

На правах рукописи

РАМОВА ЗУМРАД ФЕРДИНАНДОВНА

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПОКОРТИЦИЗМА У ДЕТЕЙ
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

14.01.08 – педиатрия

03.02.07 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Уфа – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Малиевский Олег Артурович,
доктор биологических наук, профессор
Хуснутдинова Эльза Камильевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Вялкова Альбина Александровна,
доктор медицинских наук, профессор
Викторова Татьяна Викторовна

Ведущая организация. Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «11» ноября 2010 г. в 12.00 час. на заседании диссертационного совета Д. 208.006.03 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3).

Автореферат разослан «10» октября 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мирсаева Г. Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гипокортицизм – патологическое состояние, характеризующееся неадекватной секрецией или действием надпочечниковых гормонов (Дедов И.И., 2008). Она может развиваться как вследствие патологии надпочечников (первичный гипокортицизм), так и в результате нарушения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (вторичный или третичный гипокортицизм). В основе первичного гипокортицизма могут находиться как приобретенные, так и наследственные дефекты синтеза стероидных гормонов (Betterle С., 2002; Neary N., 2010). Своевременные диагностика и лечение заболевания имеют важное значение, так как позволяют не только сохранить жизнь ребенка, но и создать условия для его нормального развития (Орлова Е.М., Карева М.А. 2008).

Одной из частых форм гипокортицизма и самым частым врожденным ферментативным нарушением стероидогенеза является врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), обусловленная мутацией гена 21-гидроксилазы, распространенность которой составляет 1 случай на 14000 новорожденных (Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А., 2002).

С 2006 года в России внедрен неонатальный скрининг на врожденную дисфункцию коры надпочечников (Петеркова В.А., 2006; Ходунова А.А., 2006). Проведение этой программы в других странах позволило выявить реальную частоту различных форм данного заболевания и назначать глюко- и минералокортикоидную терапию детям в неонатальном периоде. Данные о результатах неонатального скрининга в отечественной литературе немногочисленны. Опубликованы отдельные сообщения о экономической эффективности данного вида скрининга (Ипатова О.Е., 2009).

В Республике Башкортостан впервые исследование гена 21-гидроксилазы было внедрено проф. Т.В.Викторовой (2001), однако исследовались всего 3 мутации. Вместе с тем разработка эффективной ДНК-диагностики является актуальной задачей медицинской генетики, поскольку анализ молекулярного дефекта, установление гетерозиготного носительства мутаций гена *CYP21A2* необходимы для правильной трактовки формы заболевания, оценки генетического риска в семьях родственников и супругов больных ВДКН, в связи с высокой частотой популяционного носительства мутаций в гене *CYP21A2*, достигающей 1:60 (Merke D.P., Bornstein S.R., 2005).

В Республике Башкортостан распространенность, структура и молекулярно-генетическая характеристика гипокортицизма остаются практически неизученными.

Целью настоящего исследования явилась разработка подходов к дифференциальной диагностике гипокортицизма у детей на основе изучения клинико-генетической характеристики различных его вариантов.

Задачи исследования:

1. Установить распространенность и нозологическую структуру гипокортицизма среди детей в Республике Башкортостан.
2. Разработать алгоритм дифференциальной диагностики первичного и вторичного гипокортицизма.
3. Оценить эффективность неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы, в Республике Башкортостан.
4. Установить молекулярно-генетические особенности классических форм врожденной дисфункции коры надпочечников вследствие дефицита 21-гидроксилазы в Республике Башкортостан.
5. Разработать алгоритм молекулярно-генетической диагностики дефицита 21-гидроксилазы.

Научная новизна. Определена структура гипокортицизма у детей в Республике Башкортостан (РБ), представленная врожденной дисфункцией коры надпочечников (75,0%), вторичным гипокортицизмом (15,4%) и первичной недостаточностью коры надпочечников (9,6%). Среди нозологических форм первичной недостаточности коры надпочечников преобладают аутоиммунные полигландулярные синдромы 1-го и 2-го типов (соответственно 40,0% и 30,0%), триплет А (20%). Вторичный гипокортицизм в большинстве случаев (68,8%) является одним из проявлений идиопатического пангипопитуитаризма, а в 31,2% случаев обусловлен опухолью гипоталамо-гипофизарной области.

Определена распространенность врожденной дисфункции вследствие дефицита 21-гидроксилазы, которая по данным неонатального скрининга составила 1 случай на 8974 новорожденных. Определена клинико-экономическая эффективность неонатального скрининга данного заболевания, характеризующаяся выявлением сольтеряющей формы до развития сольтеряющего криза, выявлением вирильной формы в неонатальном периоде, преобладанием предотвращенных экономических потерь над затратами.

У больных с ВДКН из РБ на 69,1% хромосом было идентифицировано 8 различных мутаций, в том числе на 84,6% хромосом у больных с сольтеряющей формой и на 52,7% хромосом с простой вирильной формой. Показано, что для каждой формы недостаточности 21-гидроксилазы в основном характерен свой спектр диагностически значимых мутаций. Проведенный анализ особенностей

фенотипических проявлений идентифицированных мутаций у больных ВДКН показал выраженную корреляцию между фенотипом и характером мутации.

Практическая значимость работы. Разработанный алгоритм дифференциальной диагностики первичной недостаточности коры надпочечников позволяет определять вариант заболевания на этапах первичной медико-санитарной и специализированной медицинской помощи у 90% пациентов. Предложен алгоритм дифференциальной диагностики вторичного гипокортицизма.

На основе клинической и молекулярно-генетической характеристик дефицита 21-гидроксилазы разработана схема молекулярной диагностики заболевания в группах высокого риска.

Внедрение результатов исследований в практику. Результаты исследования внедрены в работу эндокринологического отделения ГУЗ «Республиканская детская клиническая больница» и ГУЗ «Республиканский перинатальный центр». Основные теоретические положения и практические рекомендации включены в учебный курс и используются при обучении студентов на кафедре госпитальной педиатрии с курсом поликлинической педиатрии и кафедре педиатрии ИПО Башкирского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нозологическая структура гипокортицизма у детей в Республике Башкортостан характеризуется преобладанием врожденной дисфункцией коры надпочечников, реже регистрируется вторичный гипокортицизм и первичная недостаточность коры надпочечников.
2. Показана высокая клинико-экономическая эффективность неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников, проявляющаяся выявлением заболевания в неонатальном периоде, предотвращением летальных случаев при сольтеряющей форме и преждевременного полового развития при вирильной форме, благодаря своевременной заместительной гормональной терапии.
3. Определены молекулярно-генетические особенности классических форм дефицита 21-гидроксилазы в Республике Башкортостан.
4. Разработаны алгоритмы дифференциальной диагностики гипокортицизма и молекулярно-генетической диагностики дефицита 21-гидроксилазы.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: конгрессе European Society of Pediatric Endocrinology (Istanbul, 2008), III Всероссийской научно-практической конференции «Достижения науки – в практику детского эндокринолога» (Москва, 2007), VI Всероссийской научно-практической конференции «Задачи детской эндокринологии в реализации национального проекта «Здоровье» (Уфа, 2008), VII Всероссийской научно-

практической конференции «Приоритетный национальный проект «Здоровье, задачи детской эндокринологии в его реализации» (Санкт-Петербург, 2009), VI съезде Общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), Республиканской конференции «Актуальные вопросы эндокринологии» (Уфа, 2009), заседании Проблемной комиссии БГМУ «Новые технологии в диагностике, лечении и профилактике заболеваний у детей и подростков» совместно с отделом геномики Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (Уфа, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 в журналах, включенных в перечень периодических и научно-практических изданий, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертационного исследования на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 186 страницах, содержит 20 таблиц и 21 рисунок. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 215 источников (90 отечественных, 125 иностранных авторов).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведено углубленное обследование 104 детей и подростков с различными вариантами гипокортицизма в возрасте от 0 до 17 лет включительно. Обследование больных проводилось на базе эндокринологического отделения ГУЗ «Республиканская детская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Башкортостан» (главный врач – канд. мед. наук Р.З.Ахметшин, заведующая эндокринологическим отделением – канд. мед. наук Д.С.Нурмухаметова).

Критериями включения являлись: возраст от 0 до 17 лет включительно, информированное согласие родителей или ребенка, наличие гипокортицизма, верифицированного по результатам гормональных исследований, в т.ч. при проведении функциональных проб. Критериями исключения были: отказ от участия в исследовании, ятрогенные варианты гипокортицизма (в т.ч. на фоне глюкокортикоидной терапии), острая недостаточность коры надпочечников, неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы, другие варианты врожденной дисфункции коры надпочечников (кроме дефицита 21-гидроксилазы).

При изучении структуры больных гипокортицизмом использовалась международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем 10-го пересмотра.

Таблица 1 – Возрастно-половая характеристика детей с гипокортицизмом

Возраст	Мальчики, n=48		Девочки, n=56		Всего, n=104	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
До года	9	18,8	8	14,3	17	16,3
1 – 2 года	2	4,2	1	1,8	3	2,9
3 – 6 лет	10	20,8	12	21,4	22	21,2
7 – 9 лет	11	22,9	11	19,6	22	21,2
10 – 14 лет	9	18,8	14	25,0	23	22,1
15 – 17 лет	7	14,5	10	17,9	17	16,3

Для решения поставленных цели и задач были использованы клинико-анамнестические, лабораторные (гормональные), инструментальные, молекулярно-генетические, статистические методы исследования.

Анамнез заболевания и жизни собирался путем опроса родителей. Обращалось внимание на наличие в родословной больных с гипокортицизмом, аутоиммунными заболеваниями, в т.ч. аутоиммунными эндокринопатиями (аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, сахарный диабет 1 типа), а также случаев рождения детей с гермафродитным строением наружных гениталий и смерти детей в неонатальном периоде. Объективное обследование проводилось по общепринятой методике. По показаниям дети осматривались невропатологом, отоларингологом, окулистом, кардиологом, урологом, гинекологом. Для подтверждения диагноза гипокортицизма и определения его варианта определялись концентрации кортизола, АКТГ, ренина и 17-оксипрогестерона (17-ОНП) в сыворотке крови в утренние часы (8.00-9.00). В сомнительных случаях проводился АКТГ-стимулирующий тест. Первичная недостаточность коры надпочечников диагностировалась при уровне базального кортизола < 80 нмоль/л, стимулированного < 500 нмоль/л (Орлова Е.М., Карева М.А., 2007). Уровень кортизола и АКТГ измерялся иммунохемилюминесцентным методом на автоматической иммунохемилюминесцентной системе «Immulite 2000TM» с использованием тест-систем компании «Siemens Medical Solutions Diagnostics». Уровень 17-ОНП и ренина определялся иммуноферментным методом на иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Россия) с использованием тест-систем компании «ELISAS» (Германия). Забор крови для исследования АКТГ и ренина осуществлялся в пробирки с трикалиевой солью ЭДТА.

Проведен анализ результатов неонатального скрининга на врожденную дисфункцию коры надпочечников. При проведении скрининга у всех новорожденных на 4 – 5-й день жизни (у недоношенных детей – на 7 – 14-й день жизни) осуществлялся забор капиллярной крови из пятки на специальную бумагу

кружками диаметром 1 см. Уровень 17-ОНР в пятне крови новорожденных определялся иммунофлюоресцентным методом с использованием реактивов «DELFA Neonatal 17-ОНР» на анализаторе «Victor» фирмы «Wallak». В лаборатории неонатального скрининга первоначально в качестве верхнего допустимого предела (точка cut-off) принимался уровень 17-ОНР 30 нмоль/л для доношенных и 60 нмоль/л для недоношенных. В связи с тем, что повышенные уровни 17-ОНР в 2008 году стали регистрироваться значительно реже, с 01.07.2008 года точка cut-off была снижена до 15 нмоль/л для доношенных и 30 нмоль/л для недоношенных, что согласуется с рекомендациями ряда авторов о необходимости разработки собственных нормативных стандартов каждой лаборатории (Н.Ю. Калинин, 2005). Определение 17-ОНР в цельной крови новорожденных проведено в лаборатории неонатального скрининга (заведующая лабораторией – Г.В.Печенина) медико-генетического кабинета (заведующая кабинетом – канд. мед. наук А.К.Марданова) Республиканского перинатального центра (главный врач – Ф.М. Байрамгулов). В случае повышенного уровня 17-ОНР в цельной крови новорожденные вызывались для исследования уровня 17-ОНР, калия и натрия в сыворотке крови. Для оценки эффективности неонатального скрининга определялись сроки выполнения каждого этапа скрининга, возраст при постановке диагноза сольтеряющей и вирильной форм ВДКН у мальчиков и девочек.

Для определения экономической эффективности неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников рассчитывались затраты на его реализацию и предотвращенные потери. Стоимость затрат оценивалась в соответствии с «Инструкцией по расчету стоимости медицинских услуг», утвержденной Министерством здравоохранения РФ (10.11.1999 г. №01-23/4-10) и Российской академией медицинских наук (10.11.1999 г. №01-02/41) на основе фактических расходов Республиканского перинатального центра. При определении затрат на проведение одного исследования расчет прямых и косвенных расходов производился за фиксированный период (с 01.01.2008 г. по 31.12.2008 г.) независимо от источника финансирования, при этом учитывались расходы как лаборатории неонатального скрининга, так и вспомогательных общеучрежденческих служб. При расчете затрат использованы цены 2008 года. Был принят коэффициент дисконтирования 18,3%, в т.ч. 5% - рекомендуемый показатель без учета инфляции, 13,3% - уровень инфляции в 2008 году.

Экономический эффект сохранения жизни ребенка рассчитывали по формуле: $\Delta = 0,5 \times Д/Р \times (t_n - t_r) - \Phi/Н \times (t_r + t_o)$,
 где Δ – экономический эффект сохранения жизни ребенка (руб.); 0,5 – доля стоимости прибавочного продукта в национальном доходе, Д – национальный

доход, P – численность работающего населения (человек), t_n – средний возраст выбытия из трудовой деятельности (лет), t_r – средний возраст вступления в трудовую деятельность (лет), t_o – средняя продолжительность жизни после окончания трудовой деятельности (лет), $(t_n - t_r)$ – трудовой период жизни (лет), $(t_r + t_o)$ – нетрудовой период жизни (лет), Φ – фонд социальной сферы, N – общая численность населения (человек) (А.И. Вялков, 2005). При расчетах использованы данные Федеральной службы государственной статистики.

Молекулярно-генетическое исследование гена 21-гидроксилазы проведено у 78 больных ВДКН, в том числе у 2 sibсов с одинаковой формой заболевания и у 123 членов их семей. 39 больных имели сольтерную форму ВДКН (51,3%), 37 – простую вирильную форму (48,7%). Выделение ДНК проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови (С.С. Mathew, 1985). Для скрининга 12 наиболее распространенных мутаций гена *CYP21A2*: *large gene deletion (delA2)*, *large gene conversion (LGC)*, *P30L*, *I2splice*, *G110del8nt*, *I172N*, *E6cluster*, *F306+1nt*, *V281L*, *Q318X*, *R356W*, *P453S* - мы применили различные виды полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология», Россия) и «Eppendorf» (Германия) с использованием праймеров, описанных ранее (Осиновская Н.С., 2006; О. Evgrafov, 1995; Н.Н. Lee, 2000, 2001; А. Bhangoo, 2007; N. Stikkelbroeck, 2003) и, если это было необходимо, с последующим рестрикционным анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распространенность, структура и дифференциальная диагностика гипокортицизма у детей

Нами проведен анализ нозологической структуры гипокортицизма среди детей в Республике Башкортостан. Наибольший удельный вес составила врожденная дисфункция коры надпочечников, обусловленная дефицитом 21-гидроксилазы (75,0%). На втором месте по частоте оказался вторичный гипокортицизм (15,4%), на третьем - первичная недостаточность коры надпочечников (9,6%).

Первичная недостаточность коры надпочечников была диагностирована у 10 детей. Среди них вариант заболевания определен в 90% случаев. Наибольший удельный вес составили аутоиммунные полигландулярные синдромы (70,0%), в т.ч. 1 (40,0%) и 2 типов (30,0%). Третье место по частоте занял триплет А (20,0%). До последнего времени это заболевание считалось редкой причиной первичной недостаточности коры надпочечников (ПНКН), поскольку генетический дефект был установлен относительно недавно. Это также способствовало плохой осведомленности врачей о данном заболевании. Выявленная на-

ми семья, имеющая 2 больных с триплетом А, является первой в России с данным заболеванием. В лаборатории Технического университета г.Дрездена проведено секвенирование гена ALADIN (проф. А.Хебнер), которое выявило его мутацию в компаунд-гетерозиготном состоянии, в т.ч. гетерозиготную мутацию сайта сплайсинга 892+2T>G ((IVS8+2T>G) в 8-м интроне и гетерозиготную нонсенс-мутацию 227C>T (Gln 49 Stop (Q49X) во 2-м экзоне с образованием стоп-кодона. У 10,0% пациентов причину первичной недостаточности коры надпочечников установить не удалось.

С учетом литературных данных и полученных сведений о структуре и клинических проявлениях первичного гипокортицизма нами разработан алгоритм дифференциальной диагностики различных его форм (рис. 1). На уровне первичной медико-санитарной помощи ведущая роль в ранней диагностике отводится врачам – педиатрам, врачам – педиатрам участковым, врачам общей практики (семейным врачам), врачам узкого профиля как в амбулаторно-поликлинических, так и в стационарных учреждениях. Данные специалисты могут предположить наличие первичного гипокортицизма на основании таких характерных клинических симптомов как артериальная гипотензия, в т.ч. ортостатическая гипотензия, диффузная гиперпигментация кожных покровов, пристрастие к соленой пище.

На этапе специализированной медицинской помощи дети с указанными отклонениями должны направляться к врачу – детскому эндокринологу детского эндокринологического кабинета, который проводит обследование, необходимое для верификации первичного гипокортицизма, в частности определение уровня базального кортизола, АКТГ, рениновой активности плазмы, по показаниям АКТГ-стимуляционный тест, которые доступны в амбулаторно-поликлинических учреждениях.

В случае подтверждения первичного гипокортицизма (базальный уровень кортизола <80 нмоль/л, стимулированный уровень кортизола <500 нмоль/л, повышенный уровень АКТГ) следующим этапом является исключение аутоиммунных полигландулярных синдромов. Это обусловлено тем, что они занимают наибольший удельный вес в структуре первичного гипокортицизма (70%), имеют характерные клинические синдромы (гипопаратиреоз, слизисто-кожный кандидоз, сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит), которые, как правило, появляются до развития гипокортицизма, лабораторные исследования, необходимые для диагностики этих синдромов (уровень глюкозы, ионизированного кальция, антител к тиреоидной пероксидазе), доступны для исследования в амбулаторно-поликлинических учреждениях.

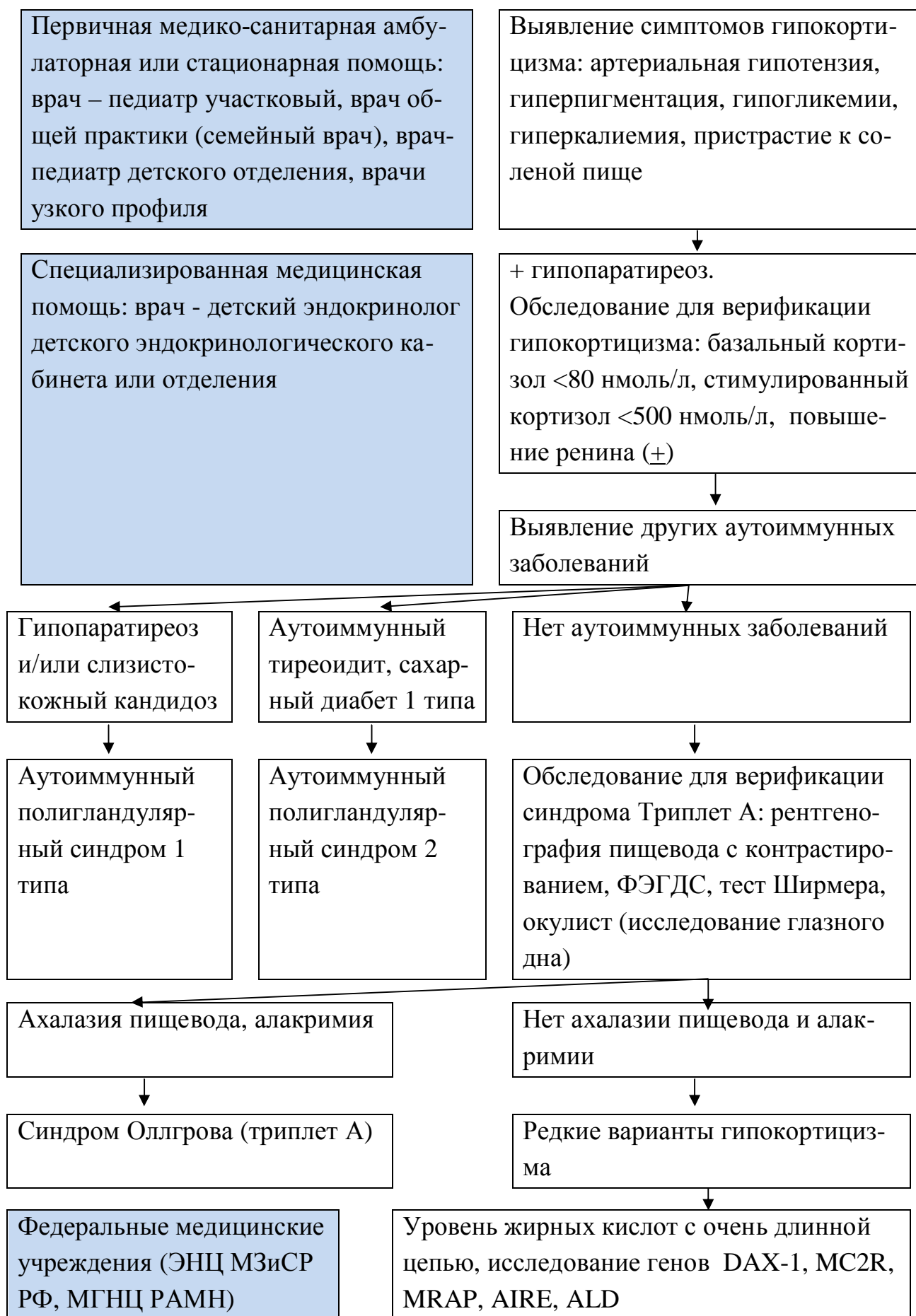


Рис. 1. Алгоритм дифференциальной диагностики первичной недостаточности коры надпочечников

При исключении аутоиммунных полигландулярных синдромов необходима дифференциальная диагностика достаточно редко встречающихся форм первичного гипокортицизма. Среди всего их многообразия на уровне специализированной медицинской помощи точно можно диагностировать лишь синдром Триплет А, поскольку он имеет такие характерные клинические симптомы, как алакрия, ахалазия пищевода, атрофия диска зрительного нерва. Для диагностики этих состояний необходимо провести рентгенографию пищевода с контрастированием и/или фиброэзофагогастродуоденоскопию, тест Ширмера для оценки продукции слезной жидкости, исследование глазного дна для выявления атрофии диска зрительного нерва. Все эти исследования доступны как в амбулаторно-поликлинических, так и в стационарных медицинских организациях.

Диагностика других вариантов первичного гипокортицизма невозможна даже в условиях республиканских (областных) медицинских организаций, поскольку требует сложных биохимических и молекулярно-генетических исследований. Такие больные нуждаются в направлении в федеральные учреждения.

Анализ причин вторичного гипокортицизма показал, что в большинстве случаев (62,5%) он был одним из проявлений идиопатического пангипопитуитаризма. Как правило поводом для обследования является выраженная задержка роста у этих пациентов, в связи с чем им проводится исследование соматотропной функции гипофиза, а после подтверждения соматотропной недостаточности – исследование других гипофизарных и связанных с ними гормонов, включая АКТГ и кортизол. Как правило, у этих пациентов вторичный гипокортицизм развивается только в подростковом возрасте или даже во взрослом периоде жизни. У двух детей пангипопитуитаризм был выявлен в неонатальном периоде при обследовании по поводу гипогликемических состояний.

У 25,0% детей с вторичным гипокортицизмом причиной заболевания явилась краниофарингеома. Также наблюдалось по одному случаю дисгерминомы и септо-оптической дисплазии (синдром де Морьсе).

Нами также разработан алгоритм дифференциальной диагностики вторичного гипокортицизма, который имеет несколько принципиальных от такового при первичном гипокортицизме (рис. 2).

Поскольку вторичный гипокортицизм в отличие от первичного не имеет каких-либо характерных клинических симптомов, на уровне первичной медико-санитарной помощи основная роль в выявлении этих пациентов отводится не врачам – педиатрам, а врачам узкого профиля (неврологи, нейрохирурги, онкологи), курирующие пациентов с заболеваниями, при которых развитие вторичного гипокортицизма потенциально возможно. Это дети с опухолями гипоталамо-гипофизарной области, а также перенесшие хирургические, лучевые и

другие воздействия в данной зоне. Другое отличие заключается в том, что обследование, направленное на диагностику гипокортицизма, должно проводиться у этих больных регулярно, поскольку вторичный гипокортицизм может развиваться в достаточно отдаленные сроки (годы и десятилетия) после развития основного заболевания. В данном обследовании помимо неврологических и нейрохирургических больных нуждаются также дети, состоящие на учете врача – детского эндокринолога с другими гипофизарными расстройствами (гипопитуитаризм, несахарный диабет, гипогонадотропный гипогонадизм).

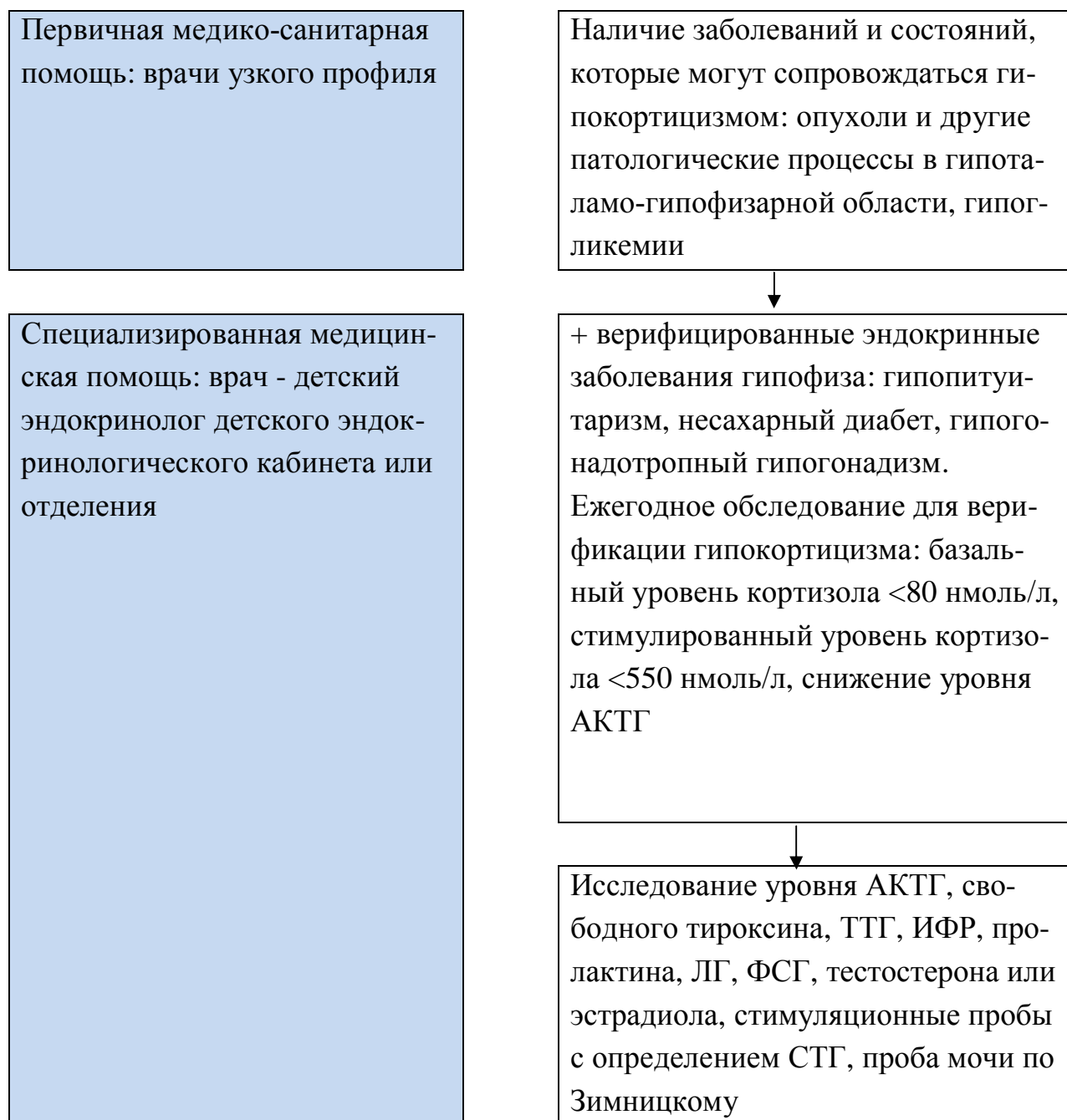


Рис. 2. Алгоритм дифференциальной диагностики вторичного гипокортицизма

Эффективность неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников

В течение всего периода скрининга было обследовано 134 618 новорожденных. Повышенный уровень 17-ОНР в цельной крови был выявлен у 806 (0,6%) новорожденных, включенных в программу скрининга. При исследовании уровня 17-ОНР в сыворотке крови этих детей его повышенные концентрации выявлены в 113 (8,4%) случаях. У 98 новорожденных при динамическом наблюдении уровень 17-ОНР снижался, что позволило исключить у них врожденную дисфункцию коры надпочечников. У 15 новорожденных 17-ОНР оставался повышенным, в связи с чем у этих детей был проведен анализ гена CYP21, что позволило верифицировать данный диагноз.

Таким образом, распространенность врожденной дисфункции коры надпочечников в Республике Башкортостан составила 1 случай на 8974 новорожденных. Данный показатель не отличается от аналогичного в большинстве других субъектов РФ, в которых ВДКН встречается с частотой от 1 : 7617 в Краснодарском крае до 1: 10014 в г.Москве (Денисенкова Е.В., 2008; Матулевич С.А., 2009; Суплотова Л.А., 2006).

Анализ сроков реализации отдельных этапов скрининга показал (медианы), что сбор образцов крови у новорожденных осуществляется на 5-й день жизни, их доставка в лабораторию – на 8-й день. Определение уровня 17-ОНР в цельной крови проводится на 11-й день, ретест – на 13-й день жизни, а исследование данного маркера в сыворотке крови – на 21-й день жизни. Отставание фактических сроков реализации отдельных этапов скрининга от целевых показателей объясняется тем, что согласно методике проведения скрининга у недоношенных, а также у новорожденных, получающих инфузионную терапию, глюкокортикоидные препараты, взятие крови проводится после прекращения интенсивной терапии.

Возраст при постановке диагноза сольтерьющей формы ВДКН у девочек после введения скрининга существенно не изменился (табл. 2). Это обусловлено тем, что и до внедрения скрининга диагностика заболевания у девочек была в большинстве случаев своевременной из-за гермафродитного строения наружных гениталий, особенно в тех случаях, когда развивался сольтерьющий криз. Вирильная форма ВДКН у девочек во всех случаях стала диагностироваться в неонатальном периоде, тогда как в прежние годы отмечались случаи диагностики заболевания в школьном возрасте, особенно если вирилизация наружных гениталий не превышала II степени по Прадеру.

Существенно изменились сроки постановки диагноза у мальчиков (табл. 2). Все случаи сольтерьющей формы у них выявлялись в неонатальном периоде

еще до развития тяжелого сольтеряющего криза, благодаря чему не требовалась госпитализация в реанимационные отделения и палаты интенсивной терапии. Выявление у новорожденных мальчиков гиперкалиемии и гипонатриемии наряду с повышенным уровнем 17-ОНР позволяло достаточно быстро верифицировать данную форму заболевания и своевременно назначать заместительную гормональную терапию.

До введения неонатального скрининга все случаи вирильной формы выявлялись в возрасте старше 4 лет, при этом поводом для обращения к врачу было преждевременное половое развитие по изосексуальному типу (табл. 2). После внедрения скрининга медиана возраста, в котором окончательно устанавливался диагноз, снизилась с 5,3 года до 43 дней. Необходимо отметить, что, сроки реализации всех этапов скрининга (забор и транспортировка образцов, определение уровня 17-ОНР в цельной крови и сыворотке крови) не зависели от формы заболевания, вирильная форма все же диагностировалась позже, чем сольтеряющая (соответственно 43 дня и 20 дней, $p < 0,013$). Это обусловлено тем, что из-за большого количества ложноположительных повышенных значений 17-ОНР у мальчиков требуется повторное исследование данного маркера в динамике каждые 2 недели, и лишь при стойком его повышении заболевание может быть диагностировано.

Таблица 2 - Средний возраст при постановке диагноза, дни жизни (медиана, мин. – макс.)

Форма ВДКН	До скрининга	При проведении скрининга	p
М : Д	1 : 1,1	1 : 0,9	
Сольтеряющая форма – девочки	11 дней (5 – 23 дня)	8 дней (4 – 19 дней)	0,082
Сольтеряющая форма – мальчики	34 дня (14 дней – 3 мес.)	20 дней (14 – 28 дней)	0,021
Вирильная форма – девочки	6 мес. (0 – 16 лет)	15 дней (5 – 21 день)	<0,001
Вирильная форма - мальчики	5,3 года (4,2 – 14,2)	43 дня (29 – 54 дня)	<0,001

Стоимость расходов на проведение неонатального скрининга в ценах 2008 года составила 5192676,91 руб., а затраты на проведение одного определения уровня 17-ОНР - 131,93 руб. С учетом количества выявленных больных суммарные затраты на выявление одного случая заболевания составили 1168805,56 руб. Ранняя диагностика заболевания в неонатальном периоде позволила избежать таких осложнений, как сольтеряющий криз, и связанные с ними летальные исходы и длительная госпитализация, а также предотвратить развитие преждевременного полового развития при вирильной форме (табл. 3).

Таблица 3 - Предотвращенные экономические потери при проведении неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников

Причины экономических потерь	Потери на 1 больного, тыс. руб.	Кол-во больных	Потери, тыс. руб.
Длительное пребывания в стационаре вследствие развития сольтеряющего криза	44,415	2	88,83
Летальность в неонатальном периоде у мальчиков с сольтеряющей формой	12 214,24	1	12 214,24
Преждевременное половое развитие у мальчиков с вирильной формой	390,0	3	1 170,0
Итого...			13 473,07

С учетом затрат на реализацию неонатального скрининга и предотвращенных потерь экономическая эффективность скрининга составила 2,59 руб. на каждый рубль, вложенный в реализацию программы.

Молекулярно-генетическая характеристика дефицита 21-гидроксилазы

У 76 больных ВДКН выявлено 8 различных мутаций гена *CYP21A2* (табл. 4). С наибольшей частотой (26,3%) обнаружена делеция/конверсия (*delA2orLGC*), в том числе в гомозиготном состоянии у 9 больных с сольтеряющей формой заболевания. Второй по частоте была мутация *R356W* (18,4%). Мутации *I2splice*, *I172N* и *Q318X* гена *CYP21A2* выявлены с частотами 12,5%, 6,5% и 5,9% соответственно. Мутация *V281L* гена *CYP21A2* обнаружена у двух больных с вирильной формой (ВФ) в компаунд-гетерозиготе с другими мутациями (1,3%). Мутация *P30L* идентифицирована у одного больного с ВФ в гомозиготном состоянии (1,3%), а мутация *P453S* – у одного больного с ВФ в

компаунд-гетерозиготе с мутацией *I172N* (0,7%). На 30,9% хромосом у больных с ВДКН мутации не идентифицированы.

Анализ распределения частот мутаций в гене *CYP21A2* в двух группах пациентов с классическими формами заболевания показал статистически значимые отличия. Так, у больных с СТФ по сравнению с вирильной формой делеция/конверсия *delA2orLGC* гена *CYP21A2* встречалась в 2,2 раза чаще (35,9% и 16,2% соответственно, $\chi^2=6,61$, $p=0,005$), мутация *R356W* – в 2,4 раза чаще (25,6% и 10,8% соответственно, $\chi^2=4,62$, $p=0,020$), мутация *I2splice* – в 2,6 раза чаще (18,0% и 6,8% соответственно, $\chi^2=3,39$, $p=0,03$;) и *Q318X* (10,3% и 1,4% соответственно, $\chi^2=3,93$, $p=0,020$). Напротив, мутация *I172N* более характерна для больных с ВФ, чем для больных с СТФ заболевания (12,2% и 1,3% соответственно, $\chi^2=5,65$, $p=0,008$). Мутации *P30L* и *V281L* выявлены только у больных с ВФ.

Таблица 4 - Частота мутаций гена *CYP21A2* у больных с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы

Мутации	Всего, n=152		СТФ, n=78		ВФ, n=74	
	n	%	n	%	n	%
<i>delA2orLGC</i>	40	26,3	28	35,9	12	16,3
<i>R356W</i>	28	18,4	20	25,6	8	10,8
<i>I2splice</i>	19	12,5	14	18,0	5	6,8
<i>Q318X</i>	9	5,9	8	10,3	1	1,4
<i>I172N</i>	10	6,6	1	1,3	9	12,2
<i>V281L</i>	2	1,3	-	-	2	2,7
<i>P30L</i>	2	1,3	-	-	2	2,7
<i>P453S</i>	1	0,7	-	-	1	1,4
X	47	30,9	12	15,4	35	47,3

Для больных с сольтерьющей формой заболевания (СТФ) в основном характерны гомозиготные генотипы по делеции/конверсии *delA2orLGC* (23,1%), мутациям *I2splice* и *R356W* (10,3%), тогда как для больных с ВФ – гетерозиготные генотипы по делеции/конверсии *delA2orLGC* и мутации *I172N* (13,5%) или неидентифицированной мутации (8,1%) (табл. 5).

У 6 больных ВДКН обнаружено присутствие двух мутаций на одной хромосоме: *R356W+Q318X* (3,3%, 5/152), *I172N+Q318X* (0,7%, 1/152). Такое сцепление мутаций, или кластер, унаследовано больным либо от матери, либо от отца. Кластеризация мутаций на одной хромосоме внутри нуклеотидной после-

довательности гена характерна для гена *CYP21A2*. Одним из ярких примеров сцепления мутаций в этом гене является кластер из 3-х миссенс-мутаций - *I236N*, *V237E*, *M239K* - в 6-м экзоне, известный как *E6cluster*. Согласно литературным данным у больных ВДКН из разных стран мира идентифицированы различные кластеры мутаций, специфичные для каждого региона. Возможно, такие кластеры возникают вследствие больших конверсий или многократных мутационных событий.

Таблица 5 - Частота генотипов с мутациями гена *CYP21A2* у больных с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы

Генотипы	Всего, n=76		СТФ, n=39		ВФ, n=37	
	n	%	n	%	n	%
<i>delA2orLGC/delA2orLGC</i>	9	11,84	9	23,1	-	-
<i>delA2 or LGC/I172N</i>	5	6,6	-	-	5	13,5
<i>delA2orLGC/I2splice</i>	3	3,9	1	2,6	2	5,4
<i>delA2orLGC/ R356W</i>	4	5,3	3	7,7	1	2,7
<i>delA2orLGC/ Q318X</i>	4	2,6	2	5,1	-	-
<i>delA2orLGC/R356W+ Q318X</i>	1	1,3	1	2,6	-	-
<i>delA2orLGC/V281L</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>delA2orLGC/X</i>	6	7,9	3	7,7	3	8,1
<i>I2splice/I2splice</i>	4	5,3	4	10,3	-	-
<i>I2splice/R356W</i>	2	2,6	1	2,6	1	2,7
<i>I2splice/Q318X</i>	1	1,3	1	2,6	-	-
<i>I2splice/I172N</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>I2splice/X</i>	4	5,3	3	7,7	1	2,7
<i>R356W/R356W</i>	5	6,6	4	10,3	1	2,7
<i>R356W+Q318X/R356W</i>	4	5,3	3	7,7	1	2,7
<i>R356W /I172N</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>R356W/X</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>I172N+Q318X/R356W</i>	1	1,3	1	2,6	-	-
<i>I172N/P453S</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>I172N/X</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>V281L/X</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>P30L/P30L</i>	1	1,3	-	-	1	2,7
<i>X/X</i>	17	22,4	3	7,7	14	37,8

В нашем регионе наиболее распространенным оказался кластер из 2 миссенс-мутаций в 8-м экзоне *R356W+Q318X*, который был уже выявлен и в других популяциях мира как отдельно, так и в сцеплении в кластеры с другими мутациями (Bachega T. et al., 2000; Koppens P. et al., 2000; Krone N. et al., 2000; Stikkelbroeck N. et al., 2003). Второй идентифицированный кластер *I172N+Q318X* оказался специфичным для больных из РБ.

На основании данных проведенного исследования мутаций в гене *CYP21A2* нами разработан алгоритм молекулярной диагностики ВДКН в семьях высокого риска (рис. 3). Данный алгоритм позволяет определять стратегию поиска мутаций, приводящих к недостаточности 21-гидроксилазы у больных, в том числе и у вновь выявленных во время массового неонатального скрининга, выявлять гетерозитное носительство мутаций гена *CYP21A2* и проводить пренатальную диагностику для предотвращения рождения больных детей в семьях, имеющих больных с ВДКН.

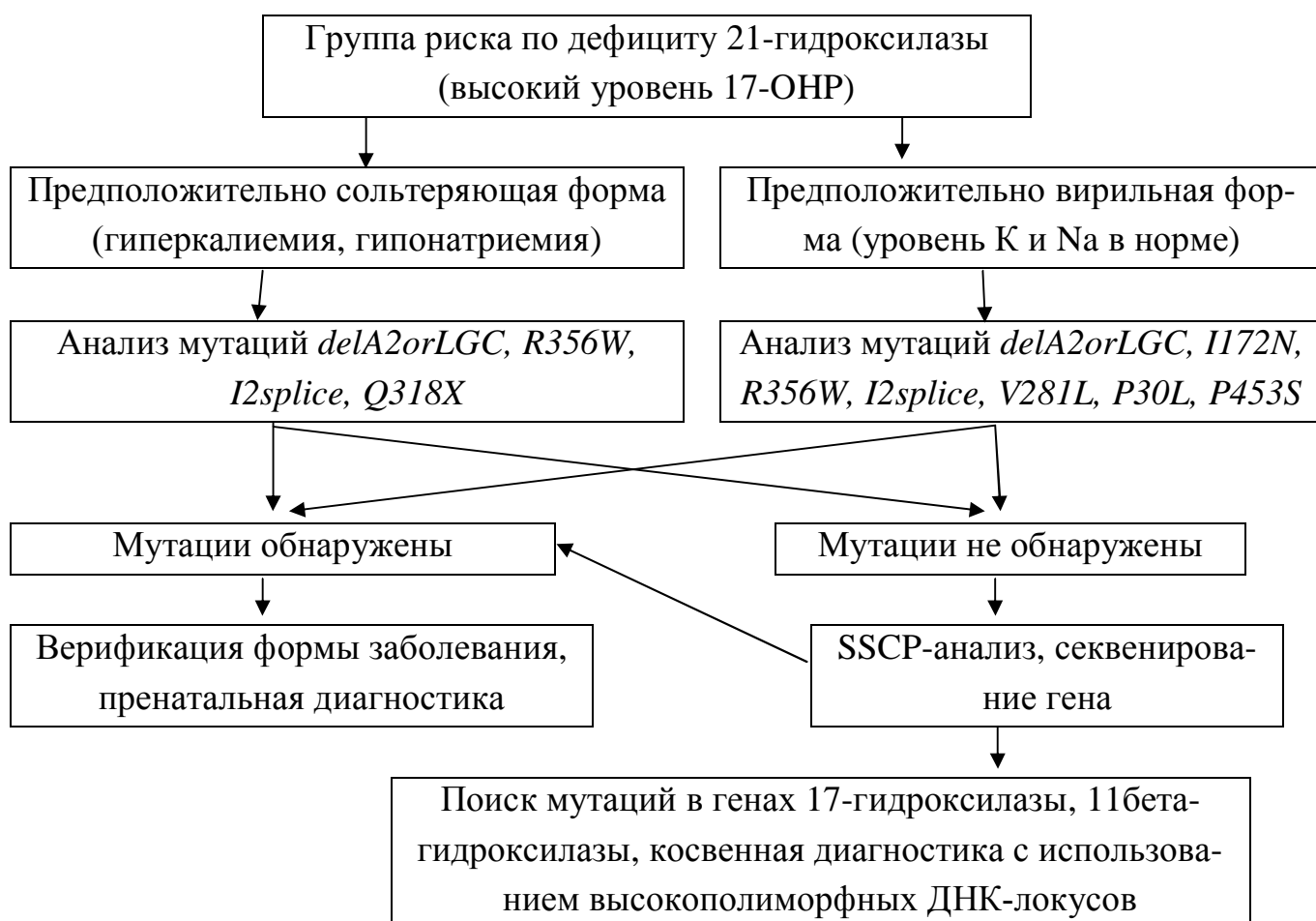


Рис. 3. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики ВДКН в Республике Башкортостан

Наличие гиперкалиемии и гипонатриемии с высокой долей вероятности указывает на сольтеряющую форму ВДКН, при которой наиболее частыми оказались мутации *delA2orLGC* (35,9%), *R356W* (25,6%), *I2splice* (17,9%), *Q318X* (10,3%) гена *CYP21A2*, которые мы и предлагаем выявлять в той последовательности, в которой они перечислены. При нормальном уровне электролитов более вероятна вирильная форма, которая может быть обусловлена такими мутациями как *delA2orLGC* (16,2%), *I172N* (12,2%), *R356W* (10,8%), *I2splice* (6,8%). При их отсутствии проводится детекция более редких мутаций: *V281L* (2,7%), *P30L* (2,7%), *P345S* (1,4%). В случае частичной или абсолютной неинформативности нужно проводить SSCP-анализ и секвенирование всего активного гена *CYP21A2*.

В трех семьях с ВДКН из РБ была проведена пренатальная диагностика заболевания прямым методом. В данных семьях были известны обе мутации. Было показано, что один плод является компаунд-гетерозиготой по делеции/конверсии *delA2orLGC* гена *CYP21A2* и нормы, у второго плода обнаружены в компаунд-гетерозиготном состоянии делеция/конверсия *delA2orLGC* и мутация *R356W*, а у третьего плода мутации *delA2orLGC* и мутация *Q318X*, определенные в компаунд-гетерозиготном состоянии у пробанда, не выявлены.

Таким образом, в случае выявления обеих мутаций в гене *CYP21A2* с помощью системы наиболее распространенных и легко детектируемых мутаций семья является информативной для прямой ДНК-диагностики и для этой семьи возможны проведение пренатальной диагностики и выявление гетерозиготных носителей с использованием разработанного нами алгоритма молекулярной диагностики ВДКН.

Проведенное нами молекулярно-генетическое обследование 76 семей с ВДКН, проживающих в Республике Башкортостан, показало, что 61% семей, имеющих больных ВДКН, оказались полностью информативными и 17% частично информативными для ДНК-диагностики методами ПЦР, рестрикционного анализа и аллельспецифичной амплификации. 22% семей с ВДКН из РБ были абсолютно неинформативными. В связи с этим в таких семьях необходимо проводить в дальнейшем более глубокое молекулярно-генетическое исследование с помощью секвенирования всего активного гена *CYP21A2* и косвенную ДНК-диагностику заболевания с использованием высокополиморфных ДНК-локусов и составленных по ним гаплотипов.

Таким образом, изучение распространенности, структуры и клинико-генетической характеристики гипокортицизма представляет несомненную научную и практическую значимость в плане использования полученных данных

для дифференциальной диагностики различных его форм, медико-генетического консультирования и пренатальной диагностики.

ВЫВОДЫ:

1. Распространенность гипокортицизма в Республике Башкортостан составила 12,03 на 100000 детского населения. Нозологическая структура гипокортицизма представлена врожденной дисфункцией коры надпочечников (75,0%), первичной недостаточностью коры надпочечников (9,6%) и вторичным гипокортицизмом (15,4%). У мальчиков по сравнению с девочками наблюдается более высокий удельный вес вторичного гипокортицизма (соответственно 27,1% и 5,4%). Среди нозологических форм первичной недостаточности коры надпочечников преобладают аутоиммунные полигландулярные синдромы 1-го и 2-го типов (соответственно 40,0% и 30,0%) и Триплет А (20,0%). Вторичный гипокортицизм в большинстве случаев (68,8%) является одним из проявлений идиопатического пангипопитуитаризма, а в 31,2% случаев обусловлен опухолями гипоталамо-гипофизарной области.
2. Разработанные алгоритмы дифференциальной диагностики первичной недостаточности коры надпочечников и вторичного гипокортицизма на этапах первичной медико-санитарной и специализированной медицинской помощи позволяют определять клинический вариант заболевания у большинства пациентов.
3. Распространенность врожденной дисфункции коры надпочечников вследствие дефицита 21-гидроксилазы составляет 1 случай на 8974 новорожденных. Реализация программы неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников позволила диагностировать заболевание в неонатальном периоде, выявлять сольтеряющую форму до развития сольтеряющего криза. Экономическая эффективность неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников в Республике Башкортостан составила 2,59 руб. на каждый рубль, вложенный в реализацию данной программы, благодаря предотвращению экономических потерь, связанных с летальными случаями и длительной госпитализацией новорожденных с сольтеряющей формой, и предупреждению преждевременного полового развития у мальчиков с вирильной формой.
4. В Республике Башкортостан в гене 21-гидроксилазы у больных врожденной гиперплазией коры надпочечников идентифицировано 8 различных мутаций на 69,1% хромосом. С наибольшей частотой обнаружены мутации *delA2orLGC* (26,3%), *R356W* (18,4%) и *I2splice* (12,5%). Среди больных с сольтеряющей формой чаще встречались мутации *delA2orLGC* (35,9%),

R356W (25,6%), *I2splice* (18,0%) и *Q318X* (10,3%), а при простой вирильной форме *delA2orLGC* (16,2%), *R356W* (10,8%), *I2splice* (6,8%), *I172N* (12,2%).

5. Разработанный алгоритм молекулярно-генетической диагностики врожденной дисфункции коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы, позволяет оптимизировать поиск диагностически значимых мутаций.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании детей с первичной недостаточностью коры надпочечников и вторичным гипокортицизмом рекомендуется использование оригинальных алгоритмов дифференциальной диагностики.
2. Определение клинической формы дефицита 21-гидроксилазы должно основываться не только на клинических данных, но и на результатах молекулярно-генетического исследования гена *CYP21A2*.
3. В качестве заключительного этапа неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников рекомендуется проведение молекулярно-генетической диагностики в соответствии с разработанным алгоритмом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Мурзабаева, С.Ш. Экономические аспекты неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников /С.Ш.Мурзабаева, О.А.Малиевский, З.Ф.Рамова //Вопросы практической педиатрии.- 2009.- Т.4, №6.- С.52-55.
2. Ахметова, В.Л. Спектр мутаций в гене 21-гидроксилазы у больных с врожденной гиперплазией коры надпочечников в Башкортостане / В.Л.Ахметова, З.Ф.Рамова, О.А. Малиевский, Э.К.Хуснутдинова //Генетика.- 2008.- Т.40, №10.- С.1420-1428.
3. Малиевский, О.А. Особенности патологии надпочечников в детском возрасте / О.А. Малиевский, З.Ф. Рамова, Д.С. Нурмухаметова [и др.] // Здравоохранение Башкортостана.- 2005.- №5.- С.36-37.
4. Рамова, З.Ф. Анализ мутаций гена 21-гидроксилазы у больных с адрено-генитальный синдромом в Республике Башкортостан / З.Ф. Рамова, О.А. Малиевский, В.Л. Ахметова, Э.К. Хуснутдинова // Задачи детской эндокринологии в реализации национального проекта «Здоровье»: матер. всеросс. конф.- Уфа, 2008.- С.91-93.

5. Малиевский, О.А. Патоморфологические изменения головного мозга при синдроме Олгрова (Триплет А) / О.А. Малиевский, В.Н. Афанасьев, З.Ф. Рамова, Д.С. Нурмухаметова // Задачи детской эндокринологии в реализации национального проекта «Здоровье»: матер. всеросс. конф.- Уфа, 2008.- С.74-76.
6. Малиевский, О.А. Патоморфологическая характеристика надпочечников при синдроме Олгрова (Триплет А) / О.А. Малиевский, В.Н. Афанасьев, З.Ф. Рамова, Д.С. Нурмухаметова // Задачи детской эндокринологии в реализации национального проекта «Здоровье»: матер. всеросс. конф.- Уфа, 2008.- С.76-77.
7. Результаты неонатального скрининга на адрено-генитальный синдром в Республике Башкортостан /А.К. Марданова, Г.В. Печенина, З.Ф. Рамова [и др.] // Задачи детской эндокринологии в реализации национального проекта «Здоровье»: матер. всеросс. конф.- Уфа, 2008.- С.78-80.
8. Малиевский, О.А. Врожденная дисфункция коры надпочечников: клиника, неонатальный скрининг, диагностика и лечение / О.А. Малиевский, З.Ф. Рамова, Д.С. Нурмухаметова, Р.В. Башарова, Г.В.Печенина // Актуальные вопросы эндокринологии: матер. науч.-практ. конф.- Уфа, 4 июня 2009.- С.75-87.
9. Рамова, З.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика адреногенитального синдрома в Республике Башкортостан / З.Ф. Рамова, О.А. Малиевский, В.Л. Ахметова, Э.К. Хуснутдинова [и др.] // Актуальные вопросы эндокринологии: матер. науч.-практ. конф.- Уфа, 4 июня 2009.- С.92-96.

РАМОВА ЗУМРАД ФЕРДИНАНДОВНА

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПОКОРТИЦИЗМА У ДЕТЕЙ
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.
Подписано к печати 08.10.2010
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 1,5. Уч.-изд. л. 1,5.
Тираж 100 экз. Заказ № 91.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Росздрава»