

Распространенность неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников (на примере популяции Московской области)

Т.А. ИОНОВА^{1*}, А.Н. ТЮЛЬПАКОВ¹, К.М.Н. С.Г. КАЛИНЕНКОВА²

The prevalence of the non-classical form of congenital adrenal hyperplasia as exemplified (by the population of the Moscow region)

T.A. IONOVA, A.N. TYULPAKOV, S.G. KALINENKOVA

¹ ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ; ² МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) — одно из самых частых моногенных заболеваний с ауто-сомно-рецессивным типом наследования. В отличие от классических форм заболевания частота НК21ОН в российской популяции до настоящего времени не изучена. Цель исследования — оценить истинную частоту НК21ОН на основании распространенности двух наиболее частых мутаций, характерных для данного заболевания. Исследовано 938 случайно отобранных образцов пятен крови, полученных при проведении неонатального скрининга у детей, родившихся в течение одного календарного года на территории Московской области. Частота заболевания была рассчитана с использованием формулы Харди—Вайнберга. Минимальный показатель распространенности НК21ОН в популяции Московской области оказался равным 1:2206. Уровень 17-гидроксипрогестерона, полученный в ходе скрининга, не позволяет выявлять носителей, а неонатальный скрининг не позволяет диагностировать НК21ОН более чем в 90% случаев.

Ключевые слова: неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы, неонатальный скрининг, 17-гидроксипрогестерон.

The non-classical form of 21-hydroxylase deficiency (NC21OH) is one of the most common monogenic diseases inherited in the autosomal-recessive pattern. The incidence of this condition in the Russian population, unlike that of its classical variant, remains to be elucidated. Aim. The objective of the present study was to estimate the true incidence of NC21OH based on the prevalence of the two most frequent mutations associated with this disease. A total of 938 randomly selected blood spots were obtained in the course of neonatal screening of the children born within one calendar year at the territory of the Moscow region. The incidence of the disease was calculated with the use of Hardy-Weinberg equation. The minimal prevalence rate of NC21OH in the population of the Moscow region was estimated to be 1:2206. The level of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) calculated based on the results of the screening studies can not be used to identify the carriers of the pathology of interest whereas neonatal screening allows to diagnose no more than 90% of the cases of NC21OH.

Key words: non-classical form of 21-hydroxylase deficiency, neonatal screening, 17-hydroxyprogesterone.

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) — группа заболеваний с ауто-сомно-рецессивным типом наследования, при которых нарушен один из этапов биосинтеза кортизола вследствие генетически обусловленного дефекта ферментных систем или транспортных белков. Дефицит фермента 21-гидроксилазы является самой распространенной формой заболевания и встречается более чем в 90% всех случаев ВДКН [1—5]. Средняя распространенность классических форм заболевания, вычисленная по данным неонатального скрининга, составляет в среднем 1 на 10 000—15 000 новорожденных [6—14]. В российской популяции, по последним данным, эта величина достигает 1:8000. Частота встречаемости неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) обычно превышает таковую классических вариантов заболевания, но значительно варьирует в различных популяциях, колеблясь от 1:27 до 1:10 000 новорожденных [15—19]. Для

российской популяции эти данные отсутствуют. В отличие от классических форм дефицита 21-гидроксилазы, характеризующихся наличием специфических клинико-лабораторных критериев, выявляющихся уже в период новорожденности, клинические и гормональные проявления НК21ОН отсрочены и неспецифичны, что затрудняет возможность оценки ее распространенности по обращаемости и данным неонатального скрининга. Нами была оценена частота встречаемости НК21ОН на основании распространенности двух наиболее частых мутаций, характерных для данного заболевания.

Материал и методы

Объект исследования — случайно отобранные образцы пятен крови, полученные при проведении неонатального скрининга у детей, родившихся в течение одного календарного года на территории Мо-

сковской области. Критериями включения являлись доношенность новорожденного и отсутствие тяжелых врожденных заболеваний. Уровень 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) при отборе образцов не учитывался.

Для определения необходимого объема наблюдений использовалась статистическая формула (относительные величины):

$$n = \frac{t^2 pq}{\Delta^2},$$

где n — необходимый объем наблюдений, t — доверительный коэффициент, p — показатель, взятый из предыдущих исследований, а если аналогичные исследования не проводились, то берется максимальная величина pq , равная 50%, Δ — ошибка.

Молекулярно-генетическое исследование. ДНК выделяли с использованием наборов Diatom Pre DNA 100. Для выявления мутации V281L при ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды: F1, CGGACCTGTCCTTGGGAGACTAC (прямой праймер, специфичный для экзона 3 гена *CYP21A2*), 1688T, GGTCCACTGCAGCCATGTGCAA (обратный праймер, специфичный для мутации V281L), и R1, CCTCTCCCAGACCGTCTCATC (обратный праймер, внутренний контроль). При наличии мутации V281L ожидалась амплификация 2 ПЦР-продуктов: F1-1688T (993 п.о.) и F1-R1 (1635 п.о.), при отсутствии мутации — 1 ПЦР-продукт F1-R1 (1635 п.о.). Наличие мутации подтверждалось затем при секвенировании.

Для выявления мутации P30L при ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды: F2, GCGATTCAGGAAGGCCTATTAGG (прямой праймер, внутренний контроль), 92T, CTCGGAGCCTCCACCTCCT (прямой праймер, специфичный для мутации P30L), и R2, TCCAGAGCAGGGAGTAGTCTC (обратный праймер, специфичный для экзона 3 гена *CYP21A2*). При наличии мутации P30L ожидалась амплификация 2 ПЦР-продуктов: F2-R2 (1146 п.о.) и F2-92T (640 п.о.), при отсутствии мутации — 1 ПЦР-продукт F2-R2 (1146 п.о.). Наличие мутации подтверждалось затем при секвенировании.

Вычисление частоты заболевания проводилось по формуле Харди—Вайнберга:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

где p^2 — доля гомозигот по одному из аллелей; p — частота этого аллеля; q^2 — доля гомозигот по альтернативному аллелю; q — частота соответствующего аллеля; $2pq$ — доля гетерозигот.

Статистическую обработку материала проводили с помощью пакета прикладных программ Stat-Plus 2008. В ходе исследования анализировались выборки, подчиняющиеся нормальному распределению и характеризующиеся показателем $\mu \pm \sigma$, где μ —

среднее, σ — стандартное отклонение. Количественные данные представлены в виде $Me (25-75)$, где Me — медиана; 25 и 75 — разброс значений в виде соответствующих процентилей. При сопоставлении двух независимых выборок пользовались критерием Стьюдента (t).

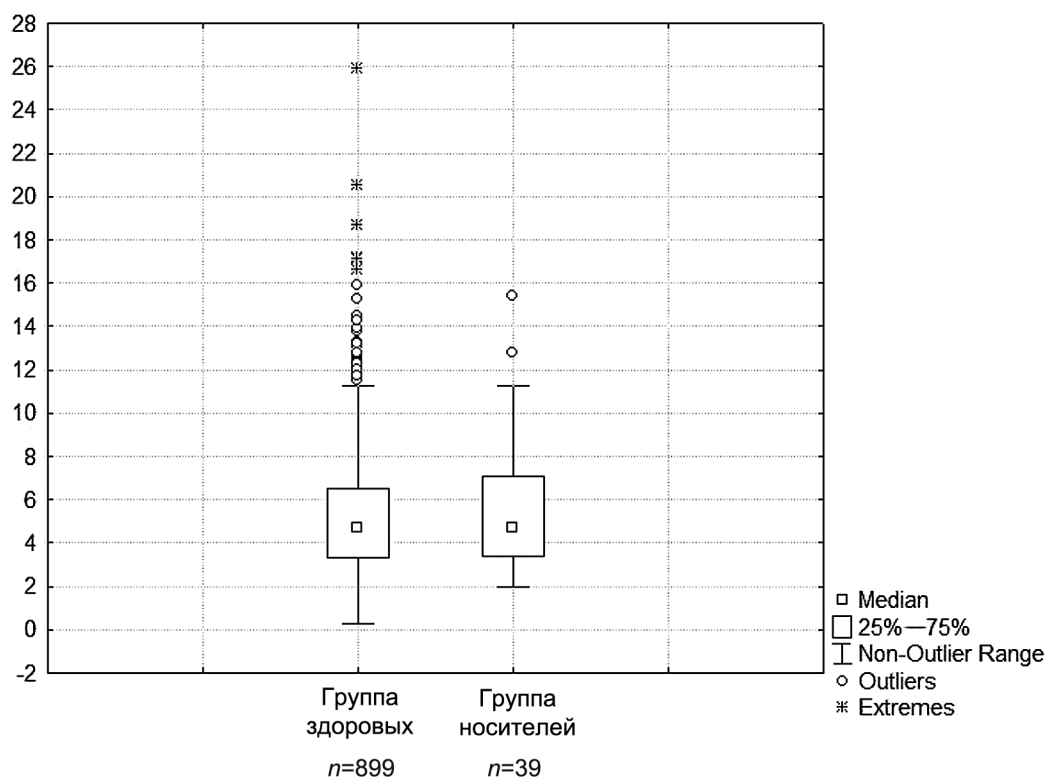
Результаты

Объем наблюдений (при $t=2$, т.е. с вероятностью безошибочного прогноза $P=95\%$) оказался равным 938. В результате аллель-специфической ПЦР среди 938 исследуемых образцов в 41 была обнаружена мутация V281L. Наличие мутации было проверено секвенированием соответствующего участка гена в каждом из образцов: в 2 образцах мутации выявлено не было, т.е. число носителей оказалось равным 39. Интересно, что в некоторых образцах при секвенировании были выявлены дополнительные мутации в гетерозиготном состоянии (**см. таблицу**). В ходе аллель-специфической ПЦР ни в одном из 938 исследуемых образцов мутации P30L выявлено не было. Таким образом, частота гетерозигот оказалась равной 1:24. Доля гомозигот для мутации V281L, рассчитанная по закону Харди—Вайнберга, оказалась равной 1:2206. Учитывая возможность ассоциации НК21ОН с компаунд-гетерозиготностью по мутации V281L, а также другими более редкими мутациями, можно утверждать, что 1:2206 является минимальной частотой распространенности данного заболевания в исследованной популяции.

Нами также был проанализирован уровень 17-ОНП у группы носителей ($n=39$) и в образцах, где мутаций выявлено не было ($n=899$), и получены следующие результаты: среднее значение 17-ОНП в первой группе составило $5,8 \pm 3,1$ нмоль/л, минимальное значение 17-ОНП — 2 нмоль/л, макси-

Дополнительные мутации и выявленные при секвенировании

№	Порядковый номер образца	Дополнительные мутации
1	106	c.920_921insT
2	170	c.920_921insT
3	335	c.920_921insT, Q318X
4	416	c.920_921insT
5	552	c.920_921insT, Q318X, R356W
6	636	c.920_921insT
7	656	Q318X, R356W
8	808	c.920_921insT
9	820	c.920_921insT
10	827	Q318X, R356W
11	867	c.920_921insT, Q318X, R356W
12	933	Q318X, R356W



Сравнение значений 17-ОНП в группе здоровых и группе носителей.

мальное — 15,4 нмоль/л; во 2-й группе образцов средний уровень значений 17-ОНП оказался равным $5,9 \pm 3,0$ нмоль/л, при этом минимальный уровень показателя — 0,3 нмоль/л, максимальный — 25,9 нмоль/л (см. рисунок). Для определения значимости различий между показателями 17-ОНП в изучаемых группах коэффициент Стьюдента был вычислен в группе образцов с мутацией ($n=39$) и сопоставимой по количеству группе случайно отобранных образцов без мутации ($n=39$). Полученный коэффициент t , равный 1, позволяет утверждать, что с вероятностью безошибочного прогноза $P > 95\%$ (или $p < 0,01$) различия значений показателя 17-ОНП в этих группах статистически незначимы.

Обсуждение

ВДКН представляет собой группу наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, в основе которых лежит дефект одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в биосинтезе кортизола. Наиболее часто (более чем в 90% случаев) среди известных 7 форм ВДКН встречается дефицит 21-гидроксилазы. Клинически принято различать три основные формы дефицита 21-гидроксилазы: две классические

(простая вирильная и сольтерная форма) и неклассическая форма заболевания (НК21ОН) [1–3, 5]. Средняя распространенность классических форм дефицита 21-гидроксилазы высока и составляет в среднем 1 на 10 000–15 000 новорожденных [6–14] с наибольшей частотой встречаемости среди таких популяций, как юпик-эскимосы (1:282) [20] и жители региона Режуньон во Франции (1:2100) [6] и наименьшей — в популяции Китая (1:28 000) [21]. В российской популяции, по последним данным, эта величина равна 1:8847 новорожденных. Приведенные данные получены в основном при неонатальном скрининге на ВДКН по уровню 17-ОНП — специфического маркера дефицита 21-гидроксилазы. Исключение составляет исследование популяции Китая, где распространенность была вычислена по закону Харди–Вайнберга из частоты носителей гетерозиготных мутаций при исследовании 1000 случайных образцов [21].

Что касается НК21ОН, то данные литературы о распространенности этой формы заболевания скудны и также весьма вариабельны, что объясняется, во-первых, влиянием национальных и этнических факторов, а во-вторых, — неодинаковыми подходами для вычисления данного показателя в разных популяциях. При этом было ярко продемонстрирова-

но, что частота встречаемости НК21ОН значительно превышает таковую классических вариантов и что НК21ОН является едва ли не самым распространенным моногенным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования [15]. Исследование В. Therrell и соавт. [8], проведенное в 1998 г., показало, что неонатальный скрининг на ВДКН позволяет идентифицировать классические формы дефицита 21-гидроксилазы в 86%, а неклассические — лишь в 13%. Так, распространенность НК21ОН среди жителей Техаса, по данным неонатального скрининга, составила 1:35 870, что в десятки раз ниже таковой в среднем в популяции (1:1000). Важно отметить, что клинические проявления НК21ОН очень вариабельны и отсрочены, а от 20 до 50% пациентов с верифицированной НК21ОН вообще не имеют клинических проявлений заболевания [22, 23]. Таким образом, оценить истинную распространенность НК21ОН, используя гормональные маркеры (неонатальный скрининг) или данные обращаемости за медицинской помощью (т.е. по совокупности клинических симптомов), невозможно. В 1985 г. Р. Speiser и соавт. [15], обследуя семьи детей с классическими и неклассическими формами дефицита 21-гидроксилазы среди различных этнических групп, предприняли попытку вычислить распространенность НК21ОН по частоте гена, опираясь на гормональные критерии. Так, наибольшая частота НК21ОН, вычисленная с помощью закона Харди—Вайнберга по частоте гена в популяции, была выявлена у евреев ашкенази — 1 (3,7%) из 27; несколько меньшая частота НК21ОН была выявлена у испаноговорящих народов и славян (1/53 и 1/63 соответственно), реже всего заболевание встречалось у итальянцев (1/333) и «остальных» европейцев (1:1000). Таким образом, средняя частота заболевания среди всех представленных популяций составила 1:111 [15]. S. Sherman и соавт. [16], используя ту же выборку пациентов, что и Р. Speiser [15], применили более совершенную методику вычисления частоты заболевания с учетом расщепления и сцепления генов, клинико-гормональных данных и HLA-типирования. Вычисленные частоты гена в популяции были сравнимы с таковыми в исследовании Р. Speiser [15].

В 1999 г. опубликована статья группы исследователей из Новой Зеландии, США и Швейцарии, которые провели молекулярно-генетическое исследование (аллель-специфическая ПЦР с анализом 9 наиболее частых мутаций, включая характерные для НК21ОН V281L и P30L) 603 образцов пятен крови, полученных в ходе неонатального скрининга в одном из центров Новой Зеландии. В 2% (12 образцов из 603) были выявлены мутации, характерные для НК21ОН, причем в 100% случаев обнаружена мутация V281L. Таким образом, распространенность заболевания в Новой Зеландии, исходя из ча-

стоты носителей, составила 1:10 000 [18]. Вторым крупным исследованием по изучению распространенности НК21ОН среди населения средней Европы явилась работа ученых из Австрии [17]: методом аллель-специфической ПЦР образцов крови 200 человек разных этнических групп носительство гетерозиготных мутаций, характерных для НК21ОН, было выявлено у 4% обследуемых. Таким образом, частота гетерозигот составила 1:25, а вычисленная распространенность заболевания — 1:2500. Среди выявленных носителей в 87,5% обнаружена характерная мутация V281L, в остальных случаях — P30L. В 2008 г. изучение распространенности НК21ОН продолжила группа авторов из Испании, которые провели молекулярно-генетическое исследование (секвенирование) образцов крови 144 добровольцев (95 женщин, 49 мужчин), в ходе которого мутации, характерные для НК21ОН, были выявлены в 17 из 144 образцов; частота носительства составила 12% или 1:8, а распространенность заболевания, вычисленная по закону Харди—Вайнберга, — 1:255. Важно отметить, что в 16 (94%) из 17 образцов была выявлена мутация V281L [19].

В настоящем исследовании распространенность НК21ОН, рассчитанная по частоте носительства двух искоемых мутаций (V281L и P30L) на примере популяции Московской области, оказалась равной 1:2206, что совпадает с данными S. Baumgartner-Pargzer и соавт. [17]. Ни в одном из 938 образцов носительства мутации P30L обнаружено не было, что, в соответствии с данными трех зарубежных исследований, описанных выше, доказывает, что частота встречаемости мутации V281L значительно превышает частоту встречаемости мутации P30L [17—19].

При сравнении уровней 17-ОНП в группе носителей и группе, где мутаций выявлено не было, достоверной разницы выявлено не было. Подобный анализ в зарубежных работах не проводился.

Для сравнения нами также был рассчитан показатель распространенности НК21ОН по данным скрининга. В нашем центре за период 2007—2011 гг. были диагностированы 7 случаев НК21ОН, заподозренных на основании повышенного уровня 17-ОНП при неонатальном скрининге. За указанный период неонатальным скринингом на ВДКН были охвачены все дети, родившиеся на территории Московской области. Учитывая количество детей, родившихся в Московской области в период 2007—2011 гг. (279 607, по данным федеральной службы государственной статистики), частота заболевания получается равной 1:39 944, что более чем в 18 раз ниже истинной частоты НК21ОН, рассчитанной по закону Харди—Вайнберга. Естественно, следует учесть тот факт, что не все дети, у которых при скрининге выявлялись повышенные значения 17-ОНП, проходили обследование в нашем центре.

Выводы

1. В популяции Московской области минимальный показатель распространенности НК21ОН равен 1:2206.

2. Уровень 17-ОНП, полученный в ходе скрининга, не позволяет выявлять носителей.

3. Неонатальный скрининг в большинстве случаев не позволяет диагностировать НК21ОН.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — А.Н. Тюльпаков, Т.А. Ионова

Сбор и обработка материала — Т.А. Ионова, С.Г. Калиненко

Статистическая обработка данных — Т.А. Ионова

Написание текста — Т.А. Ионова, А.Н. Тюльпаков

Редактирование — А.Н. Тюльпаков, С.Г. Калиненко

Конфликт интересов и финансовая заинтересованность авторов отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

- White P.C., New M.I., Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 1987; 316: 24: 1519—1524.
- White P.C., Speiser P.W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocrinol Rev 2000; 21: 3: 245—291.
- Speiser P.W., White P.C. Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 2003; 349: 776—788.
- New M.I., Wilson R.C. Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 12790—12797.
- Morel Y., Miller W.L. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Adv Hum Genet 1991; 20: 1—68.
- Pang S.Y., Wallace M.A., Hofman L., Thuline H.C., Dorche C., Lyon I.C., Dobbins R.H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics 1988; 81: 6: 866—874.
- Allen D.B., Hoffmann G.L., Fitzpatrick P., Laessig R., Maby S., Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. J Pediatr 1997; 130: 128—133.
- Therrell B.L., Berenbaum S.A., Manter-Kapanke V. et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. Pediatrics 1998; 101: 4: Pt 1: 583—590.
- Balsamo A., Cacciari E., Piazzzi S., Cassio A., Bozza D., Pirazzoli P., Zappulla F. Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia-Romagna region of Italy 1980—1995. Pediatrics 1996; 98: 362—367.
- Suwa S. Nationwide survey of neonatal mass-screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan. Screening 1994; 3: 141—151.
- Cutfield W.S., Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand. J Pediatr 1995; 126: 118—121.
- Glatt K., Garzon D.L., Popovic J. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Spec Pediatr Nurs 2005; 10: 3: 104—114.
- Merke D.P., Bornstein S.R. Congenital adrenal hyperplasia. Lancet 2005; 365: 9477: 2125—2136.
- Speiser P.W., Dupont J., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusie-Luna M.T., Lesser M., New M.I., White P.C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest 1992; 90: 584—595.
- Speiser P.W., Dupont B., Rubinstein P., Piazza A., Kastelan A., New M.I. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 1985; 37: 4: 650—667.
- Sherman S.L., Aston C.E., Morton N.E. et al. A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 1988; 42: 830—838.
- Baumgartner-Parzer S.M., Nowotny P., Heinze G. Carrier Frequency of Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency) in a Middle European Population. J Clin Endocrinol Metabol 2005; 90: 2: 775—778.
- Fitness J., Dixit N., Webster D., Torresani T., Pergolizzi R., Speiser P.W., Day D.J. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metabol 1999; 84: 3: 960—966.
- Parajes S., Quinteiro C., Domínguez F., Loidi L. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency PLoS ONE 2008; 3: Issue 5.
- Pang S., Murphey W., Levine L.S., Spence D.A., Leon A., LaFranchi S., Surve A.S., New M.I. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. J Clin Endocrinol Metabol 1982.
- Lee H.H., Kuo J.M., Chao H.T., Lee Y.J., Chang J.G., Tsai C.H., Chung B.C. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese. J Clin Endocrinol Metabol 2000; 85: 2: 597—600.
- Feldman S., Billaud L., Thalabard J., Raux-Demay M.C., Mowszowicz I., Kuttann F., Mauvais-Jarvis P. Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metabol 1992; 74: 3: 635—639.
- Dewailly D., Vantyghem-Haudiquet M.C., Sainsard C., Buvat J., Cappelletti J.P., Ardaens K., Racadot A., Lefebvre J., Fossati P. Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metabol 1986; 63: 418—423.