

МАКАЗАН НАДЕЖДА ВИКТОРОВНА

**Роль нарушений пострецепторного сигналинга в развитии  
мультигормональной резистентности и автономной  
гиперфункции эндокринных желез у детей**

14.01.02 - эндокринология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(директор – академик РАН И.И.Дедов)

Научный руководитель: **Петеркова Валентина Александровна**  
Академик РАН доктор медицинских наук, профессор,  
директор Института детской эндокринологии ФГБУ  
«НМИЦ эндокринологии» Минздрава России

Официальные оппоненты: **Петрайкина Елена Ефимовна**  
доктор медицинских наук, профессор кафедры  
доказательной медицины медицинского института  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Российский университет дружбы народов».

**Райгородская Надежда Юрьевна**  
доктор медицинских наук, доцент кафедры  
пропедевтики детских болезней, детской  
эндокринологии и диабетологии, научный сотрудник  
НИИ фундаментальной и клинической  
уронефрологии Саратовского государственного  
медицинского университета им. В.И. Разумовского.

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Российский национальный  
исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации**

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2018 года в \_\_\_\_ часов на  
заседании диссертационного совета Д.208.126.01 в ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России по  
адресу: 117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ  
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»  
Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного  
совета, доктор медицинских наук

Суркова Елена Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

В развитии мультигормональной резистентности и автономной гиперфункции эндокринных желез большую роль играет патология стимулирующей альфа-субъединицы G-белка (*Gas*), так как через нее осуществляется передача сигнала от множества гормонов: паратгормон (ПТГ), тиреотропный гормон (ТТГ), гормон-роста-рилизинг гормон, лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), адренокортикотропный гормон (АКТГ), меланоцитстимулирующий гормон, глюкагон, вазопрессин, катехоламины ( $\beta$ -адренорецепторы). *Gas* кодируется геном *GNAS*. *GNAS* имеет несколько альтернативных промоторов и первых экзонов (NESP 55, *XLas*, NESP-AS, A/B), обеспечивающих образование нескольких продуктов с одного гена. Все промоторные области альтернативных первых экзонов имеют дифференциально метилируемые регионы (ДМР), подвергающиеся метилированию на одном из аллелей *GNAS*. Экспрессия A/B происходит под контролем цис-регуляторных элементов, содержащихся в гене *STX16*, и регионе NESP55 локуса *GNAS*. Нарушение метилирования ДМР A/B приводит к подавлению образования *Gas* в тех тканях, где в норме *Gas* синтезируется только с материнского аллеля – в проксимальных почечных канальцах, щитовидной железы, гонадах, соматотрофах гипофиза, паравентрикулярных и дорсомедиальных ядер гипоталамуса. Генетические и эпигенетические нарушения в гене *GNAS*, приводящие к нарушению синтеза или снижению функции *Gas*, обуславливают развитие пострецепторной резистентности тканей- мишеней гормонов, действующих через *Gas* и развитию псевдогипопаратиреоза (ПГП). Соматические активирующие мутации в гене *GNAS*, обеспечивают гиперактивность *Gas* и автономную гиперфункцию органов и тканей, проявляющуюся комплексом клинических проявлений, объединенных в понятие синдром МакКьюна-Олбрайта-Брайцева (МОБ). Изучение патологии *Gas* и комплексного гена *GNAS* имеет важное значение для фундаментальной и практической медицины, так как эпигенетические и

генетические нарушения *GNAS* являются причиной развития тяжелых мультисистемных заболеваний.

### **Степень разработанности темы исследования**

Заболевания, обусловленные пострецепторными нарушениями сигналинга, являются предметом активного изучения в странах Европы и США. Исследование темы мультигормональной резистентности, обусловленной патологией гена *GNAS*, осуществляются в рамках работы Европейского общества по изучению псевдогипопаратиреоза. Существенную ясность в понимание клинико-генетических особенностей синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева внесли исследования зарубежных авторов, проведенные за последние 15 лет. Тем не менее, остается множество вопросов, касающихся патогенеза заболеваний, обусловленных патологией гена *GNAS*, роли молекулярно-генетического исследования в диагностике ПГП и синдрома МОБ, разработки алгоритмов обследования и лечения. Редкая частота встречаемости заболеваний не позволяет проводить исследования на больших группах пациентов, поэтому важно объединить усилия разных стран. В РФ не проводилось клинико-генетического исследования детей с псевдогипопаратиреозом и синдромом МакКьюна-Олбрайта-Брайцева, есть лишь единичные описания клинических случаев. В связи с этим, является актуальным проведение клинико-генетического исследования пациентов с заболеваниями, обусловленными дефектами гена *GNAS* в РФ, в том числе оценка генотип-фенотипической корреляции, разработка протоколов ведения пациентов с этими редкими (орфанными) заболеваниями.

### **Цель исследования**

Установить связь между клиническими проявлениями и генетическими нарушениями и разработать алгоритмы диагностики и лечения наследственных заболеваний, связанных с дефектами гена *GNAS*, приводящих к мультигормональной резистентности и автономной гиперфункции эндокринных желез у детей.

## **Задачи**

1. Анализ клинического разнообразия и вариантов течения синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.
2. Анализ клинического разнообразия и вариантов течения псевдогипопаратиреоза.
3. Анализ спектра молекулярно-генетических дефектов *GNAS* в структуре псевдогипопаратиреоза.
4. Оценка роли методов генетического тестирования соматических мутаций в диагностике синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.

## **Научная новизна**

Впервые в России проведено комплексное (молекулярно-генетическое и клиническое) исследование заболеваний, связанных с дефектами гена *GNAS*, которые приводят к нарушению пострецепторного сигналинга, мультигормональной резистентности или мультигормональной гиперфункции. Впервые в России проведен детальный клинический анализ большой выборки пациентов с псевдогипопаратиреозом – орфанным заболеванием, определен спектр клинических проявлений, установлены разные варианты течения данного заболевания. Нами были проведены генетические исследования для выявления мутаций в самом гене *GNAS* или эпигенетических нарушений с применением метода MS-MLPA и выявлены новые, неописанные ранее, генетические дефекты гена *GNAS*. Проведена оценка роли данных генетических методов для диагностики псевдогипопаратиреоза и семейного генетического консультирования. На основании полученных результатов разработаны алгоритмы диагностики и лечения псевдогипопаратиреоза. Впервые в России проведен генетический анализ с применением современных молекулярно-генетических методов для диагностики соматических в гене *GNAS* при синдроме МакКьюна-Олбрайта-Брайцева. Определена практическая ценность генетических методов в диагностике синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева. Проведено клиническое исследование с оценкой частоты и характера клинических проявлений синдрома Мак-Кьюна-Олбрайта-Брайцева в большой когорте пациентов с России, предложена шкала оценки тяжести проявлений при данном синдроме.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Оценена диагностическая значимость молекулярно-генетических методов исследования и разработаны практические рекомендации по диагностике и лечению псевдогипопаратиреоза и синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева. Редкость заболеваний, ограничивающая возможности формирования больших выборок, обуславливает значимость каждого отдельного исследования, включая настоящее – все они вносят вклад в определение спектра всех возможных клинических проявлений псевдогипопаратиреоза и синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева, создание алгоритмов диагностики и лечения и открывают дальнейшие перспективы совместных международных исследований.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

Наиболее распространенными проявлениями при синдроме МакКьюна-Олбрайта-Брайцева в изученной выборке пациентов являются пятна цвета кофе-с-молоком, периферическое преждевременное половое развитие и фиброзная дисплазия. Манифестация любых компонентов может возникать у детей до года, что обуславливает необходимость скрининга на возможные компоненты вне зависимости от возраста при выявлении синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.

Проявления наследственной остеодистрофии Олбрайта определяются при всех вариантах дефекта в гене *GNAS*. При одном и том же виде молекулярно-генетического дефекта может определяться различная клиническая картина, что не позволяет делать прогнозы о спектре возможных клинических проявлений на основании результатов молекулярно-генетического исследования и ограничивают область применения методов молекулярно-генетической верификации диагноза медико-генетическим консультированием семей.

Учитывая вариабельность клинических признаков псевдогипопаратиреоза и возможность отсроченного развития проявлений резистентности к ПТГ, детям с фенотипическими признаками наследственной остеодистрофии Олбрайта необходимо проводить обследование для исключения псевдогипопаратиреоза.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование и детекция соматических мутаций с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan™ определяют соматические мутации *GNAS* в случаях тяжелой и средней тяжести форм течения синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.

### **Степень достоверности**

Достоверность изложенных в настоящем исследовании положений, выводов и рекомендаций подтверждаются тщательным анализом научно-исследовательских работ по синдрому МакКьюна-Олбрайта-Брайцева и псевдогипопаратиреозу; согласованностью полученных результатов с известными данными; применением методов исследования с доказанной эффективностью; проведением экспериментальных методов согласно стандартам и с современными средствами измерений; применением статистического анализа для обработки полученных данных.

### **Апробация результатов**

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 29 ноября 2017 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ НМИЦ Эндокринологии Минздрава России. Результаты работы доложены на 55-ом Съезде Европейского Общества Детских Эндокринологов ESPE 2016 (Париж, Франция, 09.2016), III-ем Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, РФ, 03.2017), XIII Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Персонализированная эндокринологическая помощь в педиатрии» (Санкт-Петербург, РФ, 05.2017).

### **Благодарности**

Выражаю искреннюю признательность заведующему отделением наследственных эндокринопатий детского возраста Института Детской Эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ д.м.н. Тюльпакову Анатолию Николаевичу и сотруднику лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» к.б.н. Васильеву Евгению

Викторовичу за осуществление впервые в России молекулярно-генетического исследования соматических мутаций в GNAS. Выражаю глубокую благодарность заведующей лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБУ «Медико-Генетический Научный Центр» д.м.н. Захаровой Екатерине Юрьевне и сотруднику лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБУ «Медико-Генетический Научный Центр» Крыловой Татьяне Дмитриевне за осуществление впервые в России молекулярно-генетического исследования нарушений метилирования в GNAS.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Диссертация состоит из введения, шести глав, списка условных обозначений, использованной литературы, приложений. Общий объем работы составил 158 страниц, включая 131 страницу основного текста, содержит 27 рисунок, 17 таблиц. Список литературы включает 179 наименований.

### **Материалы и методы**

*Дизайн исследования:* одномоментное наблюдательное исследование двух независимых несравнимых выборок пациентов от 0 до 18 лет с использованием ретроспективно полученной информации. В первую выборку были включены пациенты с псевдогипопаратиреозом (ПГП). Вторая выборка состояла из пациентов с синдромом МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.

*Критерии включения в выборку пациентов с ПГП:* 1) Повышенный ПТГ + гипокальциемия + гиперфосфатемия; 2) Повышенный ПТГ при нормальных уровнях кальция и/или фосфора в сочетании с фенотипом наследственной остеодистрофии Олбрайта (НОО) и/или мультигормональной резистентностью.

Наличие фенотипа НОО устанавливалось при выявлении компонентов НОО. Специфические компоненты: брахидактилия, подкожные кальцификаты. Неспецифические компоненты: ожирение (SDS ИМТ более 2), округлое лицо, низкорослость (SDS роста менее 2), умственная отсталость. Мультигормональная резистентность устанавливалась при наличии нечувствительности к другим гормонам, действующим через Gas



(резистентность к ТТГ и/или к ГР-РГ, и/или ЛГ/ФСГ). Наличие двух и более признаков НОО определялось как клиническое соответствие ПГП типа Ia, тогда как наличие резистентности к ПТГ при отсутствии более двух компонентов НОО рассматривалось как ПГП Ib.

*Критерии включения в выборку пациентов с синдромом МакКьюна-Олбрайта-Брайцева:* наличие двух из трех классических признаков: пятна цвета «кофе-с-молоком», фиброзная дисплазия, одно из проявлений автономной гиперфункции органов-мишеней для гормонов, действующих через Gas (периферическое преждевременное половое развитие, макроорхидизм у мальчиков, неаутоиммунный тиреотоксикоз, СТГ-гиперсекреция, АКТГ-независимый гиперкортицизм, гиперфосфатурическая гипофосфатемия).

*Критериями исключения* при формировании выборки по изучению клинических особенностей ПГП являлся дефицит витамина D как причина имевшихся нарушений кальций-фосфорного обмена, хроническая почечная недостаточность, несогласие пациентов и/или их представителей на участие в исследовании клинических особенностей ПГП. Критериями исключения при формировании выборки по изучению клинических особенностей синдрома МОБ являлись несогласие пациентов и/или их представителей на участие в исследовании клинических особенностей синдрома МОБ. Критериями исключения при наборе биологического материала являлись несогласие пациентов и/или их представителей на участие в молекулярно-генетическом исследовании, несоответствие качества биологического образца необходимым для выполнения исследования критериям. Обследование пациентов включало в себя измерение показателей роста и веса с расчетом стандартного отклонения при помощи компьютерной программы Auxology версия 1.0 b17 (Pfizer, New York, NY, USA). Лабораторные исследования проводились на базе клинικο-диагностической лаборатории ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России (зав. отделением Ильин А.В.). Значения биохимических и гормональных показателей сыворотки крови оценивались в соответствии с нормативными значениями, определенными для каждого возрастного периода. Лучевые методы

исследования осуществлялись на базе отделения лучевой диагностики ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России (зав.отделением д.м.н. Воронцов А.В.). Ультразвуковая диагностика выполнялась заведующей отделением ультразвуковой диагностики к.м.н. Солдатовой Т.М. и врачом ультразвуковой диагностики Артемовой А.М. Молекулярно-генетическое обследование проведено на базе лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России под руководством д.м.н. Тюльпакова А.Н. и на базе лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» под руководством д.м.н. Захаровой Е.Ю.

*Первый этап исследования – клиническое обследование.* В обеих группах регистрировались варианты манифестации заболеваний, исследовался спектр клинических проявлений, проводился скрининг осложнений (см.рисунок 1).

Пациентам с МОБ определялась тяжесть течения заболевания в зависимости от проявлений. Степень тяжести определялась по разработанной нами шкале оценки тяжести течения отдельных проявлений. Каждый признак оценивался по шкале от 1 до 5 баллов. Тяжелая степень устанавливалась при общем сумме баллов от 15, средняя степень тяжести - от 5 до 15 баллов, легкая степень – до 5 баллов.



*Второй этап исследования* – исследование спектра генетических дефектов в *GNAS* при ППП, оценка диагностической значимости примененных молекулярно-генетических методов исследования соматических мутаций в *GNAS* при синдроме МОБ. Пациентам проводился забор образцов периферической крови в пробирки с ЭДТА. Выделение ДНК из образцов периферической крови выполнено набором PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies K1820). Оценка концентрации ДНК в полученных образцах проводилась с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Life Technologies) и спектрофотометра с оценкой отношения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм. Образец считался чистым, если отношение значений 260нм/280нм было более 1,7.

Пациентам, чья клинико-лабораторная картина соответствовала ППП Ia, в первую очередь проводился поиск мутаций в гене *GNAS*. Статус впервые выявленной мутации присваивался при отсутствии описания мутации в базе данных генеративных мутаций в генах человека Human Gene Mutation Database, HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Для оценки патогенности впервые выявленных новых миссенс-мутаций были использованы программы компьютерного предсказания патогенности: MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>). При отсутствии данных за наличие мутаций в гене *GNAS*, пациентам с ППП Ia проводилось исследование дефектов метилирования. Пациентам с ППП Ib в первую очередь проводилось исследование дефектов метилирования *GNAS* и делеций в *STX16*. Молекулярно-генетическое исследование *GNAS* проводилось пациентам с установленным диагнозом синдром МОБ и в группе пациентов с подозрением на этот диагноз (наличие одного критерия) двумя различными методами выявления соматических мутаций – методом детекции соматических мутаций с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan™, Life Technologies, Inc (CAST-PCR) и методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (Next generation

sequencing, NGS) на платформе PGM™ (Personal Genome Machine) Ion Torrent (Life Technologies, США).

*Третий этап – анализ данных.* Статистическая обработка данных проводилась с помощью прикладных программ Statistica 13.2 En (StatSoftInc., USA). Для описания количественных данных выборки указывалось число объектов исследования и медиана с интерквартильным размахом в виде Me [Q1;Q3]. Качественные данные выборки представлялись с указанием абсолютной и относительной частот признака. Относительная частота признака выражалась в процентах в виде целых чисел для выборок с числом объектов от 20 до 100. Числовые данные округлялись по правилам арифметического округления. Ширина распределения относительной частоты признака представлялось в виде 95% доверительного интервала с указанием нижней и верхней границы, рассчитанного методом Клоппера-Пирсона. Для оценки различий между выборками использовались критерии непараметрической статистики. Сравнение независимых групп по количественным признакам проводилось путем проверки статистических гипотез с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для сравнения зависимых групп по количественным и качественным порядковым признакам использовался критерий Вилкоксона. Критический уровень значимости различий принимался равным 0,05.

## **Результаты исследования**

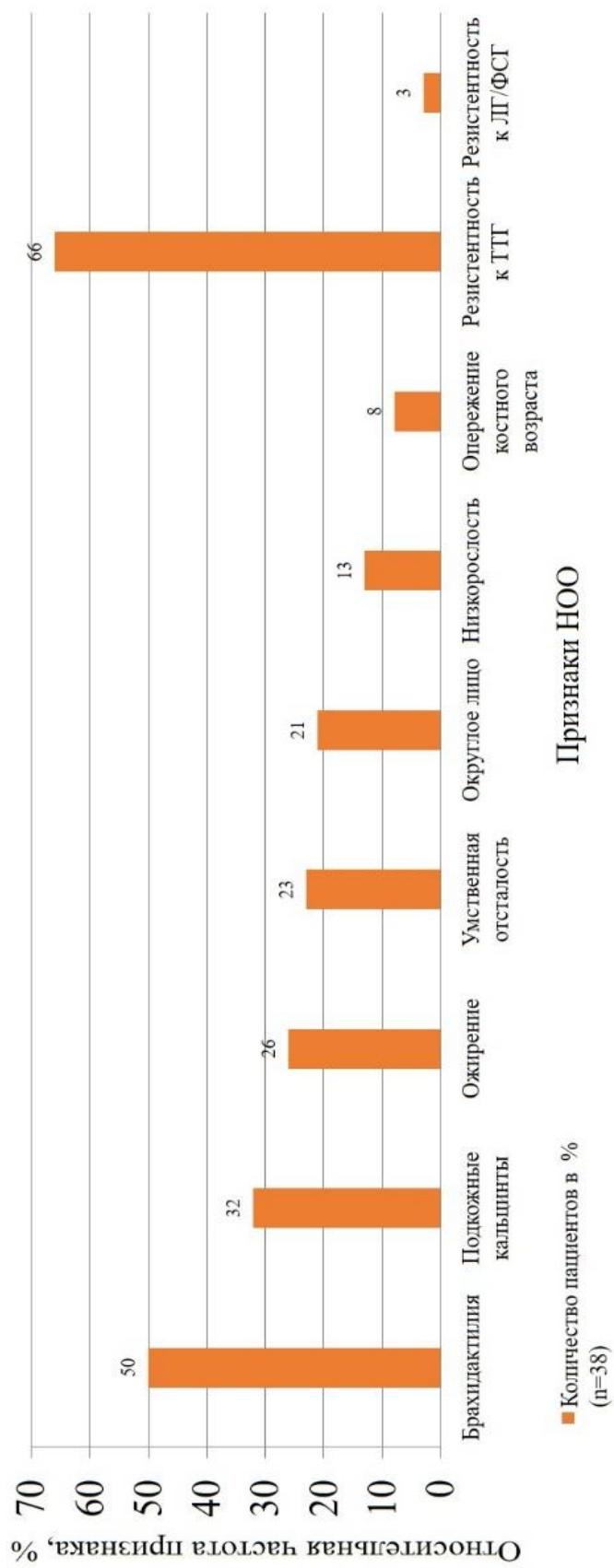
### **Клиническая характеристика пациентов с ПГП.**

Обследовано 38 пациентов с ПГП из 37 семей: 36 неродственных случая, 2 пациента являлись братом и сестрой. Медиана возраста на момент диагностики составила 11,8 лет [8,9; 13,2], возраст варьировал от 0,8 до 17 лет. Клинические признаки НОО у одного из родителей отмечались в трех случаях из 37 семей (8%; 3/37). Выделено 3 причины первичного обращения к врачу и/или манифестации заболевания: проявления гипокальциемии (68%, 95% ДИ: 51% - 83%, 26/38), раннее прогрессирующее ожирение (24%, 95% ДИ: 11% - 40%, 9/38),

брахидактилия (5%, 95% ДИ: 1% - 18%, 2/38). Один пациент обследован в связи с заболеванием у сестры (3%, 95% ДИ: 0,1% - 14%, 1/38).

Нарушения кальций-фосфорного обмена при ПГП имели ряд особенностей: в дебюте заболевания у 18% пациентов (95% ДИ: 8% - 34%, 7/38) уровень кальция ионизированного был в пределах нормы и гипокальциемия развилась позднее. Клинические проявления гипокальциемии были неспецифичны и вариабельны – от ларингоспазма до генерализованных тонических судорог. Сходность проявлений с эпи-приступом обусловил позднюю диагностику гипокальциемии в 45% случаев (95% ДИ: 26% - 64%, 13/29), когда пациентам первоначально был установлен диагноз эпилепсия и назначена противосудорожная терапия с продолжительностью лечения от 6 месяцев до 7 лет.

Оценка компонентов ПГП позволила выделить 4 фенотипических варианта течения ПГП: изолированная ПТГ-резистентность - 26% (95%ДИ: 13% - 43%, 10/38), ПТГ-резистентность в сочетании наследственной остеодистрофией Олбрайта – 11% (95% ДИ: 3% - 25%, 4/38), мультигормональная резистентность без компонентов НОО - 16% (95%ДИ: 6% - 31%, 6/38), мультигормональная резистентность в сочетании с наследственной остеодистрофией Олбрайта - 47% (95% ДИ: 31% - 64%, 18/38). Визуализация распространенности признаков НОО в выборке представлена на рисунке 2, в таблице 3 указаны фенотипические варианты пациентов.



**Рисунок 2. Варианты и частота встречаемости компонентов псевдогипопаратиреоза (n=38)**

**Таблица 1. Таблица 3. Варианты фенотипов пациентов с ПГП (n=38).**

<b>Компоненты ПГП</b>	<b>Кол-во пациентов</b>
Резистентность к ПТГ	10
Резистентность к ПТГ + брахидактилия	2
Резистентность к ПТГ + ожирение + круглое лицо	2
Резистентность к ПТГ и к ТТГ	6
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + Низкорослость+ опережение костного возраста	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + умственная отсталость	2
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ +брахидактилия + подкожные кальцинаты + ожирение	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты + умственная отсталость	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты + низкорослость	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты + низкорослость + умственная отсталость	3
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + ожирение + круглое лицо	1
Резистентность к ПТГ + к ТТГ + брахидактилия + ожирение + круглое лицо + умственная отсталость + резистентность к ЛГ/ФСГ	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ +брахидактилия + подкожные кальцинаты + ожирение+круглое лицо	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты + ожирение+круглое лицо + умственная отсталость	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия + подкожные кальцинаты + ожирение+ круглое лицо +опережение костного возраста	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + брахидактилия +подкожные кальцинаты + ожирение+ круглое лицо + умственная отсталость + опережение костного возраста	1
Резистентность к ПТГ и к ТТГ + подкожные кальцинаты +ожирение +округлое лицо + опережение костного возраста	1



## Результаты молекулярно-генетического исследования гена *GNAS* при различных вариантах ПГП.

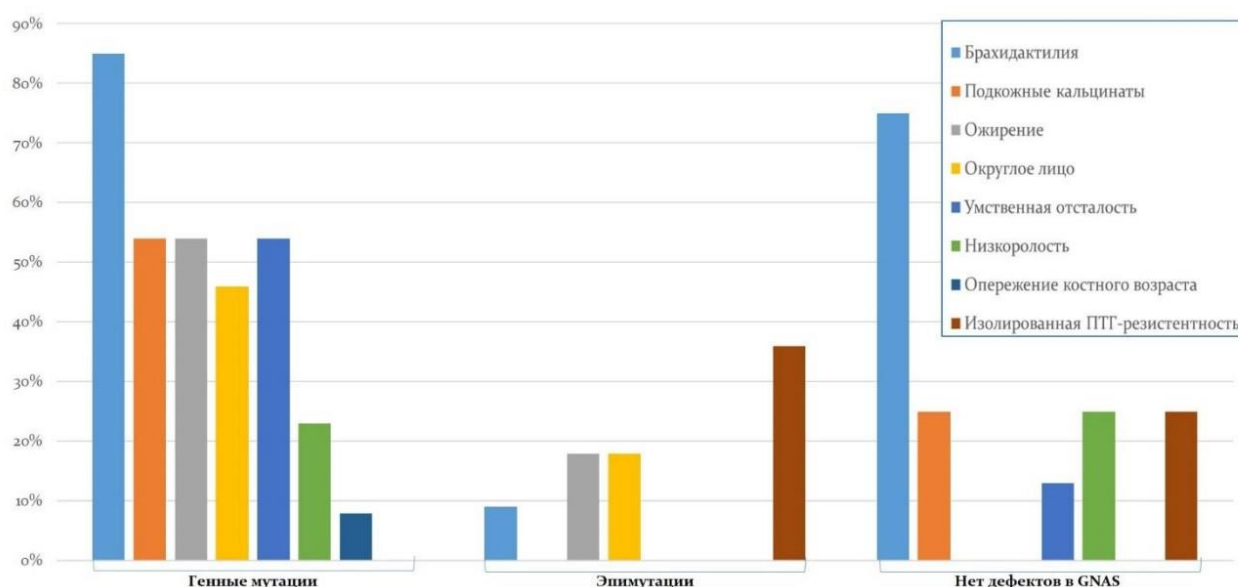
Образцы ДНК для молекулярно-генетического исследования были доступны у 32 пациентов с ПГП. Дефекты в *GNAS* выявлены в 75% (95% ДИ: 57 – 89%, 24/32), из них генные мутации в *GNAS* отмечались в 41% (95% ДИ 24% - 59%, 13/32) и были представлены в 85% случаев (11/13) гетерозиготными мутациями и в 15% (2/13) крупными делециями (потеря нескольких экзонов). Все выявленные мутации были патогенны и, за исключением одной мутации, выявлены впервые. Описанный ранее молекулярно-генетический дефект был выявлен у 4 человек из 11, двое из которых были родственники. При анализе локализации мутаций по экзонам, установлено, что подавляющее большинство дефектов – 63% мутаций (n=7/11) были выявлены в 7 экзоне, остальные определялись во 2, 5, 6, 12 экзонах. Характеристика мутаций представлена в таблице 2.

**Таблица 2. Характеристики выявленных мутаций в гене *GNAS* (n=11).**

Экзон	n	нуклеотидная последовательность	аминокислотная последовательность	Тип мутации	Патогенность	Описана/ впервые выявлена
12	1	NM_000516.4:c.G1032C	p.E344D	Несинонимич замена	патогенная	Впервые выявлена
7	1	NM_000516.4: c.550dupG	p.V184GfsX6	Дупликация	патогенная	Впервые выявлена
7	4	NM_000516.4: c.565_568delGACT	p.D189MfsX14	Делеция	патогенная	HGMD CD920862
7	2	NM_000516.4: c.576delG	p.A193fsX203	Делеция	патогенная	Впервые выявлена
6	1	NM_000516.4: c.467A>T; c.468T>A	p. D156V p.D156E	Несинонимич. замена	патогенная	Впервые выявлена
2	1	NM_000516.4: c.199delG	p.G68Lfs*32	Делеция	патогенная	Впервые выявлена
5	1	NM_000516.4: c.343insC	p.P117Rfs*139	Инсерция	патогенная	Впервые выявлена

Эпимутации в *GNAS* были выявлены у 34% (95% ДИ 19% - 53%, 11/32). Изолированное нарушение метилирования ДМР A/B *GNAS* было выявлено в двух случаях (18%, 2/11). Множественное нарушение метилирования ДМР *GNAS* выявлены в 6 случаях (55%, 6/11). Нарушение метилирования A/B в сочетании с

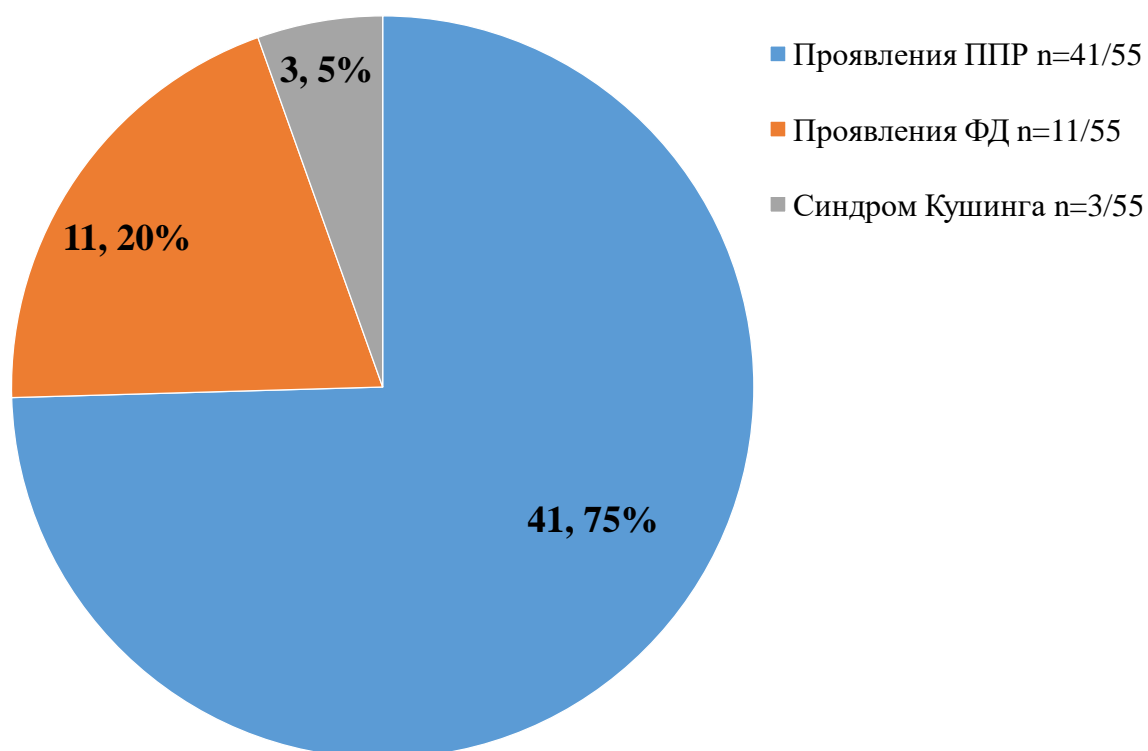
делециями в *STX16* были выявлены в трех случаях, из них в одном случае установлено наследование от матери. У 8 пациентов не обнаружено молекулярно-генетических дефектов *GNAS* и *STX16*. Проявления НОО определялись как при мутациях в гене *GNAS*, так и при эпимутациях. Соответствие спектра клинических проявлений характеру дефекта *GNAS* при ПГП представлено на рисунке 3.



**Рисунок 3. Клинические проявления и характер дефекта *GNAS* при ПГП**

### **Клиническая характеристика пациентов с синдромом МОБ**

В исследование были включены 55 пациентов (44 девочки, 11 мальчиков) с синдромом МОБ. Медиана возраста пациентов на момент первичного обследования составляла 2 года [1,7;5,5], возраст варьировал от 0,5 до 11 лет. Варианты манифестации представлены на рисунке 4. Распространенность найденных признаков синдрома МОБ представлена в таблице 3.



**Рисунок 4. Варианты клинической манифестации синдрома МОБ - причина первичного обращения к врачу, n=55.** ППР – периферическое преждевременное половое развитие. ФД – фиброзная дисплазия.

**Таблица 3. Частота проявлений различных признаков синдрома МОБ**

Признак синдрома МОБ	% пациентов (n=55, 44 девочки, 11 мальчиков)
Фиброзная дисплазия	78% (95% ДИ: 65% - 88%, 43/55),
Пятна цвета «кофе-с-молоком»	84% (95% ДИ: 71% - 92%, 46/55)
Девочки: пППР	98% (95% ДИ: 88% - 99%, 43/44)
Мальчики: макроорхидизм без ППР	64 % (95% ДИ: 31% - 89%, 7/11)
Мальчики: пППР	36% (95% ДИ: 11% - 69%, 4/11)
Диффузные/узловые изменения щ.ж. (УЗИ)	35% (95% ДИ: 22% - 49%, 19/55)
Тиреотоксикоз	13% (95% ДИ: 5% - 24%, 7/55)
Гипофосфатемия	33% (95% ДИ: 21% - 47%, 18/55)
Гиперсекреция СТГ	26% (95% ДИ: 15% - 39%, 14/55)
Аденома гипофиза (СТГ-секретирующая)	7% (95% ДИ: 2% - 15%, 4/55)
Синдром Кушинга	9% (95% ДИ: 3% - 20%, 5/55)
Тахикардия (не связанная с тиреотоксикозом)	20 % (95% ДИ: 10% - 33%, 11/55)

## Результаты молекулярно-генетического исследования гена *GNAS* при синдроме МОБ.

Молекулярно-генетическое исследование было проведено 39 пациентам с синдромом МОБ и 6 детям, у которых был заподозрен диагноз МОБ, но на момент обследования было недостаточно клинических критериев (девочки с эпизодами кровотечений при исключенном центральном генезе ППР и пациенты с изолированной фиброзной дисплазией и отсутствием других клинических признаков синдрома МОБ). Также исследование проведено у 7 здоровых людей. Мутации в гене *GNAS* p.R201C и p.R201H были найдены у 16 пациентов с синдромом МОБ (41% 16/39). У детей с подозрением на МОБ и у здоровых людей мутации выявлены не были. Показатели диагностической значимости примененных молекулярно-генетических методов исследования соматических мутаций *GNAS* указаны в таблице 4.

**Таблица 4. Показатели диагностической значимости примененных молекулярно-генетических методов исследования соматических мутаций *GNAS*.**

	Пациенты с синдромом МОБ	Контрольная группа	Всего
Положительный результат	16	0	16
Отрицательный результат	23	7	30
Всего	39	7	
Чувствительность метода: 0,41 (41%, 95%ДИ 26% - 58%) Специфичность метода: 1,0 (100%, 95%ДИ 60 – 100%) Прогностическая значимость положительного результата: 1,0 Прогностическая значимость отрицательного результата: 0,23 (23%, 95% ДИ 19% – 28%) Точность: 0,5 (50%, 95%ДИ 35% - 65%)			

Полученные результаты молекулярно-генетического исследования были сопоставлены с тяжестью течения заболевания и количеством проявлений синдрома МОБ. Результаты представлены в таблицах 5 и 6.

**Таблица 5. Частота обнаружения мутаций в *GNAS* p.R201C и p.R201H в зависимости от тяжести течения заболевания.**

Степень тяжести	Количество пациентов с данной формой течения заболевания	Количество пациентов с найденной мутацией
Тяжелое	8	88% (7/8) 95% ДИ: 47% - 100%
Средней тяжести	17	53% (9/17) 95% ДИ: 28% - 77%
Легкой степени	14	0% (0/14) 95% ДИ: 0% - 23%
Один компонент МОБ	6	0% (0/6) 95% ДИ: 0% - 46%

**Таблица 6. Частота обнаружения мутаций в *GNAS* p.R201C и p.R201H в зависимости от количества имеющихся проявлений.**

Степень тяжести	Количество пациентов с данной формой заболевания	Количество пациентов с найденной мутацией
Пациенты с классической триадой и мультигормональной гиперфункцией	14 36% (95% ДИ: 21% – 53%)	64% (9/14) 95% ДИ: 35% - 87%
Пациенты с классической триадой (пятна цвета кофе-с-молоком, ФД, поражение одного органа эндокринной системы)	14 36% (95% ДИ: 21% – 53%)	50% (7/14) 95% ДИ: 23% - 77%
Пациенты с двумя признаками МОБ	11 28% (95% ДИ: 15% – 45%)	0%(0/11) 95% ДИ: 0% - 28%
МОБ под сомнением	6	0% (0/6) 95% ДИ: 0% - 46%

## Выводы

1. Нарушения пострецепторного сигналинга вследствие инактивирующих мутаций и нарушений метилирования в гене *GNAS* выявлены у 75% пациентов с клинической картиной псевдогипопаратиреоза. Генные мутации в *GNAS* были выявлены в 41% и эпимутации в *GNAS* в 34% случаев.

2. Выделено четыре клинических варианта течения псевдогипопаратиреоза: мультигормональная резистентность в сочетании с наследственной остеодистрофией Олбрайта (47%), изолированная ПТГ-резистентность (26%), мультигормональная резистентность без компонентов

наследственной остеодистрофии Олбрайта (16%), ПТГ-резистентность в сочетании наследственной остеодистрофией Олбрайта (11%).

3. Компоненты наследственной остеодистрофии Олбрайта встречаются при всех вариантах молекулярно-генетических дефектов в *GNAS*: в 100% случаев при мутациях в гене *GNAS* и в 64% при эпимутациях в *GNAS*.

4. Автономная гиперфункция эндокринных желез при синдроме МакКьюна-Олбрайта-Брайцева чаще всего представлена нарушением функции гонад: периферическое преждевременное половое развитие у 98% девочек, тогда как у мальчиков в 64% отмечался макроорхидизм при отсутствии признаков прогрессии полового развития и в 36% - периферическое преждевременное половое развитие. С меньшей частотой отмечались тиреопатии (35%), гиперсекреция СТГ (26%), синдром Кушинга (9%).

5. Среди неэндокринных компонентов синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева у 84% пациентов имелись пятна цвета «кофе-с-молоком» и в 78% отмечалась фиброзная дисплазия, реже встречались гипофосфатемия (33%) и автономная тахикардия (20%).

6. Мультисистемный характер синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева был представлен тремя вариантами течения: классическая триада признаков и мультиэндокринная гиперфункция (36%), классическая триада с поражением одного органа эндокринной системы (36%), наличие двух признаков синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева (28%)

7. Методы высокопроизводительного параллельного секвенирования и детекции соматических мутаций с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan™ по ДНК, полученной из периферической крови, позволяют выявить мутации в *GNAS* R201C и R201H в 88% при тяжелом течении синдрома МакКьюна-Олбрайта-Брайцева и только в 53% при средней тяжести течения заболевания.

## Практические рекомендации

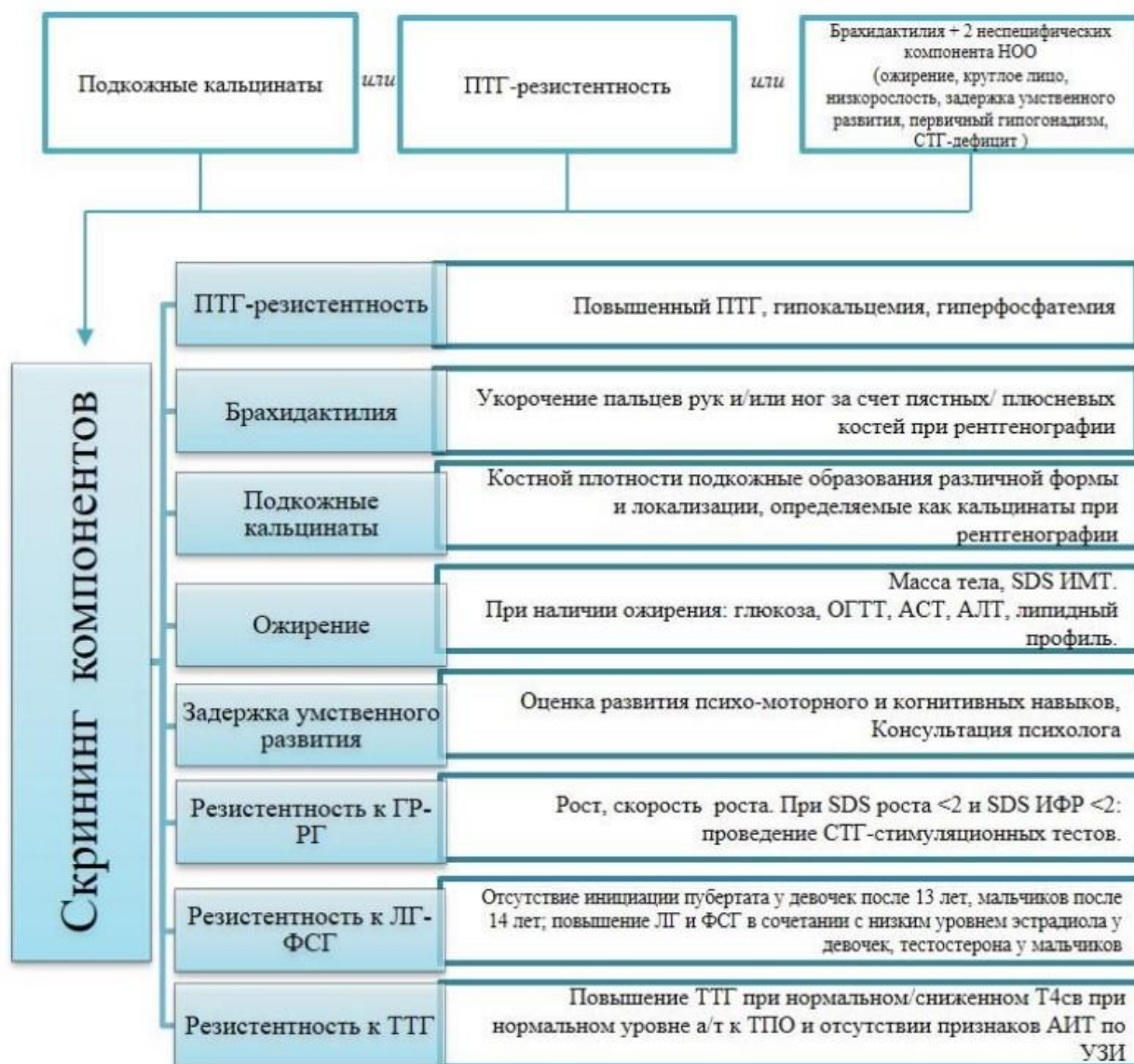
1. Пациентам с псевдогипопаратиреозом и проявлениями наследственной остеодистрофии Олбрайта рекомендуется в первую очередь проводить детекцию мутаций в гене *GNAS*. Пациентам с псевдогипопаратиреозом при отсутствии мутаций в *GNAS* и пациентам с псевдогипопаратиреозом и отсутствием проявлений наследственной остеодистрофии Олбрайта следует исследовать дефекты метилирования *GNAS* и детекцию микроделений *STX16* методом метил-специфической мультиплексной амплификации лигированных зондов с последующим медико-генетическим консультированием семьи при выявлении дефектов в *GNAS*.

2. Всем детям с судорожным синдромом рекомендуется проводить исследование показателей кальций-фосфорного обмена с целью ранней диагностики псевдогипопаратиреоза.

3. Детям с ранними формами прогрессирующего ожирения, с неиммунным и не врожденным первичным гипотиреозом рекомендуется исключение псевдогипопаратиреоза в рамках проводимой дифференциальной диагностики причины заболевания

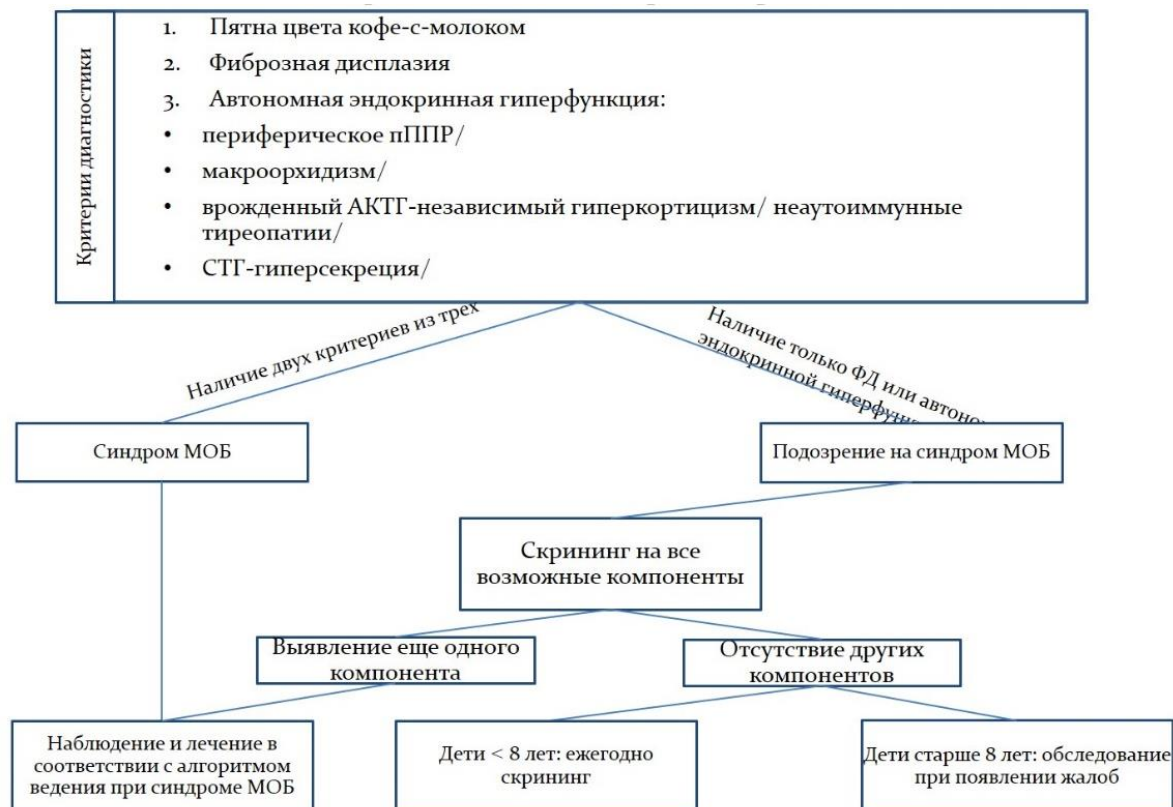
4. Синдром МакКьюна-Олбрайта-Брайцева устанавливается на основании клинических критериев, тогда как имеющиеся на сегодняшний день методы генетической диагностики не могут являться ключевыми. Критериями диагностики являются пятна цвета «кофе-с-молоком», фиброзная дисплазия, автономная эндокринная гиперфункция. Клинические компоненты могут манифестировать на протяжении всей жизни, поэтому рекомендуется регулярный скрининг на наличие возможных новых компонентов. При наличии фиброзной дисплазии или одной из возможных при синдроме МОБ автономной эндокринной гиперфункции рекомендуется скрининг на все возможные компоненты и наблюдение в динамике.

## Приложения: критерии диагностики и скрининг компонентов при псевдогипопаратиреозе и синдроме МОБ



**Рисунок 5. Критерии диагностики и показания к скринингу по псевдогипопаратиреозу.**





**Рисунок 6. Скрининг компонентов при синдроме МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.** пППР – периферическое преждевременное половое развитие, ФД – фиброзная дисплазия.

Скрининг компонентов	Синдром Кушинга (у детей до 1 года)	Оценка весо-ростовых показателей при рождении и в динамике, АКТГ, кортизол, суточный ритм секреции кортизола
	Фиброзная дисплазия	Остеогаммасцинтиграфия костей скелета, Rg конечностей, МСКТ головы
	пППР	ЛГ, ФСГ, Э2, тестостерон, проба с аналогом Гн-РГ. УЗИ органов малого таза/мошонки. Rg кистей рук.
	СТГ-гиперсекреция	СТГ, ИФР-1, SDS ИФР-1, тест на подавление СТГ, МРТ головы.
	Тиреопатии	ТТГ, т4св, Т3св, УЗИ щитовидной железы, ТАБ
	Гипофосфатемический рахит	Фосфор и креатинин крови, фосфор и креатинин разовой порции мочи, оценка экскреции фосфора с мочой
	Тахикардия и осложнения со стороны ССС	ЧСС, Холтер-мониторирование ЭКГ, ЭХО-КГ
	Патология гепато-билиарного тракта	АСТ, АЛТ, УЗИ органов брюшной полости

**Рисунок 7. Скрининг компонентов при синдроме МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.**

## Список работ, опубликованных автором по теме диссертации.

1. Маказан Н.В., Орлова Е.М., Карева М.А. Псевдогипопаратиреоз: обзор литературы. // Проблемы эндокринологии. — 2015. — Т. 61-3. С. 47-56
2. Н.В. Маказан, Е.М. Орлова, М.А. Карева, И.В. Поддубный, К.Н. Толстов, Г.А. Полякова, П.С.Богданова, В.А. Петеркова. Синдром Кушинга у новорожденного мальчика с синдромом МакКьюна-Олбрайта. // Проблемы эндокринологии. — 2016. — Т. 62-3. С. 9 -15
3. Makazan Nadezhda «Generalized glucocorticoid resistance in an adolescent girl». // Hormone Research in Pediatrics . — 2015. — Vol. 84, Suppl. 1.
4. Makazan Nadezhda «Variable Phenotype and Genetic Findings in a Cohort of Patients with Pseudohypoparathyroidism». // Hormone Research in Pediatrics. — 2016. — Vol. 86, Suppl. 1.
5. Маказан Н.В. «Заболевания, обусловленные дефектами в гене *GNAS*». //Материалы конференции «XIII Российская научно-практическая конференция детских эндокринологов «Персонализированная эндокринологическая помощь в педиатрии», Санкт-Петербург, Россия 20.05.17 – 21.05.17
6. Makazan Nadezhda, Elizaveta Orlova, Natalya Zubkova, Maria Kareva, Valentina Peterkova «Management of Cushing syndrome in children with Mccune-albright syndrome is a challenging task». // Hormone Research in Pediatrics. — 2017. — Vol. 88, Suppl. 1.
7. Карева М.А., Маказан Н.В., Орлова Е.М., Поддубный И.В., Петеркова В.А. Синдром Кушинга у ребенка первого года жизни //Проблемы эндокринологии. — 2017. — Т. 63. —№ 2. С. 92-97.
8. Маказан Н.В., Орлова Е.М., Тозлиян Е.В., Меликян М.А., Карева М.А., Калинин Н.Ю., Петеркова В.А. «Клинический полиморфизм псевдогипопаратиреоза у детей //Проблемы эндокринологии. — 2017. — Т. 63. —№ 3. С. 148-161.
9. Маказан Н.В., Орлова Е.М., Колодкина А.А., Карева М.А., Калинин Н.Ю., Васильев Е.В., Тюльпаков А.Н., Петеркова В.А. «Роль молекулярно-генетических методов исследования в диагностике синдрома МакКьюна—Олбрайта—Брайцева» // Проблемы эндокринологии. — 2017. — Т. 63. — №6.

## Список сокращений

ПГП – псевдогипопаратиреоз.

Синдром МОБ – синдром МакКьюна-Олбрайта-Брайцева.

G-белок - гуанин-нуклеотид связанный белок, guanine nucleotide-binding protein.

Gas - стимулирующая  $\alpha$ -субъединица G-белка.

GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) - комплексный локус, кодирующий Gas и другие продукты.

NESP55 - хромограниноподобный нейроэндокринный специфический белок массой 55 кДа.

XLas, extra large Gas – экстра-крупная изоформа стимулирующей альфа-субъединицы G белка. STX16 (syntaxin 16) – ген, кодирующий белок синтаксин 16.

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

ПТГ – паратгормон.

ТТГ – тиреотропный гормон.

ГР-РГ- гормон-роста-рилизинг гормон.

ЛГ – лютеинизирующий гормон.

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон.

АКТГ – адренокортикотропный гормон.

МСГ – меланоцитостимулирующий гормон.

ССТ - сайт старта транскрипции промоторных областей альтернативных первых экзонов.

ДМР - дифференциально метилируемый регион.

НОО - наследственная остеодистрофия Олбрайта.