



НЕКЛАССИЧЕСКАЯ ФОРМА ДЕФИЦИТА ФЕРМЕНТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ В ЖЕНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ: ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ

Е.Б. Храмова¹, Л.А. Суплотова¹, О.Н. Иванова², С.А. Прокофьев², С.В. Фомина¹

¹ ГОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия
Минздравсоцразвития России
(ректор — проф. Э.А. Кашуба)

² ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий
(дир. — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Эффективным и доступным методом диагностики неклассической формы недостаточности фермента 21-гидроксилазы является стимуляционная проба с синтетическим аналогом адренокортикотропного гормона пролонгированного действия. Стимулированный уровень 17-ОР более 50 нмоль/л отражает нарушение ферментативной активности и в 80% случаев подтверждает наличие врожденной ферментопатии. Концентрация 17-ОР в пробе от 30 до 50 нмоль/л не может рассматриваться в качестве критерия диагностики неклассической формы заболевания, что определяет необходимость верификации диагноза методом молекулярно-генетического анализа с детекцией мутаций в гене *CYP21*.

Ключевые слова: 17-гидроксипрогестерон, мутации гена *CYP21*.

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВКДН) — одно из наиболее распространенных наследственных заболеваний. Одним из синонимов ВКДН является термин адреногенитальный синдром (АГС). В 95% случаев данная патология обусловлена дефицитом 21-гидроксилазы (P450c21), приводящим к недостаточной продукции кортизола и активной секреции андрогенов, биосинтез которых не зависит от активности фермента. В последние годы обобщены данные о распространенности заболевания в различных популяциях, разработаны методики диагностики классической формы 21-гидроксилазной недостаточности, определены оптимальные алгоритмы заместительной гормональной терапии.

Неклассическая форма недостаточности фермента P450c21 встречается в женской популяции с частотой 4% [1, 2]. Особенностью данной формы заболевания является умеренное снижение активности фермента, определяющее отсутствие симптомов гипокортицизма, проявления гирсутного синдрома, нарушение менструальной функции и первичное или вторичное бесплодие, а также высокий риск репродуктивных потерь в случае наступления беременнос-

ти [2, 4]. Зачастую клиническая картина заболевания дебютирует в подростковом возрасте или в период гестации, что позволяет рассматривать популяцию беременных женщин в качестве группы риска [3].

Биохимическая диагностика неклассической формы дефицита P450c21 основана на определении высокой концентрации патогенетического маркера врожденной ферментопатии — 17-ОР. Согласно европейским критериям диагностики, базальный уровень 17-ОР более 6 нмоль/л рассматривается как пограничный для диагностики недостаточности P450c21, а уровень более 15 нмоль/л — как диагностический. При сомнительной оценке исходной концентрации 17-ОР применяют стимуляционную пробу с синтетическим аналогом адренокортикотропного гормона (АКТГ) короткого действия с определением содержания метаболита на пике стимуляции через 1 ч. Концентрация 17-ОР менее 30 нмоль/л исключает ферментативный дефект, значения в диапазоне 30–50 нмоль/л указывают на возможное гетерозиготное носительство мутантного гена P450c21 (*CYP21*), стимулированный уровень более 50 нмоль/л рассматривается как диагностический [1, 5]. На отечественном фармацевтическом рынке отсутствуют синтетические аналоги АКТГ короткого действия, а используемая модификация пробы с аналогом АКТГ пролонгированного действия (синктен-депо) не имеет четких критериев оценки.

Внедрение в клиническую практику методов молекулярной диагностики позволяет с высокой точностью определить наличие наследственного заболевания при сомнительных результатах гормонального теста. Поиск новых специфических мутаций в гене *CYP21* расширяет возможности диагностики неклассической формы дефицита P450c21.

Важным звеном в решении проблемы репродуктивных нарушений у женщин является определение достоверных диагностических критериев неклассической формы недостаточности фермента P450c21 и ее дифференциальная диагностика с другими ви-

дами гиперандрогении.

Цель настоящего исследования заключалась в определении диагностической ценности методов, применяемых для верификации неклассической формы недостаточности фермента P450c21 в женской популяции.

Материалы и методы

По завершению периода гестации обследованы 134 женщины, отобранные методом случайной выборки из 2792 беременных с высокими уровнями 17-ОР и ДГЭАС в I триместре, определенных в рамках селективного скрининга беременных на неклассическую форму дефицита фермента P450c21. Средний возраст обследованных составил $29,0 \pm 4,7$ года, группа представлена русскими женщинами. Оценивали клинические признаки гиперандрогении надпочечникового генеза, определяли базальный и стимулированный синтетическим аналогом АКГТ пролонгированного действия (синактен-депо, Novartis) уровни 17-ОР. Препарат вводили внутримышечно в дозе 1000 мг, пробы крови брали до введения и через 9 ч после него (на пике действия). Уровень 17-ОР определяли методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с применением набора «DRG 17-a-OH Progesteron E 1Ф-1292» (США). Пациенток обследовали при наличии информированного согласия на базе Многопрофильной клиники ГОУ ВПО ТюмГМА Минздравсоцразвития России (гл. врач — проф. Л.А. Суплотова).

Молекулярно-генетическое исследование выполнено у 44 пациенток в генетической лаборатории ФГУ ЭНЦ Росмедтехнологий (зав. лабораторией — С.А. Прокофьев) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров для функционально активного гена [5]. Определяли мутации гена CYP21, которые приводят к аминокислотным заменам, характерным для неклассического варианта

ВДКН: V281L, P30L, P453S [5]. Для анализа нуклеотидной замены 693С/Т (P105L) с помощью аллель-специфической ПЦР разработаны праймеры:

S1 — 5'-GGTGCTGAAGTCCAAGAGG-3',

S2 — 5'-AAGCTGGTGTCTAAGAACTACC c/t 3',

AS — 5'-GCTTTCCAGAGCAGGGAGT-3'

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Продукты ПЦР (контрольный фрагмент — 428 н.п., специфический — 62 н.п.) с указанными праймерами специфичны для CYP21A2.

В случае гетерозиготного носительства мутаций неклассической формы дефицита P450c21 проводили детекцию мутаций классических форм (I2spl, R356W, Q318X, L306insT, V237E, G291S, I172N), а также определение гетерозиготного носительства химерного гена (30 kb del) [6].

Для амплификации использовали амплификатор «Терцик» МС-2 (НПФ «ДНК-Технология», Россия). Детекцию результатов осуществляли путем электрофореза в 1–3% агарозном геле с добавлением этидиума бромиды.

Статистический анализ полученных данных проведен с помощью программы Statistica (версия 6.0, StatSoft, Inc, 2001). Количественные данные представлены в виде М. Критерий корреляции Спирмена применялся для оценки взаимосвязи между количественными показателями. Сравнение качественных показателей осуществлялось при помощи критерия χ^2 . Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клинический осмотр женщин вне гестации позволил выявить отсутствие специфических маркеров врожденной ферментопатии: у всех пациенток

Рис. 1. Точность метода определения базального уровня 17-ОР для диагностики неклассической формы недостаточности P450c21

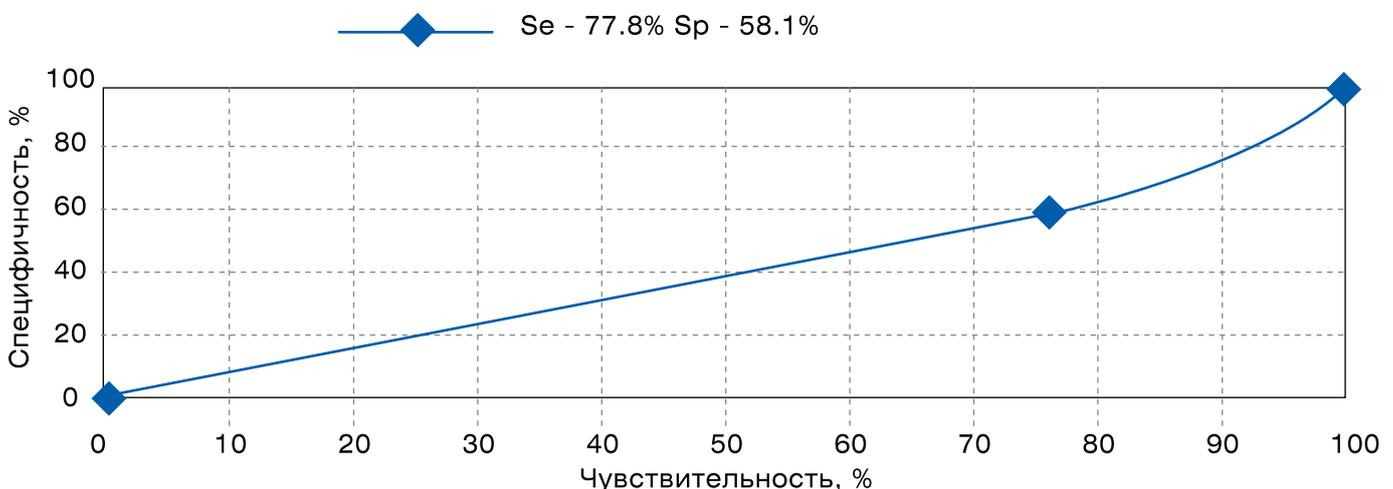




Таблица 1. Наличие мутаций в гене CYP21 у пациенток с высоким базальным и/или стимулированным уровнем 17-ОР

№ пациентки	Мутация	Базальный 17-ОР, нмоль/л	Стимулированный 17-ОР, нмоль/л
27	V281L/V237E	6,36	60,6
58	30kb del/V281L	7,3	60,0
73	30kb del/P453S	18,2	60,0
18	30kb del/V281L	13,3	58,2
5	Не найдена	8,05	54,5
22	Не найдена	4,2	38,5
97	Не найдена	15,7	34,8
132	Не найдена	4,2	35,4
16	Не найдена	17,3	21,2
39	Не найдена	15,1	22,4

Таблица 2. Детектированные мутации в гене CYP21 у пациенток с уровнем стимулированного 17-ОР менее 30 нмоль/л

№ пациентки	Мутация	Базальный 17-ОР, нмоль/л	Стимулированный 17-ОР, нмоль/л
95	— /P105L	6,4	22,1
133	— /P105L	3,9	16,9
110	— /30kb del	3,4	15,4
123	— /P105L	7,3	14,8
46	— /30kb del	11,2	13,9
128	— / P105L	2,5	13,9
129	— /P105L	1,2	12,3
116	— /P105L	3,9	10,6
100	— /30kb del	7,2	9,9
107	— /30kb del	7,2	6,8
85	— /P105L	3,9	6,2
108	— /P105L	3,5	6,0
1	— /P105L	3,6	3,9

был женский фенотип без признаков маскулинизации, гирсутое число — в пределах нормы (индекс Ферримана-Голлвея от 7 до 12 баллов). По данным анамнеза, раннее адrenaрхе наблюдалось у 12,7% женщин. Средний возраст менархе у женщин в группе обследования составил $13,3 \pm 1,3$ года, что соответствует нормальным значениям; однако у 5,2% женщин наступление менархе произошло в возрасте старше 15 лет. Нарушение менструального цикла по типу олигоменореи диагностировано у 20,9% обследованных; чаще нарушения менструального цикла встречались у женщин с поздним началом менструаций, однако различия не были значимы ($p=0,141$).

У каждой 5-й женщины из числа обследованных (19,4%) в анамнезе имелось бесплодие, длительность которого составляла от 2 до 17 лет; в большинстве случаев — первичное (у 61,5% женщин).

Максимальное количество репродуктивных нарушений приходилось на невынашивание предыдущих беременностей: самопроизвольные аборты отмечены у 27,6% женщин, регрессирующие беременности — у 5,2%. При этом наибольшее количество репродуктивных потерь (до 72,7%) приходилось на ранние сроки гестации.

Таким образом, наличие отягощенного репродуктивного анамнеза в отсутствие фенотипических проявлений гиперандрогении позволяет формировать группу риска врожденных нарушений стероидогенеза, нуждающейся в дальнейшем проведении гормонального и молекулярно-генетического исследований.

Базальный уровень 17-ОР, определяемый как патогенетический маркер 21-гидроксилазной недостаточности, у 34,3% женщин превышал лаборатор-

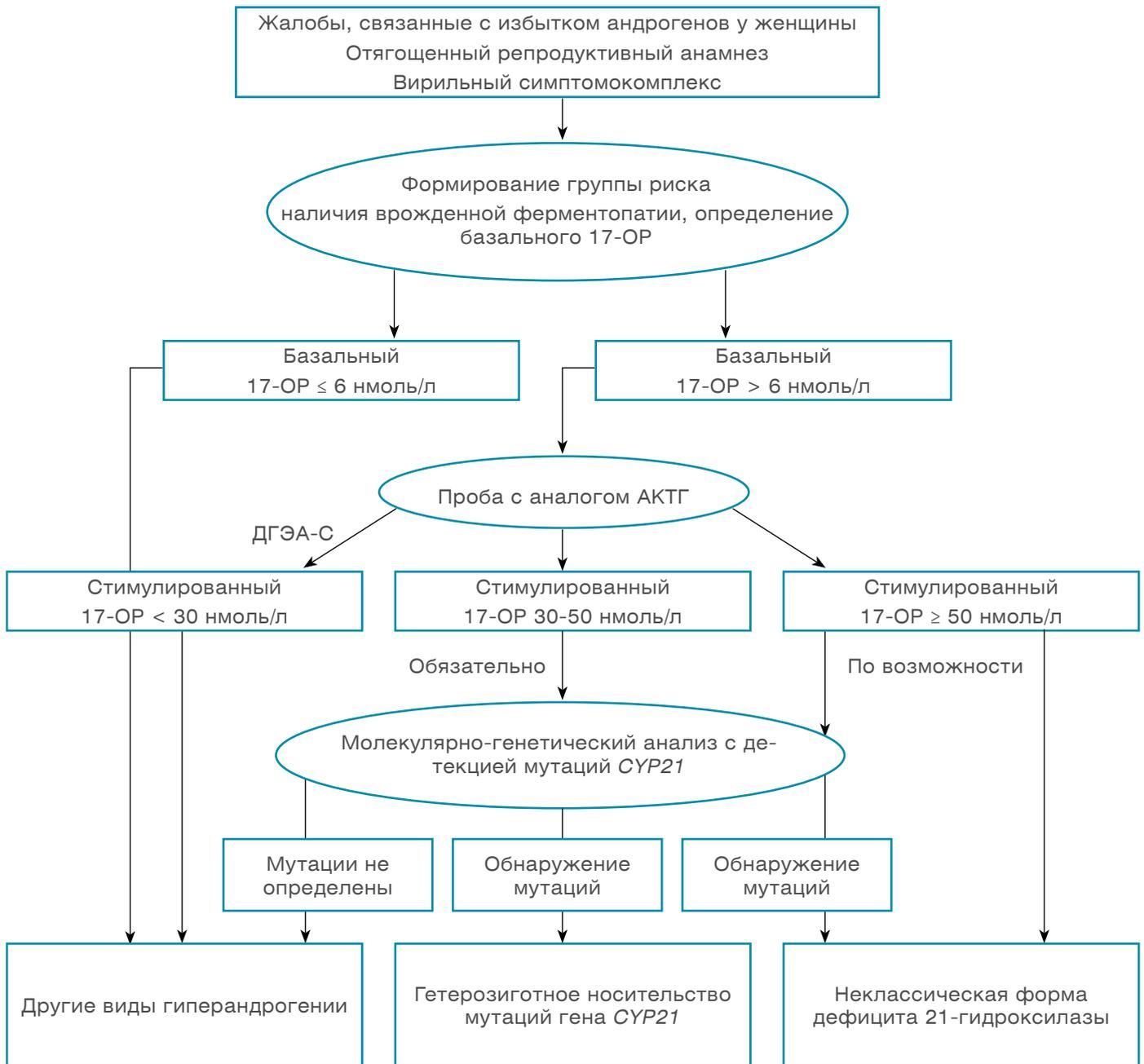


Рис. 2. Алгоритм диагностики неклассической формы недостаточности фермента P450c21



ный норматив (6,0 нмоль/л), но лишь у 5% пациенток соответствовал диагностическому уровню неклассической формы недостаточности P450c21 (>15 нмоль/л). При проведении стимуляционной пробы с пролонгированным аналогом АКТГ уровень 17-ОР более 50 нмоль/л определен у 9,6% женщин из числа обследованных.

Для верификации неклассической формы недостаточности P450c21 использован метод молекулярно-генетического анализа, позволяющий исключить ложноположительные случаи заболевания при положительном результате гормонального теста.

Молекулярно-генетические исследования у 44 женщин позволили выявить 13 случаев точковых мутаций гена *CYP21* (табл. 1). Наиболее сильно ассоциированными с клинико-гормональными проявлениями гиперандрогении в популяции женщин Тюмени явились замены, приводящие к мутациям в положении V281L и P453S при сочетанном нахождении химерного гена (*30 kb del*).

У 32% женщин в отсутствие клинических признаков гиперандрогении при уровнях базального и стимулированного 17-ОР <15 и <30 нмоль/л соответственно выявлена гетерозиготность по нуклеотидной замене 693 С/Т в гене *CYP21* (P105L), при этом ни в одном случае не была выявлена гомо(геми)зиготность по данному аллелю (табл. 2).

Несмотря на то что у всех женщин с доказанным дефектом стероидного синтеза в исследовании базальный уровень 17-ОР превышал 6 нмоль/л, диагностика неклассической формы дефицита P450c21 по изолированному его определению не представляется возможной: прогностическая ценность отрицательного результата (-PV) составляет 92,6% (рис. 1). Уровень 17-ОР на пике стимуляции в диапазоне от 30 до 50 нмоль/л также не является достаточным критерием диагностики врожденной ферментопатии: прогностическая ценность положительного результата (+PV) составляет только 50%, что с равной вероятностью указывает на наличие ферментативного дефекта у женщин как с повышенным уровнем метаболита, так и с нормальной концентрацией 17-ОР. Уровень 17-ОР на пике стимуляции >50 нмоль/л в 80% случаев подтверждает наличие дефекта в гене *CYP21* и может рассматриваться в качестве

значимого критерия диагностики недостаточности P450c21. Общая точность сочетанного определения уровней базального и стимулированного 17-ОР более 6 и 50 нмоль/л соответственно составляет 70,4%, однако прогностическая ценность положительного результата (+PV) составляет также 80%, не увеличивая, таким образом, прогностическую ценность положительного результата при изолированном определении стимулированного уровня 17-ОР >50 нмоль/л.

Алгоритм диагностики неклассической формы недостаточности фермента P450c21 представлен на рис. 2.

Выводы

1. Формирование группы риска по неклассической форме дефицита P450c21 основано на определении клинических проявлений гиперандрогении и/или наличии репродуктивных нарушений в анамнезе. Изолированное выявление базального уровня 17-ОР более 6 нмоль/л не позволяет диагностировать неклассическую форму ВДКН и отражает необходимость выполнения стимуляционной пробы с синтетически аналогом АКТГ пролонгированного действия.
2. Стимулированный аналогом АКТГ уровень 17-ОР более 50 нмоль/л с высокой долей вероятности подтверждает наличие врожденной ферментопатии. У пациенток со стимулированным уровнем 17-ОР в диапазоне от 30 до 50 нмоль/л для верификации диагноза в обязательном порядке должен быть использован метод молекулярно-генетического исследования с детекцией мутаций в гене *CYP21*.
3. Причиной нарушения функциональной активности фермента P450c21 в исследовании явилось наличие сочетанных мутаций в гене *CYP21* (*V281L/30kb del*, *P453S/30kb del*, *V281L/V237E*).
4. Для неклассической формы недостаточности P450c21 наиболее часто встречающейся мутацией явилась аминокислотная замена в позиции V281L.

Литература

1. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний: Руководство. Под ред. М.И. Балаболкина, Е.М. Клебановой, В.М. Креминской. М: Медицина 2002;752.
2. Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. Половое развитие детей. М: Медицина 2002;180.
3. Labrie F., Luu-The Van, Labrie C. et al. Endocrine and Intracrine Sources of Androgens in Women: Inhibition of Breast Cancer and Other Roles of Androgens and Their Precursor Dehydroepiandrosterone. *Endocrin Rev* 2003;24 (2):152-182.
4. Parker CR Jr. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids* 1999;64(9):640-647.
5. Wedell A., Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Molecul Genet* 1993;2(5):499-504.
6. Lee H.H., Chang G.J. et al. Analysis of the chimeric *CYP21P/CYP21* gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 2000;46(5):606-611.
7. White P.C., Speiser P.W. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. 2000;21(3):245-291.

Поступила 19.11.2007 г.