

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРОЖДЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ НАДПОЧЕЧНИКОВ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ СРЕДИ ЖЕНЩИН В УЗБЕКСКОМ РЕГИОНЕ

Меҳрибон Баҳромовна Назирова

Институт Биохимии и Биофизики при НУУз младший научный сотрудник

Аброр Акрамович Абдурахимов

Институт Биохимии и Биофизики при НУУз старший научный сотрудник, к.б.н.

Диера Нодирбек кизи Курмаева

Центр передовых технологий при МИР РУз младший научный сотрудник

Светлана Атахановна Ходжаева

Самаркандский Государственный Медицинский Университет ассистент
кафедры фтизиатрии

Дилбар Акбаровна Далимова

Центр Передовых Технологий при МИР РУз заместитель директора по науке,
к.б.н.

АННОТАЦИЯ

Изучение различных форм ВГКН с появлением методов молекулярно-генетического анализа вышла на совершенно новый уровень. Достижения в этой области изменили наши представления о этиопатогенезе и, как следствие возможности диагностики, лечения и профилактики многих заболеваний. Проведение скрининга мутаций в гене CYP21A2 у женщин репродуктивного возраста дает возможность профилактики наследственной передачи различных форм гиперплазии надпочечников будущему поколению.

Ключевые слова: 21-гидроксилаза, молекулярно-генетический анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР), полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), ген CYP21A2.

ABSTRACT

The study of various forms of CAH with the emergence of methods of molecular genetic analysis has reached a completely

to a new level. Achievements in this area have changed our understanding of etiopathogenesis and as a result, its diagnostic capabilities, as well as the treatment and prevention of many diseases. The Screening for mutations in the CYP21A2 gene among women of reproductive age makes it possible to prevent transmission of different forms of hereditary adrenal hyperplasia to the future generation

Keywords: 21-hydroxylase, molecular-genetic analysis, polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction real time (PCR-RT), gen CYP21A2

ВВЕДЕНИЕ

Такое заболевание как врожденная гиперплазия надпочечников или адреногенитальный синдром было описано еще в середине XIX века. Заболевание характеризуется снижением синтеза кортизола, что влечет за собой повышение секреции АКТГ с явными признаками гиперандрогении и как следствие ведет к развитию гиперплазии коры надпочечников, а также накоплению метаболитов, которые далее участвуют в процессе дефектного стероидогенеза [3,4,7]. Гены, связанные с гиперплазией надпочечников, кодируют ферменты, преобразующие холестерин в стероиды. Существует различные проявления гиперплазии, которые варьируют в зависимости от затронутого гена. В связи с этим различают различные формы ВГКН:

Классическая сольтеряющая;

Классическая простая вирильная,

Неклассическая форма.

При классической форме ВГКН проявляются выраженные изменения женских половых органов, в таком случае постановка диагноза ставится при рождении [2,3]. В случаях не классической формы постановка диагноза затруднена и часто проявляется в более позднем возрасте. В данном случае первыми симптомами заболевания бывают позднее менархе, гирсутизм, акне и другие признаки гормональной активности, которые обычно проявляются после окончания пубертатного периода, например нерегулярный менструальный цикл [1,5,8].

ВГКН является наследственным заболеванием вызванное чаще всего ферментативными дефектами 21-гидроксилазы. За недостаточность 21-гидроксилазы отвечает ген CYP21A2. Ген CYP21A2 относится к ферментам семейства цитохром P450. Ферменты этой группы играют большую роль в обмене стероидов, желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот, и нейтрализации ксенобиотиков.

С развитием молекулярной генетики, в конце XX века были клонированы гены, кодирующие ферменты стереогенеза и разработана методика молекулярной диагностики для всех форм ВГКН[10,11]. Особое значение в развитии методов молекулярно-генетической диагностики, послужила возможность проводить пренатальную диагностику адреногенитального синдрома, что позволило предотвратить внутриутробную верилизацию половых органов у плодов женского пола при использовании дексометозона.

В случае выявления ВГКН у женщин репродуктивного возраста, мы можем говорить о неклассической форме заболевания. Чаще всего клиническими признаками являются гирсутизм, нарушение менструального цикла, бесплодие, не вынашивание[3,7,9]. Иногда заболевание протекает бессимптомно. При изучении анамнеза и истории больного выясняется, что девочкам с таким диагнозом было характерно ускорение роста, преждевременное анархе, пубархе, акне, парой встречается гипертрофия клитора[5,6]. Именно этот анамнез часто позволяет, при диагностике, прийти к ошибочному диагнозу – синдром поликистоза яичников (СПКЯ). Молекулярно-генетический анализ помогает подтвердить диагноз, а также помогает дифференцировать форму ВГКН для начала проведения лечения.

Диагностика ВГКН основана на выявлении мутаций и рекомбинации между двумя структурными генами фермента. Оба этих гена локализованы на коротком плече 6-й хромосомы[9,12]. Выявление конкретных мутаций гена помогают в постановке точного диагноза и в дифференцировке форм АГ, а также решает вопрос о необходимости начала терапии. Все вышеизложенное говорит о перспективах и достоверности проведения молекулярно-генетического анализа.

Целью настоящей работы является изучение наиболее часто встречающихся мутаций гена СУР21А2, приводящих к различным формам ВГКН у женщин в узбекском регионе.

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 женщин репродуктивного возраста с различными симптомами андрогенизации (гирсутизм, себорея, угревая сыпь, нарушение менструального цикла). Венозная кровь в

количестве 1мл отбиралась в 0,1мл раствора цитрата натрия (антикоагулянт) и хранилась при температуре -20°C .

Критерием для отбора являлись женщины в возрасте от 15 до 49 лет.

Выделение ДНК из цельной крови осуществлялось набором реагентов Diatomtm DNAPrep 200 (производство ООО «Лаборатория ИзоГен», Москва Россия) по стандартному протоколу.

Для проверки наличия ДНК в отобранном супернатанте проводили электрофорез в 0,5xTBE буфере в течении 30-60 мин при 120 В. Использовали 0,9% агарозный гель.

Полученный ПЦР продукт разбавляли в 30 раз и использовали для постановки ПЦР для специфической амплификации гена CYP21A2. Для этого использовали набор реагентов IsogeneGenPak®PCR-Core.

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, содержащих кроме всего прочего одинаковые флуоресцентно-меченные зонды TaqMan.

В результате нами было отобрано 130 женщин репродуктивного возраста с признаками клинической гиперандрогемией. Всем обследованным женщинам проводился молекулярно-генетический анализ на наличие мутации гена CYP21A2 с целью выявления в гене наиболее часто встречаемых 4 (T999A, A/C655G, C1994T и T1380A) мутаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проделанной работы было проведено генотипирование гена CYP21A2 по следующим 4 мутациям (T999A, A/C655G, C1994T и T1380A). Для этого был собран биологический материал (венозная кровь) у 120 женщин с симптомами клинической гиперандрогемии. Далее проводилось выделение ДНК и оценка его качества и количества. Проводился двухэтапный ПЦР анализ. На первом этапе был выполнен молекулярно-генетический анализ с помощью локус специфичных праймеров и проведена селективная амплификация гена. Это проводилось для того, чтобы отделить функциональный ген от псевдогена.

Праймеры для специфической амплификации гена CYP21A2:

FORWARD - 5' - GTCGGTGGGAGGGTACCTGAA -3'

REVERSE - 5' - AATTAAGCCTCAATCCTCTGCAGCG-3'

На втором этапе, после получения ПЦР продуктов, мы его разбавляли в 30 раз, это было необходимо для дальнейшей постановки аллель специфичного ПЦР анализа в реальном времени.

Молекулярно-генетический анализ гена CYP21A2 проведенный у 130 женщин выявил недостаточность 21-ГД в 16 случаях, что послужило основанием для дальнейшей постановки диагноза ВГКН.

По результатам проведенных исследований нами были получены следующие данные. Были выявлены 4 мутации из 4-х исследуемых в гене CYP21A2. Всего у всех отобранных для исследования женщин в 16 образцах были обнаружены мутации, что составляет 12,3% от общего числа обследованных. Здесь, сразу, хотелось бы отметить, что встречались случаи наличия нескольких мутаций у одного и того же пациента в гене.

Так, наиболее часто встречающейся мутацией явилась мутация С1994Т, она встречалась у 11 исследуемых женщин, и это составляет 8,5% от общего числа, выявленные мутации все были гетерозиготами. На втором месте стоят сразу две мутации, это Т999А и А/С655G эти мутации были выделены, каждая, в 2 исследованных образцах, что составляет каждая, по 1,53%. Мутация А/С655G также встречалась только в виде гетерозиготы, тогда как у мутации Т999А наоборот оба выявленных случая гомозиготные. С мутацией Т1380А был выявлен только один образец из числа исследованных женщин, что составляет 0,76% от общего числа исследованных женщин. Надо отметить, что выявленный образец был гетерозиготным.

Распределение мутаций среди общего количества исследованных женщин

Табл.№1

N	Мутация	Кол=во исследован образцов (n=)	гомозигота	гетерозигота	% от общего кол-ва
1	С1994Т	130	-	11	8,5
2	Т999А	130	2	-	1,53
3	А/С655G	130	-	2	1,53
4	Т1380А	130	-	1	0,76

Несмотря на то, что полученные данные не являются полномасштабными, а только лишь предварительными, но по итогам проведенного исследования можно уверенно говорить



о необходимости использования молекулярно-генетических анализов и изучения точечных мутаций при изучении гена CYP21A2 и постановки диагноза ВГКН у женщин репродуктивного возраста.

ВЫВОДЫ

По итогам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

Из 130 обследованных нами женщин на наличие 4 основных мутаций гена CYP21A2 были выявлены все 4 мутации, что составило 12,3%.

Также было выявлено, что наиболее часто встречающейся мутацией явилась мутация C1994T. Она представляет собой замену остатка цитозина на тимин в 8 экзоне, и это создает образование стоп -кодона в 318 положении полипептидной цепи и как следствие терминацию дальнейшего синтеза белка. Данная мутация приводит к полному прекращению ферментативной активности стероид 21-гидроксилазы.

Таким образом проведенное нами исследование показывает на его полезность и необходимость в постановке правильного диагноза, а также для назначения необходимого лечения и профилактики наследственной передачи различных форм гиперплазии надпочечников будущему поколению.

REFERENCES

1. Верещинский А.О. Надпочечно-половой синдром с точки зрения хирургической патологии и терапии. Вестн хир 1923; 4:3:207—219.
2. Далимова Д.А., Мирхайдарова М.Д., Миракбарова З.М., Турдикулова Ш.У. Молекулярно – генетический анализ мутаций в гене CYP21A2 цитохрома P54 человека, ассоциированных с врожденной гиперплазией коры надпочечников. / Инфекция, иммунитет и фармакология № 4, август 2017
3. Клиническая фармакология / под ред. А.Г. Гилманна. – М.: Практика, 2006. – С. 1269–1280.
4. Молекулярная эндокринология / под ред. Б.Д. Вайнтрауба. – М.: Медицина, 2003. – С. 440–458.
5. Каланходжаева Ш. Б., Хайдарова Ф.А. Репродуктивная функция при классической и неклассической формах врожденной гиперплазии коры надпочечников. Инфекция, иммунитет и фармакология. Ташкент, 2015 № 1 стр. 60-63.
6. Миракбарова З.М., Адиллов Б.Р., Адылов Б.Ш., Далимова Д.А. Молекулярно-генетический анализ неклассической формы врожденной гиперплазии коры надпочечников среди

- женщин с симптомами гиперандрогении в Узбекистане. Стр. 339-340. Ёш олимлар илмий-амалий конференция - 22 декабрь. 2015 г.
7. Попова С.С. Неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников//Здоровья Украины.-2011.-№1.-С62-64.
8. Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Малиевский О.А.,Хуснутдинова Э.К. Врожденная дисфункция коры надпочечников:поиск мутаций в гене CYP21A2//Вестник Башкирского университета.-2013.-Т.18,№4.-С.1039-1041.
9. Турдикулова Ш.У., Далимова Д.А., Давлетчурин Д.Х. Изучение роли цитохрома р450 в развитии ВГНК. Сборник тезисов международной научной конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» 15-16 ноября 2013г. С.156-157.
10. Шерешевский Н.А. Клиническая эндокринология. М 1946.
11. D. Dalimova D. Davletchurin , F. Khaidarova, S. Turdikulova , B. Adilov, Prevalence and spectrum of CYP21A2 gene mutations in women with symptoms of hyperandrogenism in Uzbekistan. European Journal of Human Genetics, May 2014. P.395.
12. D. Davletchurin, Haydarova F. Prevalence of Cytochrome P450c21 in Women with Symptoms of Hyperandrogenism in Uzbekistan. Rcent Trends In Physical &Biological Sciences Bangalore 2014, p. 60