

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННОЙ СОМАТОТРОПНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

О.С. Берсенева¹, А.С. Глотов², О.С. Глотов², Е.А. Серебрякова², Т.Э. Иващенко², Е.Б. Башнина¹, В.С. Баранов²

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,

² Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург, Россия

Клиническая гетерогенность проявлений соматотропной недостаточности при однозначных результатах гормональных стимуляционных тестов определяет необходимость поиска молекулярно-генетических маркеров заболевания для формирования персонализированных терапевтических алгоритмов. Методом секвенирования нового поколения (NGS) с помощью технологии «Амплисек» на аппарате «Ion Torrent» («Life technologies», США) проведено исследование кодирующих регионов генов GH1, GHRH, GHRHR, VTK, GHSR, PROP1, POU1F1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3, SOX2, OTX2, GLI2, ARNT2, ARPC5L, DLK1, DRD2, PAX6, RNPC3, SHH, SPCS2, SPCS3, ассоциированных с соматотропной недостаточностью, у пациентов, состоящих в Регистре больных гипопитуитаризмом города Санкт-Петербурга. Выявлено различие в частоте мутаций у пациентов с множественным дефицитом гормонов аденогипофиза (27,7%) и у пациентов с изолированной соматотропной недостаточностью (9,6%). Изучена частота встречаемости мутаций в генах, ассоциированных с врожденным гипопитуитаризмом, у больных с соматотропной недостаточностью, получающих лечение препаратами гормона роста. У 16,3% больных гипопитуитаризмом (16 из 98) выявлены мутации в генах, ассоциированных с врожденным гипопитуитаризмом. Наиболее часто диагностируемыми мутациями являются изменения в гене PROP1. Молекулярно-генетические исследования у больных с изолированной соматотропной недостаточностью предполагают вероятность наличия редких генетических аномалий генов GHSR, ARNT2, VTK, ассоциированных с низкорослостью, требующих персонализированных клинических подходов. В настоящее время проведение молекулярно-генетического исследования у пациентов с врожденной соматотропной недостаточностью позволяет прогнозировать дальнейшее развитие заболевания и, при необходимости, корректировать проводимую заместительную терапию.

Ключевые слова: врожденный гипопитуитаризм, соматотропная недостаточность, гормон роста, мутации генов, ассоциированных с соматотропной недостаточностью.

Введение

Синдром дефицита гормона роста (ГР) у детей или соматотропная недостаточность представляет собой комплекс патогенетически различных заболеваний, сопровождающихся задержкой роста с исходом в низкорослость в случае отсутствия лечения. Частота соматотропной недостаточности у детей колеблется от 1:4000 до 1:10 000 новорожденных. Клиническая гетерогенность проявлений соматотропной недостаточности при однозначных результатах гормональных стимуляционных тестов определяет необходимость поиска молекулярно-генетических маркеров заболевания для формирования персонализированных терапевтических алгоритмов. Вместе с тем, известно, что генетические аномалии и факторы внешней среды могут значительно изменять клиническую картину даже моногенных заболеваний – наиболее простой формы из числа сложных многокомпонентных нарушений [1].

Современные возможности молекулярно-генетических методов исследования в определении генеза низкорослости позволили сформировать диагностическую панель для поиска мутаций в генах, ассоциированных с нарушением секреции основного ростового гормонального регулятора – гормона роста с учетом известных физиологических механизмов, определяющих ростовые эффекты. Наиболее широко в литературе представлены данные о мутациях в генах HESX1, LHX3, LHX4, PROP1, POU1F1, GHRHR, GHSR.

Изолированный дефицит гормона роста является самым распространенным дефицитом гормона гипофиза в результате врожденных или приобретенных причин, хотя для большинства пациентов его этиология остается неизвестной [2]. Причинами изолированного дефицита ГР могут быть дефекты в генах GH1, GHRHR. В РФ аутосомно-доминантные формы чаще вызываются гетерозиготной мутацией в GH1. Так, при обследовании пациентов с

тяжелым врожденным изолированным дефицитом ГР в России, мутации в GH1 была определена в 32,1% случаев [3].

Мутации в генах, ответственных за гипофизарные транскрипционные факторы, обеспечивающие онтогенез гипофиза или развитие и функционирование гипоталамо-гипофизарной системы, приводят к проявлениям недостаточности нескольких гормонов аденогипофиза. Проявления данной патологии будут зависеть и от тяжести дефицита ГР, и от ряда сопутствующих факторов (например, возраст диагностики заболевания, недостаточность других гормонов аденогипофиза). Фенотипические признаки также определяются фактором транскрипции, который вовлечен в патологический процесс [4].

Международные исследования, касающиеся частоты встречаемости и клинической значимости мутаций в генах, ассоциированных с гипопитуитаризмом, представлены в литературе неоднозначными, часто противоречивыми данными.

Гетерогенность по частоте встречаемости мутаций при врожденном гипопитуитаризме может быть обусловлена специфичностью методологии при проведении генетических исследований, особенностью отбора пациентов для проведения генетического анализа, а также этническими особенностями.

Целью данного исследования было изучение характера генетических изменений у пациентов с врожденной соматотропной недостаточностью, включенных в Федеральный регистр города Санкт-Петербурга больных гипофизарным нанизмом, получающих лечение препаратами гормона роста.

Материалы и методы

В настоящем исследовании были изучены данные молекулярно-генетического обследования 98 пациентов, получающих лечение препаратами гормона роста в связи с врожденной соматотропной недостаточностью. Семьи всех участников подписали информированное согласие на участие в исследовании. В исследование не включались пациенты с приобретенным дефицитом ГР, с органическими причинами задержки роста (травмы, опухоль гипофиза). У всех больных диагноз был подтвержден результатами тестов, направленных на стимуляцию секреции гормона роста. Диагностическим значением, определяющим недостаточную секрецию соматотропина при проведении теста с клонидином и теста с инсулином (с достижением гипогликемии менее 2 ммоль/л), был по-

казатель выброса гормона роста менее 10 нг/мл. У 36 пациентов имелся множественный дефицит гормонов аденогипофиза, соответственно у 62 – изолированная соматотропная недостаточность. Все пациенты на момент исследования получали заместительную терапию препаратами гормоном роста из расчета средней терапевтической дозы 0,033 мг/кг массы тела в сутки. В случаях множественного дефицита гормонов аденогипофиза проводилась адекватная потребности гормональная заместительная терапия другими препаратами.

С учетом имеющихся в литературе данных о молекулярно-генетических факторах, вовлеченных в процесс секреции гормона роста, были изучены следующие гены: GH1, GHRH, GHRHR, BTK, GHSR, PROP1, POU1F1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3, SOX2, OTX2, GLI2, ARNT2, ARPC5L, DLK1, DRD2, PAX6, RNPC3, SHH, SPCS2, SPCS3. В рамках исследования было проведено секвенирование этих генов с помощью панели customAmpliseq_HP на аппарате «IonTorrent» («Life technologies», США).

Молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования нового поколения (NGS) с помощью технологии «Амплисек» на аппарате «IonTorrent» («Life technologies», США), представляет собой определение точного порядка нуклеотидов кодирующих регионов генов. С помощью данной технологии определяется последовательность 90-95% кодирующих участков генов. Данный анализ не включает в себя исследование некодирующих регионов, хромосомных перестроек (транслокаций, делеций, дупликаций, инверсий более 30 пар нуклеотидов), полиплоидии, анеуплоидии, мозаицизм, мутации в GC-богатых участках.

Обработка результатов секвенирования образцов ДНК производилась при помощи программных пакетов bwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) и Genome Analysis ToolKit (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>). Аннотация производилась при помощи базы dbNSFP (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>), с использованием программ SnpEff и SnpSift (<http://snpeff.sourceforge.net/>). Фильтрация и интерпретация вариантов производилась при помощи программы SNVViewer (<http://genome.ifmo.ru/snviewer/>).

Верификация полученных данных проводилась методом прямого секвенирования на приборе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США).

Результаты и их обсуждение

Спектр обнаруженных генетических изменений достаточно обширен, и включает редкие находки, нечасто выявляемые при врожденном гипопитуитаризме. Несмотря на широкий спектр

выявленных мутаций, у всех пациентов эффективность заместительной терапии гормоном роста подтверждается уменьшением отклонения SDS роста через 1 год после начала заместительной терапии гормоном роста (Табл. 1).

Таблица 1

Спектр генетических мутаций, выявленных у больных с врожденной соматотропной недостаточностью, включенных в Федеральный регистр (Санкт-Петербург)

№	Пол пациента	Возраст постановки диагноза (лет)	Пик СТГ на пробе (нг/мл)	SDS роста на момент диагностики	SDS роста через 1 год лечения соматропином	ген	мутация
1	ж	10,75	1,7	-2,3	-1,06	GH1	c.130C>T
2	м	5,6	0,9	-2,03	-0,55	SOX2	p.G179V
3	м	9	2,2	-3,77	-3,01	PROP1	c.297_302delAGp. C102fsX109
4	м	9	0,83	-4,94	-4,08	PROP1	c.297_302delAGp. C102fsX109
5	м	6,5	0,6	-3,5	-1,85	PROP1	c.301_302delAG
6	м	6,25	2,5	-3,51	-2,57	PROP1	c.212G>A
7	м	5,6	0,8	-2,63	-0,97	PROP1	c.297_302delAGp. C102fsX109
8	м	8,2	6,42	-1,81	-1,6	HESX1	p.G12E
9	ж	5,3	2,75	-3,62	-1,92	PROP1	c.150delAp.D53fsX164, c.297_302delAG p.C102fsX109
10	м	14,4	2,6	-1,84	-1,69	GLI2	c.2202G>T
11	ж	9,8	8,9	-2,12	-2,26	BTK	c.1899C>T(G>A)
12	м	6,5	7,9	-1,43	-0,96	POU1F1	p.M124V
13	м	6,3	0,5	-2,65	-0,5	PROP1	c.150delA p.D53fsX164
14	ж	10,2	6,84	-2,17	-1,52	GHSR	c.837C>A
15	ж	10,2	6,94	-2,12	-1,39	GHSR	c.837C>A
16	м	14	0,4	-4,28	-3,32	ARNT2	c.1672C>T

По результатам данного исследования установлено, что частота встречаемости генетических изменений при врожденной соматотропной недостаточности различается в группе пациентов с множественным дефицитом гормонов аденогипофиза (27,7%) и у больных с изолированным дефицитом гормона роста (9,6%). Общее количество детей с врожденной соматотропной недостаточностью в Санкт-Петербурге с мутациями в генах, ассоциированных с врожденным гипопитуитаризмом, составляет 16,3%. Наиболее частыми являются мутации в гене PROP1. Отличительной особенностью молекулярно-генетических характеристик детей с изолированной соматотропной недостаточностью жителей Санкт-Петербурга является наличие мутаций в генах

ARNT2, GHSR, BTK, с редким описанием в литературе, требующее детального рассмотрения.

Важным в диагностическом алгоритме при поиске этиологического фактора соматотропной недостаточности с клинических позиций является обнаружение мутаций, свидетельствующих о множественных гормональных нарушениях (PROP1, POU1F1) [5]. Такие находки определяют необходимость своевременного назначения заместительной терапии тиреоидными гормонами (мутации в генах PROP1, POU1F1) и гормонами коры надпочечников (мутации в гене PROP1). Недостаточность гонадотропинов (гипогонадотропный гипогонадизм) в сочетании с соматотропной недостаточностью является показанием к лечению гипогонадизма на

фоне применения ростовых, а в последующем метаболических доз препаратов гормона роста.

Выявленные единичные случаи мутаций в генах ARNT2, GHSR, BTK, GLI2 у пациентов с низкой стимулированной секрецией гормона роста по диагностическим тестам являются предметом индивидуального обсуждения. Это связано с гетерогенностью клинической картины в каждом конкретном случае. Общими составляющими для пациентов с редкими генетическими мутациями являлись снижение скорости роста и низкие показатели стимулированной секреции соматотропина при проведении диагностических тестов.

Обращает на себя внимание тот факт, что мутации в гене GH1, описанные в литературе, как наиболее часто встречающиеся при врожденной изолированной соматотропной недостаточности, в нашем исследовании обнаружены у одного пациента с поздней диагностикой.

Выводы

Таким образом, невысокая частота обнаруженных мутаций (16,3%) позволяет предположить необходимость изучения более широкого спектра генов, ответственных за развитие и дальнейшее функционирование системы гипоталамус – гипофиз – инсулиноподобный фактор роста-1, определяющих функциональные взаимоотношения всех факторов, влияющих на реализацию ростовых эффектов гормональных и негормональных регуляторов роста.

Небольшое количество выявленных генетических отклонений у пациентов с низкими секреторными ответами на стимуляцию секреции гормона роста определяет необходимость поиска более значимых диагностических критериев соматотропной недостаточности с целью разработки персонализированных терапевтических подходов. Показания к проведению молекулярно-

генетических исследований при изолированной соматотропной недостаточности у детей следует индивидуализировать с учетом сопутствующей задержке роста клинической симптоматики.

Вместе с тем, молекулярно-генетические исследования у пациентов с гипофизарным низом в ряде случаев позволяют прогнозировать дальнейшее развитие заболевания и, при необходимости, корректировать проводимую гормональную заместительную терапию. Своевременное назначение тиреоидных препаратов, глюкокортикоидов и половых гормонов при выявлении мутации в гене PROP 1 определяет ростовой эффект препаратов гормона роста.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Эндокринные заболевания у детей и подростков. Руководство для врачей. Под ред. Башниной Е.Б. // ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 416 с.
2. Alatzoglou K., Kular D., Dattani M. Autosomal Dominant Growth Hormone Deficiency (Type II) // *Pediatr Endocrinol Rev.* – 2015. – Vol. 2. – № 4. – P. 347-355.
3. Fofanova O., Evgrafov O., Polyakov A. et al. A novel splicing mutation in exon 4 (456G>A) of the GH1 gene in a patient with congenital isolated growth hormone deficiency // *Hormones (Athens).* – 2006. – Vol. 5. – № 4. – P. 288-294.
4. Дедов И.И., Петеркова В.А. Детская эндокринология, руководство // М.: Универсум паблишинг, 2006. – 595 с.
5. Гаврилова А.Е., Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю., Реброва О.Ю., Тюльпаков А.Н., Петеркова В.А., Дедов И.И. Клинико-генетические особенности пациентов с множественным дефицитом гормонов аденогипофиза, обусловленным мутациями в гене PROP1: эффективность терапии рекомбинантным гормоном роста // *Проблемы эндокринологии.* – 2017. – Т. 63. – № 2. – С. 72-81.

О.С. Берсенева

Тел. +7 9112268062,

E-mail: o.berseneva@mail.ru

О.С. Берсенева, А.С. Готов, О.С. Готов, Е.А. Серебрякова, Т.Э. Ивашенко, Е.Б. Башнина, В.С. Баранов. Молекулярно-генетические характеристики детей с врожденной соматотропной недостаточностью // *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета.* – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 12–16.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS CHILDREN WITH GROWTH HORMONE DEFICIENCY

O. Berseneva¹, A. Glotov², O. Glotov², E. Serebryakova², T. Ivashenko², E. Bashnina¹, V. Baranov²

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

² The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, Saint-Petersburg, Russia

Clinical manifestations of heterogeneity of growth hormone deficiency when definitive results of hormonal stimulus test determines the need to search for molecular genetic markers of the disease to form personalized therapeutic algorithms. Molecular genetic analysis in patients with congenital hypopituitarism was carried out by new-generation sequencing (NGS) with "Amplisek" technology. All patients with congenital hypopituitarism, who are in a special registry of Saint Petersburg, were included in this study. Differences in the frequency of detection of mutations in patients with multiple anterior pituitary hormone deficiency and in patients with isolated growth hormone deficiency were found. The mutation frequency of diagnosis in genes responsible for congenital hypopituitarism in patients of St. Petersburg were studied.

Mutations in genes associated with congenital hypopituitarism were identified in 16.3% of patients with pituitary dwarfism (16 of 98). The most commonly diagnosed mutations are changes in gene PROP1. In carrying out the molecular genetic studies of patients with congenital hypopituitarism is necessary to consider the likelihood of the presence of these rare pathologies such as loss of genes GHSR, ARNT2, BTK. Currently conducting molecular genetic studies in patients with congenital hypopituitarism further predicts development of the disease and, if necessary, adjust the ongoing replacement therapy.

Key words: Congenital hypopituitarism, growth hormone deficiency, growth hormone, gene PROP1, GH1, GHRH, BTK, GHSR, GLI2, POU1F1.

Authors

O. Berseneva

Tel.: +7 9112268062

E-mail: o.berseneva@mail.ru

O. Berseneva, A. Glotov, O. Glotov, E. Serebryakova, T. Ivashenko, E. Bashnina, V. Baranov. Molecular genetic characteristics children with growth hormone deficiency // Herald of the Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov. – 2017. – T. 9. – № 4. – P. 12–16.