

POLIMORFIZM GENÓW UKŁADU RENINA-ANGIOTENSINA (RA) I PROMOTORA GENU TGF- β 1 W PATOGENEZIE NEFROPATII ODPŁYWOWEJ U DZIECI – DONIESIENIE WSTĘPNE

POLYMORPHISM OF GENES OF THE RENIN-ANGIOTENSIN (RA) SYSTEM AND TGF- β 1 PROMOTER IN PATHOGENESIS OF REFLUX NEPHROPATHY IN CHILDREN – PRELIMINARY REPORT

Andrzej Brodkiewicz, Grażyna Adler¹, Sebastian Woźniak, Elwira Szychot¹,
Jarosław Peregud-Pogorzelski, Janusz Fydryk, Andrzej Ciechanowicz¹

I Klinika Chorób Dzieci Katedry Chorób Dzieci PAM

¹Samodzielna Pracownia Patobiochemii i Biologii Molekularnej PAM

Streszczenie: Nasilenie aktywności układu RA (renina-angiotensyna) w nerkach powoduje trwale zwiększenie ekspresji i aktywności TGF- β , a w konsekwencji indukcję procesów włóknienia tkankowego. **Cel pracy.** Celem projektu było (i) opracowanie i/lub optymalizacja metod identyfikacji polimorfizmu: I/D genu ACE, G(-6)A genu ATG, A1166C genu AT1R, C(-509)T genu TGF- β 1 oraz (ii) ocena związku powyższych polimorfizmów z predyspozycją do rozwoju nefropatii refluksowej RN u dzieci. **Materiał i metoda.** Badania przeprowadzono u 52 dzieci z przebyłym/zakażeniem/zakażeniami układu moczowego (UTI) oraz u 52 zdrowych dzieci stanowiących grupę kontrolną. **Wyniki.** Pomiedzy grupą badaną a grupą kontrolną nie obserwowano istotnych różnic w rozkładzie badanych genotypów genów ACE, AT1R i ATG. Natomiast częstość występowania homozygot CC TGF- β 1 w porównaniu do nosicieli allelu T (CT + TT) w grupie UTI była znamienne większa ($p < 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto w grupie UTI częstość występowania tych homozygot wśród dzieci z wstecznym odpływem pęcherzowo-moczowodowym (VUR) była istotnie większa ($p < 0,05$) w porównaniu do dzieci bez odpływu. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy pacjentami o różnych genotypach z grupy badanej w zakresie: rozkładu płci, liczby nawrotów i nasilenia objawów klinicznych UTI, stopnia odpływu/ów, ilości blizn w nerkach, wielkości nerek, wartości skurczowego lub rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz stężenia kreatyniny i mocznika w surowicy. **Wnioski.** Wyniki naszych wstępnych badań sugerują związek pomiędzy genotypem CC promotora TGF- β 1 i występowaniem wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego u dzieci z UTI. **Słowa kluczowe:** dzieci, nefropatia odpływowa, układ renina-angiotensyna, TGF- β 1, polimorfizm genu

Abstract: Increase in the activity of the renin-angiotensin-aldosterone system in kidneys leads to a permanent increase of both the expression and activity of TGF- β factor responsible for the induction of tissue fibrosis. **The aim of the project** was (i) to introduce and/or optimise methods of identification of polymorphism for: I/D in the ACE gene, G(-6)A in the ATG gene, A1166C in the AT1R gene, C(509)T in the TGF- β 1 gene with (ii) analysis of association of aforementioned polymorphisms with respect to reflux nephropathy predisposition in children. **Material and methods.** The study was carried out in 52 children with history of urinary tract infection (UTI) and the control group of 52 healthy children. **Results.** No significant difference in the distribution of considered ACE, AT1R, and ATG genotypes was observed between the control and studied group. However, the prevalence of individuals homozygous for C allele of TGF- β 1 compared to T allele carriers (CT or TT genotype) was significantly higher ($p < 0.05$) in the studied group in comparison to the control group. Moreover, in the UTI group the number of CC homozygotes in children with vesico-urethral reflux (VUR) was significantly higher ($p < 0.05$) than in children without a reflux. Insignificant differences with respect to various genotypes in the study group were noted for age distribution, recurrence and severity of UTI, degree of reflux, kidney cicatrix formation, kidney size, systolic and diastolic arterial blood pressure, creatinine and urea concentration in serum. **Conclusions.** The results of our preliminary study suggest the association between CC genotype of TGF- β 1 promoter and VUR in children with UTI.

Key words: children, reflux nephropathy, renin-angiotensin system, TGF- β 1, gene polymorphism

Wstęp

Termin nefropatia odpływowa (ang. *reflux nephropathy, RN*), zaproponowany przez Baileya w 1973 r. określa bli-

znowaty, ogniskowy zanik mięszu nerkowego na przestrzeni od szczytu kielichów nerki do jej powierzchni, który może dotyczyć jednej lub obu nerek. RN związana jest z wstecznym odpływem pęcherzowo-moczowodowym (ang. *vesi-*

co-urethral reflux - VUR) i zakażeniem układu moczowego (ang. *urinary tract infection - UTI*) (1, 2). W przypadku rozpoznania pierwotnego VUR częstość występowania RN rośnie wraz z wiekiem, w którym postawiono rozpoznanie VUR (1). Dillon i wsp., Jacobson i wsp. oraz Feather i wsp. zwracają uwagę na ścisły związek pomiędzy nasileniem zmian bliznowatych w nerkach a stopniem VUR, częstością występowania epizodów UTI (głównie *pyelonephritis acuta*) i uropatogennymi szczepami bakterii wywołującymi zakażenie (1, 3, 4). Krzeska i wsp. oraz Dillon i wsp. określają częstość występowania RN w populacji na 1/250 (1, 2). Nadal utrzymują się duże kontrowersje co do patogenyzy nefropatii odpływowej, doboru wykonywanych badań diagnostycznych oraz sposobów jej prewencji i terapii. Rozbieżności te dzielą nefrologów dziecięcych na zwolenników poglądu, że odpływ i UTI są czynnikami niezbędnymi do bliznowacenia nerek oraz na tych, którzy uważają że wystarczy samo hydrodynamiczne działanie odpływu („odpływ sterylny”) (1, 2). Wielu autorów podkreśla też rolę predyspozycji genetycznej do wystąpienia VUR (1-3, 5). Obecność VUR nie musi wiązać się z rozwojem RN. Przeprowadzone w ostatnich latach badania molekularne pozwoliły na identyfikację polimorfizmu kluczowych genów układu renina-angiotensyna (RA) oraz na określenie ich związku ze zwiększoną aktywnością układu RA. Nasilenie aktywności układu RA w nerkach powoduje poprzez trwałe zwiększenie ekspresji i aktywności TGF- β nasilenie procesów włóknienia tkankowego, a w konsekwencji nadmierną akumulację macierzy pozakomórkowej. Dodatkowym modulatorem procesu włóknienia w tkankach wydaje się być również polimorfizm genu kodującego TGF- β 1 (6, 7). Niekwestionowana rola TGF- β 1 w procesach włóknienia oraz wpływ angiotensyny II (ANG II) na zwiększenie jego aktywności nasuwa przypuszczenie, iż stan układu RA może mieć istotne znaczenie dla rozwoju RN u dzieci z VUR.

Cel pracy

Celem projektu było opracowanie i/lub optymalizacja metod identyfikacji polimorfizmów: I/D genu ACE, G(-6)A genu ATG, A1166C genu AT1R, C(-509)T genu TGF- β 1 oraz ocena związku powyższych polimorfizmów z predyspozycją do rozwoju RN u dzieci.

Materiał i metody

Grupa badana

Badaniami objęto 52 dzieci (36 dziewczynek, 16 chłopców) w wieku od 1 do 170 miesięcy (mediana czasu obserwacji 58 miesięcy), które przebyły zakażenie układu moczowego (UTI) i pozostawały pod opieką Przyklinicznej Poradni Nefrologicznej. W ramach projektu u wszystkich tych pacjentów wykonano: badania biochemiczne (ocena funkcji nerek) oraz bakteriologiczne (posiew moczu), usg jamy brzusznej, cystourethrografię mikcyjną, scyntygrafię statyczną (DMSA znakowane Tc ^{99m}). U każdego dokonano również szczegółowej oceny klinicznej według protokołu uwzględniającego wywiad chorobowy, wywiad rodzinny, stosowane leczenie, stan przedmiotowy, całodobowe pomiary ciśnienia tętniczego przy użyciu aparatów firmy Space-Lab, konsultację okulistyczną (ocena dna oka), pomiary antropometryczne (ocena rozwoju fizycznego dziecka). W zależności od przypadku i wskazań badania były odpowiednio modyfikowane. Wsteczne odpływy pęcherzowo-moczowodowe klasyfikowano wg pięciostopniowej skali międzynarodowej. Na podstawie wyników scyntygrafii statycznej wg kryteriów zaproponowanych przez Howarda i wsp., oceniano obecność i rozległość blizn (blizny) w miąższu nerek (8). Scyntygrafia statyczna była wykonywana w pierwszych dwóch ty-

godniach od pierwszego epizodu UTI. Kontrolna scyntygrafia statyczna była przeprowadzona najwcześniej po 6 miesiącach od badania pierwszego (z reguły po 12 miesiącach). Kontrolę rozkładu badanych genotypów w populacji stanowiła, zgodna co do płci i liczebności, grupa dzieci bez zakażeń układu moczowego, z aktualnym, prawidłowym wynikiem badania usg jamy brzusznej. Z badań wykluczeni zostali pacjenci z potwierdzonymi zaburzeniami neurologicznymi czynności pęcherza moczowego (np. przepuklina oponowo-rdzeniowa) oraz z wadami układu moczowego innymi niż odpływ pęcherzowo-moczowodowy.

Izolowanie DNA

W celu izolacji DNA od każdego dziecka pobierano jednorazowo 5 ml krwi żyłnej do probówek z 0,1 ml 5% EDTA. Genomowy DNA z leukocytów izolowano metodą nieenzymatyczną i nieorganiczną z użyciem 2% roztworu Tritonu X-100 (9).

Polimorfizm I/D genu ACE

Dla oceny polimorfizmu I/D genu ACE przy amplifikacji DNA w PCR stosowano parę oligonukleotydów: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3', jako starter sensowny i 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGCTC-3', jako starter antysensowny (10). Produktami PCR z tymi starterami są fragmenty DNA: dla allelu D fragment o długości 319 par zasad (pz), a dla allelu I fragment o długości 597 pz. W przypadku dzieci wstępnie określonych jako homozygoty DD, genotyp weryfikowano poprzez wykonanie drugiej PCR z parą oligonukleotydów: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3', jako starterem sensownym, i 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3', jako starterem antysensownym. Druga para starterów jest swoista dla allelu I (10).

Polimorfizm G(-6)A genu ATG

Dla oceny polimorfizmu G(-6)A genu ATG zaprojektowano własne startery do PCR. Jako starter sensowny przy amplifikacji DNA w PCR stosowano oligonukleotyd 5'-GTCGCTTCTGGCATCTGCCTTCT-3', a jako starter antysensowny oligonukleotyd 5'-CCCCCGCTTACCTTCTGCT-3'. Produktem PCR z tymi starterami jest fragment DNA o długości 193 pz obejmujący nukleotydy od 146 do 47 genu ATG (11). Produkt PCR był następnie poddawany trawieniu enzymem restrykcyjnym *EcoRII*.

Polimorfizm A1166C genu AT1R

W ocenie polimorfizmu A1166C genu AT1R zastosowano metodę PCR-AFLP opracowaną przez Nakauchi (12). Amplifikację DNA w PCR prowadzono z oligonukleotydami: 5'-TCCTTGAGCACTTCACTACCAAATGGGC-3', jako starterem sensownym, i 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGCTC-3', jako starterem antysensownym. Produktem PCR z tymi starterami jest fragment DNA o długości 201 pz obejmujący nukleotydy od 1136 do 1336 genu AT1R (12). Produkt PCR był następnie poddawany trawieniu enzymem restrykcyjnym *HaeIII*.

Polimorfizm C(-509)T genu TGF- β 1

W ocenie polimorfizmu C(-509)T promotora genu TGF- β 1 zastosowano metodę PCR-AFLP opracowaną przez Granger (13). Amplifikacja DNA w PCR była prowadzona z oligonukleotydami: 5'-CAGACTCTAGAGACTGTGAC-3', jako starterem sensownym i 5'-GTCACCAGAGAAAGAGAC-3', jako starterem antysensownym. Produktem PCR z tymi starterami jest fragment DNA o długości 419 pz. Produkt PCR był następnie poddawany trawieniu enzymem restrykcyjnym *Bsu36I*.

Protokół PCR-AFLP

Próbki DNA (40 ng) były amplifikowane w roztworze o końcowej objętości 20 μ l zawierającym: 4 pM każdego z pary starterów, 2,5 mM każdego z trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), bufor do PCR (końcowe stężenie magnezu: 1,5 mM MgCl₂) i 0,5 jednostki polimerazy Taq (MBI Fermentas). Amplifikacje prowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) w nastę-

Tabela 1. Rozkład genotypów ACE, ATG, AT1R i TGF-β1 u dzieci z zakażeniem układu moczowego [UTI (+)] i w grupie kontrolnej [UTI (-)].

	Zakażenia układu moczowego (+) UTI (+) (n=52)	p <	Kontrola
ACE(%)			
II	8(15,4)	n.s.	11 (21,2)
ID	29(55,8)		25 (48,1)
DD	15 (28,8)		16 (30,8)
ATG (%)			
AA	10 (19,3)	n.s.	11 (21,2)
AG	29 (55,8)		25 (48,1)
GG	13 (25,0)		16 (30,8)
AT1R (%)			
AA	31 (59,6)	n.s.	22 (42,3)
AC	20 (38,5)		27 (51,9)
CC	1 (1,9)		3 (5,8)
TGF-β1 (%)			
CC	28 (53,8)*	n.s.	17 (32,7)
CT	16 (30,0)		22 (42,3)
TT	8 (15,4)		13 (25,0)

* p < 0,05 w porównaniu do nosicieli allelu T (CT+TT)

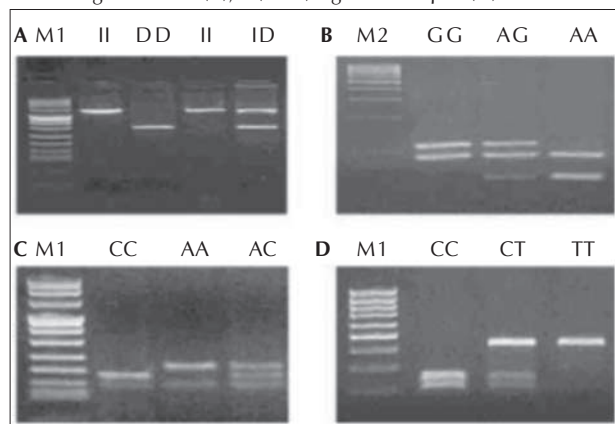
pujących warunkach: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 minut, a następnie 35 cykli: denaturacja w temperaturze 94°C przez 15 sekund, wiązanie starterów przez 30 sekund w temperaturze 58°C (dla obu par starterów ACE) lub 62°C (dla pozostałych genów) oraz wydłużanie łańcucha w temperaturze 72°C przez 30 sekund PCR kończyło 8-minutowe wydłużanie łańcucha w temperaturze 72°C. Powstałe amplicony trawiono odpowiednimi restryktazami, a powstałe fragmenty restrykcyjne rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym wybarwianym bromkiem etydydy. W celu dokumentacji wyników wykonywano zdjęcia żeli w nadfiolecie.

Analiza statystyczna

Stosując test Kołmogorowa Smirnowa stwierdzono, że rozkład zmiennych ilościowych różnił się istotnie od rozkładu normalnego. Stąd też wyniki dotyczące tych danych przedstawiono w postaci mediany, podając także wartość minimalną i maksymalną, a w analizie statystycznej zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa i/lub Mann'a-Whitney'a. W ocenie zmiennych jakościowych zastosowano test χ^2 .

Wyniki

U wszystkich pacjentów z grupy badanej i grupy kontrolnej, dla każdego z badanych genów uzyskano dobrej jakości rozdziały elektroforetyczne ampliconów poddanych ana-

Rycina 1. Polimorfizm I/D genu ACE (A), G(-6)A genu ATG (B), A1166C genu AT1R (C), C(-509)T genu TGF-β1 (D).

M1 – marker wielkości DNA pUC Marker Mix 8 (MBI Fermentas)
M2 – marker wielkości DNA GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas)

Tabela 2. Charakterystyka badanych dzieci w zależności od obecności wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego [VUR (+)] lub braku wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego [VUR (-)], mediana (zakres).

	Odpływ pęcherzowo-moczowodowy (+) VUR (+) (n=24)	p <	Odpływ pęcherzowo-moczowodowy (-) VUR (-) (n=28)
Dziewczynki/ Chłopcy			
	23/1	0,005	13/15
Wiek (miesiące)			
	121 (30-204)	n.s.	120 (6-180)
Wiek pierwszego ZUM (miesiące)			
	24 (1-108)	0,05	44 (2-156)
Okres obserwacji (miesiące)			
	82 (9-170)	0,001	36 (1-150)
Stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)			
	51,3 (26,5-71,6)	n.s.	52,2 (20,3-88,4)
Nefropatia odpływowa (+/-)			
	6/18	n.s.	2/26
ACE(%)			
II	3(12,5)	n.s.	5 (17,9)
ID	15(62,5)		14 (50,0)
DD	6 (25,0)		9 (32,1)
ATG (%)			
AA	5 (20,8)	n.s.	5 (17,9)
AG	14 (58,4)		15 (53,5)
GG	5 (20,8)		8 (28,6)
AT1R (%)			
AA	16 (66,7)	n.s.	15 (53,6)
AC	8 (33,3)		12 (42,8)
CC	0 (0,0)		1 (3,6)
TGF-β1 (%)			
CC	17 (70,8)*	n.s.	11 (39,0)
CT	5 (20,8)		11 (39,3)
TT	2 (8,3)		6 (21,4)

* p < 0,05 w porównaniu do nosicieli allelu T (CT+TT)

lizie restrykcyjnej. Pozwoliło to na wiarygodne i jednoznaczne określenie indywidualnych genotypów. We fragmencie genu ACE amplifikowanym z pierwszą parą starterów (ryc. 1A), z uwagi na zjawisko preferencyjnej amplifikacji krótszych fragmentów DNA (w tym przypadku allelu D) i stąd ryzyko "niedoszacowania" częstości występowania genotypu ID, istniała konieczność weryfikacji próbek DNA od osób, wstępnie określonych jako homozygoty DD. Produkt PCR (długości 395 pz) z drugą parą primerów jest dowodem obecności genotypu ID, brak powyższego produktu potwierdza obecność genotypu DD. W amplifikowanym fragmencie genu ATG o długości 193 pz istnieje naturalne miejsce restrykcyjne *Eco RI*: po trawieniu powstają fragmenty o długości 110 i 83 pz, co jest charakterystyczne dla allelu G(-6). Transycja G/A w pozycji (-6) powoduje powstanie dodatkowego miejsca restrykcyjnego *Eco RI*, co prowadzi do powstania fragmentu restrykcyjnego 83 pz i dwóch fragmentów restrykcyjnych po 55 pz [allel A(-6)] (ryc. 1B). W starterze sensownym dla AT1R w miejsce trzeciej od końca 3' adeniny obecnej w prawidłowej sekwencji genu wprowadzono guaninę (podkreślone G). Spowodowało to pojawienie się miejsca restrykcyjnego dla enzymu *Hae III* w przypadku obecności cytozyny w pozycji 1166 (allel C1166) i trawienie produktu PCR na fragmenty 171 i 30 pz. Natomiast allel A1166 po inkubacji z enzymem *Hae III* pozostaje niestrawiony (rycina 1C). W amplifikowanym fragmencie genu TGF-β1 w allelu C(-509) istnieje naturalne miejsce restrykcyjne dla enzymu *Bsu36I* i po trawieniu powstają fragmenty o długości 228 i 191 pz. Transycja cytozyny w pozycji -509 na tyminę powoduje utratę miejsca restrykcyjnego *Bsu36I* i produkt PCR pozostaje niestrawiony (ryc. 1D).

Grupa badana [UTI (+)] i grupa kontrolna [UTI (-)] nie różniły się istotnie w zakresie rozkładu płci i wieku. Pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic

Tabela 3. Charakterystyka badanych dzieci w zależności od obecności [RN (+)] lub braku nefropatii odpływowej [RN (-)].

	Nefropatia odpływowa (+) RN (+) (n=8)	p<	Nefropatia odpływowa (-) RN (-) (n=44)
Dziewczynki/ Chłopcy	7/1	n.s.	31/13
Wiek (miesiące)	162 (60-180)	0,05	111 (6-204)
Wiek pierwszego ZUM (miesiące)	24 (6-108)	n.s.	36 (1-156)
Okres obserwacji (miesiące)	126 (14-170)	0,01	39 (1-160)
Stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)	53,9 (35,4-63,6)	n.s.	51,3 (20,3-88,4)
ACE(%)			
II	0 (0,0)	n.s.	8 (18,2)
ID	6 (75,0)		23 (52,3)
DD	2 (25,0)		13 (29,5)
ATG (%)			
AA	3 (37,5)	n.s.	7 (15,9)
AG	4 (50,0)		20 (56,8)
GG	1 (12,5)		12 (27,3)
AT1R (%)			
AA	5 (62,5)	n.s.	26 (59,1)
AC	3 (37,5)		17 (38,6)
CC	0 (0,0)		1 (2,3)
TGF-β1 (%)			
CC	6 (75,0)	n.s.	22 (50,0)
CT	2 (25,0)		14 (31,8)
TT	0 (0,0)		8 (18,2)

w rozkładzie genotypów ACE, AT1R i ATG (tab. 1). Pomiędzy obiema grupami obserwowano jedynie znikomą różnicę w odsetku homozygot CC TGF-β1 w stosunku do nosicieli allelu T (CT+TT) ($p<0,05$). W obu grupach stwierdzony rozkład genotypów wszystkich genów nie różnił się znacząco od rozkładu przewidywanego na podstawie równania Hardy'ego-Weinberga. W grupie z UTI (+) dominowały dziewczynki (69,2%). Analizując dane w grupie dzieci z UTI, u chorych z VUR pierwszy epizod zakażenia układu moczowego wystąpił znacznie wcześniej w porównaniu do dzieci bez wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego ($p<0,05$). W grupie z VUR również dominowały dziewczynki ($p<0,005$), a okres obserwacji w tej grupie był znacznie dłuższy ($p<0,001$) w porównaniu do dzieci bez odpływu. Pomiędzy grupami VUR(+) i VUR(-) nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu kreatyniny w surowicy, częstości występowania nefropatii refluksowej oraz w rozkładzie genotypów ACE, AT1R i ATG (tab. 2). Jedynie częstość homozygot CC TGF-β1 w grupie dzieci z VUR była istotnie większa w porównaniu do dzieci bez odpływu ($p<0,05$). Dzieci z potwierdzoną obecnością nefropatii refluksowej były starsze ($p<0,05$), a okres ich obserwacji istotnie dłuższy ($p<0,01$) w porównaniu do grupy dzieci z UTI, u których nie doszło do tworzenia zmian bliznowatych w nerkach. Pomiędzy grupami RN(+) i RN(-) nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie płci, stężeniu kreatyniny w surowicy, wieku pierwszego zachorowania na UTI oraz w rozkładzie genotypów czterech badanych genów (tab. 3). W grupie badanej nie stwierdzono także istotnych różnic u osób o różnych genotypach w zakresie: rozkładu płci, liczby nawrotów i nasilenia objawów klinicznych UTI, stopnia odpływu/wówu, ilości blizn w nerkach, wielkości nerek, wartości skurczowego lub rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz stężenia kreatyniny w surowicy.

Dyskusja

Przekonujące dowody wskazują, że w nerce, podobnie jak w wielu innych narządach, obok krążącego układu RA, istnieje jego lokalny, tkankowy odpowiednik. Wyniki badań

przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat udowodniły, że angiotensyna II (ANG II), główny mediator układu RA, przejawia wielokierunkowe działania, takie jak: stymulacja wzrostu komórek, indukcja procesów włóknienia tkankowego i immunomodulacja, które wykraczają poza klasyczne, dobrze poznane funkcje tego peptydu (14). Kluczowym pośrednikiem takiego działania angiotensyny II jest transformujący czynnik wzrostu-beta (TGF-β). Nasilenie nerkowej aktywności układu RA powoduje trwałe zwiększenie ekspresji i aktywności TGF-β, a w konsekwencji nadmierną akumulację macierzy pozakomórkowej, prowadząc do progresji przewlekłej niewydolności nerek (15). Przeprowadzone w ostatnich latach badania molekularne pozwoliły nie tylko na identyfikację polimorfizmów kluczowych genów układu renina-angiotensyna, w tym genu kodującego angiotensynogen (ATG), genu kodującego enzym konwertujący angiotensynę I (ACE) i genu kodującego typ I receptora dla ANG II (AT1R), ale także na ich powiązanie funkcjonalne ze zwiększoną aktywnością tak ogólnego (krążącego), jak i lokalnego (tkankowego) układu RA. Opublikowano tylko kilka prac potwierdzających związek polimorfizmu genu ACE ze zwiększoną skłonnością do tworzenia się zmian bliznowatych w nerkach dzieci z UTI i VUR (5,16-23). Polimorfizm I/D genu kodującego enzym konwertujący angiotensynę I (ACE) polega na odpowiednio insercji lub delecji 287 par zasad w obrębie 16 intronu (24). Obecność genotypu DD czy też przynajmniej jednego allelu delecyjnego (genotyp ID) wiąże się z wyższą aktywnością ACE zarówno w osoczu, jak i w tkankach (24, 25). W 1997 r. na podstawie badań przeprowadzonych w małej grupie dzieci ($n=26$) Ozen i wsp. stwierdzili, że obecność genotypu DD genu ACE dziewięć razy zwiększa ryzyko tworzenia się blizn w nerkach w przebiegu VUR w porównaniu do dzieci z genotypami II lub ID (26). Dwa lata później ci sami autorzy w dużej grupie dzieci ($n=94$) z VUR III-IV^o ponownie potwierdzili związek genotypu DD z powstawaniem blizn w nerkach (20). W naszej pracy analiza częstości rozkładu genotypów genu ACE nie wykazała statystycznie istotnych zależności pomiędzy częstością występowania genotypu DD a rozwojem RN u dzieci z UTI i VUR (brak istotnej statystycznej zależności może być też powodowany małą liczebnością badanej grupy). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają obserwacje opublikowane w 2000 r. przez Parka i wsp. i w 2001 r. przez Ohtomo i wsp. na dużych grupach dzieci koreańskich i japońskich z VUR oraz w 2002 r. i 2003 r. przez Kowalewską-Pietrzyk i wsp. i w 2002 r. przez Su Jin Cho i wsp. (17-19, 22, 27). Analizując doniesienia Parka i wsp., Ohtomo i wsp. i Sun Jin Cho i wsp. należy pamiętać o populacyjnych różnicach w rozkładzie alleli genu ACE pomiędzy osobami rasy żółtej i białej. Yoneda i wsp. również nie wykazali zależności pomiędzy polimorfizmem genu ACE a rodzinnym występowaniem VUR (23). Inoue i wsp. wykryli, że substytucja adeniny w pozycji (-6) promotora genu ATG przez guaninę zmienia wiązanie jądrowych czynników transkrypcyjnych, prowadząc do nasilenia transkrypcji genu ATG, a w konsekwencji zwiększenia stężenia angiotensynogenu w osoczu (28). W naszej pracy, pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie badanych genotypów genu ATG. Może mieć to związek z małą liczebnością badanej grupy. W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień oceniających związek polimorfizmu genu ATG z tworzeniem się blizn w nerkach u dzieci z UTI i VUR. W nerce ANG II przejawia swoje działanie głównie po związaniu z receptorem typu 1 (AT1R) obecnym zarówno w ścianie naczyniowej, komórkach kłębuszka, jak i komórkach kanalików nerkowych (29). W przydatkach tętnic łukowatych i międzypłatowych u ludzi stwierdzono także obecność drugiego typu receptora ANG II (AT2R), ale jego funkcja nadal pozostaje nie wyjaśniona (21, 29). W regionie niekodują-

cym 3' genu AT1R zidentyfikowano polimorfizm A1166C. Według niektórych autorów obecność allelu z cytozyną w pozycji 1166 wiąże się z upośledzeniem mechanizmu zmniejszenia ekspresji tego receptora w odpowiedzi na angiotensynę II (30). W naszym opracowaniu, podobnie jak w przypadku genu ACE i genu ATG, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania genotypów genu AT1R pomiędzy badanymi grupami. Według naszej wiedzy w literaturze brak jest doniesień poświęconych związkowi polimorfizmu genu AT1R z tworzeniem się blizn w nerkach u dzieci z UTI i VUR. Niekwestionowana rola TGF- β 1 w procesach włóknienia tkankowego oraz wpływ ANG II na zwiększenie jego aktywności nasuwa przypuszczenie, iż może on mieć istotne znaczenie dla określenia predyspozycji oraz rozwoju RN u dzieci z VUR. Pozostający pod kontrolą układu RA gen kodujący TGF- β 1 charakteryzuje się obecnością 7 miejsc polimorficznych, w tym polimorfizmu C915G (Pro25Arg), gdzie obecność argininy w pozycji 25 łańcucha polipeptydowego TGF- β 1 wiąże się nie tylko z wyższym stężeniem tego peptydu w osoczu, ale także z nasileniem procesu włóknienia w tkankach (6, 7). W 1999 r. Grainger i wsp. opisali polimorfizm C(-509)T promotora TGF- β 1 i stwierdzili, że u nosicieli allelu T osoczowe stężenie tego peptydu jest znamienne wyższe w porównaniu do wartości u homozygot CC (13). W naszej pracy, pomiędzy grupą dzieci z UTI a grupą kontrolną stwierdzono znamienne różnicę w odsetku homozygot CC TGF- β 1 w stosunku do nosicieli allelu T. Częstość homozygot CC TGF- β 1 w grupie dzieci z VUR była również istotnie większa w porównaniu do dzieci bez odpływu. Mając na uwadze wyniki Graingera i wsp. można wysnuć hipotezę, że w naszej grupie pacjentów względny niedobór TGF- β 1 u homozygot CC może być czynnikiem predysponującym do wystąpienia odpływu pęcherzowo-moczowodowego. Nie można jednak wykluczyć, że opisane przez nas zjawisko ma jedynie charakter przypadkowej obserwacji, zależnej po części od małej liczebności badanej grupy. W grupie z UTI (+) i VUR (+) dominowały dziewczynki a pierwszy epizod zakażenia układu moczowego u chorych z VUR obserwowano

wcześniej w porównaniu do dzieci bez wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego. Ze względu na warunki anatomiczne pęć żeńska jest jednym z głównych czynników predysponujących do wystąpienia UTI u dzieci (2, 4). Przyczynę tego również można upatrywać w zwiększonej predyspozycji do wystąpienia UTI u dzieci z VUR (2, 4, 30). Dzieci z potwierdzoną obecnością RN były starsze ($p < 0,05$), a okres ich obserwacji dłuższy ($p < 0,01$) w porównaniu do grupy dzieci z UTI, u których nie doszło do tworzenia się zmian bliznowatych w nerkach. Jest to zgodne z obserwacjami Krzeskiej i wsp. oraz Dillona i wsp. którzy uważają, iż rozwój RN wiąże się ze stopniem i czasem trwania odpływu, częstością i ciężkością nawrotów zakażeń, wiekiem dziecka w chwili rozpoznania VUR oraz jego sytuacją społeczno-ekonomiczną (2, 30). W naszym opracowaniu zbyt mała liczba pacjentów z RN nie pozwalała na wiarygodną analizę statystyczną. Wydaje się, że zestawienie wyników polimorfizmu genów układu RA oraz TGF- β 1 z przebiegiem klinicznym oraz wynikami leczenia UTI, VUR oraz RN, w oparciu o dużą liczbę badanych dzieci, może w przyszłości wskazać na celowość uzupełnienia stosowanych aktualnie metod farmakoterapii o inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę II w celu obniżenia produkcji i aktywności TGF- β 1 u pacjentów ze zwiększoną aktywnością układu RA.

Wnioski

1. Zastosowane metody zapewniają wiarygodną identyfikację alleli badanych genów.

2. Obecność genotypu CC promotora TGF- β 1 wydaje się być czynnikiem ryzyka wstecznego odpływu pęcherzowo-moczowodowego u dzieci z zakażeniami układu moczowego.

3. Wyniki naszych wstępnych badań sugerują brak związku polimorfizmu I/D genu ACE, G(-6)A genu ATG, A1166C genu AT1R, oraz C(-509)T genu TGF- β 1 z predyspozycją do rozwoju RN u dzieci.

Praca wykonana w ramach realizacji projektu badawczego KBN nr 4 P05E 091 19

PIŚMIENICTWO:

- Dillon M. J., Goonasekera C. D. Reflux nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, 2377-2383.
- Krzeska I., Krzeski T. Nefropatia refluksowa u dzieci. Warszawa, PZWL, 1996, 9-73.
- Feather S. A., Woolf A. S., Allison J., Barratt T. M., Blydson D. C., Malcolm S. M. Exclusion of key nephrogenesis genes as candidates for familial vesicoureteric reflux (VUR). *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997, 8, 388A.
- Jakobsson B., Berg U., Svensson L. Renal scarring after acute pyelonephritis. *Arch. Dis. Child.* 1994, 70, 111-115.
- Aggarwal V. K., Verrier Jones K. Vesicoureteric reflux: screening of first degree relatives. *Arch. Dis. Child.* 1989, 64, 1538-1541.
- Li B., Khanna A., Sharma V., Singh T., Suthanthiran M., August P. TGF- α 1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension* 1999, 33, 271-275.
- El-Gamel A., Awad M., Sim E., Hasleton P., Yonan N., Egan J., Deiraniya A., Hutchinson I. V. Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1998, 13, 424-430.
- Howard R. G., Roebuck D. J., Yeung P. A., Chan K. W., Metreweli C. Vesicoureteric reflux and renal scarring in Chinese children. *Br. J. Radiol.* 2001, 74, 331-334.
- Lahiri D. K., Bye S., Nummerger J. I., Hodes M. E., Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1992, 25, 193-205.
- Lindpaintner K., Pfeffer M. A., Kreutz R., Stampfer M. J., Grodstein F., LaMotte F., Buring J., Hennekens C.H. A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Eng. J. Med.*, 1995, 332, 706-711.
- Nibu Y., Takahashi S., Tanimoto K., Murakami K., Fukamizu A. Identification of cell type-dependent enhancer core element located in the 3'-downstream region of the human angiotensinogen gene. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 28598-28605.
- Nakauchi Y., Suehiro T., Yamamoto M., Yasuoka N., Arai K., Kumon Y., Hamashige N., Hashimoto K. Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996, 125, 161-169.
- Grainger D. J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P. R., Metcalfe J. C., Carter N. D., Spector T. D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type b1. *Hum. Mol. Genet.* 1999, 8, 93-97.
- Wolf G. Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney: emerging role in the progression of renal disease: beyond haemodynamics. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1131-1142.
- Ketteler M., Noble N.A., Border W.A. Transforming growth factor-b1 and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Annu. Rev. Physiol.* 1995, 57, 279-295.
- Klahr S., Morrissey J. Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int. Suppl.* 1997, 63, S111-114.
- Kowalewska-Pietrzak M., Młynarski W., Młodawska E., Kozłowski J., Kubryn I., Gadzicki M., Bodalski J. Polimorfizm genu konwertazy

- angiotensyna a powstawanie blizn w nerkach u dzieci z odpływem pęcherzowo-moczowodowym. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2002, 12, 352-354.
18. Kowalewska-Pietrzak M., Młynarski W., Młodawska E., Kozłowski J., Kubryn I., Gadzicki M., Bodalski J. Polimorfizm genu konwertazy angiotensyny a powstawanie blizn w nerkach u dzieci z zakażeniami układu moczowego w przebiegu odpływu pęcherzowo-moczowodowego – doniesienie wstępne. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2003, 14, 102-105.
 19. Ohtomo Y., Nagaoka R., Kaneko K., Fukuda Y., Miyano T., Yamashiro Y. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in primary vesicoureteral reflux. *Pediatr. Nephrol.* 2001, 16, 648-652.
 20. Ozen S., Alikasifoglu M., Saatri U., Bakkaloglu A., Besbas N., Kara N., Korak H., Erbas B., Unsal I., Tuncbilek E. Implications of certain genetic polymorphisms in scarring in vesicoureteric reflux: importance of ACE polymorphism. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 34, 140-145.
 21. Zhuo J., Dean R., MacGregor D., Alcorn D., Mendelsohn F. A. Presence of angiotensin II AT2 receptor binding sites in the adventitia of human kidney vasculature. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 1996, 3, S147-154.
 22. Cho S. J., Lee S. J. Ace gene polymorphism and renal scar in children with acute pyelonephritis. *Pediatr. Nephrol.* 2002, 17, 491-495.
 23. Yoneda A., Oue T., Puri P. Angiotensin-converting enzyme genotype distribution in familial vesicoureteral reflux. *Pediatr. Surg. Int.* 2001, 17, 308-311.
 24. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* 1990, 86, 1343-1346.
 25. Danser A. H., Schalekamp M. A., Bax W. A., van den Brink A. M., Saxena P. R., Riegger G. A., Schunkert H. Angiotensin converting enzyme in human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995, 92, 1387-1388.
 26. Ozen S., Alikasifoglu M., Tuncbilek E., Bakkaloglu A., Besbas N., Aran B., Saatci U. Polymorphisms in angiotensin converting enzyme gene and reflux nephropathy: a genetic predisposition to scar formation? *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 2031-2033.
 27. Park H. W., Koo J. W., Kim J. S., Ha I. S., Cheang H. I., Choi Y. Association of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism with reflux nephropathy in children. *Nephron* 2000, 86, 52-55.
 28. Inoue I., Nakajima T., Williams C.S., Quackenbush J., Puryear R., Powers M., Cheng T., Ludwig E. H., Sharma A. M., Jeunemaitre X., Lalouel J.M. A nucleotide substitution in the promotor of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 1786-1797.
 29. Matsubara H., Sugaya T., Murasawa S., Nozawa Y., Mori Y., Masaki H., Maruyama K., Tsutumi Y., Shibasaki Y., Moriguchi Y., Tanaka Y., Iwasaka T., Inada M. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron* 1998, 80, 25-34.
 30. Chudek J., Niemir Z., Kokot F. Znaczenie patogenetyczne polimorfizmu genów układu renina-angiotensyna. *Pol. Arch. Med. Wew.* 1996, 96, 369-377.

Adres do korespondencji:

Dr med. Andrzej Brodkiewicz
I Klinika Chorób Dzieci
Katedry Chorób Dzieci
Pomorska Akademia Medyczna
ul. Unii Lubelskiej 1
Szczecin 71-344
tel: 0 601 79 80 66
e-mail: brodkiewicz@csv.pl

