

© Н. П. ГОНЧАРОВ, Г. С. КОЛЕСНИКОВА, 2007

УДК 616.453-008.1-053.1-008.9-074

Н. П. Гончаров, Г. С. Колесникова

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ И НАРУШЕНИЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗА

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН и РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Рассматриваются проблемы биохимической диагностики врожденной дисфункции коры надпочечников, обусловленной прежде всего дефицитом 21-гидроксилазы надпочечников. Приводятся данные о синтезе кортикостероидов в коре надпочечников и обсуждается возможность применения различных биохимических маркеров в неонатальном скрининге и более поздней диагностике врожденной дисфункции коры надпочечников, в том числе 21-дезоксикортизола в крови и прегнантриола и прегнантриолона в моче.

Ключевые слова: дисфункция коры надпочечников, нарушение стероидогенеза.

The paper deals with the problems in the biochemical diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused mainly by adrenal 21-hydroxylase deficiency. It presents data on the adrenal cortical synthesis of corticosteroids and discusses whether different biochemical markers, including the levels of blood deoxycortisol and those of urinary pregnantriol and pregnantriolone, may be used in neonatal screening and later diagnosis of congenital adrenal hyperplasia.

Key words: adrenal hyperplasia, impaired steroidogenesis.

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) — группа наследственных аутосомно-рецессивных заболеваний, при которых из-за мутаций в генах, кодирующих ферменты стероидогенеза в коре надпочечников, наблюдается сдвиг в продукции основных стероидных гормонов от кортикостероидов к андрогенам. Результатом этих дефектов является отсутствие или снижение в разной степени синтеза кортизола из его предшественника — холестерина (рис. 1). Из-за недостатка циркулирующего кортизола передняя доля гипофиза (по принципу обратной связи) секретирует повышенные количества АКТГ, под влиянием которого развивается гиперплазия коры надпочечников [2, 15, 19].

Как видно на рис. 1, 7 ферментов обеспечивают синтез глюкокортикоидов, минералокортикоидов и андрогенов в коре надпочечников. Гены для всех этих ферментов были клонированы и охарактеризованы. Ферменты СYP11A1, СYP17, СYP21B, СYP11B1, СYP11B2 связаны с цитохромом P-450. СYP17 (17-гидроксилаза) присутствует и в коре надпочечников, и в гонадах, тогда как СYP21B (21-гидроксилаза), СYP11B1 (11 β -гидроксилаза) и СYP11B2 (18-гидроксилаза) присутствуют только в коре надпочечников, причем СYP17 (17-гидроксилаза) отсутствует в клубочковой зоне, где осуществляется синтез минералокортикоидов, СYP21B

(21-гидроксилаза) экспрессируется в пучковой и сетчатой зонах, где происходит синтез глюкокортикоидов и андрогенов, СYP11B1 (11 β -гидроксилаза) присутствует в клубочковой и пучковой зонах, а СYP11B2 (18-гидроксилаза) локализована только в клубочковой зоне, где осуществляется синтез минералокортикоидов. 3 β -ол-стероиддегидрогеназа участвует в синтезе всех классов кортикостероидов и экспрессируется, кроме коры надпочечников, в гонадах, плаценте и периферических тканях (кожа, жировая ткань).

Более чем в 90% случаев генетические нарушения затрагивают ген, кодирующий 21-гидроксилазу [1, 8]. Эта ферментная система необходима для синтеза как кортизола, так и альдостерона. Зачастую термин ВДКН употребляется как синоним дефекта именно этого фермента. Прямым следствием такого дефекта является усиление синтеза стероидов, которые непосредственно предшествуют ферментативному блоку (17-гидроксилированных производных прогестерона и прегненолона), и андрогенов, путь биосинтеза которых не заблокирован.

Данный синдром имеет достаточно широкий диапазон клинических проявлений и подразделяется на 3 основные формы: наиболее тяжелая сольтеряющая (дефицит кортизола и альдостерона), простая вирильная (классическая, дефицит кортизола) и неклассическая (поздно проявляющаяся).

Тяжесть заболевания зависит от места повреждения гена, которое определяет степень потери активности 21-гидроксилазы. Недостаточность фермента приводит к дефициту двух основных конечных продуктов стероидогенеза (кортизола и альдостерона) и избытку предшественников, накапливающихся перед дефектной ферментной реакцией, т. е. на стадии пре-

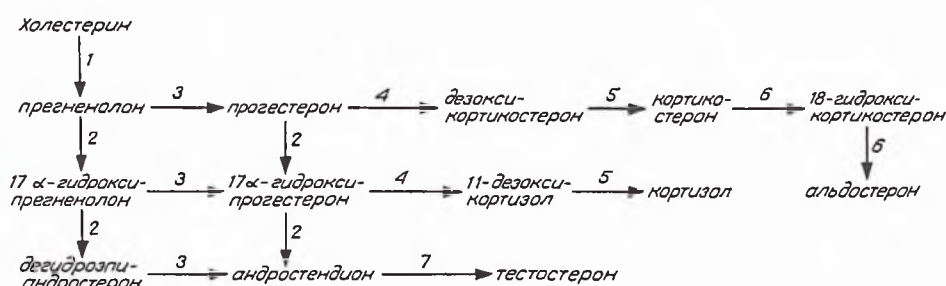


Рис. 1. Схема биосинтеза стероидов в коре надпочечников.

1 — СYP11A1 (20,22-десмолаза), 2 — СYP17 (17-гидроксилаза/17,20-десмолаза), 3 — HSD2 (3 β -ол-стероиддегидрогеназа), 4 — СYP21B (21-гидроксилаза), 5 — СYP11B1 (11 β -гидроксилаза), 6 — СYP11B2 (18-гидроксилаза), 7 — 17 β -HSD (17 β -ол-стероиддегидрогеназа).

Таблица 1

Содержание 17-гидроксипрогестерона и 17-гидроксипрегненолона (в нмоль/л) у больных с ВДКН и здоровых доноров в течение суток ($M \pm m$)

Группа обследованных	17-гидроксипрогестерон			17-гидроксипрегненолон		
	8-00	16-00	24-00	8-00	16-00	24-00
Больные с ВДКН	180,6 ± 9,3	105,9 ± 34,2	79,5 ± 33,6	97,2 ± 24,0	36,0 ± 8,7	32,1 ± 10,2
Здоровые доноры	4,8 ± 0,3	3,0 ± 0,3	7,5 ± 1,7	17,1 ± 1,9	8,4 ± 1,1	7,5 ± 1,7

вращения 17-гидроксипрогестерона в 11-дезоксикортизол и прогестерона в 11-дезоксикортикостерон. 17-Гидроксипрогестерон может превращаться в тестостерон и другие кортикостероиды через альтернативные пути биосинтеза в коре надпочечников и в других тканях. Именно поэтому у таких больных может наблюдаться неполное отсутствие в крови тех или иных стероидов. Например, у больных с глубоким дефицитом 21-гидроксилазы был обнаружен близкий к нормальному уровень 21-гидроксилированных стероидов, что являлось результатом 21-гидроксилирования предшественников вне надпочечника [14].

Ген, кодирующий 21-гидроксилазу (CYP21), локализован на коротком плече хромосомы 6 и дублируется его псевдогеном (CYP21P), нефункциональным. Эти гены частично перекрываются, образуя так называемую полигенную область [12]. Псевдоген P450c21A отличается от функционального гена тремя точечными мутациями, каждая из которых препятствует образованию мРНК активной 21-гидроксилазы [21]. Синтезированная при транскрипции псевдогена мРНК принимает участие в регуляции экспрессии функционального P450c21B-гена [3]. Генетические повреждения, вызывающие дефицит 21-гидроксилазы, включают крупные делеции, крупные или небольшие конверсии и (наиболее часто) точечные мутации [17].

В настоящее время не вызывает сомнения существование множества генетических нарушений, приводящих к развитию ВДКН. Как и при других рецессивных аутосомных патологиях, степень тяжести заболевания и клинические симптомы определяются двумя функционирующими аллелями гена, полученными от отца и матери. Большинство больных с ВДКН гетерозиготны и имеют разные нарушения в каждом аллеле [1, 2].

Наиболее распространенный гормональный маркер дефицита 21-гидроксилазы — повышенный уровень 17-гидроксипрогестерона в сыворотке или амниотической жидкости (при пренатальной диагностике) [16]. Степень повышения этого стероида определяется формой ВДКН: при классической форме его уровень возрастает в десятки раз, при неклассической — может быть в пределах физиологических колебаний, и только проба с АКТГ сопровождается значительно повышенным выбросом этого соединения.

В качестве гормонального маркера ВДКН может быть использован и 17-гидроксипрегненолон. Данный маркер используется нами при диагностике ВДКН в течение почти 3 лет с удовлетворительным результатом. Концентрация 17-гидроксипрегненолона у больных с ВДКН превышает норму в 2—3 раза (табл. 1). При определении обычными методами у больных неклассической формой ВДКН может не наблюдаться дефицита кортизола [15], однако базальные и стимулированные АКТГ уровни 17-оксипрегненолона и 17-оксипрогестерона всегда выше, чем в контроле.

У больных с дефицитом 21-гидроксилазы наблюдается более низкий уровень свободного кортизола в моче — $72,6 \pm 9,4$ нмоль/л, чем у здоровых лиц — $117 \pm 17,6$ нмоль/л [5, 6].

Из-за дефицита 21-гидроксилазы у больных с ВДКН синтезируются значительные количества 21-дезоксикортизола (рис. 2) — стероида, концентрация которого у здоровых людей чрезвычайно мала (у мужчин — $0,33-0,87$ нмоль/л, у женщин — $0,15-1,05$ нмоль/л [9, 18]). Совместное использование жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [11, 20] позволило обнаружить не только высокую концентрацию 17-оксипрогестерона ($79,9-997$ нмоль/л) и низкую концентрацию кортизола ($2,5$ нмоль/л), но и присутствие значительных количеств 21-дезоксикортизола ($83,7-324,0$ нмоль/л).

В настоящее время в связи с внедрением в лабораторную практику автоматизированных систем

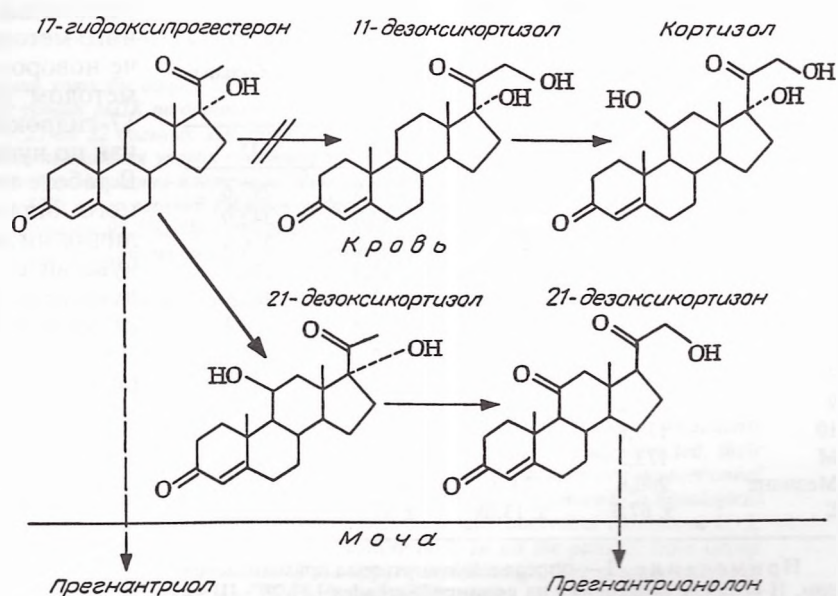


Рис. 2. Альтернативный путь стероидогенеза у больных с ВДКН.

с прямым безэкстракционным определением кортизола в сыворотке регистрируются завышенные показатели кортизола у больных с ВДКН. Следует вспомнить работу J. Brotherton и В. Rothbart [4], определявших кортизол у женщин с гирсутизмом и ВДКН пятью различными методами: РИА-³H после экстракции этанолом, прямой РИА-¹²⁵I, Дельфия, Амерлайт, "Synelisa". Многие пациенты с ВДКН имели повышенный уровень кортизола (690 нмоль/л), хотя логически уровень кортизола должен быть низким. Нереально высокие показатели концентрации кортизола обусловлены высокой перекрестной реакцией антисыворотки к нему, прежде всего с 21-дезоксикортизолом. Действительно, в молекулах кортизола и 21-дезоксикортизола имеются идентичные иммуноактивные функциональные группы: 11 β - и 21-гидроксилы. Завышение уровней кортизола при этом оказывается прямо пропорциональным содержанию 21-дезоксикортизола в пробе и обратно пропорциональным степени дефицита 21-гидроксилазы [7].

Для проверки этого положения нами были проведены следующие исследования: 1) РИА-методом в произвольно выбранных 10 пробах сыворотки от больных с ВДКН определяли содержание кортизола;

2) из тех же проб сыворотки после экстракции стероидов выделяли фракцию кортизола с помощью хроматографии на колонке "Sephadex LH-20" и определяли его содержание тем же методом;

3) к исследуемым сывороткам добавляли кристаллический стандарт 21-дезоксикортизола (150 нг/мл) и снова определяли содержание кортизола с помощью того же метода.

Результаты исследования приведены в табл. 2.

Видно, что концентрации кортизола в сыворотке больных с ВДКН значительно превышают соответствующие показатели, полученные для фракции кортизола после хроматографии. Уровень собственно кортизола составляет $4,9 \pm 1,0\%$ от общей концентрации стероида. Процент открытия добавленного стандарта 21-дезоксикортизола составлял

Таблица 2

Результаты определения кортизола в сыворотке крови больных с ВДКН

Больные	I	II	III	IV
1	147,6	3,8	285,8	297,6
2	192,0	16,6	440,0	342,0
3	126,9	28,2	261,8	276,9
4	106,2	9,8	298,9	256,2
5	283,6	7,6	512,3	433,6
6	209,1	19,4	417,5	359,1
7	242,9	24,0	445,1	392,9
8	234,9	40,3	372,4	384,9
9	314,2	40,1	439,3	464,2
10	173,8	32,6	435,3	323,8
M	173,5	22,2	390,8	314,6
Медиана	200,6	21,7	426,4	350,55
Σ	$\pm 67,3$	$\pm 13,08$	$\pm 87,75$	$\pm 67,25$

Примечание. I — определение кортизола прямым методом, II — после разделения на колонке "Sephadex LH-20", III — после добавления 21-дезоксикортизола, IV — ожидаемая концентрация кортизола.

$114,4 \pm 10,6$. Следовательно 21-дезоксикортизол действительно обладает высоким иммунологическим сродством к антителам к кортизолу и поэтому определяется в иммунной реакции. У больных с ВДКН уровень 21-дезоксикортизола в сыворотке может значительно превышать содержание кортизола, что определяется степенью блока 21-гидроксилазы.

Из сказанного выше следует, что определение содержания кортизола обычными прямыми методами иммуноанализа (включая автоматизированные системы) у больных с ВДКН не имеет практической диагностической ценности и его не следует включать в диагностический алгоритм ВДКН.

Уровень кортизола (как химической молекулы) у больных с ВДКН можно определить, только выделив его хроматографически перед количественным определением методами иммуноанализа. Оптимальный вариант — использование метода газовой хроматографии и масс-спектрографии; сочетание этих методов позволяет количественно и качественно оценить весь спектр стероидов, включая и маркеры ВДКН. Высокая стоимость этой технологии и сложность эксплуатации ограничивают ее использование в рутинной лабораторной практике. Она должна быть использована в специализированных референсных лабораториях, организация которых необходима при проведении неонатального скрининга.

Генетические методы выявления ферментативных дефектов при ВДКН внесли важный вклад в решение задачи раннего выявления заболевания. Однако эти методы выполнимы только в специализированных лабораториях при наличии высококвалифицированных специалистов и специального оборудования. Поэтому продолжается поиск дополнительных биохимических маркеров ВДКН. Одни из них предложены японскими авторами [10]: метаболиты 17-гидроксипрогестерона и 21-дезоксикортизона в моче (см. рис. 2) — прегнантриол и прегнантрионолон. Методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией были убедительно показаны преимущества неинвазивного метода определения прегнантрионолона в моче новорожденных по сравнению с существующим методом неонатального скрининга (определение 17-гидроксипрогестерона в капиллярной крови) как по чувствительности, так и по специфичности. В работе также приводятся результаты сравнительного определения 17-гидроксипрогестерона различными методами иммуноанализа. Все они по чувствительности и специфичности уступают методу определения прегнантрионолона в моче. Следует отметить, что использование приведенной технологии как референсной необходимо предусмотреть при организации специализированных лабораторий по Национальной программе скрининга новорожденных на ВДКН.

Заключение

В рутинной диагностике дефицита 21-гидроксилазы необходимо использовать определение 17-гидроксипрогестерона проверенными иммунологическими методами, а также (желательно)

21-дезоксикортизола и его метаболита методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии. Определение кортизола прямыми методами иммуноанализа без использования хроматографии лишено смысла, так как в этом случае вместе с кортизолом определяется близкий ему по структуре 21-дезоксикортизол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Н. П., Колесникова Г. С. // Кортикостероиды: метаболизм, механизм действия и клиническое применение. — М., 2002.
2. Vachega T. A., Billerbeck A. E., Marcondes J. A. et al. // Clin. Endocrinol. (Oxford). — 2000. — Vol. 52, N 5. — P. 601—607.
3. Bristow J., Gitelman S. E., Tee M. K. et al. // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 12919—12923.
4. Brotherton J., Rothbart B. // J. Steroid Biochem. — 1990. — Vol. 28, N 6. — P. 641—649.
5. Charmandari E., Pincus S. M., Matthews D. R. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87, N 5. — P. 2238—2244.
6. Charmandari E., Merke D. P., Negro P. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89, N 5. — P. 2228—2236.
7. Franks R. S. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1974. — Vol. 39, N 6. — P. 1099—1103.
8. Geley S., Peter M., Johrer K. et al. // Exp. Clin. Endocrinol. — 1993. — Vol. 101. — Suppl. 1. — P. 15—31.
9. Gueux B., Fiet J., Pham-Huu-Tsung M. T. et al. // Acta Endocrinol. (Copenh.). — 1985. — Vol. 108, N 4. — P. 537—544.
10. Homma // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89, N 12. — P. 6087—6091.
11. Kao P. C., Machacek D. A., Magera M. J. et al. // Ann. Clin. Lab. Sci. — 2001. — Vol. 31, N 2. — P. 199—204.
12. l'Allemand D., Tardy V., Gruters A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2000. — Vol. 85, N 12. — P. 4562—4567.
13. Maitra A., Shirwalkar H. // Indian J. Exp. Biol. — 2003. — Vol. 41, N 7. — P. 701—709.
14. Mellon S. H., Miller W. L. // J. Clin. Invest. — 1989. — Vol. 84. — P. 1497—1501.
15. Merke D. P. et al. // Fertil. and Steril. — 2000. — Vol. 74, N 2. — P. 329—334.
16. Minutti C. Z., Lacey J. M., Magera M. J. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89, N 8. — P. 3687—3693.
17. Morel Y., Miller W. L. // Adv. Hum. Genet. — 1991. — Vol. 20. — P. 1—4.
18. Nahoul K., Adeline J., Bercovici J. P. et al. // J. Steroid Biochem. — 1989. — Vol. 33, N 6. — P. 1167—1172.
19. New M. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 1038. — P. 14—43.
20. Saisho S., Shimozawa K., Jata J. et al. // Horm. Res. — 1990. — Vol. 33, N 1. — P. 27—34.
21. White P. C., New M. J., Dupont B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 5—10.

Поступила 04.04.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 616.45-006.488-07:616.634:577.175.52]-074

Н. С. Кузнецов, Д. Г. Бельцевич, Н. П. Гончаров, Л. Е. Кац, Г. В. Кацья, Г. С. Колесникова, А. В. Ильин, Г. А. Мельниченко

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КАТЕХОЛАМИНОВ — ПАТОГНОМОНИЧНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРИЗНАК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН и РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

У 46 оперированных больных определен уровень метилированных производных катехоламинов (МПК) — метанефрина и норметанефрина. Больные разделены на 2 группы. 1-я группа — 24 пациента, у которых при гистологическом исследовании выявлена хромоаффинная опухоль. Возраст больных варьировал от 9 до 75 лет (в среднем 37,8 года). 2-я группа — 22 пациента, у которых удалены опухоли надпочечников коркового происхождения либо забрюшинные опухоли вненадпочечникового генеза. Возраст больных варьировал от 11 до 67 лет (в среднем 44,3 года). При гистологическом исследовании в этой группе больных были выявлены: альдостеромы — 7 наблюдений, гормонально-неактивные аденомы коры надпочечников — 6, адренокортикальный рак — 5, кортикостерома — 1 наблюдение, лимфосаркома надпочечника — 1, адренолиптома — 1, рак почки — 1.

У всех больных 1-й группы отмечено увеличение хотя бы одного из показателей МПК не менее 110% по отношению к верхней границе нормы. В среднем превышение уровня МПК по отношению к верхней границе нормы составило для метанефрина 456%, для норметанефрина 574%. У 21 из 22 больных 2-й группы с опухолями надпочечников и забрюшинного пространства нехромоаффинного происхождения повышения уровня суточной экскреции МПК выявлено не было. У 1 больного 2-й группы с гистологически верифицированной смешанно-клеточной аденомой коры надпочечника было отмечено повышение суточной экскреции метанефрина на 17% выше верхней границы референсных значений. Таким образом, чувствительность метода составила 100%, специфичность 95,5%. Нижняя граница достоверного диагностического интервала значений суточной экскреции МПК для феохромоцитомы составляет 714 мкг/сут для метанефрина и 1500 мкг/сут для норметанефрина.

Метод определения свободных МПК в плазме обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть использован однократно у больных с артериальной гипертензией в качестве скрининга симптоматического характера заболевания.

Ключевые слова: определение уровня метилированных производных катехоламинов, диагностика, феохромоцитома.

The levels of the methylated catecholamine derivatives (MCD) metanephrine and normetanephrine were measured in 46 patients operated on. The patients were divided into 2 groups: 1) 24 patients in whom chromaffinoma was histologically detected; their age varied from 9 to 75 years (mean 37.8 years); 2) 22 patients who had undergone adrenal cortical tumors or retroperitoneal tumors of extraadrenal genesis; their age ranged from 11 to 67 years (mean 44.3 years). In this group of patients, a histological study revealed aldosteromas in 7 cases, hormonally inactive adrenal cortical adenomas in 6, adrenocortical carcinoma in 5, corticosteroma in 1, adrenal lymphosarcoma in 1, adrenolipoma in 1, and renal cancer in 1. In all the patients from Group 1, there was an increase of one MCD index for instance of less than 110% of the upper normal range. The average excess of MCD levels over the upper normal range is 456% for metanephrine and 574% for normetanephrine. No increase in the level of daily MCD excretion was found in 21 out of the 22 Group 2 patients with nonchromaffin adrenal and retroperitoneal tumors. In this group, 1 patient with histologically verified mixed-cell adenocarcinoma of the adrenal cortex was observed to have a