

## Podonet

### **Podocito paveldimų ligų klinikinis, genetinis ir eksperimentinis tyrimas Steroidams rezistentiško nefrozinio sindromo klinikinis registras ir šeiminio / sindrominio steroidams jautraus nefrozinio sindromo genetinis tyrimas**

**Pagrindinis tyrėjas:**

Prof. med.Dr. Franz Shaefer

Vaikų nefrologijos padalinys

Vaikų ir paauglių medicinos centras

Heidelbergo universiteto ligoninė

Im Neuenheimer Feld 430

Heidelberg69120 Heidelberg, Germany

Telefonas +49-6221-56-2349

Faksas +49-6221-56-5166

franz.schaefer@med.uni-heidelberg.de

**Vietinis tyrėjas Heidelberge:**

Dr.med. Agnes Trautmann

Vaikų nefrologijos padalinys

Vaikų ir paauglių medicinos centras

Heidelbergo universiteto ligoninė

Im Neuenheimer Feld 430

69120 Heidelberg, Germany

Telefonas +49-6221-56-39766

Faksas +49-6221-56-5166

agnes.trautmann@med.uni-heidelberg.de

**Kiti tyrėjai:**

PodoNet darbo grupė (žr. priedą)

**Rėmimas:**

BMBF

## Santrauka

Steroidams rezistentiškas nefrozinis sindromas (SRNS) yra reta, bet reikšminga ir ūmi klinikinė būklė. Ji randama maždaug 15 – 20% vaikų, kuriems diagnozuojamas idiopatinis nefrozinis sindromas. Nors iki 50% ligonių suintensyvintas imunosupresinis gydymas gali pasiekti ligos remisiją ir apsaugoti nuo ilgalaikių pasekmių, vis tik dauguma atvejų pasirodo sąlygoti genetinių sutrikimų. Paveldimos SRNS formos dažniausiai yra rezistentiškos imunosupresiniam gydymui ir greitai progresuoja iki terminalinio inkstų funkcijos nepakankamumo. Ligoniai su genetinėmis SRNS formomis gali atsakyti į intensyvią imunosupresinį gydymą ir liga gali nerecidyvuoti po inksto transplantacijos. Tačiau, kol kas išaiškintų genų paaiškina tik apie pusę visų SRNS atvejų, kurie yra rezistentiški betkokiam imunosupresiniam gydymui.

PodoNet projektas įkurs tarptautinį SRNS registrą. Jo tikslas yra ištirti demografiją imunologinių ir žinomų genetinių formų vaikų ir paauglių su SRNS ir įvertinti genotipo-fenotipo koreliacijas. Dar daugiau, mes tikimės pagerinti klinikinę priežiūrą ir atrasti naujas terapijos strategijas prospektyviai analizuodami ligos išėtis, kurios pasiektos, vartojant įvairius gydymo protokolus. Galiausiai, mes ieškosime naujų SRNS formų.

Dalyvavimas PodoNet registre apims užkoduotą klinikinių duomenų rinkimą kas 6 mėnesius, kraujo ir šlapimo mėginius kas 12 mėnesių bei kraujo DNR tyrimą vieną kartą.

## Turinys

|     |                                |          |
|-----|--------------------------------|----------|
| 1.  | Teorinis pagrindimas .....     | <u>4</u> |
| 2.  | Tyrimo tikslas.....            | <u>5</u> |
| 3.  | Studijos dizainas.....         | <u>5</u> |
| 4.  | Įtraukimo kriterijai.....      | <u>5</u> |
| 5.  | Atmetimo kriterijai.....       | <u>5</u> |
| 6.  | Tyrimų planas .....            | <u>5</u> |
| 7.  | Pasitraukimas iš studijos..... | <u>6</u> |
| 8.  | Statistika .....               | <u>6</u> |
| 9.  | Etiniai aspektai.....          | <u>6</u> |
| 10. | Duomenų apsauga.....           | <u>7</u> |
| 11. | Literatūra.....                | <u>8</u> |

## 1. Teorinis pagrindimas

Idiopatinis nefrozinis sindromas (INS) yra sunki klinikinė būklė daugiausia diagnozuojama vaikams ir pasireiškianti glomerulų selektyvumo praradimu bei masyviu baltymų netekimu su šlapimu ir sunkiomis pasekmėmis baltymų, riebalų metabolizme, hemostazės ir endokrininiais pokyčiais. Dauguma atvejų yra sąlygoti imuninės sistemos išsiregulavimo, tokie ligoniai greitai sureaguoja į gydymą kortikosteroidais ir turi puikią klinikinę prognozę [1].

Priešingai, **steroidams rezistentiškas nefrozinis sindromas** (SRNS) randamas maždaug 15 – 20% vaikų, kuriems diagnozuojamas INS, ir tai žymiai komplikuočiau ligonių grupė. SRNS kumuliacinis paplitimas tarp baltaodžių yra maždaug 3 – 4 ligoniai 100.000 vaikų. Dažniausi patohistologiniai pokyčiai koreliuojantys su SRNS yra židininė segmentinė glomerulosklerozė (**ŽSGS**) [15]. Dalis SRNS pacientų (50%) atsako į suintensyvinatą imunosupresinį gydymą [9; 10; 13]. Pasiiekta remisija koreliuoja su gera ilgalaikė prognoze [4], tuo tarpu rezistentiški gydymui ligoniai progresuoja iki lėtinio inkstų funkcijos nepakankamumo ir palaipsniui iki terminalinio inkstų funkcijos nepakankamumo [8].

Pastarąjį dešimtmetį susidomėjimo objektas buvo grupė SRNS pacientų, kurie buvo rezistentiški bet kokiam gydymui. Ypatingai identifikavimas per pozicinį klonavimą, genų įtrauktį į retas šeiminias SRNS formas su Mendelio paveldimumo keliais, ar tai autosominiu recesyviniu (AR) [2;3;7; 11; 12; 16], ar tai dominantiniu (AD) [6; 19], leido apibūdinti pakenktų **podocitų** struktūrinius ir vystymosi defektus, labai jautrias ir specifiskas visceralinio epitelio ląsteles, padengiančias glomerulų bazinę membraną, formuojant kojelių ataugėles ir veikiančias per unikalų ląstelės su ląstele kontaktą, plyšines diafragmas, sudarančias glomerulų filtracinį barjerą.

SRNS sutrikimas iliustruoja ryškų genetinių tyrimų klinikinį aktualumą ir svarbą pažeistiems pacientams ir jų šeimoms. Vaikai su genetinėmis SRNS formomis gali išvengti gydymo invaziniu imunosupresiniu gydymu [5;14]. Tėvų mutacijų tyrimas gali padėti atsakyti į tolimesnius šeimos planavimo klausimus bei giminių tinkamumą organų donorystei [11]. Dar daugiau, nefrozinio sindromo recidyvo rizika transplantuotame inkste yra žymiai

mažesnė pacientams, kuriems nustatyta struktūriniai podocitų defektai nei imunologinėms SRNS formoms [17; 18]. Pagaliau, iš klinikinio tyrimo pozicijos, ekskludavimas mutacijų nešėjų iš tyrimų protokolų sumažintų neatsakančių pacientų grupę ir taip sumažintų poreikį kontrolinės grupės pacientų, tiriant alternatyvius protokolus.

## **2. Tyrimo tikslas**

PodoNet yra platus tiriamasis tarptautinis projektas skirtas gerinti sveikatą pacientų, sergančių SRNS ir apimantis klinikiškus, genetinius ir novatoriškus eksperimentinius terapinius aspektus. Genetinė ir klinikinė projekto dalis užtikrins geresnes gydymo strategijas dabartiniams ir būsimiems pacientams su SRNS ir padės identifikuoti nepalankių išeičių rizikos faktorius.

PodoNet klinikinio ir genetinio projekto tikslai yra:

1. Surinkti kritinę masę SRNS sergančių pacientų ir jų šeimų bei jų biologinę medžiagą klinikiniam tyrimui ir įsteigti tarptaurinę registraciją on line
2. Sistemiskai tirti genotipo/fenotipo koreliacijas įskaitant ir kliniškai išreikštus SRNS pacientų su jau žinomais genetiniais nukrypimais
3. Aprūpinti gydytojus racionaliais praktiniais klinikiniais algoritmais siekiant harmonizuoti diagnostiką ir gydymą vaikų su SRNS
4. Nustatyti naujus nozologinius vienetus identifikuojant pokyčius naujuose genuose, sukeliančiuose šeiminius ir / ar sindrominius SRNS formas

## **3. Tyrimo dizainas**

Išilginė stebimoji studija renkanti retrospektyviai ir prospektyviai duomenis apie vaikus su steroidams rezistentišku nefroziniu sindromu. Duomenys bus renkami apie ligos istoriją, laboratorinius pokyčius ir genetinę informaciją.

## **4. Įtraukimo kriterijai**

- Vaikai (amžius nuo 0 iki 18 metų) su steroidams rezistentišku nefroziniu sindromu, esantys tyrime dalyvaujančių centrų priežiūroje
- Suaugusieji su šeiminiu steroidams atspariu nefroziniu sindromu

## **5. Atmetimo kriterijai**

- Steroidams jautrus nefrozinis sindromas

## **6. Tyrimo planas**

Bus renkama ir registruojama retrospektyvinė ir prospektyvinė informacija apie klinikinius ligos simptomus, šeiminiai atvejai, susijusios gretutinės ligos, farmakologinis gydymas ir ligos eiga.

Prospektyvinėje tyrimo daly, duomenys bus renkami kas 6 mėnesius mažiausiai trejus metus. Kraujo mėginiai ( 5ml) ir šlapimo mėginiai (20 ml) bus renkami kas 12 mėnesių. Tyrimas tęsis mažiausiai trejus metus. Vienkartina bus imamas kraujas iš paciento, abiejų tėvų ir jei imanoma kitų šeimos narių genetiniams tyrimams.

Klinikiniai duomenys bus perduodami per registruotą internetinį tinklalapį juos užslaptinus (raidiniu ar skaičiaus kodu), leidžiančiu tik vietiniam tyrėjui susieti tyrimus su individualiu pacientu. Taip pat bus užslaptinti ir kraujo, DNR ir šlapimo mėginiai taip, kad tik vietinis tyrėjas ir pacientą prižiūrintis gydytojas žinos konkretaus ligonio tyrimus.

## **7. Pasitraukimas iš tyrimo**

Pacientas galės pasitraukti iš tyrimo jo paties ar jo / jos tėvų pageidavimu ar tuomet, jei pacientas negali atlikti tyrimo diagnostinių procedūrų.

## **8. Statistika**

Tyrimas yra sukurtas kaip tiriamasis, epidemiologinis, išilginis duomenų rinkimas. Jam negali būti taikomi minimalaus pacientų skaičiaus įtraukimo reikalavimai.

## **9. Etiniai aspektai**

Šis pareiškimas yra susijęs klinicine ir genetinė PodoNet projekto dalimi, kuri apima žmogiškuosius subjektus. Tyrimas paklus visiems etiniams reikalavimams, teisei ir reguliavimams, numatytiems Europos Sąjungos bei šalių, kuriose bus atliekamas tyrimas. Tyrėjų ir rėmėjų susivienijimas žino ir gerbs Helsinkio Deklaraciją, Europos Tarybos konvenciją apie žmogaus teisių apsaugą ir biomediciną, visuotinę bioetikos žmogaus teisių deklaraciją ir Pasaulio Sveikatos Organizacijos Tarptautinius Etikos reikalavimus apie biomedicininius tyrimus, į kuriuos yra įtraukiami žmogiškieji subjektai ir Europos Sąjungos Direktyvą apie duomenų apsaugą (95/46/ES). Dar daugiau, konsorciumas laikysis papildomų Protokolų žmogaus klonavimo draudimo bei Visuotinės Deklaracijos apie žmogaus genomą bei žmogaus teises.

Leidimas bus gautas iš visų vietinių Etikos komitetų / Institucijų, kurie dalyvauja tyrimo registre. Bus atsižvelgiama į kiekvieną savitą nacionalinį ar vietinį etikos reikalvimą kiekvienoje konkrečioje įstaigoje.

Projektas apims vaikus, kurių gebėjimas suprasti tikslus, turinį ir tyrimo riziką kinta pagal amžių. Pagal galimybes, informacija bus pateikiama pritaikyta pagal amžių, suprantama tiek žodine, tiek raštiška forma, sutikimas bus gautas tiek iš tėvų, tiek iš paciento. Kaip įprasta už vaikus jaunesnius nei 9 – 10 metų bei protiškai atsilikusius vaikus ir paauglius bei suaugusius pasirašo jų legalus atstovas.

Ir vaikai, ir suaugę šeimos nariai bus informuoti apie galimybę atsisakyti dalyvauti tyrime arba pasitraukti iš jo be jokių pasekmių. Nebus daromas joks spaudimas dalyvauti tyrime. Pagal galimybes sutikimas dalyvauti tyrime bus gautas dalyvaujant nepriklausomam visuomeniniam stebėtojų.

Prieš įtraukiant į tyrimą, pacientai ir jų tėvai gaus išsamią informaciją apie PodoNet projekto tikslus ir procedūras (žr. paciento informacijos ir sutikimo forma). Jie žinos, kad dalyvavimas tyrime gali nebūti naudingas jiems patiems ar gali neturėti įtakos bei būti naudingas jų šeimos planavimui. Jie žinos, kad tyrimų rezultatai gali turėti įtakos bendram supratimui apie genetines ligas bei visuomenės sveikatos gerinimą bei gali būti naudinga rizikos pacientams ar gimusiems su SRNS ateity numatant geresnes prevencijos, diagnostikos ir gydymo strategijas.

Jie taip pat bus informuoti apie tai, kad dalyvavimo šiame tyrime našta yra tikrai nedidelė ir nepadidina jokios rizikos jiems patiems. Turint omeny minimalią stebėjimo, tyrimų riziką paciento draudimo nebus.

Laboratorijos, kuriose bus atliekami žmogaus genetiniai ir biocheminiai tyrimai gaus užkoduotus DNR ar serumo mėginius, kuriuose bus nurodytas centro ir paciento kodas, leidžiantis nustatyti ryšį tarp jo šeimos narių tyrimų mėginių, bet tapatybės liks nežinomos. Tyrėjai gali rasti nukrypimus, turinčius didelę ir iš karto svarbią klinikinę informaciją apie pacientą ar jo šeimos narį. Tokiu atveju dalyvaujančios laboratorijos privalo iš karto pranešti duomenis atsakingam gydytojui, kuris tik vienintelis turi teisę perduoti šią informaciją šeimai. Pacientai ir jų šeimos nariai bus informuojami apie klinikinės reikšmės genetinius radinius. Šeimos nariai taip pat gaus informaciją, kad šie mėginiai nebus naudojami jokiais kitais tikslais kaip tik genų SRNS identifikavimui be jų pritarimo.

## 10. Duomenų apsauga

Dėmesys yra kreipiamas kaip pritaikyti aukščiausius etinius standartus duomenų apsaugai. Svarbu, kad bus paisoma ES Direktyvos 95/46/ES apie individų duomenų teisių apsaugą. Optimalaus konfidencialumo, tikslumo, saugumo ir teisinės priežiūros bus laikomasi sekančiai:

- Visa klinikinė informacija ir biologiniai mėginiai ir audiniai bus perduoti į centrinį ofisą ir laboratorijas pseudononimiškai. Tik gydytojai atsakingi už pacientą galės žinoti rezultatus. Tokiu būdu visi duomenys ir tiriamoji medžiaga už klinikinio centro ribų bus visiškai “depersonalizuota” ir pilna identifikavimo apsauga garantuota.
- Klinikiniai duomenys bus talpinami į saugią elektroninę duomenų laikmeną, laikantis enkripcijos technologijos. Retrospektyviniai duomenys bus renkami iš paciento kortelės, o prospektyviniai duomenys bus įvedami tiesiogiai
- Naudojimas vieningos atvejo aprašymo formos užtikrins adekvatų ir patikimą informacijos registravimą.
- Duomenys bus vartojami tik tiems tikslams, kurie nurodyti. Duomenų vartojimas kitais tikslais galimas tik turint tikslų paciento pritarimą. Taip pat duomenys nebus perduodami už konsorciumo ribų į kitas laboratorijas ar vietas be paciento žinios ir sutikimo.
- Duomenys ir medžiaga bus laikoma tiek laiko, kiek to reikalauja nacionaliniai įstatymai ir taisyklės.

## 11. Literatūra

1. Primary nephrotic syndrome in children: clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity. A Report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int.* 20:765-771, 1981
2. Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat.Genet.* 17:467-470, 1997
3. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat.Genet.* 24:349-354, 2000
4. Cattran DC, Rao P: Long-term outcome in children and adults with classic focal segmental glomerulosclerosis. *Am.J.Kidney Dis.* 32:72-79, 1998
5. Hoyer, P. Steroid resistant nephrotic syndrome, in *Comprehensive Pediatric Nephrology*, edited by Geary D and Schaefer F. 257-268. 2008. Elsevier.

6. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR: Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat.Genet.* 24:251-256, 2000
7. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko 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* 1:575-582, 1998
8. McBryde KD, Kershaw DB, Smoyer WE: Pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Curr.Probl.Pediatr.Adolesc.Health Care* 31:280-307, 2001
9. Niaudet P: Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome and ciclosporin. *French Club of Pediatric Nephrology. Nephron* 57:481, 1991
10. Niaudet P: Treatment of childhood steroid-resistant idiopathic nephrosis with a combination of cyclosporine and prednisone. *French Society of Pediatric Nephrology. J.Pediatr.* 125:981-986, 1994
11. Niaudet P: Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr.Nephrol.* 19:1313-1318, 2004
12. Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE: WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353:431-434, 1991
13. Plank C, Kalb V, Hinkes B, Hildebrandt F, Gefeller O, Rascher W: Cyclosporin A is superior to cyclophosphamide in children with steroid-resistant nephrotic syndrome--a randomized controlled multicentre trial by the Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie. *Pediatr.Nephrol.* 23:1483-1493, 2008
14. 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.* 15:722-732, 2004
15. Srivastava T, Simon SD, Alon US: High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. *Pediatr.Nephrol.* 13:13-18, 1999
16. Weber, S. Hereditary nephrotic syndrome, in *Comprehensive Pediatric Nephrology*, edited by Geary D. and Schaefer F. 2008. Elsevier.
17. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C, Niaudet P, Antignac C: NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int.* 66:571-579, 2004

18. Weber S, Tonshoff B: Recurrence of focal-segmental glomerulosclerosis in children after renal transplantation: clinical and genetic aspects. *Transplantation* 80:S128-S134, 2005
19. 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* 308:1801-1804, 2005