



УДК 612.433.65:612.6:616-053.2-036.22:575.191 <http://dx.doi.org/dopovidi2016.03.107>

Н. А. Спринчук<sup>1</sup>, В. Є. Досенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”, Київ

<sup>2</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

*E-mail:* sprinchuk@meta.ua

## Роль визначення мутації D112G в діагностиці хворих на синдром біологічно неактивного гормону росту серед дітей, що проживають на території України

*(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Д. Троньком)*

*Досліджено мутацію D112G у гені гормону росту в 50 дітей України допубертатного віку, хворих на синдром біологічно неактивного гормону росту. Дану мутацію не було виявлено. Для генетичного підтвердження синдрому біологічно неактивного гормону росту рекомендовано проводити секвенування гена гормону росту. У постановці діагнозу даного синдрому необхідно керуватися певними клінічними і лабораторними показниками.*

**Ключові слова:** синдром біологічно неактивного гормону росту, діти, мутація D112G.

Кількість причин низькорослості є найбільшою серед усіх дитячих ендокринних захворювань, чинниками її можуть бути різні ендокринні, генетичні і соматичні розлади. Соматотропний гормон (СТГ) є головним гормональним регулятором росту, його абсолютна чи відносна недостатність призводить до зниження синтезу інсуліноподібного фактору росту-1 (ІФР-1) в печінці, м'язах, кістковій і жировій тканинах [1–5]. З розвитком медичної генетики і розширенням спектра медико-генетичних досліджень стали зрозумілими деякі патогенетичні механізми вроджених форм низькорослості. Адже причини дефіциту гормону росту (ГР) можуть бути різноманітні — від порушення синтезу і секреції соматотропного гормону до порушення периферичної чутливості до його дії.

Завдяки проведенню медико-генетичних досліджень у кінці минулого сторіччя в гені ГР було описано два типи мутацій, за наявності яких він стає біологічно неактивним, і клінічно це проявляється картиною ізольованої соматотропної недостатності [6].

© Н. А. Спринчук, В. Є. Досенко, 2016

Розпізнати роль генетичних чинників без медико-генетичного дослідження дуже складно, особливо коли йдеться про патологію, яка не часто зустрічається. Синдром біологічно неактивного гормону росту (БНГР) — це генетично детерміноване захворювання, що клінічно проявляється з раннього дитинства як ізольована соматотропна недостатність. Останнім часом ця нозологія діагностується все частіше [2]. Пацієнти з синдромом БНГР вперше були описані в 1978 р. А. А. Kowarski. Він описав дівчинку віком 3,5 року з низькорослістю, яка народилася вчасно з масою тіла 3300 г і довжиною тіла 51 см. У 3 роки і 6 місяців її зріст дорівнював 79,4 см, що становило  $-3,6$  SD (Standart Deviation) від фізіологічної норми росту. Рентгенологічний вік “відставав” від хронологічного на 1,5 року. Зріст батьків був: у тата — 161 см, у мами — 147 см. Показники рівня ГР були на стимульованих пробах підвищеними, а соматомедину С — нижче референтних значень для даної вікової категорії. За умов призначення лікування ГР збільшення росту у дівчинки становило 11 см за рік від попередніх 4,5 см. Але молекулярна основа цього захворювання була розшифрована Y. Takahashi тільки в 1996 р. [5–7].

На сьогодні відомо два типи мутацій у гені ГР, які інактивують соматотропний гормон і роблять його біологічно неактивним. При першому типі мутацій (класичний гормоночутливий варіант синдрому БНГР, описаний А. А. Kowarski) пацієнти є гетерозиготними носіями мутації D112G гормону росту, де в його 112-му кодоні гліцин замінений на аспарагін. У разі призначення таким хворим препаратів ГР відзначається значне підвищення рівня соматомедину С із подальшим ростовим ефектом [5–7].

Інший тип БНГР (гормононечутливий) є мутантним ГР, де гетерозиготна міссенс-мутація R77C призводить до змін молекули ГР із заміною в 77-му кодоні нуклеотидної основи цистеїну на аргінін і ще більшою мірою, ніж при першому типі, знижує його біологічну активність. Цей мутантний гормон має домінантно негативну дію, при цьому призначення терапії ГР не підвищує рівня ІФР-I і не справляє терапевтичного ефекту [5, 8]. Цей мутантний ГР проявляє в 6 разів більшу, ніж нормальний соматропін, спорідненість до рецепторного білка, який зв’язується з ГР. Також він блокує фосфорилування тирозину в 10 разів активніше, ніж нормальний ГР, у результаті чого значно знижується рівень ІФР-1. Терапія ГР не підвищує рівня ІФР-1 і не призводить до ростового ефекту [5, 8, 9]. Але даний приклад не є типовим для синдрому БНГР і зустрічається дуже рідко. Саме Y. Takahashi описав вперше цю мутацію у сірійського 6-річного хлопчика, який значно (більше 2 SD) відставав у зрості від своєї фізіологічної норми. Дана мутація була виявлена у його мами і дідуся, але вони були нормального середнього зросту. Хлопчик не отримував специфічного лікування ГР, але в нього спостерігалася затримка в статевому розвитку, у 20 років його ріст завершився і становив 168,2 см [9].

Складнощі діагностики БНГР полягають у тому, що разом із затримкою росту і біологічного віку, секреція ГР та інші функції гіпофізу не змінюються, а єдиним гормонально зміненим проявом є значне зниження рівня соматомедину С, що також характерно для синдрому Ларона і вимагає проведення диференціальної діагностики між цими двома генетично детермінованими захворюваннями [3, 4]. Також ідентичні лабораторні і клінічні прояви можна отримати за умов соматичної патології в дітей, яка супроводжується функціональною недостатністю печінки, некомпенсованим станом ниркової патології, будь-якими захворюваннями, що супроводжуються низькою масою тіла.

З метою визначення форми синдрому БНГР і диференціальної діагностики із синдромом Ларона (рецепторна нечутливість до ГР, мутація в гені рецептора ГР, яких відкрито більше 50), а також для призначення адекватної дози ГР необхідно застосовувати чотири-

денну пробу з введенням ГР і подальшим дослідженням ІФР-1. При отриманні негативного результату проби рекомендовано проведення медико-генетичного дослідження ГР на наявність відомих мутацій D112G і R77C [5, 9].

У відділі дитячої ендокринної патології ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України” обстежено 78 дітей віком від 1 до 10 років, які страждали на синдром БНГР, серед них 31 дівчинка і 47 хлопчиків. У всіх пацієнтів та їх батьків перед проведенням певних досліджень було отримано інформовану згоду. Усі діти страждали на низькорослість і мали відставання в рості більше 2 SD від фізіологічних показників, кістковий вік був зменшений від хронологічного більш ніж на 1,5–2 роки. Оскільки рівень ІФР-1 може зменшуватися на тлі поганого харчування і некомпенсованої соматичної патології, в усіх дітей, які ввійшли до групи обстежених, було виключено патологію печінки, шлунково-кишкового тракту, нирок, легенів і серцево-судинної системи, визначався індекс маси тіла (ІМТ), який був у межах нормальних величин.

Діагноз верифіковано на підставі характерних гормональних порушень — низького рівня соматомедину С на тлі нормального або підвищеного рівня ГР за умов ІМТ не нижче 50 перцентилі для різних вікових категорій. Тиреоїдні та інші гормональні показники в усіх дітей були в межах нормальних величин, що характерно для синдрому БНГР, який проявляється як ізольована форма недостатності СТГ. Необхідно зауважити, що всі обстежені діти раніше не отримували препаратів анаболічного ряду та ГР.

У діагностиці багатьох синдромів первинного порушення росту й гено-хромосомної патології не останнє місце, а інколи і головне займає типовий фенотип хворого. Серед обстежених дітей було досліджено і проаналізовано та описано їх фенотип. При народженні більшість дітей, хворих на синдром БНГР, мали ознаки внутрішньоутробної затримки розвитку, що проявлялося більшою мірою низькими показниками росту ( $44,8 \pm 0,55$ ) см, ніж маси тіла ( $2,57 \pm 0,5$ ) кг. В подальшому на тлі різкого відставання в рості, затримки швидкості росту й кісткового дозрівання в дітей зберігалися нормальні пропорції тіла відносно вікових показників. Але у більшості дітей (78%) спостерігалися такі особливі риси обличчя, як виступаюче чоло й сідлоподібний ніс, гіпоплазія нижньої щелепи, у багатьох дітей відмічалися відстовбурчені вуха. “Яскравість” проявів фенотипу мала пряму залежність від ступеня гормональних відхилень, особливо недостатності ІФР-1. Фенотип не відрізнявся від такого у хворих з ізольованою соматотропною недостатністю, а також від дітей, які мають низькорослість внаслідок рецепторної нечутливості до ГР.

Рівень ІФР-1 у всіх хворих був значно знижений. Оскільки референтні показники відрізняються в залежності від віку і статевого розвитку, пацієнти були розподілені на три групи за віком: перша — діти віком від 1 до 4 років (14 хворих), друга — від 5 до 7 років (29 хворих), третя — від 8 до 10 років (35 хворих). Нормальні показники рівня ІФР-1 для цих груп становили відповідно 49–171, 76–299 і 247–396 нг/мл.

З метою диференційної діагностики синдрому БНГР і рецепторної нечутливості до ГР, а також для визначення форми синдрому БНГР і призначення адекватної дози соматотропного гормону застосовувалася чотириденна проба з введенням ГР і подальшим дослідженням ІФР-1. Цей тест полягав у введенні генно-інженерного СТГ у дозі з розрахунку 0,033 мг/кг на добу, підшкірно, протягом 4 днів і визначенні рівня ІФР-1 до першої ін'єкції ГР і наступного дня після завершення проби. Проба вважається позитивною, якщо рівень ІФР-1 підвищується у 2 рази і більше. Аналізуючи показники ІФР-1 на тлі проведення тесту на чутливість до ГР у всіх пацієнтів початково вміст соматомедину С був значно меншим нижньої межі референтних значень і становив у першій групі —  $21,2 \pm 3,4$  нг/мл, у другій —

59,1 ± 6,3 нг/мл, а у третій — 154,7 ± 12,8 нг/мл. Після проведення СТГ-стимульованого тесту рівень ІФР-1 зростав більше ніж в 2–3 рази і відповідав нормальним значенням відповідної вікової категорії, а саме: в першій групі збільшувався до 58,8 ± 6,5 нг/мл, у другій — до 187,2 ± 11,4 нг/мл, у третій — до 299,4 ± 16,8 нг/мл.

Відібрана група дітей у кількості 50 пацієнтів з синдромом БНГР, який був підтверджений клінічно і лабораторно, а також проба на чутливість до ГР була позитивною. Це виключає діагноз рецепторної нечутливості до ГР (синдром Ларона) і гормононечутливу форму з гетерозиготною міссенс-мутацією R77C, яка зустрічається вкрай рідко. У відібраних пацієнтів визначали наявність мутації D112G для генетичного підтвердження синдрому БНГР. У пацієнтів даної групи проводили виділення ДНК з лейкоцитів цільної крові із використанням наборів D1Atom DNA Prep (“Isogene”, Росія). В процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі.

Мутацію (rs137853221) в гені GH (C<sup>475</sup> → T, Asp<sub>138</sub> → Gly) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C\_\_27265970\_10 та 7500 Fast Real-time PCR System (“Applied Biosystems”, США). Послідовність праймерів була такою:

GH112\_F GTACGGCGCCTCTGACA,

GH112\_R GGATGCCTTCCTCTAGGTCCTTT,

а послідовність зондів: GH112\_V VIC-CAACGTCTATGACCTCCT,

GH112\_M FAM-AACGTCTATGGCCTCCT.

Програма ампліфікації складалася з 50 циклів (денатурація – 92 °С, 15 с, гібридизація та елонгація – 60 °С, 1 хв), після чого проводився аналіз по дискримінації алелей.

Контрольну групу склали 10 здорових дітей без відхилення в зрості та гормональному статусі, у яких було проведено аналогічне дослідження на виявлення мутації D112G.

Згідно з результатами дослідження хворих на синдром БНГР та практично здорових дітей (рис. 1, див. вклейку), заміна в гені ГР (C<sup>475</sup> → T, Asp<sub>138</sub> → Gly) не виявлена в жодній особі — генотип усіх генотипованих пацієнтів С/С (Asp/ Asp).

Оскільки визначення конкретної мутації для підтвердження синдрому БНГР, як показало наше дослідження, не є інформативним, бажано проводити секвенування гена ГР, але це є малодоступним для більшості нашого населення. Тому радимо дотримуватися алгоритму діагностики низькорослості за умов зниженого рівня ІФР-1 (рис. 2, див. вклейку).

Таким чином, у дітей України, хворих на синдром БНГР, генетичне дослідження не виявило мутацію D112G у гені ГР. Основними критеріями діагностики синдрому БНГР є низькорослість з певним фенотипом пацієнта і характерними лабораторними показниками, а саме: нормальний або підвищений рівень ГР, значно знижений рівень соматомедуліну С, як правило, позитивна реакція на чутливість до ГР, нормальний ІМТ, відсутність соматичної патології. Для остаточного генетичного підтвердження синдрому БНГР найбільш інформативним може бути проведення секвенування гена ГР для виявлення порушень його структури в усіх сайтах.

## Цитована література

1. *Ranke M. B.* Diagnosis of growth hormone deficiency and growth hormone stimulation tests // *Diagnosis of Endocrine Function in Children and Adolescents.* – Basel: Karger, 2003. – P. 107–128.
2. *Laron Z.* Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome) // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 1999. – 12, No 1. – P. 231–249.
3. *Gent J., Van Den Eijnden M., Van Kerkhof P., Strous G. J.* Dimerization and signal transduction of the growth hormone receptor // *Mol. Endocrinol.* – 2003. – 17. – P. 967–975.

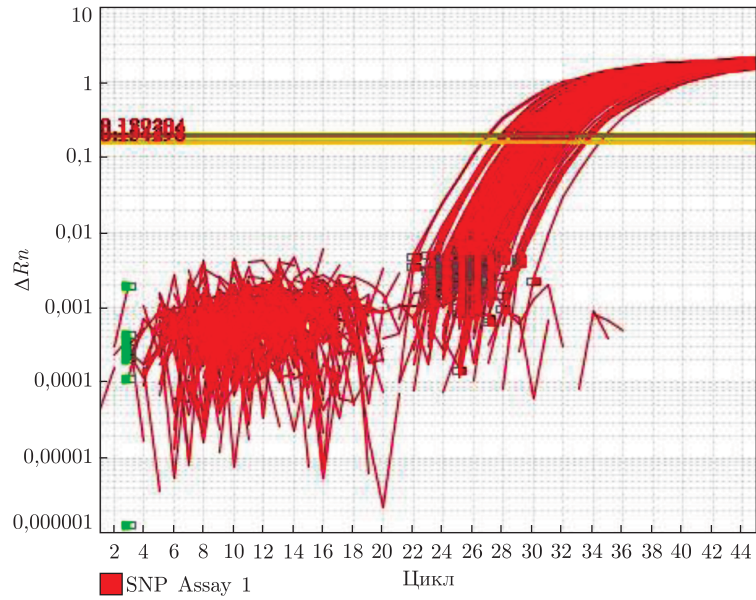


Рис. 1. Результати ампліфікації фрагменту гена ГР

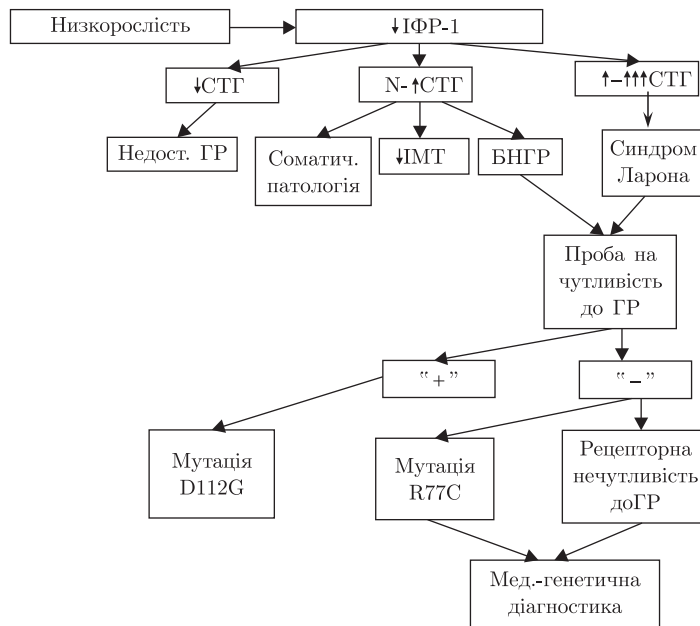


Рис. 2. Алгоритм діагностики низькорослості за умов зниженого ІФР-1

4. *Brown R. J., Adams J. J., Pelekanos R. A. et al.* Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – **12**. – P. 814–821.
5. *Takahashi K., Kaji H., Okimura Y. et al.* Brief report: short stature caused by a mutant growth hormone // *New Engl. J. Med.* – 1996. – **334**. – P. 432–436.
6. *Baneyx F., Mujacic M.* Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – **22**. – P. 1399–1408.
7. *Kowarski A. A., Schneider J., Ben-Galim E. et al.* Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1978. – **47**. – P. 461–464.
8. *Фофанова О. В.* Клинический полиморфизм и молекулярно-генетическая гетерогенность соматотропной недостаточности у детей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2000. – 61 с.
9. *Petkovik V., Thevis M., Lochmatter D. et al.* GH mutant (R77C) in a pedigree presenting with the delay of growth and pubertal development: structural analysis of the mutant and evaluation of the biological activity // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – **157**. – P. 67–74.

## References

1. *Ranke M. B.* *Diagnosis of Endocrine Function in Children and Adolescents*, Basel: Karger, 2003: 107–128.
2. *Laron Z. J.* *Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 1999, **12**, No 1: 231–249.
3. *Gent J., Van Den Eijnden M., Van Kerkhof P., Strous G. J.* *Mol. Endocrinol.*, 2003, **17**: 967–975.
4. *Brown R. J., Adams J. J., Pelekanos R. A. et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005, **12**: 814–821.
5. *Takahashi K., Kaji H., Okimura Y. et al.* *New Engl. J. Med.*, 1996, **334**: 432–436.
6. *Baneyx F., Mujacic M.* *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**: 1399–1408.
7. *Kowarski A. A., Schneider J., Ben-Galim E. et al.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1978, **47**: 461–464.
8. *Fofanova O. V.* *Clinicheskiy polymorphism i molekularno-geneticheskaya heterogennost' nedostatnosti hormona rosta u ditey: Avtoreferat duseratsia doctora med. nauk*, Moskow, 2000 (in Russian).
9. *Petkovik V., Thevis M., Lochmatter D. et al.* *Eur. J. Endocrinol.*, 2007, **157**: 67–74.

*Надійшло до редакції 30.07.2015*

**Н. А. Спринчук<sup>1</sup>, В. Е. Досенко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ГУ “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины”, Киев

<sup>2</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

*E-mail:* sprinchuk@meta.ua

## **Роль определения мутации D112G в диагностике больных синдромом биологически неактивного гормона роста среди детей, проживающих на территории Украины**

*Исследована мутация D112G в гене гормона роста у 50 детей Украины допубертатного возраста, больных синдромом биологически неактивного гормона роста. Данная мутация не была выявлена. Для генетического подтверждения синдрома биологически неактивного гормона роста рекомендовано секвенирование гена гормона роста. В постановке диагноза данного синдрома необходимо руководствоваться определенными клиническими и лабораторными показателями.*

**Ключевые слова:** синдром биологически неактивного гормона роста, дети, мутация D112G.