

© Е.Л. Соболева,
Н.С. Осинская, В.С. Баранов,
Т.Э. Иващенко, В.В. Потин

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

НЕКЛАССИЧЕСКАЯ ФОРМА ВРОЖДЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ (ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА)

■ Проведено гормональное (включая пробу с АКТГ), эхографическое и молекулярно-генетическое обследование 55 больных с симптомами андрогенизации. Показана высокая диагностическая ценность пробы с АКТГ в диагностике неклассической формы врожденной гиперплазии коры надпочечников (ВГКН). При исследовании спектра мутаций в гене 21-гидроксилазы выявлено наличие химерных генов более чем у половины больных с «идиопатической» андрогенизацией, что указывает на наличие у них латентной формы ВГКН.

■ **Ключевые слова:** андрогенизация; неклассическая форма врожденной гиперплазии коры надпочечников (ВГКН); проба с АКТГ; ген 21-гидроксилазы; спектр мутаций

Одна из причин гормонального бесплодия у женщин заключается в наличии у них неклассической формы врожденной гиперплазии коры надпочечников (**НФ ВГКН**), которая в 90–95 % случаев является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы (**21-Г**) (цитохром P-450c21), катализирующего превращение прогестерона в дезоксикортикостерон и 17-гидроксипрогестерона в 11-дезоксикортизол. Различают 2 формы ВГКН: классическую (сольтеряющую и простую вирильную) и неклассическую (легкую и латентную). Частота НФ ВГКН широко варьирует в различных этнических группах и составляет среди европейцев 1:1000, а у евреев-ашкенази 1:27 человек. Общепопуляционная частота колеблется от 0,3 % до 1 % [12]. НФ является легкой формой ВГКН и преимущественно проявляется в пубертатном или постпубертатном возрасте. НФ ВГКН характеризуется появлением симптомов андрогенизации в пубертатный период, нарушениями менструального цикла, бесплодием или невынашиванием беременности. Иногда заболевание дебютирует преждевременным пубархе. Клиническая картина заболевания очень похожа на синдром поликистозных яичников (**СПЯ**), поэтому точная диагностика НФ ВГКН вызывает определенные трудности. Для постановки диагноза определяют уровень андрогенов в крови, проводится проба с АКТГ [2], оценивается эхографическая картина яичников.

Дефицит фермента 21-гидроксилазы, приводящий к ВГКН, возникает в результате различных мутационных повреждений в гене CYP21A2, кодирующего данный фермент. Ген 21-гидроксилазы (CYP21A2) картирован на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3) [11]. В данном локусе идентифицированы два tandemно расположенных гена — функционально активный ген CYP21A2 и псевдоген — CYP21A1P, неактивный вследствие делеции в 3-м экзоне, инсерции со сдвигом рамки считывания в 7-м экзоне и нонсенс-мутаций — в 8-м экзоне [6, 7]. Оба гена состоят из 10 экзонов, имеют длину 3–4 тысячи пар оснований и отличаются только по 87 нуклеотидам.

Наличие рядом с кодирующим геном гомологичной ДНК-последовательности псевдогена зачастую ведет к нарушениям спаривания хромосом в мейозе и, как следствие этого, к конверсии (перемещению фрагмента активного гена на псевдоген), или к делеции части смыслового гена и образованию химерных конструкций ген-псевдоген [8]. В обоих случаях функция активного гена нарушается. На долю крупных делеций приходится около 20 % мутаций, на долю точечных мутаций, которые чаще всего являются результатом генных конверсий, — 75 % [1, 6, 7].

В связи с проблемами диагностики НФ ВГКН перспективным представляется идентификация мутаций в гене 21-Г у больных с подозрением на НФ ВГКН.

Материалы и методы исследования

В исследуемую группу вошли 55 женщин репродуктивного возраста с различными симптомами андрогенизации (гирсутизм, се-

борея, угревая сыпь). Всем больным на 5–8 день менструального цикла определяли содержание в крови ФСГ, ЛГ, свободного тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата (ДЭА-С), проводили пробу с АКТГ, ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза. На 21–23 день менструального цикла определяли уровень пролактина и прогестерона в крови. Пробу с АКТГ (синактен-депо, Novartis Pharma, Швейцария) проводили всем больным на 5–8 день менструального цикла. В 9 часов утра проводили взятие крови из вены для определения уровня 17-гидроксипрогестерона (17-ОНР), после чего внутримышечно вводили 2 мг синактен-депо. Повторное взятие крови проводили через 9 часов. Контрольную группу составили 10 здоровых женщин с регулярным овуляторным менструальным циклом без симптомов андрогенизации, которым была проведена проба с АКТГ. Уровень гормонов в крови определяли иммуноферментным методом с использованием реагентов фирмы «Алкор-Био». Оценка степени гирсутизма проводили по шкале Ферримана-Галлвея. Гирсутное число более 12 баллов указывало на наличие у больной гирсутизма. УЗИ проводили на аппарате Medison SA-8000 EX с использованием вагинального датчика с переменной частотой 4–9 МГц и абдоминального датчика с частотой 3–7 МГц.

Для идентификации мутаций в гене 21-Г использовали метод полимеразной цепной реакции с последующим применением анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

(ПДРФ). Делеция гена CYP21A2 (delB), а также наличие «химерных» генных конструкций 1-го (5'конец соответствует псевдогену, 3'конец — гену) и 2-го (5'конец соответствует гену, а 3'конец — псевдогену) типа исследованы с использованием генспецифичных и псевдогенспецифичных праймеров [3]. Остальные мутации (P30L, I2splice, del8, I172N, V281L, Q318X) идентифицированы методом двухступенчатой ПЦР с последующим ПДРФ-анализом [5, 10]. Продукты амплификации и ферментативного гидролиза анализировали в 7,5 % полиакриламидном геле с окраской этидиумбромидом и визуализацией в ультрафиолетовом свете. Популяционная выборка включала 40 человек.

При анализе результатов исследования использовали параметрические (коэффициент Стьюдента) и непараметрические (критерий согласия χ^2) методы. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

На основании гормонального и эхографического обследования все больные были разделены на 3 группы. Клиническая характеристика больных представлена в таблице 1. В первую группу вошла 21 больная с «идиопатической» андрогенизацией (гирсутизм, угревая сыпь, себорея). Во вторую группу вошли 8 больных СПЯ. Третью группу составили 26 больных НФ ВГКН. Как видно из приведенных данных, возраст обследо-

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных больных

Параметр	1 группа n = 21	2 группа n = 8	3 группа n = 26	P
Возраст больных	22,9 ± 1,1	24,9 ± 0,9	23,9 ± 1,0	–
Масса тела (кг)	58,8 ± 2,8	72,4 ± 5,2	63,4 ± 2,4	$P_{1-2} < 0,01$
Рост (см)	167,1 ± 1,3	168,6 ± 2,2	166,2 ± 1,2	–
Возраст менархе	13,3 ± 0,4	12,8 ± 0,9	13,2 ± 0,3	–
Регулярный цикл	10 47,6 ± 10,9 %	0	13 50,0 ± 9,8 %	–
Нарушения цикла	11 52,4 ± 10,9 %	8 100 %	13 50,0 ± 9,8 %	–
Аменорея I	0	0	1 3,8 ± 3,8 %	–
Аменорея II	0	3 37,5 ± 17,1 %	4 15,4 ± 7,1 %	–
Угревая сыпь	13 61,9 ± 10,6 %	8 100 %	14 53,8 ± 9,8 %	–
Возраст появления угревой сыпи	14,2 ± 0,9	13,0 ± 0,7	14,6 ± 0,8	–
Гирсутизм	12 57,1 ± 10,8 %	6 75,0 ± 13,3 %	16 61,5 ± 9,5 %	–
Возраст появления гирсутизма	16,2 ± 0,7	14,7 ± 1,1	13,5 ± 0,4	$P_{1-3} < 0,01$
Гирсутное число	16,1 ± 0,6	25,7 ± 1,2	18,5 ± 1,0	$P_{1-2} < 0,01$ $P_{2-3} < 0,01$

Таблица 2

Гормональная характеристика обследуемых групп больных

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	P
ФСГ (МЕ/л)	5,4 ± 0,6	5,6 ± 0,6	4,1 ± 0,3	P ₂₋₃ < 0,05
ЛГ (МЕ/л)	5,8 ± 0,7	11,0 ± 2,0	5,6 ± 0,9	P ₁₋₂ < 0,05 P ₂₋₃ < 0,01
Пролактин (мМЕ/л)	310,1 ± 28,3	379,0 ± 46,4	324,0 ± 44,5	—
Свободный тестостерон (пмоль/л)	26,5 ± 9,6	22,4 ± 7,3	40,9 ± 11,6	—
ДЭА-С (мкмоль/л)	6,8 ± 0,7	6,0 ± 0,5	11,5 ± 0,9	P ₁₋₂ < 0,01

Таблица 3

Результаты пробы с АКТГ у обследованных больных

Группы	1 группа	2 группа	3 группа	Контроль
17-ОНР (нмоль/л)				
До пробы	3,1 ± 0,3	3,9 ± 0,5	13,0 ± 3,6*	3,4 ± 0,4
Через 9 часов	12,7 ± 1,2	15,3 ± 3,1	52,7 ± 8,6*	16,2 ± 1,5

Примечание: * — достоверное отличие от показателей 1-й, 2-й и контрольной групп при p < 0,05

ванных больных и возраст менархе были сходными во всех группах. Также во всех группах были больные как с регулярным менструальным циклом, так и с опсоменореей. У больных первой группы нарушения менструального цикла носили более легкий характер и проявлялись опсоменореей с максимальной задержкой менструации до 90 дней, в то время как у остальных больных периодически наступала вторичная аменорея продолжительностью 6–9 месяцев, а в четвертой группе были 3 больные с первичной аменореей. Жалобы на бесплодие I предъявляли 12 больных НФ ВГКН, бесплодие II — 4 больных НФ ВГКН, у 5 больных НФ ВГН в анамнезе были самопроизвольные выкидыши, у 3 — нормальные роды. Возраст появления угревой сыпи был сходным во всех группах. В третьей группе возраст появления гирсутизма совпадал с началом менархе, в то время как у больных первой и второй групп гирсутизм появился значительно позже. Гирсутизм был более выраженным у больных второй группы.

При гормональном обследовании (табл. 2) обращало на себя внимание достоверно более высокое содержание ДЭА-С в крови у больных третьей группы по сравнению с больными первой и второй групп и более высокий уровень ЛГ в кро-

ви больных второй группы.

При УЗИ было выявлено увеличение размеров яичников и изменение их структуры (более 10 фолликулов диаметром менее 10 мм и увеличение количества стромы) у всех больных второй группы. У 6 больных третьей группы при УЗИ было обнаружено изменение структуры яичников (более 10 фолликулов диаметром 0,5–1,2 см, располагающихся по всей поверхности яичников), что соответствует вторичному поликистозу яичников. У остальных больных третьей группы и у всех больных первой группы не было выявлено изменение структуры яичников.

При оценке пробы АКТГ (табл. 3) более высокий исходный уровень 17-ОНР был обнаружен в крови больных третьей группы как по сравнению с контролем, так и по сравнению с двумя другими группами больных. Ответ на введение АКТГ у больных этой группы также был достоверно выше по сравнению с реакцией у других обследуемых групп.

При анализе мутаций в гене 21-Г у 12 из 21 больной первой группы были выявлены химерные конструкции 1-го и 2-го типов (табл. 4). Все больные имели «идиопатическую» андрогенизацию. У больных СПЯ мутаций выявлено не было.

Таблица 4

Распределение мутаций в гене 21-гидроксилазы у обследованных больных

хромосомы	1 группа n = 42	2 группа n = 16	3 группа n = 52	Популяционная выборка n = 80
мутации				
Химерный ген 1-го типа	3	—	8	1
Химерный ген 2-го типа	12	—	9	6
7экзон V281L	—	—	3	—
4экзон II72N	—	—	1	—
6экзон V237G	—	—	2	—
Всего	15/42	0/16	23/52	7/80

У 15 из 26 больных НФ ВГКН выявлены различные мутации в гене 21-Г: химерные конструкции 1-го и 2-го типов (9 женщин), точковые мутации (2), точковые мутации в сочетании с химерными конструкциями (3). В популяционной выборке у 7 из 40 человек идентифицированы химерные конструкции. В результате проведенного исследования выявлено достоверное повышение частоты химерных конструкций у больных первой и третьей групп по сравнению с популяционным контролем ($p < 0,001$, $\chi^2 = 13,46$). Вторая группа больных достоверно отличалась по частоте химерных конструкций от больных первой и третьей групп ($p < 0,05$; $\chi^2 = 7,8$).

Обсуждение

НФ ВГКН представлена двумя формами: ВГКН с поздним началом и латентная форма. Состояние репродуктивной системы у женщин с латентной формой заболевания практически не исследовано. Это можно объяснить тем, что данную форму заболевания, как правило, выявляют случайно среди здоровых лиц при семейных обследованиях. Большая часть из них является гетерозиготными носителями — это индивиды, имеющие в своем геноме один мутантный аллель гена 21-Г. Практически эти лица считаются здоровыми и их выявляют в семьях, где родился ребенок с классической формой ВГКН. Клиническим аспектам гетерозиготного носительства мутантного гена 21-Г внимания почти не уделялось. Единичные исследования свидетельствуют о достаточно высоком проценте гетерозиготных носителей среди больных с гирсутизмом [4]. Наличие в генотипе индивида мутантных аллелей гена 21-Г в гетерозиготном состоянии часто сопровождается нарушением функции коры надпочечников, которая у женщин фенотипически проявляется в виде нарушения менструального цикла и бесплодия. По нашим данным, у половины больных с «идиопатической» андрогенизацией выявлены мутации в гене 21-Г, что может указывать на наличие у них латентной формы ВГКН. При этом результаты пробы с АКТГ не отличались от показателей в контрольной группе. Это совпадает с данными Rumsby G. и соавт., 1998 [9], которые показали, что у более 10 % больных с нарушениями в гене 21-Г уровень 17-ОНР не повышен.

Интересно отметить выявленное нами достоверное ($p < 0,05$) повышение частоты химерных конструкций у больных первой и третьей групп по сравнению с популяционным контролем. Полученные результаты могут указывать на то, что наличие мутантного аллеля в гене 21-Г ассоциировано с появлением симптомов андрогенизации. В то же время в группе больных СПЯ мутаций

в гене 21-Г выявлено не было, что указывает на другой механизм появления симптомов андрогенизации. В группе больных с НФ ВГКН мутации в гене 21-Г были найдены у 60 % больных. При этом, в отличие от 1-й и 2-й групп, в данной группе помимо «химерных» генов идентифицированы точковые мутации. Выявленные мутации встречались как в гетерозиготном состоянии, так и в компаунде с химерными генами. Как известно, при НФ ВГКН возможно сочетание различного типа мутаций, например, «тяжелой» (приводящей к полной дезактивации фермента, кодируемого данным геном) и «легкой» (приводящей к незначительной дезактивации фермента), или «умеренной» (приводящей к частичной дезактивации фермента). Аллель, несущий «легкую» мутацию может находиться в гомозиготном состоянии. «Тяжелые» или «легкие» мутации могут быть в компаунде с аллелем, несущим функционально активную копию гена (гетерозиготное носительство). Такие гетерозиготные носители демонстрируют широкий клинический полиморфизм [13]. Таким образом, активность 21-Г зависит от тяжести мутации в гене, ответственном за данный фермент. Мы предполагаем, что «химерные» гены 2-го типа кодируют 21-гидроксилазу с незначительными нарушениями и не приводят к серьезным сбоям в работе фермента. По-видимому, по этой причине они чаще идентифицируются у больных с более легкими симптомами ВГКН. В связи с этим целесообразно проведение развернутого исследования спектра мутационных повреждений в гене 21-Г не только у больных с НФ ВГКН, но и у женщин с «идиопатической» андрогенизацией для выявления среди них больных латентной формой ВГКН.

Выводы

1. Применение пробы с АКТГ является высокоэффективным методом диагностики НФ ВГКН среди больных с симптомами андрогенизации.
2. Наличие гетерозиготного носительства химерных конструкций в гене 21-гидроксилазы у больных с «идиопатической» андрогенизацией указывает на наличие у них латентной формы ВГКН, что открывает перспективы генетических методов диагностики данной патологии.

Литература

1. Анализ спектра мутационных повреждений гена 21-гидроксилазы у больных с аденогенитальным синдромом / Осинская Н.С., Иващенко Т.Э., Соболева Е.Л. [и др.] // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 8. — С. 1147–1149.
2. Соболева Е.Л. Проба с АКТГ в диагностике неклассической формы аденогенитального синдрома / Соболева Е.Л., Осинская Н.С., Потин В.В. // Актуальные проблемы современной эндокринологии: материалы IV Всероссийского конгресса эндокринологов. — СПб., 2001. — С. 510.

3. *Evgrafov O.* Preliminary Investigation of Mutations in 21-Hydroxylase Gene in Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia in Russia / Evgrafov O., Polyakov A., Dzenis I., Baharev V. // *Hum. Mutat.* – 1995. – Vol. 5. – P. 131–136.
4. Is Heterozygosity for the steroid-21-hydroxylase deficiency responsible for hirsutism, premature pubarche, early puberty and precocious puberty and precocious puberty in children / Knorr D., Bidlingmaier F., Holler W. [et al.] // *Acta Endocrinol.* – 1986. – Vol. 279, N 113, Suppl. – P. 284–289.
5. *Lee H.* Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia / Lee H., Chao H., Ng H., Choo K. // *J. Med. Genet.* – 1996. – Vol. 33. – P. 371–375.
6. *Miller W.L.* Congenital adrenal hyperplasia / Miller W.L. // *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* – 1991. – Vol. 20, N 4. – P. 721–749.
7. *Morel Y.* Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency / Morel Y., Miller W.L. // *Adv. in Hum. Genet.* – 1991. – Vol. 20. – P. 1–67.
8. *Osinovskaja N.* CYP21-B–CYP21-P chimeric molecule as a possible cause of nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia / Osinovskaja N., Ivaschenko T., Soboleva E. // *European human genetic conference.* – Praga, 2005. – P. 270.
9. *Rumsby G.* Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms / Rumsby G., Avey C.J., Conway G.S., Honour W. // *Clin. Endocrinol.* – 1998. – Vol. 48. – P. 707–711.
10. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency / Barbat B., Bogyo A., Raux-Demay M.C. [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1995. – Vol. 5, N 2. – P. 126–130.
11. *Tusie-Luna M.T.* Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms / Tusie-Luna M.T., White P.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92, N 23. – P. 10796–10800.
12. *White P.C.* Genetic basis of Endocrine disease 2: Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency / White P.C., New M. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1992. – Vol. 71. – P. 6–11.
13. *White P.C.* Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency / White P.C., Speiser P.W. // *Endocrinol. Rev.* – 2000. – Vol. 21, N. 3. – P. 245–249.

Статья представлена Э.К. Айламазяном
НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

NON-CLASSICAL FORM OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA (ETIOLOGY, PATHOGENESIS, DIAGNOSTICS)

Soboleva E.L., Osinovskaya N.S., Baranov V.S.,
Ivaschenko T.E., Potin V.V.

■ **Summary:** Hormonal (including the ACTH stimulation test), sonographic and molecular investigation of 55 patients with androgenization symptoms was carried out. High diagnostic value of the ACTH stimulation test in diagnosis of non-classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) was shown. During the study of mutational spectrum in 21-hydroxylase gene (CYP21A2) more than a half of patients with “idiopathic” androgenization were revealed as carriers of “chimeric” genes, so it denotes that these patients have latent form of CAH.

■ **Key words:** androgenization; non-classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH); the ACTH stimulation test; 21-hydroxylase gene; mutational spectrum