

© Коллектив авторов, 2016

А.Н. Цыгин<sup>1</sup>, А.М. Мазо<sup>1</sup>, П.В. Ананьин<sup>1</sup>, Т.В. Вашурина<sup>1</sup>, А.А. Пушков<sup>1</sup>,  
И.С. Жанин<sup>1</sup>, Д.В. Зверев<sup>2</sup>, Х.М. Эмирова<sup>2</sup>, Т.Е. Панкратенко<sup>2</sup>, А.Л. Музуров<sup>2</sup>,  
В.М. Негода<sup>3</sup>, О.Б. Заболотских<sup>4</sup>, В.Н. Баринов<sup>5</sup>, Н.В. Ушакова<sup>6</sup>, Б.Г. Макарець<sup>7</sup>,  
В.В. Альбот<sup>8</sup>, М.Ю. Каган<sup>9</sup>, Н.Ю. Коваль<sup>10</sup>, И.Н. Лупан<sup>11</sup>, Г.М. Галиева<sup>12</sup>,  
К.В. Савостьянов<sup>1</sup>, А.А. Баранов<sup>1</sup>

## КЛИНИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОССИЙСКИХ ДЕТЕЙ С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

<sup>1</sup>Национальный научно-практический центр здоровья детей МЗ РФ, Москва; <sup>2</sup>Детская клиническая больница Св. Владимира, Москва; <sup>3</sup>Ростовская областная детская клиническая больница, г. Ростов-на-Дону; <sup>4</sup>Кировская областная детская клиническая больница, г. Киров; <sup>5</sup>Самарская областная клиническая больница им. В.Д. Середавина, г. Самара; <sup>6</sup>Нижегородская областная детская клиническая больница, г. Нижний Новгород; <sup>7</sup>Красноярский государственный медицинский университет, г. Красноярск; <sup>8</sup>Иркутская государственная областная детская клиническая больница, г. Иркутск; <sup>9</sup>Оренбургская областная детская клиническая больница, г. Оренбург; <sup>10</sup>Детская больница № 1, г. Тверь; <sup>11</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск; <sup>12</sup>Республиканская детская клиническая больница Башкортостана, г. Уфа РФ

Атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) является редким, преимущественно генетическим заболеванием, обусловленным дисфункцией системы комплемента и имеющим тяжелое течение с рецидивами и исходом в терминальную стадию хронической почечной недостаточности. В различных регионах мира отмечается вариабельный спектр генных мутаций, лежащих в основе болезни. Эффективность единственного препарата для лечения аГУС, экулизумаба, изучена недостаточно. Цель исследования – выявление мутаций в генах системы комплемента у детей с аГУС в Российской Федерации, выявление корреляций генотипа и фенотипа болезни, оценка эффективности применения экулизумаба. Материалы и методы исследования: в нашем исследовании проведено исследование генов *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD* методом секвенирования нового поколения и *CFHR1/CFHR3* методом MPLA, анализ историй болезни детей с аГУС с оценкой клинико-лабораторных характеристик дебюта и течения заболевания в зависимости от результатов молекулярно-генетического исследования и применения экулизумаба. В исследование включен 71 ребенок (31 мальчик и 40 девочек в возрасте от 6 мес до 17 лет 10 мес), страдающих аГУС. Результаты: у 46,5% пациентов были выявлены патогенные мутации в генах *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD* и *CFHR1/CFHR3*. Статистически значимых различий в клинических проявлениях дебюта болезни между группами с мутациями и без мутаций получено не было. Однако у пациентов с мутациями значительно чаще отмечались рецидивы. Показано, что экулизумаб эффективен и при позднем назначении (>6 мес от дебюта), позволяя отказаться от длительного диализа, чего не происходит без применения экулизумаба. У 5 детей без мутаций экулизумаб был успешно отменен после применения в течение 1 года. Заключение: частота генных мутаций среди российских детей с аГУС сопоставима с мировой. Результаты генетического исследования позволяют прогнозировать течение заболевания и длительность применения экулизумаба.

**Ключевые слова:** атипичный гемолитико-уремический синдром, гены *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD*, *CFHR1/CFHR3*, экулизумаб, дети.

**Цит.:** А.Н. Цыгин, А.М. Мазо, П.В. Ананьин, Т.В. Вашурина, А.А. Пушков, И.С. Жанин, Д.В. Зверев, Х.М. Эмирова, Т.Е. Панкратенко, А.Л. Музуров, В.М. Негода, О.Б. Заболотских, В.Н. Баринов, Н.В. Ушакова, Б.Г. Макарець, В.В. Альбот, М.Ю. Каган, Н.Ю. Коваль, И.Н. Лупан, Г.М. Галиева, К.В. Савостьянов, А.А. Баранов. Клиническая и генетическая характеристика российских детей с атипичным гемолитико-уремическим синдромом. Педиатрия. 2017; 96 (2): 65–73.

### Контактная информация:

Цыгин Алексей Николаевич – д.м.н., проф., зав. нефрологическим отделением НИИ Педиатрии ФГАУ «Научный Центр Здоровья детей» МЗ РФ  
Адрес: Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-кт, 2, стр. 1  
Тел.: (499) 134-04-49, E-mail: tsygin@nczd.ru  
Статья поступила 15.12.16, принята к печати 20.03.17.

### Contact Information:

Tsygin Alexey Nikolaevich – MD., prof., Head of Nephrology Department, National Scientific-Practical Center of Children's Health  
Address: Russia, 119991, Moscow, Lomonosovskiy Prospect, 2/1  
Tel.: (499) 134-04-49, E-mail: tsygin@nczd.ru  
Received on Dec. 15, 2016, submitted for publication on Mar. 20, 2017.

A.N. Tsygin<sup>1</sup>, A.M. Mazo<sup>1</sup>, P.V. Ananyin<sup>1</sup>, T.V. Vashurina<sup>1</sup>, A.A. Pushkov<sup>1</sup>, I.S. Zhanin<sup>1</sup>,  
D.V. Zverev<sup>2</sup>, H.M. Emirova<sup>2</sup>, T.E. Pankratenko<sup>2</sup>, A.L. Muzurov<sup>2</sup>, V.M. Negoda<sup>3</sup>,  
O.B. Zabolotskih<sup>4</sup>, V.N. Barinov<sup>5</sup>, N.V. Ushakova<sup>6</sup>, B.G. Makarets<sup>7</sup>, V.V. Albot<sup>8</sup>,  
M.Y. Kagan<sup>9</sup>, N.Y. Koval<sup>10</sup>, I.N. Lupan<sup>11</sup>, G.M. Galieva<sup>12</sup>, K.V. Savostyanov<sup>1</sup>, A.A. Baranov<sup>1</sup>

## CLINICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF RUSSIAN CHILDREN WITH ATYPICAL HEMOLITHIC-UREMIC SYNDROME

<sup>1</sup>National Scientific-Practical Center of Children's Health, Moscow; <sup>2</sup>St. Vladimir's Children's Clinical Hospital, Moscow; <sup>3</sup>Rostov Regional Children's Clinical Hospital, Rostov-on-Don; <sup>4</sup>Kirov Regional Children's Clinical Hospital, Kirov; <sup>5</sup>Samara Regional Clinical Hospital named after V.D. Seredavin, Samara; <sup>6</sup>Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod; <sup>7</sup>Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk; <sup>8</sup>Irkutsk State Regional Children's Clinical Hospital, Irkutsk; <sup>9</sup>Orenburg Regional Children's Clinical Hospital, Orenburg; <sup>10</sup>Children's Hospital № 1, Tver; <sup>11</sup>South Ural State medical university, Chelyabinsk; <sup>12</sup>Bashkortostan Republic children's clinical hospital, Ufa, Russia

Atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS) is a rare, mainly genetic disease caused by complement system dysfunction and having a severe course with relapses and outcome interterminal stage of chronic renal failure (CRF). In different regions of the world there is a variable range of gene mutations causing this disease. Efficacy of the only drug for aHUS Eculizumab is not sufficiently studied. Objective of the research – to identify mutations in complement system genes in children with aHUS in the Russian Federation, to identify correlations of disease genotype and phenotype, to evaluate Eculizumab efficacy. This research includes study of *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD* genes by modern sequencing method and *CFHR1/CFHR3* by MPLA method, case histories of children with aHUS analysis with assessment of clinical and laboratory debut characteristics and disease course depending on molecular genetic studies results and Eculizumab use. The study included 71 children (31 boys and 40 girls aged from 6 months to 17 years 10 months) with aHUS. 46,5% of patients had pathogenic mutations in *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD* and *CFHR1/CFHR3* genes. There were no statistically significant differences in debut clinical manifestations between groups with mutations and without mutations. But in patients with mutations, relapses were significantly more frequent. The study proved that Eculizumab is effective also at late appointment (> 6 months after debut) and allows avoid prolonged dialysis, that is impossible without Eculizumab therapy. In 5 children without mutations Eculizumab was successfully canceled after 1 year. The frequency of gene mutations among Russian children with aHUS is comparable world one. Genetic research results allow to predict disease course and duration of Eculizumab therapy.

**Keywords:** atypical hemolytic uremic syndrome, *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD*, *CFHR1/CFHR3* genes, Eculizumab, children.

**Quote:** A.N. Tsygin A.M. Mazo, P.V. Ananyin, T.V. Vashurina, A.A. Pushkov, I.S. Zhanin, D.V. Zverev, H.M. Emirova, T.E. Pankratenko, A.L. Muzurov, V.M. Negoda, O.B. Zabolotskih, V.N. Barinov, N.V. Ushakova, B.G. Makarets, V.V. Albot, M.Y. Kagan, N.Y. Koval, I.N. Lupan, G.M. Galieva, K.V. Savostyanov, A.A. Baranov. Clinical and genetic characteristic of Russian children with atypical hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics*. 2017; 96 (2): 65–73.

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) является наиболее распространенной причиной острой почечной недостаточности в детском возрасте [1]. Типичным вариантом ГУС является постдиарейный, ассоциированный с инфекцией штаммами кишечной палочки, продуцирующими Шига-токсин (СТЕС-инфекция), вызывающий повреждение эндотелия преимущественно почечных сосудов с образованием в них тромбов, нарушающих циркуляцию, что приводит к почечной недостаточности с необходимостью проведения диализа. В отличие от этого, атипичный вариант ГУС (аГУС), встречающийся с частотой 2 случая на 1 млн населения и относящийся к орфанным заболеваниям, является следствием дисфункции системы комплемента, одного из ключевых звеньев иммунной систе-

мы [2]. Неконтролируемая активация альтернативного пути комплемента сопровождается образованием его C5 фракции с последующей выработкой мембрано-атакующего комплекса, вызывающего повреждение эндотелия сосудов и картину тромботической микроангиопатии (ТМА). Причиной дисфункции системы комплемента в большинстве случаев является дефицит комплемент-регулирующих факторов H, I и B (*CFH*, *CFI*, *CFB*), обеспечивающих подавление специфической конвертазы, переводящей C3 фракцию в C5. Основными причинами нарушения продукции комплемент-регулирующих факторов являются мутации генов, кодирующих их выработку, или образование антител, главным образом к фактору H [3–5]. С учетом патогенетических особенностей аГУС часто имеет тяжелое

течение, зачастую с рецидивами и исходом в терминальную стадию хронической почечной недостаточности (ХПН), часть случаев носит семейный характер [6, 7].

В клинических условиях дифференциация типичного и атипичного ГУС очень важна, поскольку имеется возможность применения препарата экулизумаб, представляющего собой моноклональные антитела к С5 компоненту комплемента и блокирующего терминальную часть каскада комплемента [8–10]. Учитывая крайне высокую стоимость препарата, актуальным является углубленное исследование клинических особенностей заболевания, частоты отдельных мутаций и соответствующих им фенотипов болезни с целью совершенствования диагностики и уточнения прогноза и показаний к продолжению терапии.

Цель исследования: установить частоту и тип мутаций генов системы комплемента и их связь с проявлениями заболевания у российских детей с аГУС.

#### Материалы и методы исследования

Настоящее исследование основано на сборе информации о пациентах детского возраста с диагнозом аГУС для изучения анамнестических данных, текущего статуса и последующего наблюдения.

Всем детям проводили молекулярно-генетическое исследование. Таргетные области генов *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP* (мембранного кофакторного протеина) и *THBD* (тромбомодулина), мутации в которых могут вызывать развитие аГУС, были исследованы методом секвенирования нового поколения. Исследование проводили на платформе Roche 454 с применением технологии таргетного обогащения SeqCap EZ (Nimble Gen, Германия). Для исследования использовали разработанную библиотеку гибридных зондов SeqCap EZ Library (IRN 141014\_HG19), содержащую специфичные олигонуклеотидные последовательности для анализа всех таргетных областей. Ядерную геномную ДНК выделяли на автоматической станции выделения ДНК QIACUBE (QIAGEN), согласно стандартных протоколов. Секвенирование нового поколения проводили на платформе Roche 454. Суммарная протяженность исследуемых участков генома для одного образца составила 2,6 т.п.н, что позволяло проводить за один запуск одновременный анализ 12 образцов (библиотек) с более чем 20-кратным средним покрытием таргетных участков.

Биоинформатический анализ был осуществлен в несколько этапов с помощью встроенного программного обеспечения GS Reference Mapper (тримминг и картирование), а также с использованием программных продуктов Alamut Visual, Alamut Batch (Interactive Biosoft ware, Франция). В результате анализа все полученные генетические вариации были проаннотированы, а клинически значимые геномные варианты проверены с использованием базы данных по мутациям HGMD Professional. Анализ ранее не описанных мутаций проводили с помощью компьютерной программы Alamut Visual, позволяющей определять

функциональную значимость мутаций. Все выявленные в процессе исследования мутации и полиморфизмы подтверждались секвенированием по Сэнгеру. Для этого все таргетные фрагменты проанализированы методом прямого автоматического секвенирования с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionkit (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) на автоматическом секвенаторе ДНК ABI 3500 XL (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности были наложены на референсные последовательности Ref Seq Gene из базы данных Национального центра биотехнологической информации.

Для выявления делеций в генах *CFHR1/CFHR3* (белков 1 и 3, относящихся к фактору Н комплемента), ассоциирующихся с антител-опосредованным механизмом развития аГУС, использовали метод мультиплексной амплификации лигированных проб (MPLA). У всех пациентов была исследована хромосомная область 1q31.3.

На основании результатов молекулярно-генетического исследования сформированы группы пациентов с наличием патогенных генетических вариантов (мутации и редкие полиморфизмы) и без таковых. Проводили анализ медицинских выписок для выявления клинических различий в этих группах.

В медицинской документации анализировали: 1) в дебюте заболевания: признаки активности ТМА, потребность в диализе, плазмазамещении, наличие артериальной гипертензии (АГ), экстраренальных осложнений; 2) в течении заболевания: наличие рецидивов, динамика расчетной скорости клубочковой фильтрации (рСКФ), потребность в диализе, АГ, экстраренальные осложнения, эффективность применения экулизумаба. Для вычисления рСКФ использовали формулу Шварца для детей [11].

**Критерии включения.** Поскольку исследуемое заболевание не имеет неоспоримых критериев диагностики и диагноз ставится на основании исключения иных причин ТМА, критериями включения в группу «атипичный гемолитико-уремический синдром» являлось наличие всех или нескольких из следующих показателей: рецидивирующее течение или отсутствие ремиссии ТМА (Кумбс-негативная гемолитическая анемия, тромбоцитопения и почечная недостаточность), снижение показателей С3 фракции комплемента, активность ADAMTS 13 выше 10% от контрольной (исключение тромботической тромбоцитопенической пурпуры), отсутствие диарейного продрома или отрицательный результат исследования на STEC-инфекцию, семейный характер заболевания. В ряде случаев для подтверждения диагноза выполняли биопсию почки, тщательно исключали такие возможные причины ТМА, как системная красная волчанка и лекарственные факторы. В большинстве случаев диагноз подтверждался консилиумом специалистов Федерального медицинского учреждения.

Исследование выполнено на базе нефрологического отделения и лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НЦЗД» МЗ РФ.

Материал для исследования набран в течение 24 месяцев: с сентября 2014 г. по сентябрь 2016 г.

В качестве основного результата исследования оценивали частоту патогенных генетических вариантов (мутаций) у исследованных больных. В качестве дополнительных результатов оценивали наличие рецидивов, формирования терминальной ХПН, АГ, внепочечных осложнений на фоне экулизумаба и без него.

Исследование одобрено Локальным независимым этическим комитетом ФГАУ НЦЗД МЗ РФ.

**Статистический анализ.** Расчет объема выборки не производили, так как основным объектом исследования являются дети с редкой болезнью, и вопрос о включении в исследование рассматривали по отношению ко всем больным с диагностированным на основании экспертных заключений аГУС, чьи биологические образцы и выписки были присланы в нашу клинику.

Статистический анализ полученных данных проведен с помощью пакета анализа IBM SPSS 20 для Windows. Нормальность распределение признаков оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Для показателей с нормальным распределением рассчитаны среднее и стандартное отклонение, для показателей с распределением, отличным от нормального, – медиана и интерквартильный размах. Для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента с уровнем значимости <0,05. Для анализа качественных данных применен метод хи-квадрата, при выявлении в таблице ожидаемых частот менее 5 использован точный тест Фишера с уровнем значимости <0,05.

### Результаты

В исследование был включен 71 ребенок (31 мальчик и 40 девочек) в возрасте от 6 мес до 17 лет 10 мес из 33 регионов России.

Все пациенты удовлетворяли критериям включения.

Средний возраст дебюта заболевания составил  $4,76 \pm 3,86$  лет (от 1 мес до 16,3 лет). Период наблюдения составил Ме 27 [17; 51] мес. Семейные случаи выявлены у 5 пациентов. У всех пациентов отмечались в дебюте болезни анемия ( $Hb < 100$  г/л), тромбоцитопения (тромбоциты  $< 150 \cdot 10^9$ /л), повышение ЛДГ от 5 до 20 норм, протеинурия нефротического уровня у 18 (25%), макрогематурия у 25 (35%). У 48 пациентов сообщалось о проведении заместительной почечной терапии (ЗПТ), 58 проводилось переливание плазмы или плазмаферез. У  $1/4$  пациентов дебют аГУС привел к терминальной ХПН. За период наблюдения 2 пациента умерли (один в дебюте, один при рецидиве в течение 1 года от дебюта), один получил почечный трансплантат, у 2 заболевание прогрессировало до ХПН в течение 1 года. У 18 (25%) человек дебют осложнился судорогами или острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК), еще у 7 пациентов осложнения со стороны ЦНС развились после рецидива ТМА. АГ в дебюте отмечалась у 30 (42%) больных, в динамике развилась еще у 10. Полиорганная недостаточность отмечалась у 8

пациентов в дебюте. Рецидивы аГУС от 1 до 6 отмечались у 46% пациентов (табл. 1).

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований патогенные генетические варианты были выявлены у 33 детей (46,5%), генетические варианты с неизвестной патогенностью и редкие полиморфизмы – у 5 (7%) детей. Среди патогенных генетических вариантов преобладала гомозиготная делеция *CFHR1/CFHR3* – 12 (16,9%), *CFH* – 9 (12,7%), *CFB* – 7 (11,3%) и *MCP* – 3 (8,5%), более редко встречались мутации в генах *CFI* – 1 (1,4%) и *THBD* – 1 (1,4%). Генетические варианты с неизвестной патогенностью и редкими полиморфизмами были найдены в генах *MCP* (3), *CFH* (1) и *CFB* (1) (см. рисунок).

Наиболее часто встречалась нуклеотидная замена с.3148A>T в гене *CFH*. Данная мутация встретилась у 7 пациентов, при этом у одного из таких пациентов был выявлен также патогенный вариант с.374T>G в гене *MCP*. Кроме делеции в генах *CFHR1/CFHR3*, выявленной у 12 пациентов, мутации в гомозиготном состоянии были выявлены только у 2 пациентов: с.3590T>C в гене *CFH* и с.307C>T в гене *MCP*. Интересно отметить, что среди всех выявленных патогенных вариантов были выявлены только миссенс мутации. Мутации сплайсинга, нонсенс-мутации, а также маленькие делеции и дупликации обнаружены не были.

При сравнении клинических особенностей дебюта заболевания статистически достоверной разницы в возрасте начала заболевания, распределении по полу, тяжести проявлений дебюта в этих двух группах не было (табл. 2). Однако при анализе данных в подгруппах по выявленным мутациям отдельных генов было выявлено, что легче дебют протекает в группе патогенных генетических вариантов в гене *MCP*, что согласуется с данными международных исследований [12, 13].

В группе с патогенными вариантами в дебюте заболевания несколько чаще, но без достоверной разницы встречалась АГ (у 18 из 33 носителей мутаций и у 12 из 38 без мутаций,  $p=0,051$ ). В отношении частоты осложнений со стороны

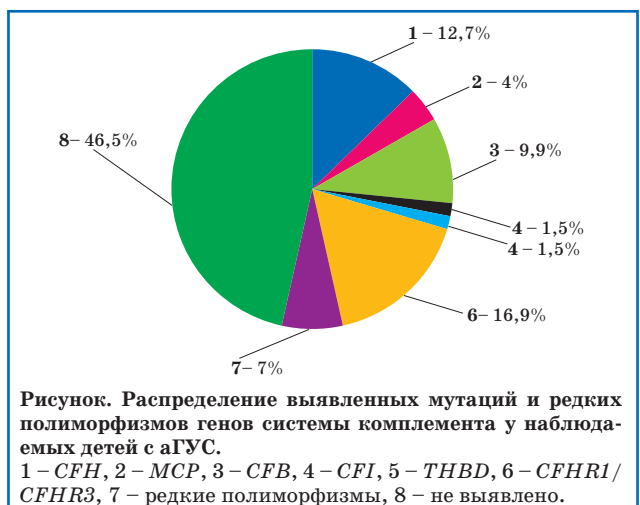


Таблица 1

## Характеристика наблюдаемых детей с аГУС

Показатели	Абс. число пациентов
Пол м/ж	31/40
Семейная форма	5 (7%)
АГ в дебюте	30 (42,3%)
ОНМК/судороги в дебюте	18 (25,4%)
Полиорганная недостаточность в дебюте	8 (11,3%)
Потребность в диализе в дебюте	48 (67,6%)
Потребность в плазме в дебюте	58 (81,7%)
Исход дебюта в ХПН (рСКФ<30 мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> )	18 (25,4%)
Рецидивы	33 (46,5%)
ОНМК/судороги/атрофия коры головного мозга за все время заболевания	25 (35,2%)
АГ за все время заболевания	40 (56,3%)
ХБП II–III стадии через 12 мес от дебюта	16 (22,5%)
ХБП IV–V стадии через 12 мес от дебюта	13 (18,3%)
Умерли в течение 12 мес от дебюта	2 (2,8%)
Трансплантация почки	1 (1,4%)

ХБП – хроническая болезнь почек.

ЦНС в виде ОНМК, судорог, комы и полиорганной недостаточности статистически достоверной разницы также выявлено не было. Потребность в диализе в дебюте аГУС и исход дебюта в терминальную ХПН были сходны в обеих группах. Клинические данные в дебюте аГУС у пациентов с выявленными мутациями представлены в табл. 2, однако в связи с малочисленностью наблюдений статистически достоверной разницы получено не было.

Согласно ряду публикаций [2, 7], диарея может наблюдаться при аГУС и расценивается в подобных случаях как триггер ТМА, опосредованной дисфункцией комплемента. Среди наших пациентов эпизоды диареи длительно-

стью 1–3 дня отмечены у 8 (21%) из 38 носителей мутаций и полиморфизмов и у 14 (42,4%) из 33 детей с отсутствием мутаций или полиморфизмов. Различия имели тенденцию к достоверности ( $p=0,052$ ), что косвенно свидетельствует о необходимости тщательного исключения STEC-позитивного ГУС на ранних этапах диагностики.

В динамике в группе с мутациями чаще отмечались рецидивы заболевания (57,6 и 31,6% соответственно,  $p=0,024$ ), наиболее часто в подгруппах с гомозиготной делецией *CFHR1/CFHR3*, с мутациями в генах *CFB* и *MCP*. Частота АГ, осложнений со стороны ЦНС, формирования ХПН достоверно не отличалась в обеих группах при длительном наблюдении (табл. 3). Наиболее

Таблица 2

## Проявления аГУС в дебюте болезни у наблюдаемых детей с различными патогенными генетическими вариантами

Показатели	Мутации (n=33)	Без мутации (n=38)	<i>CFH</i> (n=9)	<i>CFHR1/CFHR3</i> (n=12)	<i>CFB</i> (n=7)	<i>CFI</i> (n=1)	<i>MCP</i> (n=3)	<i>THBD</i> (n=1)
Возраст дебюта, мес (M±m, min–max)	5,31±3,62 (0,08–13,5)	4,28±4,04 (0,5–16,3)	5,39±3,75 (0,9–13,5)	7,03±3,3 (0,8–12,8)	2,63±2,72 (0,08–7,9)	2,17	3,68±1,41 (2,75–5,3)	10,6
Пол м/ж	15/18	16/22	4/5	6/6	3/4	0/1	1/2	1/0
Семейная форма	3	2	1	0	0	0	1	1
АГ в дебюте	18 (54,5%)	12 (31,6%)	4 (44,4%)	8 (66,7%)	4 (57,1%)	1 (100%)	1 (33,3%)	0
Потребность в диализе	21 (63,6%)	27 (71%)	5 (55,6%)	8 (66,7%)	5 (71,4%)	1 (100%)	1 (33,3%)	1 (100%)
ОНМК/судороги	5 (15,2%)	13 (34,2%) $p=0,057$	1 (11,1%)	2 (16,7%)	1 (14,3%)	1 (100%)	0	0
Исход в ХПН с рСКФ<30 мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	9 (27,3%)	10 (26,3%)	3 (33,3%)	2 (16,7%)	3 (42,9%)	0	0	1 (100%)

Осложнения и исходы аГУС у наблюдаемых детей с различными патогенными генетическими вариантами

Показатели	Мутации (n=33)	Без мутации (n=38)	CFH (n=9)	CFHR1/CFHR3 (n=12)	CFB (n=7)	CFI (n=1)	MCP (n=3)	THBD (n=1)
Период наблюдения, мес (медиана, 25; 75 квартили)	Me – 35 (21,5; 70,5)	Me – 22,5 (12,5; 36,3)						
Рецидивы (n, %)	19 (57,6%)	12* (31,6%) p=0,024	3 (33,3%)	8 (66,7%)	4 (57,1%)	1 (100%)	3 (100%)	0
ОНМК/судороги (n, %)	10 (30,3%)	15 (39,5%)	3 (33,3%)	4 (33,3%)	2 (28,6%)	1 (100%)	0	0
АГ (n, %)	21 (63,6%)	19 (50%)	4 (44,4%)	9 (75%)	5 (71,4%)	1 (100%)	1 (33,3%)	1 (100%)
Исход в ХПН с рСКФ < 30 мл/мин /1,73 м <sup>2</sup> за 1 год (n, %)	7 (21,2%)	7 (18,4%)	2 (22,2%)	3 (25%)	1 (14,3%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Умерло (n, %)	1 (3%)	1 (2,6%)	0	0	0	0	0	0
Трансплантация почки (n, %)	1 (3%)	0	0	0	0	1 (100%)	0	0

\*p<0,03 по сравнению с пациентами с мутациями.

благоприятное течение отмечалось при наличии мутаций в гене *MCP*, у всех больных (3), несмотря на рецидивирующее течение, не отмечалось ни ухудшения почечной функции, ни значимых осложнений, только у одного пациента развилась АГ. У ребенка с мутацией в гене *CFI* терминальная ХПН развилась в течение 1 года от дебюта заболевания, далее отмечалось 3 рецидива аГУС, два из которых были после отмены экулизумаба через 4 и 6 мес, после возобновления введения препарата рецидивов не отмечалось, однако не наблюдалось и улучшения почечных функций. На фоне приема экулизумаба через 7 лет от начала заболевания ребенку была выполнена трансплантация почки, продолжено введение экулизумаба, через год после трансплантации рСКФ составила 50 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Один пациент без выявленных мутаций умер через год от дебюта при развитии рецидива, другой с мутацией в гене *CFH* умер в дебюте болезни.

Экулизумаб получали 39 детей: 20 в группе с мутациями и 19 в группе без мутаций. Медиана времени до назначения экулизумаба оставляла 4,5 и 2 мес соответственно. При этом в большинстве случаев на момент назначения препарата данные молекулярно-генетического исследования отсутствовали. У более чем 50% пациентов в каждой группе через 6 мес от начала применения препарата отмечалось увеличение рСКФ более чем на 25%, в т.ч. не нуждались в диализе 8 человек в группе с мутациями и 7 человек в группе с их отсутствием. Больные, не получавшие экулизумаб, в аналогичные сроки наблюдения продолжали нуждаться в диализе. Даже при назначении Экулизумаба в отдаленном периоде от дебюта (более 6 мес) отмечалась положитель-

ная динамика рСКФ у 7 человек с мутациями. Отмечался только один рецидив заболевания на фоне введения экулизумаба, произошедший у ребенка с мутацией в гене *CFB* через 1 год от начала специфической терапии. Накануне очередного введения препарата отмечалось увеличение уровней креатинина и ЛДГ, при дальнейшем наблюдении за ребенком в течение 6 мес все показатели оставались в норме. Побочные явления, связанные с экулизумабом, в виде отека Квинке отмечались у 2 пациентов, дилатационная кардиомиопатия – у одного и повышение уровня трансаминаз – у одного пациента. В двух последних случаях связь с экулизумабом можно считать условной.

Экулизумаб по разным причинам был отменен 7 пациентам. У 2 пациентов с мутациями в генах *CFH* и *CFB* при отмене экулизумаба по причине его отсутствия в одном случае и развития аллергических реакций в другом отмечались рецидивы аГУС, при возобновлении введения препарата рецидивы не повторялись. Одному пациенту с делецией в генах *CFHR1/CFHR3* и высоким титром антител к фактору Н успешно отменили экулизумаб после 1,5 лет применения, ремиссия без экулизумаба на данный момент составляет 9 мес. У 4 пациентов без выявленных патогенных мутаций экулизумаб был успешно отменен после в среднем 1 года применения, ремиссия сохраняется от 8 мес до 2,5 лет (табл. 4).

#### Обсуждение

аГУС представляет собой не только сложную клиническую, но и экономическую проблему для здравоохранения с учетом того, что до недавнего времени препарат экулизумаб, оставаясь прак-

Результаты применения экулизумаба у наблюдаемых детей с аГУС

Показатели	Мутации n=20	Без мутации n=19
Время от дебюта до назначения экулизумаба, мес (медиана, 25-й; 75-й квартиль)	Me – 4,5 (2; 42)	Me – 2 (1; 7)
pСКФ<60 мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> до назначения экулизумаба, n (pСКФ<15 мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> )	16 (9)	11 (9)
Улучшение pСКФ>25% через 6 мес от начала терапии (n, %)	11 (55%)	8 (42%)
Прекращение диализа (n, % – расчет проводили от находящихся на диализе до начала терапии)	8 (89%)	7 (78%)
Рецидивы на экулизумабе	1 (5%)	0
Рецидивы при отмене экулизумаба	2 (10%)	0
Успешная отмена экулизумаба	1 (5%)	4 (21%)

тически единственным средством эффективного лечения, был самым дорогим медицинским препаратом в мире. Основываясь на этом факте, очевидной становится задача по совершенствованию диагностики заболевания, его течения и исходов, что должно позволить выработать оптимальную стратегию назначения экулизумаба, прогнозирования длительности лечения и возможности отмены препарата.

Накоплены многочисленные данные о генетической основе болезни. Мутации генов, кодирующих синтез белков-регуляторов системы комплемента способны приводить к неконтролируемой активации синтеза конечных продуктов его каскада, способных повреждать эндотелий мелких сосудов и приводить к развитию ТМА. Известна частота этих мутаций в выборках больных аГУС в различных регионах Европы, Азии и Северной Америки [13–15]. Настоящее исследование явилось первым в России, посвященным изучению генотипа и фенотипа болезни в репрезентативной группе российских детей с установленным аГУС.

Был обследован 71 ребенок с направляющим диагнозом аГУС, что в пересчете на детское население Российской Федерации условно составляет не менее 2,7:1 000 000 и сопоставимо с данными эпидемиологических исследований в других регионах, несмотря на то, что не все субъекты Федерации репортировали пациентов для настоящего исследования.

Анализ генных мутаций и полиморфизмов проводили методом секвенирования нового поколения (NGS) на платформе ROCHE 450. При отсутствии мутаций в генах *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD* дополнительно методом MPLA исследовали наличие делеций в гене *CFHR1/CFHR3*, которые ассоциируются с образованием антител к фактору Н комплемента (*CFH*), повышенный титр которых подтвержден у 3 пациентов с делецией этого гена.

В первую очередь следует отметить, что клинические данные свидетельствуют о крайней тяжести заболевания с потребностью в диализе в большинстве случаев, высокой частоте АГ и

исхода в терминальную ХПН уже после первого эпизода у  $1/4$  больных. Аналогичные данные приводятся большинством исследователей [4, 16].

Обнаруженная нами частота мутаций и полиморфизмов генов, ответственных за синтез белков-регуляторов комплемента, также в целом соответствует данным зарубежных исследований [13–15]. Особенностью генотипа российских детей с аГУС является относительно более высокая частота мутаций в генах *CFHR1/CFHR3* и гене *CFB*. При этом не отмечено выраженного преобладания мутаций в гене *CFH*, описанного в литературе. Отчасти данный факт можно объяснить крайней тяжестью ассоциирующегося с ними фенотипа болезни, в связи с чем вероятна высокая летальность в острый период. В силу этого больные могли оказаться недоступны для исследования.

Относительно малое число наблюдений, относящееся к мутациям отдельных генов, не позволило установить детальных корреляций генотипа и фенотипа, однако в целом отмечено совпадение с ранее опубликованными данными о рецидивирующем характере эпизодов ТМА с медленным прогрессированием почечного поражения при мутациях в гене *MCP*, в то время как мутации генов *CFH* и *CFB* могут сопровождаться отсутствием восстановления почечных функций не менее, чем у  $1/3$  детей [12, 17].

Немалые затруднения вызвал анализ эффективности применения экулизумаба у 39 из наблюдаемых детей, что связано с различными сроками его назначения от момента дебюта болезни. В целом сопоставимыми оказались доля больных с устранением потребности в диализе и количество больных с увеличением СКФ на 25% и более в группах с наличием мутаций и без таковых. Обратило на себя внимание наличие рецидивов при отмене экулизумаба среди пациентов с выявленными мутациями и отсутствие их у больных без мутаций, однако для окончательного вывода требуется более длительный период наблюдения.

Наши данные о возможности отмены или перерыва в лечении экулизумабом при отсут-

ствии мутаций у пациентов с аГУС также соответствуют ранее опубликованному наблюдению [21]. Следует согласиться с мнением, что при рецидиве даже небольших признаков активности ТМА лечение экулизумабом должно быть незамедлительно возобновлено.

Таким образом, аГУС, тяжелое орфанное заболевание с мультиорганным вовлечением и преимущественно острым почечным повреждением, в России соответствует по распространенности мировым данным и представляет собой значимую проблему в диагностическом и терапевтическом аспекте. Обязательно раннее исключение СТЕС-ассоциированного ГУС в дебюте болезни для дальнейшего целенаправленного диагностического поиска с включением молекулярно-генетического исследования для решения вопроса о лечебной тактике.

Применение экулизумаба хотя и нуждается в дальнейшем изучении, по-видимому, способно существенно улучшить течение и прогноз болезни при раннем и адекватном его назначении, основывающемся на четкой верификации диагноза. Длительность применения экулизумаба определяется с учетом его эффективности и на основании результатов молекулярно-генетического исследования. Отсутствие выявления мутаций в изученных генах может служить аргументом в пользу отмены экулизумаба через 1–2 года от начала его применения при условии стабилизации состояния больного и при сохранении тщательного последующего клинического контроля.

### Заключение

В отношении аГУС имеются сведения, убедительно подтверждающие основную роль дис-

функции системы комплемента в его патогенезе. Дефицит факторов регуляции комплемента обусловлен мутациями, выявляемыми не менее, чем у половины больных. Выявление частоты генных мутаций и соответствующих им фенотипическим особенностям, изучение эффективности экулизумаба, моноклонального антитела, блокирующего терминальный отдел каскада комплемента, направлены на улучшение диагностики и прогноза болезни и планирования лечебной тактики с клинических и экономических позиций.

В настоящем исследовании впервые в Российской Федерации на основании охвата детей с аГУС из различных регионов страны продемонстрировано наличие патогенных мутаций и полиморфизмов у 53,5% из них, что соответствует международным данным и указывает на важность их выявления для диагностики заболевания. Показана тяжесть течения болезни с исходом в терминальную ХПН в течение года у 1/5 больных. Наиболее тяжелое течение характерно для пациентов с мутациями гена *CFH*.

Установлено, что экулизумаб может способствовать улучшению почечной функции и купированию проявлений ТМА даже при отсроченном назначении. Требуется дальнейшего изучения продемонстрированная нами возможность отмены экулизумаба у пациентов с отсутствием мутаций и стабилизацией состояния. Представленный анализ клинических и генетических данных при аГУС может способствовать улучшению диагностики и лечения тяжелой жизнеугрожающей болезни.

**Источник финансирования:** исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 14-15-00994.

### Литература

1. Панкратенко Т.Е., Музуров А.Л., Зверев Д.В., Абасеева Т.Ю., Лифшиц В.И., Эмирова Х.М. Заместительная почечная терапия у детей раннего возраста с острой и хронической почечной недостаточностью. *Нефрология и диализ*. 2012; 14 (1): 48–56.
2. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet. J. Rare Dis*. 2011; 6: 60. URL: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-6-60>.
3. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, Bettinaglio P, Bresin E, Pianetti G, Gamba S, Brioschi S, Daina E, Remuzzi G, Noris M. Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum. Mol. Genet*. 2003; 12 (24): 3385–3395.
4. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006; 108 (4): 1267–1279.
5. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM. Thrombomodulin Mutations in Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med*. 2009; 361: 345–357.
6. Bu F, Borsa N, Gianluigi A, Smith RJH. Familial Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Review of Its Genetic and Clinical Aspects. *Clin. Dev. Immunol*. 2012; 2012: 370426. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/370426>
7. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, Daina E, Castelletti F, Sorosina A, Piras R, Donadelli R, Maranta R, van der Meer I, Conway EM, Zipfel PF, Goodship TH, Remuzzi G. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2010; 5: 1844–1859.
8. Rathbone J, Kaltenthaler E, Richards A, Tappenden P, Bessey A, Cantrell A. A systematic review of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). *BMJ Open*. 2013; 3: e003573. URL: <http://bmjopen.bmj.com/content/3/11/e003573.full.pdf+html>
9. Greenbaum LA, Fila M, Ardissino G, Al-Akash SI, Evans J, Henning P, Lieberman KV, Maringhini S, Pape L, Rees L, van de Kar N, Walle JV, Ogawa M, Bedrosian CL, Licht C. Eculizumab is a safe and effective treatment in pediatric patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney International*. 2016; 89: 701–711.
10. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Atypical hemolytic uremic syndrome: From the rediscovery of complement to targeted therapy. *Eur. J. Intern. Med*. 2013; 24: 492–495.
11. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and Estimation of GFR in Children and Adolescents. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2009; 4: 1832–1843.
12. Sellier-Leclerc A, Frémeaux-Bacchi V, Dragon-Durey M, Macher M, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou



F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C. Differential Impact of Complement Mutations on Clinical Characteristics in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18: 2392–2400.

13. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Frémeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, Pinto S, Goodship THJ, Alberti M, Ribes D, Valoti E, Remuzzi G, Noris M. Combined Complement Gene Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Influence Clinical Phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 24: 475–486.

14. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, Frees KL, Smith RJ. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum. Mutat.* 2010; 31: E1445–E1460.

15. Zhang T, Lu J, Liang S, Chen D, Zhang H, Zeng C, Liu Z, Chen H. Comprehensive Analysis of Complement Genes in Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Nephrol.* 2016; 43: 160–169

16. Gianviti A, Tozzi AE, De Petris L, Caprioli A, Rava L, Edefonti A, Ardissino G, Montini G, Zacchello G, Ferretti A, Pecoraro C, De Palo T, Caringella A, Gaido M, Coppo R, Perfumo F, Miglietti N, Ratsche I, Penza R, Capasso G, Maringhini S, Li Volti S, Setzu C, Pennesi M, Bettinelli A, Peratoner L, Pela I, Salvaggio E, Lama G, Maffei S, Rizzoni G. Risk factors for poor renal prognosis in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18: 1229–1235.

17. Moore I, Strain L, Pappworth I, Kavanagh D, Barlow PN, Herbert AP, Schmidt CQ, Staniforth SJ, Holmes LV, Ward R, Morgan L, Goodship THJ, Marchbank KJ. Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2010; 115 (2): 379–387.

18. Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Frémeaux-Bacchi V; French Study Group for aHUS/C3G. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat. Rev. Nephrol.* 2012; 8: 643–657.

19. Kavanagh D, Raman S, Sheerin NS. Management of hemolytic uremic syndrome. *F1000Prime Reports.* 2014; 6: 119. URL: <http://f1000.com/prime/reports/m/6/119>

20. Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D, Langman CB, Lapeyraqe A, Licht C, Nester C, Pecoraro C, Riedl M, van de Kar N, Van de Walle J, Vivarelli M, Frémeaux-Bacchi V. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol.* 2016; 31 (1): 15–39.

21. Ardissino G, Testa S, Possenti I, Tel F, Paglialonga F, Salardi S, Tedeschi S, Belingheri M, Cugno M. Discontinuation of Eculizumab Maintenance Treatment for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Report of 10 Cases. *Am. J. Kidney Dis.* 2014; 64 (4): 633–637.

## РЕФЕРАТЫ

### КУРЕНИЕ В КИНО И ПОДРОСТКОВОЕ КУРЕНИЕ: ПРОДОЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СРЕДИ АРГЕНТИНСКИХ ПОДРОСТКОВ

Задача исследования – определить, связано ли курение в кино с курением среди аргентинских подростков. В продольном исследовании участвовали 33 средних школы. В выборку были включены 2502 никогда не куривших подростка (средний возраст =12,5 лет), 1700 (67,9%) из которых до конца участвовали в исследовании длительностью 17 месяцев. Выборка кино состояла из 100 самых кассовых фильмов в период с 2009 по 2013 гг. Все они были оценены с точки зрения наличия сцен с курением. Затем подростков спрашивали, видели ли они 50 фильмов, выбранных случайным образом, и как изменилось их отношение к курению за прошедший период. С помощью логистической регрессии оценивались следующие варианты перехода: неосознанно некурящие к осознанно некурящим; некурящие к пробовавшим курить или иногда курящим и от некурящих к постоянно курящим (в течение последних 30 дней). Исследование показало следующие результаты: 34,4% некурящих приняли осознанное решение не курить, 24,1% сооб-

щили, что пробовали курить, и 9,4% стали курящими. Большинство сцен, связанных с курением, было в американских фильмах (в среднем 60,3 минуты по сравнению с 3,4 минутами из аргентинских фильмов). Наличие в кино сцен, связанных с курением, значительно влияет на отношение подростков к курению (ОШ 1,77, 95% ДИ 1,3–2,41), часть из них впервые пробует курить (ОШ 1,54, 1,14–2,08), при этом незначительно влияет на постоянно курящих подростков (ОШ 1,54, 0,99–2,4). Воздействие сцен курения в американских и аргентинских фильмах имело сходные ассоциации. Исследование показало, что в Аргентине курение в фильмах оказывает влияние на отношение к курению среди подростков, причем большая часть подобных сцен приходится на американские фильмы.

Raul Mejia, Adriana Pérez, Lorena Peña, Christy Kollath-Cattano, Paola Morello, Sandra Braun, James W. Hardin, James F. Thrasher, James D. Sargent. *The Journal of Pediatrics.* 2017; 180: 222–228.