

На правах рукописи

Милованова Анастасия Михайловна

**КЛИНИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ВРОЖДЕННОГО И ИНФАНТИЛЬНОГО
НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

14.01.08 – Педиатрия

03.02.07 - Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор
Доктор биологических наук

Цыгин Алексей Николаевич
Савостьянов Кирилл Викторович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий нефрологическим отделением ФГБУ «ФНКЦ детей и подростков» ФМБА России, заведующий кафедрой педиатрии академии постдипломного образования ФГБУ «ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России

Зокиров Нурали Зоирович

Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова

Поляков Александр Владимирович

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» «_____» 2022 года в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 001.023.01 при ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2 стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2 стр.1 и на сайте <http://www.nczd.ru>

Автореферат разослан «__» «_____» 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор РАН

Винярская Ирина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Нефротический синдром (НС) - тяжелая гломерулопатия, характеризующаяся выраженной протеинурией, гипопроотеинемией, гипоальбуминемией, гиперлипидемией и распространенными отеками. Манифестируя в детском возрасте, НС может требовать частых и длительных госпитализаций, осложняться инфекциями, венозными тромбозами и острым почечным повреждением, а также сопровождаться постепенным снижением почечных функций. Уже в начале заболевания НС приобретает стероидрезистентность в 10-15% случаев, у 12-15% детей отсутствует ответ и на иммуносупрессивную терапию, а у половины пациентов прогрессирование до хронической болезни почек (ХБП) 5 стадии происходит в течение 15 лет (Trautmann et al., 2018; Mekahli et al., 2009).

С учетом актуальности проблемы прогрессирования ХБП все дети с верифицированным стероидрезистентным нефротическим синдромом (СРНС) нуждаются в проведении диагностической нефробиопсии, результаты которой позволяют осуществить оптимальный подбор патогенетической терапии. Среди разнообразных морфологических вариантов, сопутствующих формированию СРНС, наиболее часто выявляется фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) (Rovin et al., 2021; "Nephrotic Syndrome in Children: Prediction of Histopathology from Clinical and Laboratory Characteristics at Time of Diagnosis" 1978). Установлено, что наибольшую роль в формировании ФСГС играет патология подоцитов иммунного или генетического характера. На настоящий момент выявлено более 50 генов (Liu et al., 2018), ответственных за развитие, структурную целостность и функционирование подоцитов. Патогенные нуклеотидные варианты этих генов приводят к развитию подоцитопатии при СРНС. Выработка верной тактики лечения возможна лишь при правильном определении дефекта подоцитов, в связи с чем в последние десятилетия молекулярно-генетическое исследование выходит на первый план при обследовании детей со СРНС.

Следует отметить, что среди пациентов со СРНС выделяются две наиболее проблемные группы: врожденный (манифестирует в течение первых 3 месяцев жизни ребенка) и инфантильный (манифестирует в возрасте между 3 месяцами и 1 годом жизни) нефротический синдром (ВНС и ИНС соответственно). Отсутствие эффективности иммуносупрессивной терапии и высокая скорость прогрессирования ХБП до 5 стадии при СРНС у детей данных возрастных групп определяют особую актуальность изучения генетической основы заболевания.

Степень разработанности темы

Исследования генетических причин наследственных нефропатий, в т.ч. НС, в Европе проводятся давно (Weber et al., 2004; Caridi et al., 2005; Santín et al., n.d.; Kerti et al., 2013; Lipska et al., 2013; Bezdíčka et al., 2018; Li et al., 2018; Chen et al., 2019; Sako et al., 2005), однако вследствие этиологической и популяционной гетерогенности, а также высокой стоимости и низкой доступности для широкого использования методов генетического тестирования, накопленных знаний явно недостаточно для определения тактики терапии и прогнозирования прогрессирования ХБП. В Российской Федерации к настоящему моменту имеются лишь единичные сообщения о моноцентровых выборках детей с генетическим НС (Петросян и др., 2006; Савенкова, 2020; Повилайтите и др., 2019), чего недостаточно для оценки спектра дефектных генов и нуклеотидных вариантов, характерных для народов РФ. В международном регистре подоцитопатий podonet.org участие постсоветских стран ограничивается единичными центрами с выборками не более 50 детей (в частности, от России на момент начала исследования в регистр были внесены данные 50 детей, Украина - 39 детей, Беларусь – 15 детей, Казахстан – 31 ребенок, Литва – 48 детей).

С учетом клинических рекомендаций и доступности диагностический алгоритм в регионах РФ часто ограничивается лабораторными исследованиями, а при обследовании в стационарах третьего уровня детям в качестве метода выбора проводится пункционная нефробиопсия, по результатам которой у большинства детей с первичным СРНС отмечается морфологическая картина болезни минимальных изменений (БМИ) или ФСГС.

Терапия, применяемая при ВНС и ИНС, сводится к нефропротекции (Клинические рекомендации "Нефротический синдром у детей" 2016), а дети с СРНС с более поздним дебютом, как правило, имеют крайне ограниченный ответ на иммуносупрессивную терапию, что делает подбор лечения затруднительным (Al Dhaybi et al., 2010; Büscher et al., 2016; Hinkes et al., 2008; Ruf et al., 2004; Santín et al., 2011; Büscher et al., 2010). Исследования об ответе первичного СРНС на терапию при тех или иных наследственных подоцитопатиях малочисленны и не отвечают современным потребностям (Bensimhon et al., 2019; Zhao et al., 2020; Ovunc et al., 2011).

Цель исследования

Оптимизация диагностических и терапевтических подходов при врожденном и инфантильном нефротическом синдроме с учетом клинической и молекулярно-генетической характеристики заболевания.

Задачи исследования

1. Определить относительные частоты и охарактеризовать спектр генетических вариантов, ответственных за различные дефекты структуры подоцитов и гломерулярной базальной мембраны, а также фенкопий нефротического синдрома, выявленных у российских детей.

2. Исследовать проявления нефротического синдрома и описать экстраренальные фенотипические особенности детей с различными генетическими вариантами, характерными для первичного врожденного и инфантильного нефротического синдрома.

3. Сравнить скорость прогрессирования хронической болезни почек у детей с различными генетическими и морфологическими вариантами нефротического синдрома.

4. Сравнить скорость прогрессирования хронической болезни почек у детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом, манифестировавшим на первом году жизни и после года.

5. Оценить эффективность терапии ингибиторами кальцинейрина (циклоспорином А и такролимусом) при различных генетических вариантах стероидрезистентного нефротического синдрома.

6. Оценить риски возврата заболевания в трансплантат у детей с наследственным стероидрезистентным нефротическим синдромом, явившихся реципиентами почки.

7. Выработать предложения по оптимизации диагностических и терапевтических подходов при врожденном и инфантильном нефротическом синдроме.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации проведено масштабное исследование генетических причин наследственного нефротического синдрома, в рамках которого обследовано 250 детей, что является беспрецедентным количеством для моноцентрового исследования данной когорты. Исследование вышло на лидирующую позицию в регистре пациентов с подоцитопатиями podonet.org.

Впервые дана генетическая характеристика российских детей, которая отражает спектр и частоты нуклеотидных вариантов, вызывающих нефротический синдром и его фенкопии.

Установлены клинические и лабораторные особенности течения заболевания у детей с врожденным, инфантильным нефротическим синдромом и стероидрезистентным нефротическим синдромом с возрастом дебюта старше 1 года,

описаны экстраренальные проявления при различных дефектах генов, кодирующих белки подоцитов.

Доказано более быстрое снижение функции почек по клубочковой фильтрации у детей с ранним дебютом нефротического синдрома.

Выявлена низкая эффективность терапии ингибиторами кальцинейрина у детей с врожденным, инфантильным нефротическим синдромом и стероидрезистентным нефротическим синдромом с возрастом дебюта старше 1 года. Верифицирован более высокий процент детей, ответивших на лечение, в группе детей с возрастом дебюта старше 1 года жизни.

Описана эффективность специфической патогенетической терапии у ряда российских детей с дефектами коэнзима Q10.

Ретроспективно оценены риски возврата заболевания в трансплантат у детей, явившихся реципиентами почки.

Выработаны предложения по оптимизации диагностики и лечения при врожденном и инфантильном нефротическом синдроме.

Теоретическая и практическая значимость

В результате исследования описан спектр и частоты дефектных генов, приводящих к развитию врожденного, инфантильного нефротического синдрома и стероидрезистентного нефротического синдрома с возрастом дебюта старше 1 года.

Выявлены национальные особенности и мажорные нуклеотидные варианты, характерные для народов, населяющих РФ, на основании чего предложен перечень генов, обязательных для исследования при врожденном и инфантильном нефротическом синдроме.

Подтверждены характерные для определенных генетических вариантов клинические и лабораторные особенности, с учетом чего на основании фенотипа можно заподозрить ряд наследственных нефропатий.

Выявлено более быстрое прогрессирование хронической болезни почек у детей с врожденным нефротическим синдромом, что свидетельствует о приоритетности данной группы в отношении подготовки к заместительной почечной терапии, в том числе обязательной вакцинации.

Подтверждена низкая эффективность иммуносупрессивной терапии у описываемой когорты детей, что позволяет воздержаться от назначения заведомо малоэффективной терапии при нефротическом синдроме с ранним дебютом.

На примере опыта одного центра проиллюстрированы низкие риски возврата заболевания в трансплантат при наследственном нефротическом синдроме.

Предложено обязательное проведение молекулярно-генетического исследования у детей с ранним дебютом нефротического синдрома, в то время как в группе детей с более поздним дебютом рекомендовано приоритетное проведение пункционной нефробиопсии, что позволяет оптимизировать тактику ведения детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в клиническую практику НИИ нефроурологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и Обособленного структурного подразделения «Российская детская клиническая больница ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Методология и методы исследования

При выполнении работы был осуществлен тщательный анализ литературы, современных научных данных по вопросу молекулярно-генетического обследования детей с врожденным, инфантильным нефротическим синдромом и стероидрезистентном нефротическом синдроме с возрастом дебюта старше 1 года. Особое внимание уделено изучению клинических и лабораторных характеристик данных подгрупп, а также эффективности иммуносупрессивной терапии у детей с наследственным нефротическим синдромом.

Диссертационное исследование носило ретро- и проспективный характер. Была проведена оценка данных 250 детей с первичным стероидрезистентным нефротическим синдромом, а также с врожденным и инфантильным нефротическим синдромом, установленными на основании клинической картины, а также по результатам лабораторных и инструментальных методов исследований. В исследование также вошли 23 ребенка с фенокопиями нефротического синдрома, направленные в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России с диагнозом нефротический синдром. Оценка медицинской документации проведена за период 10 лет. Анализ полученных данных осуществляли в соответствии с современными методиками, включающими описательные статистики, оценку статистической значимости, построение кривых Каплана-Майера.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди детей с врожденным и инфантильным нефротическим синдромом отмечается более высокий, чем в группе стероидрезистентного нефротического синдрома с возрастом дебюта старше 1 года жизни, процент генетически

детерминированного нефротического синдрома, что должно быть учтено при выработке тактики лечения.

2. У детей с дебютом нефротического синдрома на первом году жизни преобладают патогенные варианты в трех генах: *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, что может быть использовано для оптимизации молекулярно-генетического обследования российских детей.

3. У детей с ранним дебютом нефротического синдрома чаще встречаются экстраренальные проявления.

4. Наличие экстраренальных проявлений и характерная фенотипическая картина позволяют сузить круг диагностического поиска до одного гена, патогенетически ответственного за развитие нефротического синдрома.

5. На настоящий момент не выявлено отличий скорости прогрессирования хронической болезни почек в зависимости от конкретного генетического варианта.

6. Хроническая болезнь почек при раннем дебюте заболевания прогрессирует быстрее, что соответствует крайне низкому ответу на иммуносупрессивную терапию.

7. Несмотря на общепринятое мнение об отсутствии эффекта ингибиторов кальцинейрина у детей с наследственными вариантами нефротического синдрома, у небольшого процента данная терапия эффективна.

8. Наследственные формы нефротического синдрома, имеющие возможности специфической патогенетической терапии, не верифицируются морфологически и требуют проведения молекулярно-генетического исследования.

9. Проведение трансплантации почки у детей с наследственным нефротическим синдромом перспективно в связи с низкими рисками возврата заболевания в трансплантат.

Степень достоверности результатов

Исследование основывается на современных представлениях о диагностике и ведении пациентов с врожденным и инфантильным нефротическим синдромом, которые обсуждаются в отечественной и иностранной литературе. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается выбором релевантного дизайна исследования, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными. Подготовка, анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Апробация результатов

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XIV Общероссийской научно-практической конференции РДО (21-23 ноября 2019 г.), Научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студеникинские чтения» (2 декабря 2019 г.), Russian-Finnish seminar ISN “Chronic kidney disease» в Университетском госпитале г. Хельсинки (10 января 2020 г.), XIX Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием (20 октября 2020 г.), Russian-Uzbek Conference ISN “Chronic kidney disease» (5 февраля 2021 г.), World Congress of Nephrology, Canada (19 апреля 2021 г.), XX Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием (22 октября 2021 г.), XVI Общероссийской научно-практической конференции РДО (20 ноября 2021 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных научных результатов диссертационных исследований – 3 (из них статей в журналах, индексируемых в SCOPUS, – 1), тезисов и кратких сообщений о результатах в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, – 7 (из них в журналах, индексируемых в SCOPUS, – 6).

Личный вклад автора

Вклад автора состоит в непосредственном активном участии в исследовательской работе на всех ее этапах: в анализе литературы, постановке цели и задач исследования, разработке методических подходов и их выполнения, ведении пациентов в стационаре, обработке медицинской документации, формировании базы данных, статистической обработке, анализе полученных результатов, участии в научно-практических конференциях, внедрении в клиническую практику разработанных рекомендаций, на основании которых были сформулированы основные положения диссертационного исследования, выводы и практические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Общий объем работы составляет 180 страниц машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 4 глав с описанием полученных результатов, главы обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа

иллюстрирована 12 таблицами и 31 рисунком, а также приложением с кратким описанием известных литературе генов, вызывающих НС или его фенокопии. Список использованной литературы включает 282 источника: 7 отечественных и 275 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на базе нефрологического отделения (руководитель – д.м.н., профессор Цыгин А.Н.) и лаборатории медицинской геномики (руководитель – д.б.н. Савостьянов К.В.) ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (директор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор Фисенко А.П.).

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Объем и дизайн исследования

Исследование носило двунаправленный (ретро- и проспективный) характер. В ретроспективной части исследования проанализирована медицинская документация детей, наблюдавшихся в нефрологическом отделении ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России с 2014 года по 2019 год. Также проводился проспективный набор детей, соответствующих критериям включения, при СРНС с возрастом дебюта старше 1 года детям при отсутствии противопоказаний выполнена пункционная нефробиопсия с обязательным иммунофлюоресцентным исследованием биоптата. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Критерием включения явилось наличие протеинурии нефротического уровня в рамках симптомокомплекса НС (в т.ч. неполного) или носящей изолированный характер с дебютом до 17 лет 11 месяцев.

Детям с дебютом заболевания в возрасте старше 1 года, а также детям с гематурией, снижением функции почек по клубочковой фильтрации при отсутствии противопоказаний к инвазивному вмешательству проведена пункционная нефробиопсия.

Всем детям проведено молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования нового поколения (NGS – new generation sequencing) таргентных областей 200 генов (Сладков и др., 2016), ассоциированных с наследственными заболеваниями почек, в т.ч. НС. Общий размер панели составил 0,9Mb, средняя глубина прочтения таргентных областей составила 150X.

С учетом возраста дебюта сформировано 3 группы: дети с возрастом дебюта заболевания в первые 3 месяца жизни (ВНС), между 3 и 12 месяцами (ИНС), а также после 1 года.

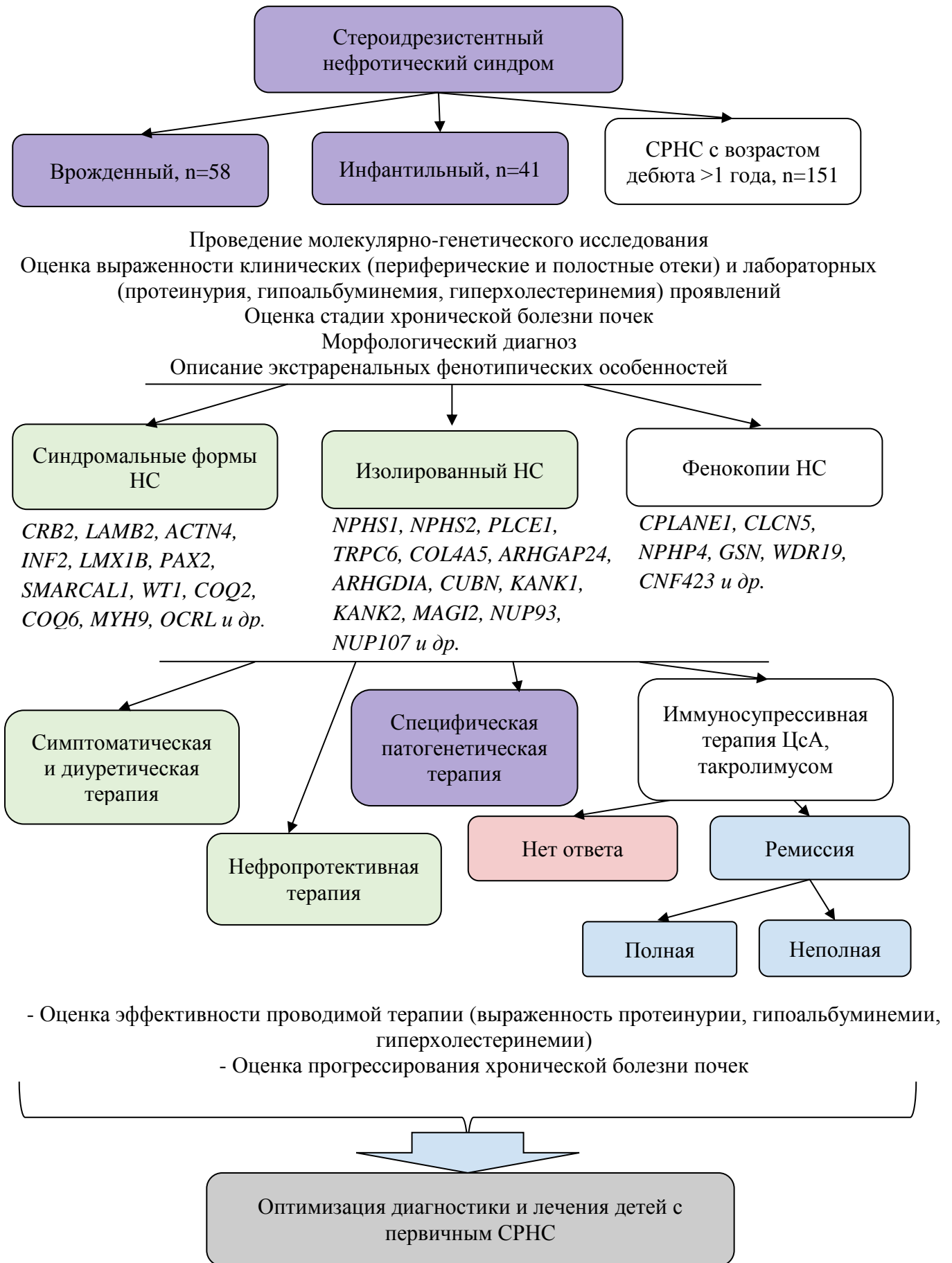


Рисунок 1. Дизайн исследования

Для проведения исследования было набрано 280 детей, однако 30 детей в связи с позитивными результатами иммунофлюоресценции были исключены. Таким образом, в исследование вошли 99 детей с ВНС и ИНС, а также 151 ребенок с НС или протеинурией нефротического уровня, манифестировавшими в возрасте старше 1 года. Возраст детей составил от 1 месяца до 17 лет 11 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические и молекулярно-генетические особенности врожденного нефротического синдрома

В группу ВНС набрано 58 детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет 8 месяцев (средний возраст – 6 лет 9 месяцев, SD 8 месяцев). Средний возраст дебюта составил 1,19 месяцев, SD 0,162 месяцев. Превалировали мальчики (65,5%).

Среди детей с ВНС изолированный НС/протеинурия нефротического уровня отмечались у 17 (29,3%), гематурия – у 23 (39,7%), артериальная гипертензия (АГ) – у 19 (32,8%) детей.

Наследственный анамнез отягощен у 15 детей (25,8%), при этом один ребенок был рожден в близкородственном браке.

По данным морфологического исследования превалировал ФСГС (16 детей – 47,1%), БМИ отмечалась лишь у 8 детей (23,5%).

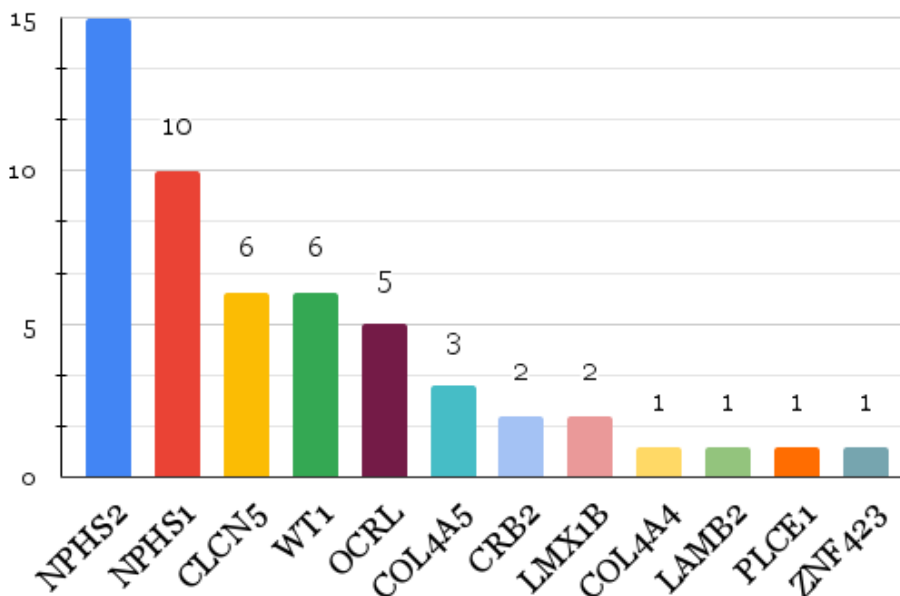


Рисунок 2. Распределение генов, содержащих клинически значимые нуклеотидные варианты, в группе детей с ВНС, n=53.

По результатам молекулярно-генетического исследования всего у 5 детей не обнаружено клинически значимых вариантов НС, у остальных пациентов (91,4%) найдены варианты, которые были охарактеризованы как патогенные и вероятно

патогенные, в генах, кодирующих белки щелевой диафрагмы (ЩД, 28 – 48,3%), гломерулярной базальной мембраны (ГБМ, 5 – 8,6%), метаболизма и биосинтеза (5 – 8,6%), ядра и факторов транскрипции (8 – 13,8%) и др. Спектр генов, патогенные варианты в которых найдены у детей с ВНС, представлен на рисунке 2.

Несмотря на заведомо очевидную неэффективность стероидной терапии в данной группе пациентов (Лойманн и др., 2010), преднизолон в анамнезе получили 24 ребенка, что составило 41,4%.

Попытка терапии ингибиторами кальцинейрина (ЦсА – циклоспорином А или такролимусом) была предпринята у 20 детей (34,5%), при этом частичная ремиссия была достигнута лишь у одного ребенка – девочки с компаунд-гетерозиготным вариантом *c.686G>A, p.R229Q / c.897G>C, p.K299N* в гене *NPHS2* (Рисунок 3).

В описываемой группе прогрессирование ХБП до 5 ст. было отмечено у 16 детей (27,6%), медиана возраста достижения ХБП 5 ст. составила 44 месяца (Q1-Q3 21-64 месяцев). Снижение функции почек по клубочковой фильтрации, соответствующее ХБП 3 ст., наблюдалось еще у 7 детей (всего 23 – 39,7%). Медиана возраста достижения ХБП 3 ст. составила 40 месяцев (Q1-Q3 30-62 месяца).

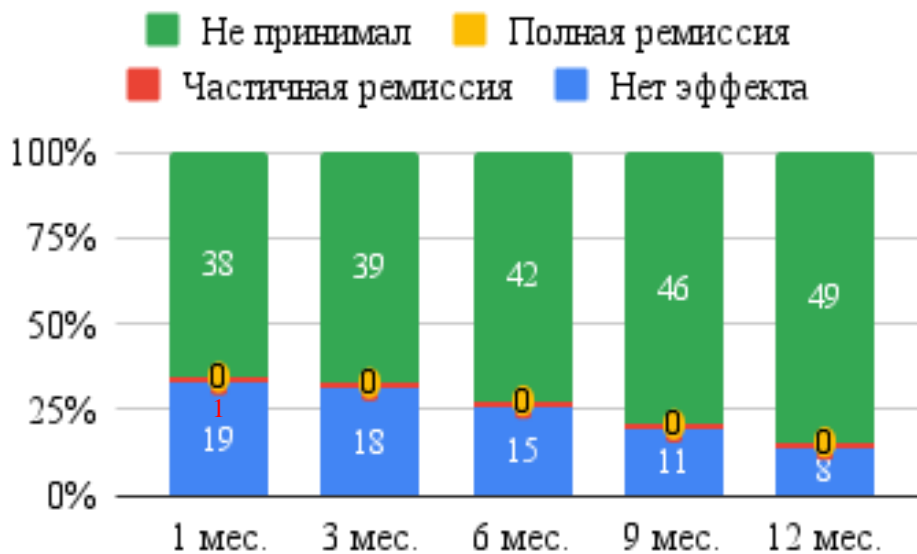


Рисунок 3. Эффективность терапии ЦсА в группе детей с ВНС, n=58.

Клинические и молекулярно-генетические особенности инфантильного нефротического синдрома

В группу ИНС включен 41 ребенок, из них 58,5% мальчиков (24 ребенка). Средний возраст дебюта составил 7,34 месяцев, SD 0,477 месяцев. Возраст

пациентов на момент исследования составил от 1 года 1 месяца до 17 лет 11 месяцев (средний возраст 8 лет 10 месяцев, SD 60 месяцев).

Наследственный анамнез по гломерулярным болезням отягощен у 15 детей (36,6%), из них двое рождены от близкородственных браков.

В группе детей с ИНС чаще, чем при ВНС, отмечалась гематурия - у 13 детей (32%), $p < 0,001$.

По данным морфологического исследования нефробиоптата в группе детей с ИНС превалировала БМИ (14 детей – 51,9%), ФСГС выявлен лишь у 8 детей (29,6%).

При проведении молекулярно-генетического исследования у 10 детей (24,4%) не было выявлено клинически значимых вариантов. Чаще других встречались патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *CLCN5* (7 – 17,1%), что не было характерно для других групп. У всех этих детей верифицирована фенокопия НС – болезнь Дента. Варианты в гене подоцина, превалирующего в группе ВНС, у детей с возрастом дебюта от 3 до 12 месяцев жизни оказались более редкой причиной болезни – всего в 12,1% случаев (5 детей). Интересно, что среди частых вариантов при ИНС выявлены варианты в гене *CUBN* (Рисунок 4).

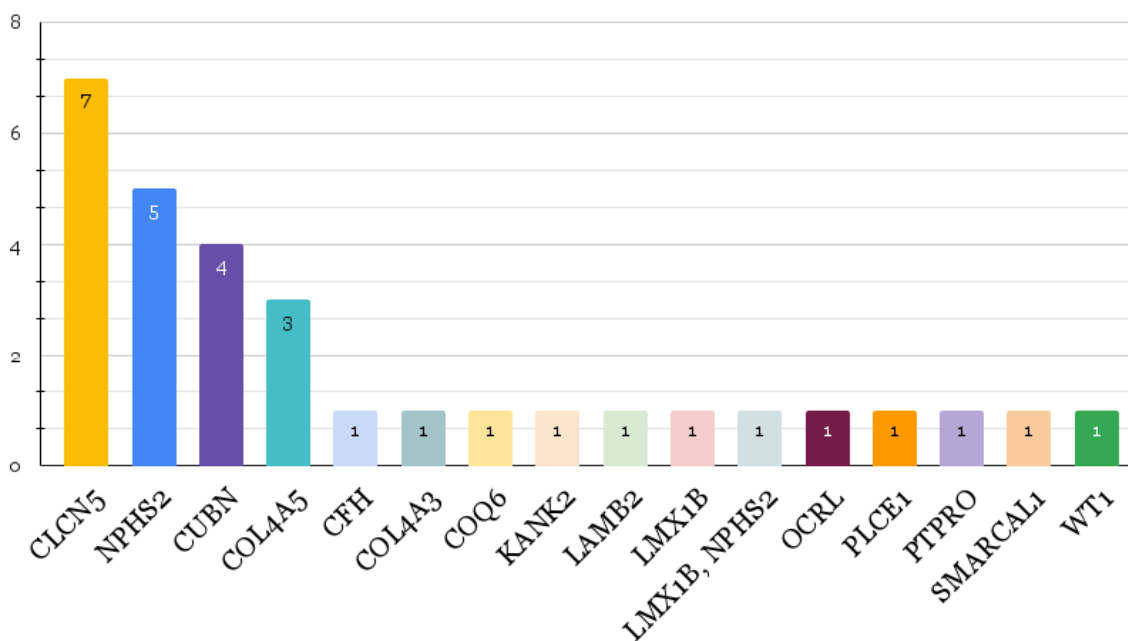


Рисунок 4. Распределение генов, содержащих клинически значимые нуклеотидные варианты, в группе детей с ИНС, $n=31$.

Таким образом, патология ЩД в данной группе отмечена лишь в 14,6% (у 6 детей), у относительно большого процента детей при проведении молекулярно-генетического исследования верифицированы фенокопии НС.

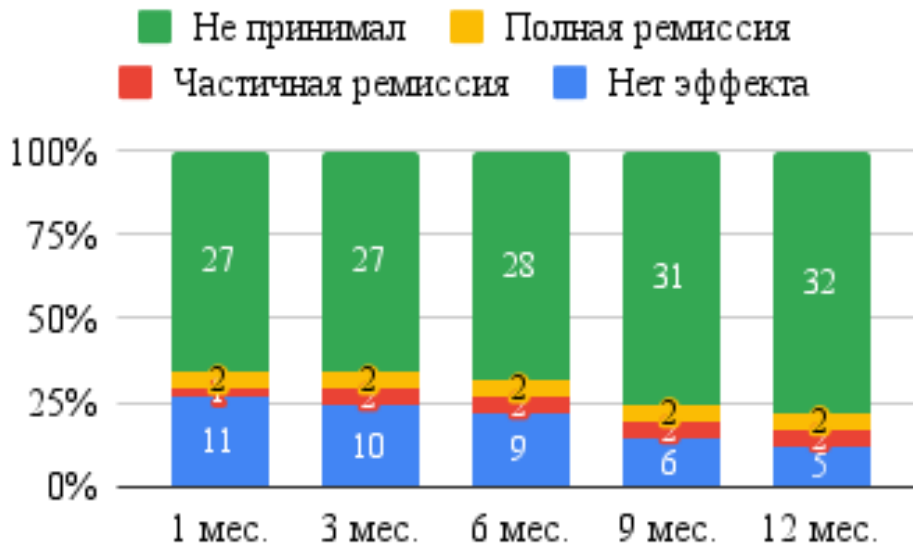


Рисунок 5. Эффективность терапии ЦсА в группе ИНС, n=41.

Стероиды были применены в анамнезе у 19 пациентов, что составило 46,3%.

Терапия ингибиторами кальцинейрина ЦсА или такролимусом была назначена 14 детям (34,1%), при этом эффект достигнут лишь у 4 пациентов (через месяц лечения 2 ребенка вышли в полную ремиссию, 1 – в частичную, еще у одного протеинурия снизилась до субнефротических значений через 3 месяца терапии). Только двое детей из данной группы, вышедшие в полную ремиссию, имели верифицированные причинные варианты: *COQ6* hom *c.1235A>G*, *p.Y412C* и *CUBN* comp het *c.5488G>T*, *p.V1830F/ c.8071G>A*, *p.G2691R* (Рисунок 5).

ХБП 5 ст. была констатирована у 7 детей (17,1%), еще 2 ребенка (всего 9 – 22%) снизили функцию почек по клубочковой фильтрации до значений, соответствующих ХБП 3 ст. Медиана возраста достижения ХБП 3 ст. составила 134 месяца (Q1-Q3 40-185 месяца), медиана возраста прогрессирования ХБП до 5 ст. составила 151 месяц (Q1-Q3 28-212 месяцев).

Клинические и молекулярно-генетические особенности нефротического синдрома с возрастом дебюта после 12 месяцев

В группу СРНС с возрастом дебюта старше 1 года включен 151 ребенок (80 мальчиков – 53%) в возрасте от 1 года 6 месяцев до 17 лет 11 месяцев, средний возраст составил 10 лет 9 месяцев (SD 55 месяцев). Средний возраст дебюта - 5 лет 8 месяцев, SD 4,105 месяцев.

Наследственный анамнез по гломерулопатиям отягощен у 35 детей (23,2%), при этом 2 ребенка рождены от близкородственных браков.

В группе детей с возрастом дебюта заболевания старше 1 года чаще отмечалась артериальная гипертензия (33 ребенка - 22%, $p=0,006$).

У большинства детей с возрастом дебюта старше 1 года отмечалась морфологическая картина ФСГС (74 ребенка – 56,1%), БМИ выявлена в 26,5% случаев (32 ребенка).

По результатам молекулярно-генетического обследования патогенные, вероятно патогенные варианты, а также варианты с неизвестной клинической значимостью выявлены всего в половине случаев (81 ребенок – 53,6%). Преобладали варианты в генах *COL4A5* (12 – 7,9%), *WT1* (10 – 6,6%), *NPHS2* (7 – 4,6%) – рисунок 6.

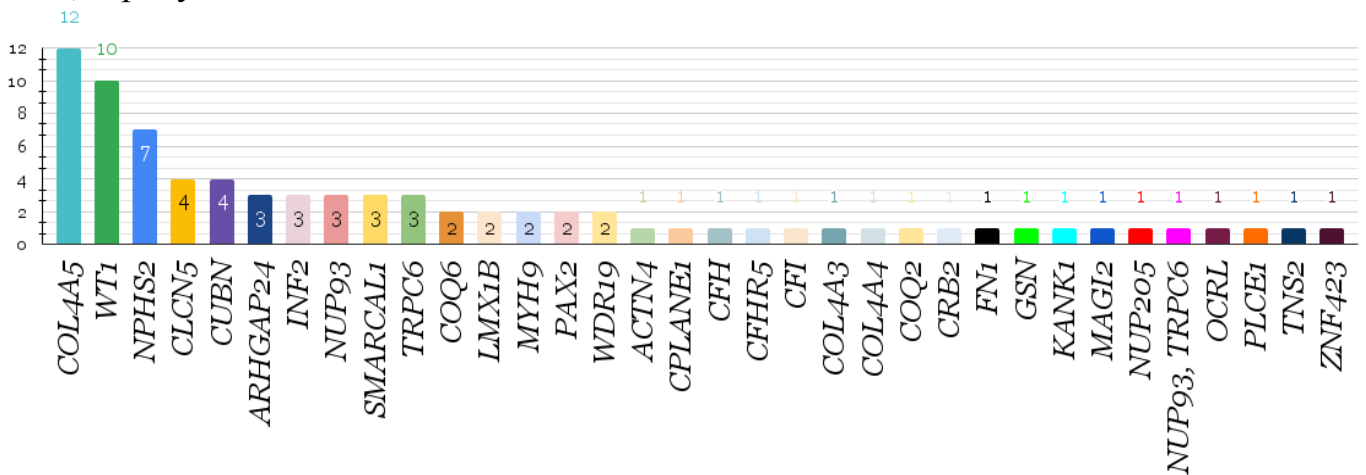


Рисунок 6. Распределение генов, содержащих клинически значимые нуклеотидные варианты, в группе детей с НС с возрастом дебюта старше 1 года, $n=81$.

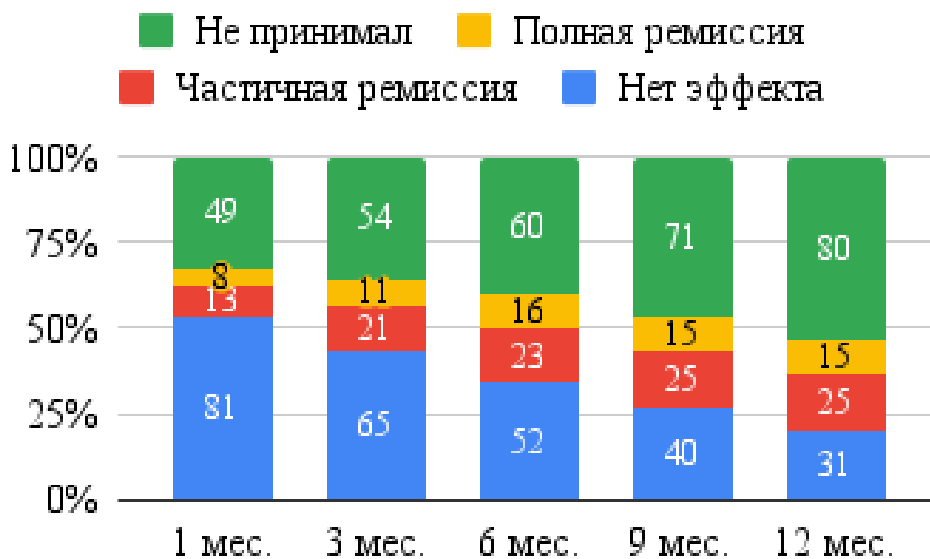


Рисунок 7. Эффективность терапии ЦсА в группе СРНС с возрастом дебюта старше 1 года, $n=151$.

Большинство пациентов данной группы получали стероидную терапию в анамнезе и оказались к ней резистентны (121 ребенок – 80,1%), 101 ребенку (66,9%) проводилась терапия ингибиторами кальцинейрина, при этом 25 детей (24,8%) на фоне терапии в течение года вышли в частичную, а 16 детей (15,6%) - в полную ремиссию (рисунок 7). Среди ответивших на терапию ЦсА большинство не имели нуклеотидных вариантов, вызывающих НС (68,8% - 11 детей - вышедших в полную ремиссию, 68% - 17 детей - в частичную ремиссию).

ХБП 5 ст. достигли 14 детей (9,3%), ХБП 3 ст. еще 16 детей (30 пациентов - 19,9%). Медиана возраста достижения ХБП 3 ст. составила 82 месяца (Q1-Q3 60-117 месяцев), медиана возраста прогрессирования ХБП до 5 ст. составила 79 месяцев (Q1-Q3 69-126 месяцев).

Сравнение клинико-генетических характеристик НС в зависимости от возраста дебюта

Симптомокомплекс НС отмечался у 211 детей (84,4%). Изолированный НС наблюдался менее чем у трети пациентов (26-29%), у 40-50% отмечалась гематурия, у 26,5-53,5% - АГ, причем АГ достоверно чаще отмечалась при позднем НС. Кальциурия практически не встречалась у детей с возрастом дебюта заболевания >1 года.

Наследственный анамнез был отягощен у 26,4%, доля пациентов с отягощенной наследственностью достоверно выше была у пациентов с кальциурией. При наследственных формах реже отмечался изолированный НС, а гематурия при наследственном и спорадическом НС выявлена в равных процентах (47%).

Экстраренальные проявления, отмеченные у 63,2% пациентов, были разделены на подгруппы по системам органов. Наиболее часто наблюдалось нарушение зрения, в т.ч. миопия средней и высокой степени, астигматизм, - у 54 детей (21,6%), задержка психо-моторного развития (ЗПМР) и когнитивный дефицит – 34 ребенка (13,6%), множественные (более 5) стигмы дизэмбриогенеза – 36 детей (14,4%).

У детей с ранним дебютом экстраренальные проявления отмечались статистически значимо чаще, чем у детей с НС с возрастом дебюта старше 1 года (70,7% против 57,6%, $p=0,037$).

В результате настоящего исследования выявлен 171 нуклеотидный вариант в 37 генах, причинные нуклеотидные варианты обнаружены в 66% случаев.

Нуклеотидные варианты в гене *NPHS2* были выявлены у 27 детей (10,8%), в гене *COL4A5* – у 18 детей (7,2%), в генах *WT 1* и *CLCN5* – по 17 детей (6,8%), нуклеотидные варианты в остальных генах выявлены с долями менее 5%.

Значимые нуклеотидные варианты в генах, приводящих к повреждению ЩД, чаще отмечены при раннем дебюте НС. При поражении других структур статистически значимых различий по возрасту дебюта не отмечалось.

У 37 детей (14,8%) вследствие высокой протеинурии отмечался гипотиреоз. Большую часть этих детей составили пациенты без найденных мутаций (12/37 – 32,4%), а также с мутациями в генах *NPHS1* (7/37 – 18,9%), *NPHS2* (8/37 – 21,6%), *WT1* (2/37 – 5,4%), *LMX1B* (2/37 – 5,4%), и по 1 (2,7%) ребенку с мутациями в генах *LMX1B*, *PLCE1*, *SMARCA1*, *MYH9*, *OCRL* и *CFH*.

У пациентов, включенных в исследование, среди морфологических типов преобладали БМИ и ФСГС (суммарно 62%), при клинически значимых нуклеотидных вариантах в генах *COL4A3*, *COL4A4* и *COL4A5* морфологическая картина соответствовала синдрому Альпорта. При мембранозной нефропатии мутаций не выявлено.

Половине детей (136 – 54,4%) проводилась попытка патогенетической терапии ингибиторами кальцинейрина ЦсА или такролимусом, полная ремиссия достигнута лишь у 18 детей (13,2%), частичная – у 28 детей (20,6%). Следует отметить, что ремиссия носила кратковременный и нестойкий характер.

У большей части детей, вышедших в ремиссию (65,3%), не выявлено нуклеотидных вариантов, вызывающих НС. Среди ответивших детей с верифицированными нуклеотидными вариантами не обнаружено преобладающих генов.

Все дети, включенные в исследование, получали нефропротективную терапию ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента, диуретики и терапию альбумином в дебюте заболевания получали 78 детей (31,2%), а 37 детям (14,8%) с гипотиреозом назначен препарат левотироксина.

За время наблюдения 62 ребенка (24,8%) снизили функцию почек по клубочковой фильтрации до цифр, соответствующих ХБП 3 ст., а у 38 детей (15,2%) ХБП прогрессировала до 5 ст. Половина детей с ВНС снизила функцию почек по клубочковой фильтрации до цифр, соответствующих ХБП 3 ст., к возрасту 122 месяцев, с ИНС – к 185 месяцам, большая часть детей с возрастом дебюта старше 1 года (121 – 80,1%) имели сохранную функцию почек по клубочковой фильтрации.

Среди детей, снизивших функцию почек по клубочковой фильтрации до цифр, соответствующих ХБП 3 ст., в группе ВНС превалировали дети с нуклеотидными вариантами в гене *NPHS1* (17,3%), *NPHS2* (26,1%), *WT1* (21,7%), в группах ИНС и НС с возрастом дебюта старше 1 года не обнаружены гены, ассоциированные с большей вероятностью снижения функции почек.

Медиана срока прогрессирования ХБП до 5 ст. при ВНС составила 36 месяцев, при ИНС – 151 месяц, при НС с возрастом дебюта старше 1 года – 86 месяцев.

Средний срок прогрессирования ХБП до 5 ст. при ВНС составил 44,063 мес. \pm 8,025 мес., при ИНС – 122,857 мес. \pm 32,020 мес., при НС с возрастом дебюта старше 1 года – 101,37 мес. \pm 13,896 мес. (Рисунок 8).

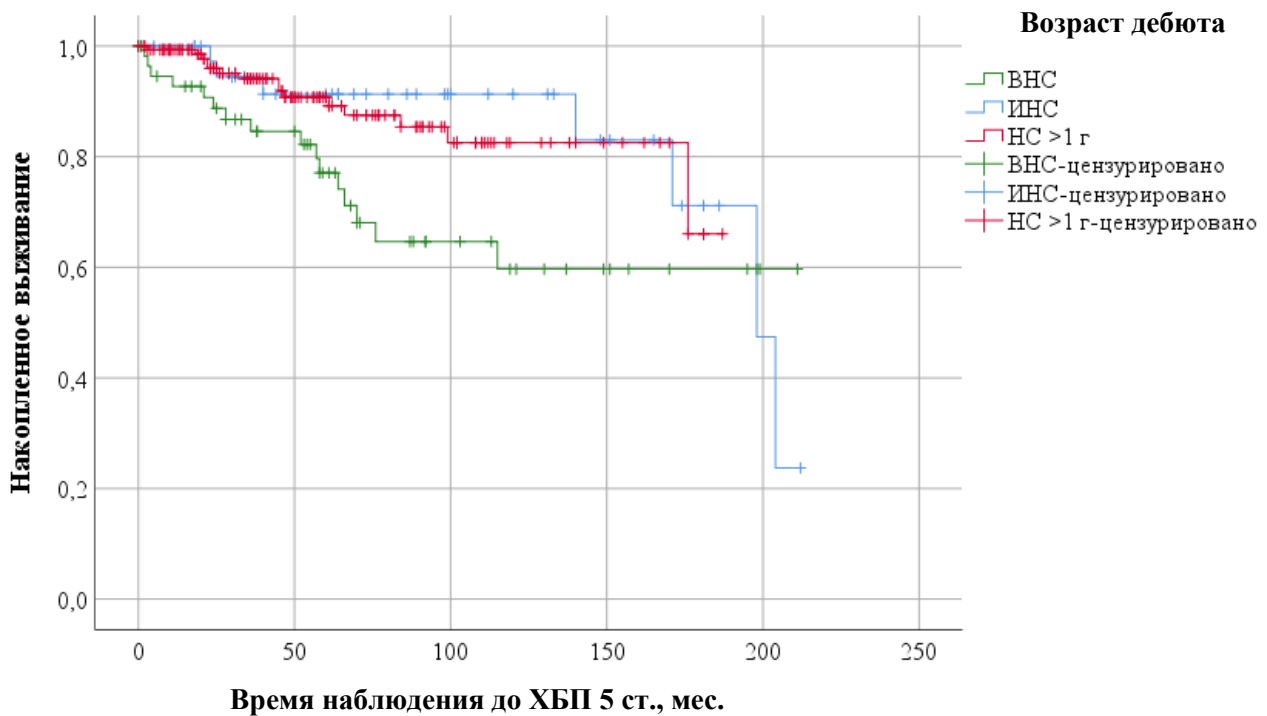


Рисунок 8. Кривые почечной выживаемости за время наблюдения (от дебюта), $n=250$.

Среди детей, снизивших функцию почек по клубочковой фильтрации ниже 15 мл/мин (ХБП 5 ст.), в группе ВНС преобладали дети с вариантами в гене *NPHS1* (26,7%), *NPHS2* (33,3%), *WT1* (26,6%), в группах ИНС и НС с возрастом дебюта старше 1 года не обнаружено генов, ассоциированных с большей вероятностью снижения функции почек.

Достоверной корреляции между возрастом дебюта и возрастом выхода в ХБП 5 ст. в ходе настоящего исследования не выявлено ($p>0,05$).

В отношении возраста дебюта и поврежденного гена отмечаются некоторые отличия (критерий Краскела–Уоллиса – $<0,001$): наиболее ранний дебют характерен для пациентов с нуклеотидными вариантами в генах *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *LAMB2*, поздний дебют более характерен для пациентов с нуклеотидными вариантами в генах *COL4A5*, *ACTN4*, *NUP93*, *INF2*, *TRPC6*, *LMX1B*.

Корреляций между поврежденными генами и возрастом достижения ХБП 5

ст. не выявлено (критерий Краскела-Уоллиса - 0,149).

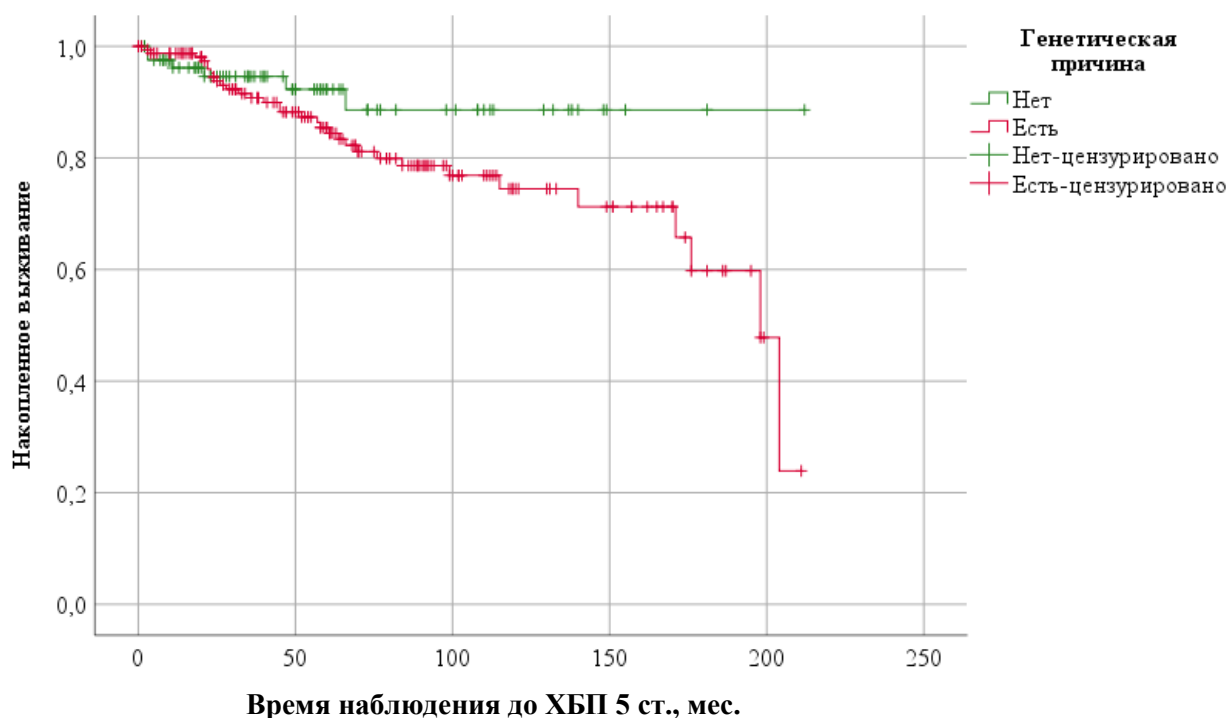


Рисунок 9. Кривые почечной выживаемости у детей с верифицированной генетической причиной заболевания и без нее.

Проведен анализ почечной выживаемости в зависимости от наличия генетической причины НС (Рисунок 9). Лог-ранг критерий Ментеля-Кокса равен 0,091, что подтверждает отсутствие статистически значимых различий. На рисунке 9 можно проследить параллельный ход линий на ранних этапах с наибольшим количеством наблюдений.

Проведен анализ почечной выживаемости в зависимости от морфологического диагноза, выявленного в дебюте заболевания (Рисунок 10). Лог-ранг критерий Ментеля-Кокса равен 0,627, что соответствует отсутствию статистически значимых отличий в отношении прогрессирования ХБП до 5 ст. при различных морфологических типах.

Среди пациентов, достигших ХБП 5 ст., 14 (42,4%) в качестве метода выбора заместительной почечной терапии начат гемодиализ (ГД), еще 6 (18,2%) – перитонеальный диализ (ПД), 10 пациентов (30,3%) за время наблюдения получили и ГД, и ПД в связи с возникшими осложнениями проводимой эфферентной заместительной терапии. Оставшимся 8,1% выполнена трансплантация почки без начала эфферентной заместительной почечной терапии. Возврат заболевания в трансплантат составил 22-33%. Среди трасплантированных пациентов с выявленными мутациями процент возврата заболевания в трансплантат оказался значительно ниже - 12%.

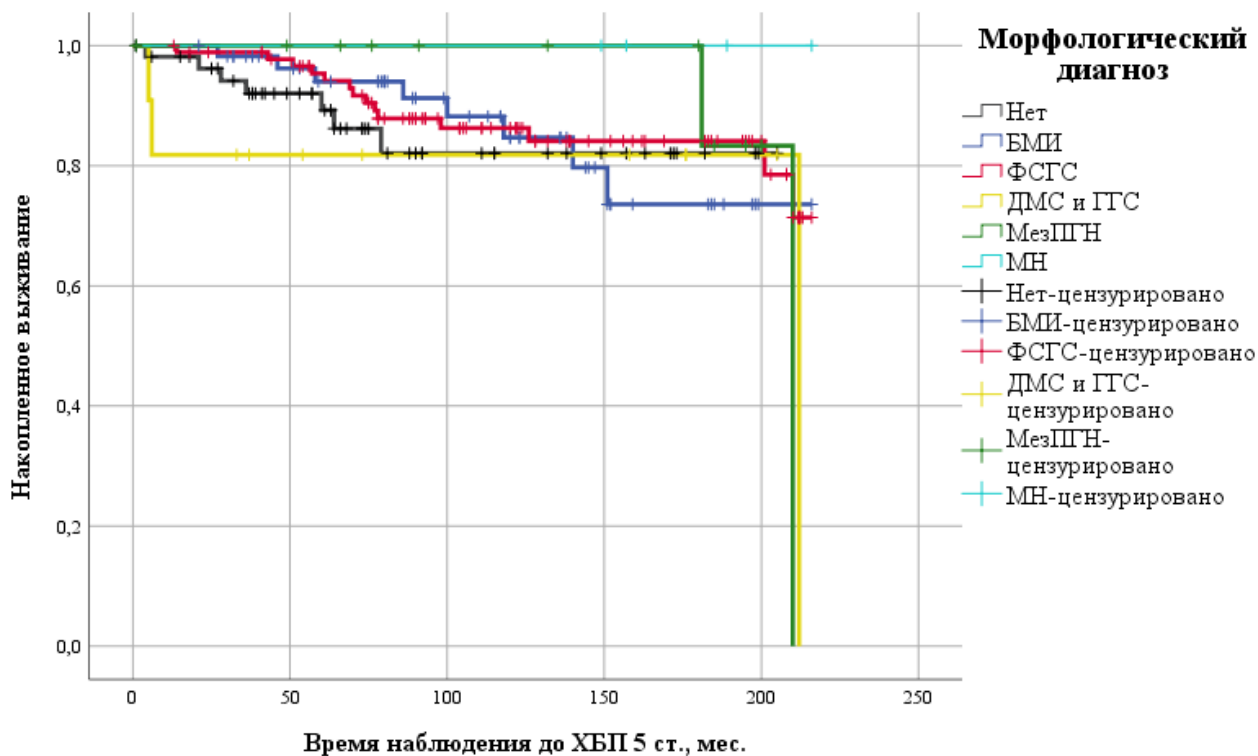


Рисунок 10. Кривые почечной выживаемости у детей при различных морфологических вариантах НС.

ВЫВОДЫ

1. Среди детей с врожденным и инфантильным нефротическим синдромом отмечается высокая частота генетически детерминированного нефротического синдрома - 85%, что существенно превышает этот показатель в группе с возрастом дебюта старше 1 года.

2. У детей с дебютом нефротического синдрома на первом году жизни преобладают патогенные варианты в генах *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, что может быть использовано для оптимизации молекулярно-генетического обследования российских детей. В рамках настоящего исследования выявлены мажорные для российской группы детей нуклеотидные варианты (*NPHS2* с.259G>T, р.Е87*, с.868G>A, р.У290М; *NPHS1* с.3478С>Т, р.R1160*).

3. У детей с ранним дебютом нефротического синдрома реже встречается артериальная гипертензия (30,3% против 53,6%), однако экстраренальные проявления отмечаются в большем проценте (70,7% против 57,6%), чем при стероидрезистентном нефротическом синдроме с возрастом дебюта старше 1 года.

4. Наличие экстраренальных проявлений и характерная фенотипическая картина позволяют сузить круг диагностического поиска до одного гена, патогенетически ответственного за развитие заболевания.

5. Не выявлено зависимости более быстрого прогрессирования хронической болезни почек от определенных генетических или морфологических вариантов первичного нефротического синдрома.

6. Хроническая болезнь почек при раннем дебюте заболевания прогрессирует быстрее, что отчасти объясняется большей долей детей, мультирезистентных к терапии.

7. Несмотря на общепринятое мнение об отсутствии эффекта ингибиторов кальциейрина у детей с наследственными вариантами нефротического синдрома, у небольшого процента данная терапия эффективна. В ходе исследования не выявлено взаимосвязи дефектного гена и ответа на терапию ингибиторами кальциейрина.

8. Лишь в отношении малого числа вариантов врожденного и инфантильного нефротического синдрома (патогенные нуклеотидные варианты генов *COQ2*, *COQ6*, *CUBN*) существует патогенетическая терапия, однако данные формы не дифференцируются на основании результатов светооптического анализа биопсии почки с преобладанием фокально-сегментарного гломерулосклероза в большинстве случаев.

9. С учетом полученных результатов и международного опыта, проведение трансплантации почки в описанной группе детей перспективно в связи с низкими рисками возврата заболевания в трансплантат.

10. В большинстве случаев основным диагностическим инструментом при врожденном и инфантильном нефротическом синдроме следует признать молекулярно-генетический анализ, а тактику ведения свести к посиндромной и нефропротективной терапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение молекулярно-генетического исследования таргетных областей генов, вызывающих развитие НС, приоритетно по отношению к пункционной нефробиопсии в связи с большей диагностической и прогностической значимостью у детей с дебютом заболевания на первом году жизни.

2. Детям с возрастом дебюта заболевания старше 1 года рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования таргетных областей генов, вызывающих НС, лишь при резистентности к иммуносупрессивной терапии (стероиды, ЦсА в течение 6 месяцев).

3. Проведение пункционной нефробиопсии детям со СРНС с возрастом дебюта старше 1 года показано всем детям.

4. При молекулярно-генетическом тестировании российских детей с ВНС и ИНС (а также их фенотипами) рекомендовано исследование таргетных областей 10

генов, имеющих наибольшую частоту встречаемости и/или возможности специфической терапии: *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *CUBN*, *COL4A5*, *COQ2*, *COQ6*, *ACTN*, *CLCN5*, *LMX1B*.

5. При характерном фенотипе и наличии синдромальных проявлений показано исследование конкретных генов, нуклеотидные варианты в которых вызывают соответствующую клиническую картину (НС в комбинации с врожденной аномалией почек и мочевыводящих путей – *CRB2*, микрофтальм, микрокория, глаукома, ЗППР – *LAMB2*, отсутствие надколенников, гипоплазия ногтей – *LMX1B*, костная дисплазия, нейтропения, гиперпигментация кожи – *SMARCA1*, ложный мужской гермафродитизм – *WT1*).

6. У детей с верифицированными генетическими причинами НС терапия ингибиторами кальцинейрина может быть эффективна, однако это не должно служить основой для рутинной клинической практики. Решение должно приниматься на уровне лечебных учреждений третьего уровня с учетом индивидуальных особенностей ребенка.

7. При верификации причинных нуклеотидных вариантов в генах *COQ2*, *COQ6*, *CUBN* следует незамедлительно начать специфическую патогенетическую терапию (убидекаренон, цианокобаламин).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Милованова А.М., Пушков А.А., Савостьянов К.В., Зробок О.И., Вашурина Т.В., Ананьин П.В., Столяревич Е.С., Фисенко А.П., Цыгин А.Н. Исследование генетических причин врожденного и инфантильного нефротического синдрома у российских детей. *Нефрология и диализ*. 2021; 23(1): 57-72.
2. Милованова А.М., Ананьин П.В., Вашурина Т.В., Зробок О.И., Ряпосова А.Б., Пушков А.А., Савостьянов К.В., Цыгин А.Н. Особенности врожденного и инфантильного нефротического синдрома у российских детей. *Российский педиатрический журнал*. 2021; 24(6): 381-388.
3. Милованова А.М., Вашурина Т.В., Ананьин П.В., Пушков А.А., Цыгин А.Н., Савостьянов К.В., Асанов А.Ю. Клиническая гетерогенность российских детей с нуклеотидными вариантами в гене *CRB2*. *Медицинская генетика*. 2021; 20(12): 58-61.
4. Милованова А.М., Цыгин А.Н. Полиморфность фенотипических особенностей стероидрезистентного нефротического синдрома, ассоциированного с мутацией в гене *WT1*. *Российский педиатрический журнал*. 2019; 22(5), 293-294.
5. Милованова А.М., Цыгин А.Н., Савостьянов К.В., Ананьин П.В. Наблюдение ребенка со стероидрезистентным нефротическим синдромом в сочетании с

аутосомно-доминантным поликистозом почек. Нефрология и диализ. 2019; Т 21, № 4, 483-484.

6. Tsygin A., Savostyanov K., Pushkov A., Zrobok O., Vashurina T., Dmitrienko S., Ananin P., Agaronian A., Voznesenskaya T., Ryaposova A., Milovanova A., Maltseva V., Komarova O., Fisenko A. IPN11758-93 Molecular genetic study in Russian children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2019, 34:1821–2260.

7. Милованова А.М., Цыгин А.Н., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Ананьин П.В., Вашурина Т.В., Зробок О.И. Генетические особенности врожденного и инфантильного нефротического синдрома. Нефрология и диализ. 2019; Т21, № 4, 484-485.

8. Милованова А.М., Ананьин П.В., Пушков А.А., Цыгин А.Н. Дефект нуклеопорина 93 как фактор быстрого прогрессирования хронической болезни почек. Нефрология и диализ. 2020, Т22, №4, 565-566.

9. Milovanova A.M., Ananin P.V., Vashurina T.V., Zrobok O.I., Ryaposova A.B., Dmitrienko S.V., Komarova O.V., Tsygin A.N. Perspectives of calcineurin inhibitors treatment in hereditary steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney international reports.* 2021, №6, S199.

10. Jankowski M., Dasa-roszak P., Trautmann A., Milovanova A., Balasz-chmielewska I., Grenda R., Zieg J., Jankauskiene A., Simkova E., Drożdż D., Szymanik-grzelak H., Żurowska A., Tsygin A., Ziętkiewicz E., Schaefer F., Lipskaziętkiewicz B. Clinical delineation of the NUP93 glomerulopathy prevalent in Central and Eastern Europe. *Pediatr Nephrol.* 2021. 36:3285–3491.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

БМИ – болезнь минимальных изменений

ВНС – врожденный нефротический синдром

ГБМ – гломерулярная базальная мембрана

ГД – гемодиализ

ИНС – инфантильный нефротический синдром

НС – нефротический синдром

ПД – перитонеальный диализ

СРНС – стероидрезистентный нефротический синдром

ФСГС – фокально-сегментарный гломерулосклероз

ХБП – хроническая болезнь почек

ЦсА – циклоспорин А

ЩД – щелевая диафрагма