

В.Г. Часнык, С.Я. Яковлева, Т.Е. Бурцева, M.I. New, Е.В. Синельникова, С.Л. Аврусин, В.П. Шадрин

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ДЕТЕЙ КОРЕННЫХ МАЛОЧИСЛЕННЫХ НАРОДНОСТЕЙ КРАЙНЕГО СЕВЕРА И ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ РАСПРОСТРАНЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ В ДЕТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

УДК 575.17:616.453 (571.56)

В работе представлены данные пилотного проекта по изучению распространенности генетических маркеров дефицита 21-ОН в популяциях Крайнего Севера. Методом полимеразной цепной реакции обследовано 463 образца ДНК детей, проживающих в Республике Саха (Якутия) и Ямало-Ненецком автономном округе.

**Ключевые слова:** врожденная гиперплазия надпочечников, генетические маркеры, дефицит фермента 21-гидроксилазы, интрон 2, экзон 7, прогностическая модель накопления мутации.

In work data of the pilot project on studying of prevalence of deficiency 21-OH genetic markers in populations of the Far North are presented. 463 DNA samples of children living in Republic Sakha (Yakutia) and Yamal-Nenets autonomous region are surveyed by method of polymerase chain reaction.

**Keywords:** congenital adrenal hyperplasia, genetic markers, deficiency of enzyme 21-hydroxylase, intron 2, exon 7, prognostic model of a mutation accumulation.

### Введение

Врожденная гиперплазия надпочечников – группа наследуемых аутосомно-рецессивных нарушений стероидогенеза, наиболее частой причиной которых является дефицит фермента 21-гидроксилазы, обусловленный мутацией гена CYP21A2.

Частота врожденной гиперплазии надпочечников – как классической, так и неклассической ее форм – в значительной мере обусловлена этнической принадлежностью. Наибольшая распространенность этой патологии зарегистрирована в популяциях иберийцев, выходцев с Кавказа и у евреев-ашкенази [8,10]. Распространенность неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников, составляющая в среднем по всей популяции 1:100, в популяции евреев-ашкенази составляет 1:27 [8,9], у испанцев – 1:40 [6], у итальянцев – 1:333 [6], у жителей Нью-Йорка – 1:100 [7,8]. Гетерозиготы по дефициту 21-гидроксилазы встречаются с частотой 1:60 в популяции не евреев-ашкенази и с

частотой до 1:3 в популяции евреев-ашкенази [6].

В то время как классическую форму патологии у гомозигот, как правило, распознают достаточно рано, у гетерозигот достаточно часто диагноз ставят позже, поскольку гормональные нарушения слабо выражены, а недифференцируемые гениталии если и встречаются, то в форме гипоспадии.

Неклассическая форма врожденной гиперплазии надпочечников в большинстве случаев в детстве остается нераспознанной. Как правило, неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы в период детства и в пубертатный период ошибочно идентифицируется как идиопатическое преждевременное половое созревание, кисты яичников, опухоли яичек, опухолевые образования коры надпочечников, яичниковая гиперандрогения. Достаточно характерное для детей с этим видом патологии опережение сверстников в физическом и половом развитии редко является причиной жалоб, а последующий более низкий конечный рост, обусловленный ранним эпифизарным окостенением, приходится на возраст, чаще входящий в компетенцию терапевтов, а не педиатров.

В рамках пилотного проекта изучение распространенности врожденной дисфункции коры надпочечников в детской популяции Республики Саха (Якутия) началось в 2005 г. [1]. Вместе с тем некоторые известные географические, антропологические и этногенетические предпосылки свидетельствуют, предположительно, о высокой вероятности выявления дефицита 21-гидроксилазы в популяции детей, проживающих в регионах Крайнего Севера, в частности на территории Рес-

публики Саха (Якутия). К факторам, способствующим распространению этого вида патологии, относятся в первую очередь географические условия, способствующие изоляции населения. Некоторые черты образа жизни, отмена считавшихся традиционными до 20-х гг. прошлого века ограничений на вступление в близкородственный брак способствуют широкому распространению наследственной патологии в популяции.

В Республике Саха (Якутия), по данным статистической отчетности, в настоящее время на территории 3105,6 км<sup>2</sup> проживает 949 тыс. чел. (0,31 чел. на 1 км<sup>2</sup>), 36% населения проживает в 551 поселке с численностью 200-1000 чел., расстояние между населенными пунктами составляет от 30 до 650 км. Следствием этого является высокий уровень близкородственных браков. Уровень гомолокальных браков (супруги проживали до брака в одном районе) республике составляет в среднем 50%, эндокальных (супруги проживали до брака в соседних районах) – 15%. В некоторых поселках уровень гомолокальных браков достигает до 100% [2,3]. Возможное широкое распространение этого вида патологии подтверждает высокая частота обнаружения в популяции коренных малочисленных народностей Крайнего Севера прочих – значительно менее распространенных в популяции европейцев – наследственных заболеваний, а также высокая частота низкорослости в популяции взрослых. Известно, что врожденная гиперплазия надпочечников встречается весьма часто (1:280) в популяции юпик-эскимосов [5], проживающих на Аляске, составлявшей до известных географических изменений,

**ЧАСНЫК Вячеслав Григорьевич** – д.м.н., проф., зав. кафедрой Санкт-Петербургской гос. педиатрической мед. академии; **ЯКОВЛЕВА Светлана Яновна** – зав. Консультативной поликлиникой Педиатрического центра РБ №1-НЦМ; **БУРЦЕВА Татьяна Егоровна** – к.м.н., зам. директора по науке ЯНЦ КМП СО РАМН; **NEW Maria Iandolo** – д.м.н., проф., директор клиники детской эндокринологии, руководитель стероидных программ больницы Маунт Синай, г. Нью-Йорк; **СИНЕЛЬНИКОВА Елена Владимировна** – д.м.н., доцент СПбГПМА; **АВРУСИН Сергей Львович** – к.м.н., доцент СПбГПМА; **ШАДРИН Виктор Павлович** – к.м.н., начальник информ.-аналит. отдела Якутской детской гор. больницы.

сопровождавшихся возникновением Берингова пролива, единую территорию – Берингию.

### Материалы и методы

Работа выполнена на базах Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, Педиатрического центра РБ №1-Национального центра медицины Республики Саха (Якутия) и педиатрического отделения Mount Sinai School of Medicine (Нью-Йорк, США) в соответствии с планом исследований Якутского научного центра КМП СО РАМН в рамках НИР «Нейроиммунные и эндокринные механизмы нарушения соматического, психосоматического и репродуктивного здоровья подростков Республики Саха (Якутия)» (регистрационный номер №004).

На первом этапе в ходе экспедиционной работы оценена распространенность в детской популяции фенотипических признаков, характерных для врожденной гиперплазии надпочечников, и получен материал для генетических исследований.

На втором этапе проведены генетические исследования, анализ полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации. Генетические исследования проведены у 315 детей, проживающих в населенных пунктах Республики Саха (Якутия), и у 176 детей, проживающих в населенных пунктах Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО).

В соответствии с существующей практикой этническую принадлежность определяли самоидентификацией с учетом фенотипа ребенка и семейного анамнеза. Для детей с выявленными мутациями составляли семейные деревья до 3-го уровня родства с включением данных об этнической принадлежности, степени родства, конечном роде, половом развитии, наличии гирсутизма, угревой сыпи.

Детей включали в исследование случайным образом во время профилактических осмотров по удовлетворению критериев включения. Для проведения исследования было получено одобрение этического комитета.

Критериями включения в исследование служили: пол мужской или женский, возраст 3-17 лет на момент включения, подтвержденный факт рождения и проживания в одном поселке (районе), подтвержденный факт проживания родителей ребенка в том же поселке, желание родителей и детей старше 5 лет принимать участие в исследовании, достоверное подтверждение информированного согласия.

Критериями исключения были любые известные или предполагаемые противопоказания к забору крови из вены.

Для проведения генетического анализа с целью выявления наличия мутаций в гене CYP 21 рутинным способом выделяли ДНК из лейкоцитов периферической крови. Для выявления мутаций nt 656g («intron 2g») и V281L («exon 7») использовали аллель-специфические ПЦР. Для определения мутации в интроне 2 (656) A/C → G использовали праймеры: In2ns, In2ms, In2cs. Для определения мутации в экзоне 7 (V281L) использовали праймер Ex7ma. Во всех случаях использовали положительную контрольную ДНК. В случае положительной реакции процедуру повторяли и, в случае повторного положительного результата, для подтверждения выявления мутации использовали процедуру секвенирования.

Для оценки наличия ассоциированных генетически обусловленных заболеваний в 2 случаях проводили определение панели мутаций, характерных для: синдрома Bloom, болезни Canavan, болезни Gaucher, болезни Niemann Pick, болезни Tay Sachs, семейной дизавтономии, муколипидоза, анемии Фанкони (все исследования проведены в Jewish Genetic Disease Center (директор - Dr. Robert Desnick).

Базы данных вели с использованием программных средств пакетов STATISTICA (версия 6).

### Результаты и обсуждение

Распределение числа выявленных мутаций по этническим группам представлено в таблице. Всего было выявлено 12 гетерозигот с мутациями в гене CYP21. Ни одной гомозиготы выявлено не было. Из них сплайсинг-мутация по 659AC→G была найдена в 1 хромосоме, мутация по V281L — в 11 хромосомах. Распространенность мутации 659AC→G (Intron 2g) у эвенов составила 1:41 (или 2,4:100). В прочих этнических группах эта мутация выявлена не была. Таким образом, в сред-

нем в исследованной нами популяции данная мутация определяется с частотой 0,4:100.

Распространенность мутации V281L была наибольшей у чукчей (5,1:100) и юкагиров (5:100) при средней распространенности в исследованной популяции 2,4:100.

Связи количества мутаций, этнической группы и ее численности на исследованной территории оценивали определением корреляции Spearman. Полученные результаты подтвердили на уровне тенденции существования бытового понятия «национальный поселок» ( $r=0,51$ ,  $p<0,09$ ), тем самым количественно описав степень преобладания какой-то одной этнической группы в «национальном поселке». Была выявлена средней силы связь распространенности мутации с численностью этнической группы, проживающей на исследованной территории ( $r=-0,69$ ,  $p<0,05$ ), что подтверждает некоторую склонность при выборе супруга выбирать представителя своей этнической группы.

Сравнение данных, представленных в таблице, со средней частотой встречаемости гетерозигот по мутации, ассоциированной с неклассической формой патологии (1:60 для неевреев-ашкенази), позволяет сделать вывод о том, что для всех исследованных коренных этнических групп, проживающих в Республике Саха (Якутия), распространенность мутаций по меньшей мере в 2 раза больше, чем у проживающих в Ямало-Ненецком округе селькупов и в среднем в популяции.

Очевидно, что существующие тенденции крайне негативны. При их сохранении можно ожидать ухудшения качества популяции из-за увеличения числа манифестных – часто весьма тяжелых – форм патологии. С точки зрения планирования качества популяции и развития медицинского обеспечения, целесообразно формирование математических моделей с целью прогнозирования численности больных наследственными заболеваниями. Вы-

### Распространенность исследованных мутаций в различных этнических группах

Этнические группы	Общая численность на территории	Intron 2 g		V281L	
		на количество обследованных	на 100	на количество обследованных	на 100
Чукчи	428	0:29	0:100	2:39	5,1:100
Эвены	1793	1:41	2,4:100	1:48	2,1:100
Юкагиры	476	0:20	0:100	2:40	5,0:100
Эвенки	1285	0:48	0:100	2:106	1,9:100
Долганы	1272	-	-	0:2	0:100
Саха	432290	0:25	0:100	1:49	2,0:100
Ненцы	20917	0:40	0:100	0:41	0:100
Селькупы	1530	0:58	0:100	3:137	2,2:100
Другие	-	-	-	0:2	0:100
Всего	459991	1:261	0,4:100	11:464	2,4:100



Динамика процессов изменения численности популяции, снижения уровня ее здоровья и увеличения количества гомозигот в популяции для неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников

бор управляемых переменных (например, изменение уровня гомолокальных браков вследствие проведения кампании популяризации межэтнических фестивалей или улучшения транспортной инфраструктуры и пр.) в качестве параметров модели позволит достаточно эффективно управлять численностью носителей мутаций в популяции.

В ходе разработки подходов к построению прогностической модели накопления мутации в популяции была предложена аналитическая модель уменьшения численности популяции, предполагающая 3 фазы:

1) короткая фаза появления мутации в популяции (привнос извне, мутагенез),

2) длинная фаза распространения мутации в популяции и ее фиксация (передача потомкам, появление гомозигот),

3) фаза уменьшения численности популяции (накопленное количество мутаций так велико, что популяция не может восстановиться; в этом случае уменьшение численности наступает в течение нескольких поколений).

Рисунок представляет возможный ход кривых динамики численности

популяции, ее качества и количества гомозигот в популяции, соответствующих этой модели, сформированной с учетом дилеммы Haldane для случая неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников и популяции большой численности.

Данный подход позволяет рассчитать количество поколений до «угасания» популяции как функцию исходной численности популяции, скорости распространения мутации и коэффициента селекции. В случае популяций малой численности такой подход требует учета большого

количества параметров. Выбранные в ходе работы управляющие параметры не входят в настоящее время в список характеристик государственной статистической отчетности. Легализация регистрации этих характеристик позволит описать очевидно ускоренное ухудшение уровня здоровья популяции, скорость образования гомозигот и, в конечном счете, определить более раннее наступление момента «угасания» популяции.

#### Выводы:

1. Мутация V281L, обуславливающая возникновение неклассической формы врожденной гиперплазии надпочечников, достаточно широко распространена в детской популяции коренных малочисленных народностей Крайнего Севера; наиболее часто она встречается в популяции чукчей, якутиров и селькупов.

2. Мутация в интроне 2, обуславливающая классическую форму врожденной гиперплазии надпочечников, распространена значительно чаще, чем выявляется при неонатальном скрининге.

3. Выявленные мутации являются семейными, они ассоциированы с

местом проживания, что подтверждает факт наличия гомолокальных браков, и коррелируют с численностью этнической группы.

4. Моделирование распространенности наследственной патологии в детской популяции с малой численностью населения возможно при учете значительно большего количества параметров для описания очевидно ускоренного ухудшения уровня здоровья популяции, образования гомозигот и, в конечном счете, более раннего наступления момента «угасания» популяции. Общепринятые модели расчета распространения мутаций неприменимы для популяций малой численности.

#### Литература

1. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей Якутии / С.Я. Яковлева [и др.] // Якутский медицинский журнал. -2008. - №2. - С. 4-6.
2. Максимова Н.Р. Этноспецифические наследственные болезни у якутов / Н.Р. Максимова, В.П. Пузырев // Там же. -С.91-94.
3. Некоторые параметры генетико-демографической характеристики коренных популяций Якутии / А.Л. Данилова [и др.] // Здоровье детей Севера: сб. науч. трудов межрегион. науч.-практ. конф. Якутск, -2008. -С.70-72
4. Сухомясова А.Л. О состоянии и перспективах развития медико-генетической службы / А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, Н.Р. Максимова// Тезисы в сб. научных трудов межрегиональной научно-практ. конф. -Якутск, 2007. -С. 222-223.
5. Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency / P.W. Speiser [et al.] // J. Hum. Genet. - 1992. - N 88. - P. 647-648.
6. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency / P.W. Speiser [et al.] // Am. J. Hum Genet. -1985. - N 37. - P. 650-667.
7. Late-onset adrenal steroid 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women /S.Y. Pang [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. -1985. - N 60. - P. 428-439.
8. New M.I. Extensive clinical experience. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency / M.I. New// J. Clin. Endocrinol. Metab. -2006. - P. 1645.
9. Prevalence of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency based on a morning salivary 17-hydroxyprogesterone screening test: a small sample study / M. Zerah [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1990. - N 70. - P. 1662-1667.
10. Speiser P. Congenital Adrenal Hyperplasia / P. Speiser, P. White// N. Engl. J. Med. - 2003. - N 88. - P. 349 - 776.