

## ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ ГЕНА СУР21А2 У ДЕТЕЙ С СИМПТОМАМИ ВГКН В УЗБЕКИСТАНЕ

М.Б. НАЗИРОВА<sup>1</sup>, М.Д. МИРХАЙДАРОВА<sup>1</sup>, А.Б. АБДУРАХИМОВ<sup>1</sup>, С.А. ХОЛИКОВА<sup>2</sup>, С.А. ХОДЖАЕВА<sup>3</sup>, С.О. ТУРДИКУЛОВА<sup>2</sup>, Д.А. ДАЛИМОВА<sup>2</sup>

1 - Институт Биохимии и Биофизики при НУУз;

2 - Центр передовых технологий при МИР РУз;

3 - Самаркандский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Самарканд

## ЎЗБЕКИСТОНДА ТБУБГ КЛИНИК БЕЛГИЛАРИ БЎЛГАН БОЛАЛАРДА СУР21А2 ГЕНИНИНГ МУТАЦИЯЛАРИНИ УЧРАШ ЧАСТОТАЛАРИНИ ЎРГАНИШ

М.Б. НАЗИРОВА<sup>1</sup>, М.Д. МИРХАЙДАРОВА<sup>1</sup>, А.Б. АБДУРАХИМОВ<sup>1</sup>, С.А. ХОЛИКОВА<sup>2</sup>, С.А. ХОДЖАЕВА<sup>3</sup>, С.О. ТУРДИКУЛОВА<sup>2</sup>, Д.А. ДАЛИМОВА<sup>2</sup>

1 - Ўзбекистон Миллий университети хузуридаги Биофизика ва биокимё институти;

2 - Инновация Вазирлиги қошидаги Илғор технологиялар маркази;

3 - Самарқанд давлат медицина институти, Ўзбекистон Республикаси, Самарқанд ш.

## THE STUDY OF THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF MUTATIONS OF THE GENE СУР21А2 IN CHILDREN WITH SYMPTOMS OF CAH IN UZBEKISTAN.

M.B. NAZIROVA<sup>1</sup>, M.D. MIRKHAYDAROVA<sup>1</sup>, A.B. ABDURAKHIMOV<sup>1</sup>, S.A. KHOLIKOVA<sup>2</sup>, S.A. KHODJAEVA<sup>3</sup>, S.O. TURDIKULOVA<sup>2</sup>, D.A. DALIMOVA<sup>2</sup>

1 - Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan

2 - Center for Advanced Technologies of the Ministry of Innovation Development of Uzbekistan;

3 - Samarkand State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Samarkand

*Тугма буйрак усти беши гиперплазиясининг (ТБУБГ) ноклассик шакли 21-гидроксилаза ферменти этишмовчилиги натижасида юзага келади ва ТБУБГ ташиқсланишида учраш частотаси 90% дан ортиқ ҳолатларни ташиқ қилади. ТБУБГ асосан кўп учрайдиган шакллари яхши ўрганган бўлиб, булар клиник белгилари кеч намоён бўлувчи - енгил шакли ва яширин, яъни латент шаклидир. Дунё бўйича болалар орасида ТБУБГ учраш частотаси турлича ва этник гуруҳларга боғлиқ. Хусусан, европоидларда ТБУБГ учраш частотаси 1:10 ни ташиқ этади. Умуман олганда болалар орасида ТБУБГ умумпопуляция учраш частотаси 0,6% дан 6% гача. Болаларда бу кўрсаткич ҳозирги кунга қадар Ўзбекистонда ўрганлмаган.*

**Калит сўзлар:** буйрак усти беши, гиперплазия, болалар.

*The non-classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) is the result of a deficiency of the enzyme 21-hydroxylase and found in more than 90% of cases among patients who diagnosed with CAH. Two main forms of CAH are differentiated: a light form, with a late onset and a latent form, which is hidden form. The frequency of occurrence of CAH among children varies widely and often depends on ethnic groups, for instance among Europeans, the frequency of occurrence is 1:10 000. In general, the frequency of CAH among children ranges from 0.6% to 6%. However, occurrence of CAH mutation had not been studied thoroughly in Uzbek children before this research.*

**Key words:** adrenal gland, hyperplasia, children.

**Введение.** В середине XIX века впервые были описаны симптомы врожденной гиперплазии надпочечников (ВГКН) или адреногенитального синдрома. Адреногенитальный синдром или ВГКН это врожденное многогенное аутосомно-рецессивное заболевание. В основе заболевания лежит дефект биосинтеза кортизола в коре надпочечников, за счет нарушения функций одного из ферментов транспортных белков [2,10]. В результате нарушения функции фермента, происходит снижение уровня кортизола, что в свою очередь приводит к повышению адренокортикотропного гормона (АКТГ) и, как следствие, развитию гиперплазии коры надпочечников, а также накоплению метаболитов предшествующих дефектному этапу стероидогенеза. Клиническая картина заболевания (внутриутробную вирилизацию плодов

женского пола, проявляющуюся гермафродитным строением наружных гениталий) объясняется тем, что при дефиците 21-гидроксилазы не нарушен синтез надпочечниковых андрогенов. В следствии чего, избыток андрогенов приводит у девочек к дальнейшей вирилизации, а у мальчиков к ложному, преждевременному половому развитию. В 75% случаев заболевание проявляется в дефиците минералокортикоидов, что приводит к потере соли и без своевременного лечения приводит к смерти в неонатальный период. В дни жизни ребенка с 5-15 проявляются неспецифические симптомы заболевания, такие как вялое сосание, частые срыгивания, диарея, снижение массы тела [4,7]. Без адекватной заместительной рано начатой гормональной терапии дети погибают при явлениях острой надпочечниковой недостаточно-

сти [1,3,5]. Гены, связанные с врожденной гиперплазией надпочечников или адреногенитальным синдромом, кодируют ферменты, участвующие в стереогенезе –цепочке реакций по преобразованию холестерина в стероиды. Ген CYP21A2 участвует в окислении многочисленных соединений и играет важную роль в обмене стероидов, желчных кислот, насыщенных жирных кислот, а также в нейролизации ксенобиотиков. Дефицит энзима 21- гидроксилазы (21ГД) гена CYP21A2 составляет от 90-95% всех вариантов адреногенитального синдрома. Клинически недостаточность фермента 21- гидроксилазы проявляется в виде 2 форм: Классическая (сольтеряющая, вирильная) и неклассическая формы.

Классическая форма 21-гидроксилазной недостаточности приводит к выраженной гиперандрогении. У новорожденных девочек отмечается гипертрофия клитора с формированием головки, сращение мошоночного шва, отсутствие пальпируемых гонад формирование урогенитального синуса и в редких случаях наружные половые органы отсутствуют, но при ультразвуковом исследовании визуализируются гениталии. [6]. Строение наружных половых органов новорожденных мальчиков с 21-гидроксилазной недостаточностью соответствует генетическому полу. Они имеют нормально сформированный половой член, мошонку, яички и внутренние вольфовы протоки [7]. Может наблюдаться увеличение полового члена, вторичная пигментация мошонки и сосков вследствие повышенной секреции меланокотостимулирующего гормона [8]. У мальчиков при классической форме дефицита 21-гидроксилазы диагноз чаще всего устанавливается к 4-5 годам при обнаружении признаков преждевременного полового развития по изосексуальному типу, а в нотальном периоде проявляется отсутствием набора массы тела и наличием клинических и лабораторных признаков сольтеряющего компонента, таких как гиперкалиемия, ги-

перрениемия, гипонатриемия, метаболический ацидоз [9,4]. Неклассическая форма ВГКН является наиболее распространенным из аутосомно-рецессивных нарушений и представляет собой «мягкий» вариант проявления 21-гидроксилазного дефицита [8,9]. Для девочек характерно ускорение роста, опережение костного возраста, преждевременное аденоархе, пубархе и акне, часто встречается гипертрофия клитора, высокая задняя спайка промежности. Для мальчиков также характерно ускорение роста, рост полового члена, но при этом нет увеличения объема яичек.

В связи с актуальностью данной проблемы целью проведенного исследования является молекулярно-генетическая диагностика дефицита 21ГД и изучение спектра наиболее часто встречаемых мутаций гена CYP21A2, приводящих к различным формам ВГКН.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на базе Республиканского Специализированного Научно-Практического Медицинского Центра Эндокринологии МЗ РУз.

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая у детей возраста от 0 до 14 лет с различными симптомами андрогенезии (преждевременное аденоархе, пубархе, акне, гипертрофия клитора, высокая задняя спайка промежности, у мальчиков – рост полового члена без увеличения объема яичек, сращение мошоночного шва, формирование урогенитального синуса и отсутствие пальпируемых гонад и др.). Венозная кровь в количестве 1мл отбиралась в 0,1мл раствора цитрата натрия (антикоагулянт) и хранилась при температуре -20 °С. Критерием для отбора являлись дети в возрасте от 0 до 14 лет с симптомами ВГКН. Полученный ПЦР продукт разбавляли в 30 раз и использовали для постановки ПЦР для специфической амплификации гена CYP21A2. Для этого использовали набор регентов IsogeneGenPak®PCR-Core.

Таблица 1.

Распределение мутаций среди общего количества исследованных детей

| N | Мутация | Количество исследованных образцов | Гомозигота | Гетерозигота | % от общего количества |
|---|---------|-----------------------------------|------------|--------------|------------------------|
| 1 | C89T    | 50                                | -          | -            | -                      |
| 2 | T999A   | 50                                | 2          | 2            | 8                      |
| 3 | G1683T  | 50                                | -          | 1            | 2                      |
| 4 | C1994T  | 50                                | 1          | 3            | 8                      |

Для проверки наличия ПЦР продукта проводили электрофорез на 1,2% агарозном геле в 0,5xTBE буфере в течении 40 мин при 120 В. Полученный таким образом ПЦР продукт далее использовали в качестве матрицы для обнаружения исследуемых мутаций методом аллель специфичной ПЦР в режиме реального времени. ПЦР в присутствии каждого из аллель-специфичных праймеров проводили в разных пробирках, со-

держащих кроме всего прочего одинаковые флуоресцентно-меченные зонды TaqMan. Всем обследованным детям проводился молекулярно-генетический анализ на наличие 4 мутаций (C89T, T999A, C1994T и C2108T) гена CYP21A2.

**Результаты исследования.** В результате проведенных исследований был собран биологический материал (венозная кровь) у 50 детей в возрасте от 0 до 14 лет с гиперандрогенными

симптомами. Выполнено выделение ДНК из этих образцов. Проведена оценка качества и количества выделенной геномной ДНК. Проведён двух этапный ПЦР анализ. На первом этапе проводился локус специфичный ПЦР анализ, на втором этапе проводился аллель специфичный анализ ПЦР в реальном времени на определение 4 мутаций С89Т, Т999А, С1994Т и С2108Т в гене СУР21А2. Молекулярно-генетический анализ гена СУР21А2, проведенного у 50 детей, выявил недостаточность 21-ГД в 14 случаях, что послужило основанием для постановки диагноза ВГКН. Проведенные анализы выявили 3 мутации гена СУР21А2 из 4 исследуемых мутаций: С89Т, Т999А, G1683Т и С1994Т. Из 50 исследованных образцов в 9 образцах выявлены мутации, что составило 18% от общего числа. Также, нами были выявлены случаи нескольких мутаций у одного пациента в гене СУР21А2. Мутация С1994Т была выявлена у 4 детей, что составляет 8% от общего количества обследованных детей. Из них одна была гомозиготной, а остальные 3 гетерозиготные. Мутация Т999А была выявлена в 4 образцах из отобранных, что составило 8%. Надо отметить, что в 2-х случаях из 4 выявленные мутации были гомозиготные, остальные 2 гетерозиготы. Гетерозиготная мутация G1683Т была выявлена в одном образце, что составило 2%. Мутация С89Т гена СУР21А2 ни в одном образце не выявлена. Исходя из проведенных исследований можно предположить о необходимости применения точечных мутаций гена СУР21А2.

**Выводы.** По итогам проделанной работы можно сделать вывод о том, что у 50 обследованных детей с различными гиперандрогонными синдромами из 4 нами изученных мутаций наиболее часто встречаются три мутации, что составило 18% от общего числа обследованных детей.

Наиболее часто встречающиеся мутации из 4 нами изученных мутаций гена СУР21А2 у детей в узбекском регионе являются мутации Т999А (8%) и С1994Т (8%). Проведенное молекулярно-генетическое исследование указывает на полезность, для выявления мутаций в гене СУР21А2 у детей, как для выбора тактики лечения детей в постнатальный и пубертатный период, так и для профилактики наследственной передачи различных форм ВДКН в будущем.

#### Литературы:

1. Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. // Половое развитие детей: норма и патология. – М.: Колор Ит Студио, 2002. – С. 119–129.
2. Жуковский М.А., Бурая Т.И., Кузнецова Э.С. Врожденные дисфункции коры надпочечников у детей. М 1977.
3. Каланходжаева Ш. Б., Хайдарова Ф.А. Репродуктивная функция при классической и не-

классической формах врожденной гиперплазии коры надпочечников. Инфекция, иммунитет и фармакология. Ташкент, 2015 № 1 стр. 60-63.

4. Попова С.С. Неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников//Здоровья Украины.-2011.-№1.-С62-64.
5. Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Малиевский О.А.,Хуснутдинова Э.К. Врожденная дисфункция коры надпочечников:поиск мутаций в гене СУР21А2//Вестник Башкирского университета.-2013.-Т.18,№4.-С.1039-1041.
6. Турдикулова Ш.У., Далимова Д.А., Давлетчуринов Д.Х. Изучение роли цитохрома р450 в развитии ВГКН. Сборник тезисов международной научной конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» 15-16 ноября 2013г. С.156-157
7. Arlt W., Walker E.A., Draper N. et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. Lancet 2004;363:9427:2128—2135.
8. Dalimova D. et. all Prevalence and spectrum of СУР21А2 gene mutations in women with symptoms of hyperandrogenism in Uzbekistan. European Journal of Human Genetics, May 2014. P.395.
9. Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Pediatric Endocrinology: Procedure for neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Horm. Res. – 2001. – Vol. 55. – P. 201–205.

#### ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ ГЕНА СУР21А2 У ДЕТЕЙ С СИМПТОМАМИ ВГКН В УЗБЕКИСТАНЕ

М.Б. НАЗИРОВА<sup>1</sup>, М.Д. МИРХАЙДАРОВА<sup>1</sup>,  
А.Б. АБДУРАХИМОВ<sup>1</sup>, С.А. ХОЛИКОВА<sup>2</sup>,  
С.А. ХОДЖАЕВА<sup>3</sup>, С.О. ТУРДИКУЛОВА<sup>2</sup>,  
Д.А. ДАЛИМОВА<sup>2</sup>

- 1 - Институт Биохимии и Биофизики при НУУз;
- 2 - Центр передовых технологий при МИР РУз;
- 3 - Самаркандский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Самарканд

Неклассическая форма ВГКН является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы и встречается в более чем в 90% случаях выявления ВГКН. Изучены две основные формы ВГКН, это легкая форма, с поздним началом и латентная форма, которая имеет скрытую форму. Частота встречаемости ВГКН в детском возрасте в мире широко варьирует и часто зависит от этнических групп, так у европейцев частота встречаемости составляет 1:10 000. В целом общепопуляционная частота ВГКН у детей колеблется от 0,6% до 9%. Этот показатель у детей в Узбекском регионе на данный момент не изучен.

**Ключевые слова:** надпочечник, гиперплазия, дети.