag	cc	cc	gg	gg	cc	cc
C24	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc
C25	aa	cc	cc	cc	gg	aa	gg	cc	gg	cc	gg	gg	cc	cc	gg	gt	cc	cc