

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АНОСОВА Татьяна Александровна

**АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ НЕКЛАССИЧЕСКОЙ ФОРМЫ
ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ
И КЛИНИКО-ГОРМОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ
У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**

14.01.02 - эндокринология

**Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
А.Н. Тюльпаков

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Определение, классификация, патогенез, клинические проявления дефицита 21-гидроксилазы в различных возрастных группах.....	11
1.2. Диагностика дефицита 21-гидроксилазы.....	17
1.2.1. Гормональные маркеры дефицита 21-гидроксилазы и методы их измерения.....	18
1.2.2. Молекулярная диагностика дефицита 21-гидроксилазы	25
1.3. Распространенность, заболеваемость, частота. Закон Харди-Вайнберга.....	29
1.3.1. Распространенность дефицита 21-гидроксилазы в различных популяциях.....	31
1.4. Принципы лечения дефицита 21-гидроксилазы.....	36
1.5. Клинические описания детей раннего возраста с неклассической формой 21- гидроксилазы	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56
3.1. Распространенность неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы в российской популяции.....	56
3.2. Применение метода тандемной хромато-масспектрометрии для оценки стероидного профиля у детей с подозрением на врожденную дисфункцию коры надпочечников.....	65
3.3. Клинико-гормональные и молекулярно-генетические характеристики детей раннего возраста с генетически верифицированной неклассической формой 21-гидроксилазы.....	79
3.4. Критерии диагностики неклассической формы 21-гидроксилазы и разработка референсных значений основных стероидов сыворотки крови с использованием метода тандемной хромато-масспектрометрии	100
3.4.1. Критерии диагностики неклассической формы 21-гидроксилазы с использованием метода тандемной хромато-масспектрометрии	100
3.4.2. Референсные значения основных стероидов сыворотки крови с использованием метода тандемной хромато-масспектрометрии	116

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	119
ВЫВОДЫ.....	137
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) представляет собой группу аутосомно-рецессивно наследуемых заболеваний коры надпочечников, в основе которых лежит дефект одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в биосинтезе кортизола в коре надпочечников. Различают классические и неклассические варианты заболевания. Наиболее распространенной и хорошо изученной является дефицит 21-гидроксилазы (р450с21) [87, 121, 148, 149]. Средняя распространенность классических форм заболевания в мире составляет в среднем 1 на 10000 - 15000 новорожденных [19, 23, 37, 53, 54, 80, 103, 119, 127, 131], в российской популяции по данным неонатального скрининга эта величина равна около 1:8000 новорожденных [16].

В последнее время значительно возрос интерес к так называемым неклассическим вариантам ВДКН ввиду их более высокой распространенности в общей популяции и негативного влияния на репродуктивное здоровье женщин. Частота встречаемости неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) значительно превалирует над таковой при классических ее вариантах, что делает НК21ОН одним из самых распространенных моногенных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Распространенность НК21ОН имеет определенную зависимость от национальных и этнических факторов и по данным мировой литературы колеблется от 1:27 до 1:10000 новорожденных [26, 53, 104, 118]. В российской популяции эти данные до настоящего времени отсутствуют. В отличие от классических форм дефицита 21-гидроксилазы, характеризующихся наличием специфических клинико-лабораторных критериев, и поэтому легко выявляемых уже в период новорожденности, клинические и гормональные проявления

НК21ОН отсрочены и неспецифичны, что затрудняет своевременную диагностику и медикаментозную коррекцию заболевания, а также делает невозможным оценить распространенность НК21ОН по обращаемости. В связи с этим, истинная распространенность НК21ОН, вычисленная с использованием законов популяционной генетики для наследственных форм заболевания (закон Харди - Вайнберга) по данным частоты гетерозигот в популяции, оказывается выше частоты заболевания, рассчитанной по обращаемости [26, 53, 104, 118].

Внедрение исследования на ВДКН в программу неонатального скрининга не только способствовало повышению выявляемости, сокращению сроков диагностики и, таким образом, снижению смертности новорождённых с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы, но и позволило диагностировать НК21ОН уже в период новорожденности [65, 69, 103, 115, 124, 125, 143]. В зарубежной литературе имеются отдельные наблюдения таких пациентов, однако, полученные данные скудны и не систематизированы. До настоящего момента отсутствует разработанный алгоритм диагностики, ведения и лечения пациентов раннего возраста с НК21ОН. Клинические наблюдения таких пациентов в доступной отечественной литературе нам не встречались.

Несмотря на улучшение выявляемости ВДКН с использованием скрининговых программ, основной проблемой неонатального скрининга во всем мире является высокая частота ложноположительных результатов, особенно у недоношенных детей [19, 30, 61, 95, 111, 121]. Это приводит к усложнению и удорожанию процесса скрининга, дополнительным финансовым затратам и необоснованному использованию рабочего времени врачей в процессе долгосрочного динамического наблюдения за такими детьми, а также оказывает влияние на психосоциальную сторону семей таких новорожденных. Среди основных причин ложного повышения 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) выделяют не только физиологические

особенности обменных процессов в организме новорожденного, материнские факторы, но и технические особенности используемых методов иммуноанализа [14, 61, 95, 129]. В связи с этим, продолжается поиск новых методов определения показателей 17-ОНП, позволяющих снизить число ложноположительных результатов. Одним из таких современных и перспективных методов является метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС). Данные зарубежных авторов демонстрируют его преимущества по сравнению с традиционно используемыми способами определения стероидов в сыворотке крови, что позволяет рассматривать ТХМС в качестве приоритетного для диагностики ВДКН у детей [33, 34, 46, 62, 66, 108, 113, 154, 155]. Однако, до настоящего времени, роль метода в алгоритме диагностики НК21ОН у детей остается до конца неясной. В доступной отечественной литературе результаты применения метода ТХМС и возможности его использования для верификации НК21ОН у детей первого года жизни нами не встречено.

Таким образом, отсутствие данных о распространенности НК21ОН и частоте носительства характерных для нее мутаций в российской популяции, а также необходимость разработки четких клинико-гормональных критериев и рекомендаций по тактике ведения пациентов с НК21ОН в раннем возрасте, побудило нас провести данное исследование.

Цель исследования

Оценить распространенность неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) в российской популяции путем определения частоты носительства характерных мутаций и изучить клинико-гормональные особенности заболевания у детей в раннем возрасте.

Задачи исследования

1. Определить частоты гетерозиготных мутаций V281L и P30L в случайно отобранных образцах пятен крови, полученных при проведении неонатального скрининга и рассчитать минимальную распространенность НК21ОН в популяции с учетом полученной частоты изучаемых гетерозиготных мутаций.
2. Сопоставить распространенность НК21ОН, полученную по обращаемости, с частотой, вычисленной с учетом носителей искомых мутаций.
3. Провести анализ клинико-лабораторных данных и результатов молекулярно-генетического анализа у пациентов с генетически доказанной НК21ОН, выявленной в ходе неонатального скрининга.
4. Разработать диагностические критерии метода тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС) для выявления НК21ОН и оценить информативность метода для диагностики заболевания у детей до года.

Научная новизна

Впервые с помощью методов молекулярной генетики изучена частота носительства мутаций V281L и P30L и на основании этих данных с использованием популяционного анализа рассчитана истинная распространенность НК21ОН в российской популяции. С учетом результатов молекулярно-генетического исследования продемонстрированы особенности генотипа НК21ОН российской популяции. С помощью картографического метода показаны демографические особенности распространенности НК21ОН на территории России.

Впервые для диагностики НК21ОН применен метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС), оценены преимущества метода перед иммунными методами измерения уровня стероидов сыворотки крови.

Определены референсные интервалы для основных стероидов сыворотки крови, измеренных методом ТХМС, у детей первых трех месяцев жизни.

Впервые изучены и проанализированы клинико-лабораторные данные пациентов раннего возраста с генетически верифицированной НК21ОН, выявленных в ходе неонатального скрининга.

Практическая значимость работы

На основании проведенного молекулярно-генетического и популяционного анализов продемонстрирована высокая частота НК21ОН в российской популяции, разработаны и научно обоснованы демографические особенности распространения заболевания на территории России.

Показано, что неонатальный скрининг на ВДКН позволяет выявить только 1 из 10 пациентов с НК21ОН.

Продemonстрирована высокая информативность метода ТХМС для исключения НК21ОН у детей раннего возраста. Предложены диагностические критерии показателя 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) для выявления НК21ОН у детей до года.

С учетом предложенных диагностических критериев и референсных интервалов для основных стероидов сыворотки крови, измеренных методом ТХМС, разработан алгоритм обследования новорожденных с сомнительными результатами неонатального скрининга на ВДКН. Доказано отсутствие необходимости проведения теста с аналогами адренокортикотропного гормона (АКТГ) для подтверждения НК21ОН в раннем возрасте.

Получены предварительные данные о перспективности применения метода ТХМС для проведения скрининга новорожденных детей на ВДКН.

На основании проанализированных клинико-лабораторных данных пациентов с НК21ОН различных возрастных групп предложен алгоритм ведения пациентов с НК21ОН, у которых диагноз поставлен на первом году жизни.

Основные положения, выносимые на защиту

Распространенность НК21ОН в российской популяции, рассчитанная на основании частоты носительства двух наиболее частых мутаций, характерных для данного заболевания, составила 1:2206 новорожденных.

При подозрении на НК21ОН с учетом результатов неонатального скрининга на ВДКН методом выбора для дообследования ребенка является метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС) ввиду его высокой информативности по сравнению с радиоиммунным методом (РИА) при определении 17-ОНП.

Исключение НК21ОН проводится с учетом нормативных значений основных стероидов сыворотки крови, измеренных методом ТХМС, и разработанных диагностических критериев по методу для показателя 17-ОНП.

Для подтверждения НК21ОН показано проведение молекулярно-генетического анализа (анализ частых мутаций), который в редких случаях может быть дополнен секвенированием гена *CYP21A2*.

Внедрение в практику

Научные положения и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в повседневную работу отделения наследственных эндокринопатий и НИИ Детской эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

Апробация полученных результатов

Диссертационная работа апробирована 22 июля 2014 года на межотделенческой конференции ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России. Основные положения диссертации обсуждены на конференции молодых ученых ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (Москва, 2011), первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века» (Москва, 2012), на I Научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья девочек» (Москва, 2013), II всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» с участием стран СНГ (Москва, 2014), на межотделенческих конференциях ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в отечественном журнале, включенном в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для публикации основных научных результатов диссертаций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на русском языке, в объеме 161 страницы машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 4 глав собственных наблюдений, главы заключения и обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 23 рисунками. Список использованной литературы включает 155 источника: 17 отечественных и 138 зарубежных.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Определение, классификация, патогенез, клинические проявления дефицита 21-гидроксилазы в различных возрастных группах.

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) представляет собой группу генетически обусловленных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, в основе которых лежит дефект одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в биосинтезе кортизола в коре надпочечников. Первые упоминания об этом заболевании приходятся на середину 19-го века, однако, лишь в середине 20-го века, когда появились работы, посвященные изучению заболеваний с рецессивным типом наследования, стал возможным более детальный анализ клинико-гормональных особенностей ВДКН [54, 87, 149].

Наиболее часто (более чем в 90% случаев) среди известных 7 форм ВДКН встречается дефицит 21-гидроксилазы [54, 80, 87, 93, 121, 122, 148, 149]. 21-гидроксилаза - фермент, принадлежащий к семейству цитохрома P450, принимающий участие в синтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов в коре надпочечников, активируя превращение прогестерона в 11-дезоксикортикостерон (11-ДОК) и 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) в 11-дезоксикортизол [81, 147]. Принято различать 3 основные формы дефицита 21-гидроксилазы: две классические (простая вирильная и сольтеряющая форма) и неклассическая форма заболевания (НК21ОН) [87, 90, 93, 121, 122, 148, 149]. Мутации, являющиеся причиной классических форм дефицита 21-гидроксилазы (КФ21ОН), приводят к существенному снижению активности вышеназванного фермента (остаточная активность составляет обычно от 0

до 5%). Патогенетические механизмы, лежащие в основе классических форм заболевания, обусловлены нарушением синтеза глюкокортикоидов и минералокортикоидов, а также накоплением стероидов, предшествующих ферментативному блоку [119, 135]. Дефицит синтеза минералокортикоидов, больше характерный для сольтеряющей формы заболевания, приводит к жизнеугрожающему состоянию - сольтеряющему кризу, клиническими проявлениями которого являются гипотония, рвота, дегидратация, гиперкалиемия и гипонатриемия и другие. Дефицит кортизола является причиной надпочечниковой недостаточности с классическими ее проявлениями, а также через активацию кортикотропин-рилизинг-гормон (КРГ) гипоталамуса и АКТГ гипофиза по механизму отрицательно обратной связи приводит к гиперплазии коры надпочечников (а в ряде случаев – к образованию аденом) и избыточной продукции гормонов, обладающих андрогеновой активностью: с одной стороны, стероидов, предшествующих блоку - 17-ОНП и прогестерон, с другой стороны - андрогенов сетчатой зоны надпочечников. Гиперандрогения является причиной внутриутробной и постнатальной вирилизации у девочек и преждевременного полового развития у мальчиков [54, 80].

Неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) (другое название: латентная, отсроченная, скрытая, ослабленная), обусловленная «мягким» ферментативным дефектом 21-гидроксилазы, впервые была выделена в качестве самостоятельного заболевания в середине 50-х годов прошлого столетия [41]. В 1982 году Kohn В. с соавт. [72] приводит подробную характеристику клинико-гормональных данных симптоматических и асимптоматических форм НК21ОН, а с 1988 года появляются первые сведения о мутациях, характерных для данного заболевания [120]. В отличие от классических форм дефицита 21-гидроксилазы, мутации, приводящие к развитию НК21ОН, снижают активность фермента в среднем на 50 - 80% [90, 124, 125, 135]. В основе

развития заболевания глобально лежат те же механизмы, что и при КФ21ОН, однако, патогенез НК21ОН несколько сложнее [54, 78, 85, 90]. В отличие от вирильной и сольтеряющей форм ВДКН, у пациентов с НК21ОН отсутствует явный дефицит глюкокортикоидов и минералокортикоидов, и, следовательно, выраженное повышение уровней АКТГ и КРГ, хотя у многих пациентов обнаруживается гиперергический ответ на стимуляцию аналогами АКТГ. Основное звено патогенеза - избыточная продукция андрогенов за счет накопления гормонов-предшественников [110]. Этим частично объясняется сохраняющиеся повышенные цифры 17-ОНП и прогестерона при назначении адекватной заместительной терапии у таких пациентов. Избыточная продукция стероидов с андрогенной активностью также является причиной поликистозно-подобного синдрома у женщин (СПКЯ-подобный синдром): с одной стороны, нарушение нормальной работы яичников обусловлено накоплением большого количества прогестерона, с другой стороны, избыток андрогенов снижает чувствительность клеток гипофиза к прогестерону, что является причиной усиленной секреции гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) соответственно [90]. Клинически НК21ОН проявляется различной степенью постнатальной андрогенизации, развивающейся, как правило, в препубертатный и пубертатный периоды, однако, у части пациентов с НК21ОН симптомы заболевания могут отсутствовать [29, 50]. Следует подчеркнуть, что клинические проявления гиперандрогенемии очень variabelны, что связывают, во-первых, с различным уровнем синтеза предшественников андрогенов, во-вторых, с неодинаковыми темпами конверсии предшественников в более активные метаболиты, в-третьих, различным уровнем экспрессии андрогеновых рецепторов и наличием полиморфизмов в нем среди индивидов [75].

В детском возрасте НК21ОН является частой причиной преждевременного адrenaрхе [8, 64, 72, 78, 85, 90]. В одном из мультицентровых исследований [85] Moran С. с соавт. продемонстрировали, что преждевременное адrenaрхе у пациентов с НК21ОН манифестировало в 92% до десятилетнего возраста, в 8% в возрасте 10 - 19 лет, и в 4% - после 20 лет. Другими клиническими проявлениями НК21ОН в детском возрасте являются ускорение темпов роста и костного созревания [89], проявляющихся чаще после 12 - 18 месяцев жизни [132]. По данным Balsamo А. с соавт. (2006) [24] рост при рождении у пациентов с НК21ОН статистически не отличался от здоровых новорожденных. Литературные данные о прогнозе роста у больных с НК21ОН противоречивы. Что касается детей первого года жизни, Claahsen-van der Grinten Н.Л. с соавт. (2006) [36] считают, что избыточная продукция андрогенов не оказывает негативного влияния на темпы роста в этом периоде. По данным ряда зарубежных исследователей, несмотря на более высокие темпы роста при расчете на стандартные отклонения у пациентов с НК21ОН по сравнению с контрольной группой [132], конечный ожидаемый рост по родителям сравним с таковым у здоровых людей [32, 39, 91]. По мнению ряда исследователей, важную роль в достижении прогнозируемого роста играет время начала терапии глюкокортикоидами: так, в одном из ретроспективных исследований Weintrob N. с соавт. (1997) [145] было показано, что прогнозируемого роста достигли те пациенты, у которых терапия глюкокортикоидами была начата за год и более до начала истинного пубертата. Новорожденные женского пола с НК21ОН обычно имеют правильное строение наружных гениталий, хотя в ряде случаев встречается гипертрофия клитора разной степени выраженности, высокая задняя спайка на промежности [121, 139, 145, 151].

У девочек-подростков и взрослых женщин НК21ОН может проявляться в виде гирсутизма, нарушений менструальной функции (аменорея, олигоаменорея, ановуляция и другие), формирования поликистоза яичников, бесплодия [11, 29, 50, 151]. По данным мировой литературы частота НК21ОН среди женщин с клинико-гормональными признаками гиперандрогении очень вариабельна и составляет в среднем около 2%, с разбросом этого показателя от 0,6% до 14% [21, 45, 151]. При этом, в исследованиях, проведенных на основании ДНК-типирования, этот показатель не превышал 2,2% [45]. По результатам исследования Петерковой В.А. с соавт. [9], проведенного в 2006 году, частота НК21ОН, подтвержденная наличием мутаций в гене *CYP21* среди девочек с гиперандрогенией, составила 8,3%; при этом было отмечено, что гипертрофия клитора, особенно у девочек с преждевременным адренархе, является признаком,стораживающим в отношении НК21ОН. В исследовании Dewailly D. с соавт. (1986) [43] было продемонстрировано, что 39% женщин с доказанной НК21ОН имели клинические проявления заболевания в виде гирсутизма, 39% - в виде олигоаменореи, а у оставшихся 22% клинических симптомов гиперандрогенемии выявлено не было. В исследовании Feldman S. с соавт., проведенном в 1992 году [50], у 50% женщин с НК21ОН репродуктивная функция была не нарушена, и беременность наступила до момента постановки диагноза и начала терапии, а уровень тестостерона у женщин с НК21ОН до наступления беременности был ниже такового среди здоровых женщин во втором триместре беременности. Остается дискуссионным вопрос, вызывает ли гетерозиготное носительство мутаций в гене *CYP21* развитие НК21ОН. В диссертации Соболевой Е.Л. (2011) [10] было показано, что среди женщин, являющихся гетерозиготными носителями мутаций в гене 21-гидроксилазы, все имели нарушение менструального цикла и/или репродуктивной функции, а также симптомы андрогенизации. У

большинства женщин, вошедших в исследование, было выявлено гетерозиготное носительство "тяжелых" мутаций (делеция гена, мутация сплайсинга, точковые мутации I172N, V237E и Q318X), приводящих в гомозиготном носительстве к развитию классической формы заболевания. Автор предположила, что наличие нарушения функции яичников у женщин-носителей, делает необходимым рассматривать таких женщин, как больных НК21ОН.

Что касается лиц мужского пола, Pinkas H. с соавт. (2010) [105] описывают случаи олигоспермии и снижения фертильности при НК21ОН, нивелирующиеся при адекватно подобранной глюкокортикоидной терапии; в ряде случаев имеет место макроорхидизм. Редкими проявлениями НК21ОН во взрослом возрасте могут являться опухоли яичек у мужчин, объемные образования надпочечников, метаболические нарушения [31, 149].

Нарушение синтеза минералокортикоидов, а, следовательно, и клинические проявления сольтеряющего криза, не характерны для НК21ОН, однако, имеются сообщения о возможном развитии криза надпочечниковой недостаточности у таких пациентов в стрессовых ситуациях [90, 93]. Отсутствие клинической картины минералокортикоидного дефицита у мальчиков с вирильной формой ВДКН в некоторых случаях затрудняет дифференциальную диагностику этих двух форм дефицита 21-гидроксилазы у таких детей [54, 93].

Анализ имеющихся литературных данных лишний раз подчеркивает, что неспецифичность симптомов, «мягкий» фенотип, а в ряде случаев отсутствие клинических проявлений заболевания не позволяет выявить НК21ОН или обуславливает его позднюю диагностику.

1.2 Диагностика дефицита 21-гидроксилазы.

Диагностика классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в настоящее время не представляет трудности благодаря достижениям молекулярной генетики и совершенствованию лабораторных методов и основана на достаточно характерной клинической картине заболевания и повышении специфичных лабораторных маркеров в сыворотке крови. Несмотря на высокую распространенность неклассической формы 21-гидроксилазы (НК21ОН), до настоящего времени заболевание достаточно хорошо изучено только у пациентов препубертатного и пубертатного возраста, а также у женщин репродуктивного возраста [29, 44, 50, 54, 63, 121, 136].

Диагностика НК21ОН отличается в различных возрастных группах, но принципиально основана на [4, 9, 12, 42, 54, 121, 122, 148, 149, 151]:

- Анализе жалоб и клинических данных, включающих оценку общего состояния, прицельный осмотр области наружных гениталий, оценку физического развития
- Анализе гормональных показателей крови: 17-ОНП, кортизол, адренокортикотропный гормон (АКТГ), тестостерон, активность ренина плазмы (АРП) и другие. По показаниям - проведение стимуляционных тестов с использованием аналогов АКТГ
- Оценке костного возраста (рентгенография кистей) в декретированные сроки
- Молекулярно-генетическом исследовании гена *CYP21A2* (аллель-специфическая полимеразно-цепная реакция (ПЦР)), в некоторых случаях - секвенирование соответствующего гена)

1.2.1. Гормональные маркеры дефицита 21-гидроксилазы и методы их измерения.

Гормональным маркером дефицита 21-гидроксилазы является 17-гидроксипрогестерон (17-ОНП) [42, 54, 121, 148, 149, 151]. Высокая распространенность дефицита 21-гидроксилазы и необходимость ранней и точной диагностики ВДКН у новорожденных с одной стороны, и разработка простого метода определения 17-ОНП на фильтровальной бумаге из пятна крови с другой стороны, позволили внедрить диагностику дефицита 21-гидроксилазы в программу неонатального скрининга [30, 56, 99, 100, 102]. Скрининговые программы зародились в 1977 году в Соединенных Штатах Америки (США) [100] и постепенно получили широкое распространение по всему миру. С июня 2006 года приказом №185 Минздравсоцразвития от 22 марта 2006 г «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» скрининг на ВДКН повсеместно внедрен и в России [15]. Ранняя диагностика классических форм заболевания позволяет при сольтерющей форме начать лечение в более ранние сроки, до развития тяжелых клинических проявлений сольтерющего криза, избежать ошибок в выборе половой принадлежности у новорожденных девочек с высокой степенью вирилизации, сократить сроки постановки вирильной формы заболевания у мальчиков. Этапы и лабораторные методы неонатального скрининга на АГС несколько отличаются в разных странах. Забор образцов крови при проведении массового обследования новорожденных детей осуществляется в специализированных медицинских учреждениях здравоохранения и производится в декретированные сроки, которые варьируют в разных странах от периода 24 - 48 часов после рождения до 4 - 5 дней для доношенных новорожденных и 7 - 14 день для недоношенных. Забор образцов крови осуществляется на специальные

фильтровальные бумажные тест-бланки. Исследование образцов крови проводится в медико-генетической лаборатории в установленный срок после поступления образца крови. В настоящее время практически во всех национальных скрининговых программах на первом этапе используются методы иммуноанализа для определения 17-ОНП в кровяном пятне, а именно, высокочувствительный метод специфической флюоресценции с регистрацией флюоресцентного сигнала на специальном приборе [4, 25, 100, 112]. В нашей стране в рамках этого метода применяются 2 основных набора: «Delfia Neonatal 17-ОНП» (Финляндия) и «17α-ОН-ПРОГЕСТЕРОН-Неоскрин» (Россия). Алгоритмы оценки результатов тестирования по уровню 17-ОНП также варьируют в различных странах и обычно учитывают гестационный возраст и вес новорожденного [5, 25, 112, 126]. Для разработки алгоритмов в медико-генетических центрах России основываются на данных скрининговых программ, выполняемых в зарубежных странах в соответствии с общими рекомендациями, а также на основании собственных исследований. Используемые нормативы и алгоритмы дифференциальной диагностики по уровню 17-ОНП (так называемый cut-off) разрабатываются для каждого набора индивидуально с учетом уровня 17-ОНП соответствующего 95 перцентили. При выявлении повышенного или сомнительного уровня 17-ОНП по результатам тестирования, проводится второй этап скрининга - ретестирование. В некоторых развитых странах методом выбора на втором этапе скрининга на АГС является метод tandemной хромато-масспектрометрии (ТХМС) [112, 126]. К настоящему времени несколько штатов США применяют метод ТХМС для определения не только уровня 17-ОНП, но и других стероидов крови (21-дезоксикортизол, 11-дезоксикортизол, показатель (17-ОНП+андростендион)/кортизол) из пятна крови, полученного в ходе скрининга. Для каждого вышеназванного показателя представлены нормативные значения, уровень 17-ОНП дифференцирован по половой

принадлежности [112]. До настоящего момента в России на втором этапе скрининга до сих пор применяются методы иммуноанализа, аналогичные таковым на 1 этапе. На последующих этапах скрининговых программ на АГС при необходимости осуществляется исследование дополнительных стероидов крови, молекулярно-генетическая верификация диагноза и соответствующее наблюдение и ведение пациентов при наличии диагноза ВДКН.

Несмотря на очевидную эффективность скрининговых программ (повышение выявляемости заболевания, сокращение сроков диагностики), на данный момент существует ряд нерешенных проблем. Несмотря на разработанные критерии 17-ОНП для классических форм дефицита 21-гидроксилазы, неонатальный скрининг на ВДКН не позволяет идентифицировать до 15% случаев заболевания [131]. Что касается НК21ОН, уровень 17-ОНП, полученный в ходе неонатального скрининга на ВДКН, практически не различим у здоровых детей и детей с неклассической формой 21-гидроксилазы, что подтверждается большим числом не диагностированных в этой возрастной группе случаев заболевания (до 85% и выше) [131, 141]. Поэтому, используемые в настоящее время методы и предложенные алгоритмы оценки уровня 17-ОНП, как маркера АГС, не могут быть применены для ранней диагностики НК21ОН. Таким образом, существуют 2 основные проблемы неонатального скрининга на АГС: с одной стороны, это высокая частота ложноотрицательных результатов для диагностики НК21ОН, с другой стороны - большой процент ложноположительных результатов скрининга на ВДКН.

Для определения стероидов сыворотки крови (в том числе в России) чаще всего используются методы иммуноанализа: преимуществами этих методов считается их простота, высокая скорость исполнения, достаточная чувствительность. Однако, было показано, что точность и надежность

результатов, полученных этими методами, недостаточна для диагностики заболеваний у новорожденных и грудных детей, особенно при наличии сопутствующих заболеваний. Низкая специфичность обусловлена необходимостью стандартизации, использованием средних и больших объемов образцов для экстракции стероидов, низкой специфичностью для определения молекул с очень высокой и очень низкой концентрацией, а также влиянием таких интерферирующих факторов, как присутствие других эндогенных стероидов, липидов, перекрестных реакций специфичных антител, эффекты матрикса и так далее, что приводит к возрастанию числа ложноположительных результатов, и, таким образом, гипердиагностике. Еще одним недостатком при использовании методов иммуноанализа является отсутствие так называемой межлабораторной стандартизации, то есть, большая вариация нормативных значений показателей в различных лабораториях, измеренных в одних и тех же единицах [76, 123, 141, 142]. По данным литературы отмечено, что при исследовании 17-ОНП иммунными методами происходит перекрестное измерение 17-гидроксипрегненолона (17-ОНPr), который часто повышен у новорожденных вследствие сниженной активности 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -ГСД). Перекрестная реакция 17-ОНPr и 17-ОНП составляет около 8%, в зависимости от метода исследования и используемых антител [129]. Выявление ложноповышенного уровня 17-ОНП также может быть обусловлено физиологическим снижением активности 11 β -гидроксилазы у недоношенных или незрелых детей [61]. Другими факторами, влияющими на ложное повышение 17-ОНП, могут служить сопутствующие заболевания, стресс, патологические состояния беременности, тяжелые роды, затяжная желтуха и другие [8, 40, 83, 95, 142]. Попытки повышения порогового значения по гестационному возрасту, весу новорожденного ребенка, а также проведение предварительной экстракции 17-ОНП не

привело к значимому снижению числа ложноположительных результатов [19, 111]. Для улучшения данной ситуации необходимо внедрение новых методов, позволяющих повысить специфичность результатов и дающих возможность использовать их не только для рутинной диагностики, но и в масштабах неонатального скрининга. Одним из таких современных методов, позволяющих избежать недостатков методов иммуноанализа для исследования 17-ОНП, является метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС). Согласно литературным данным этот метод имеет ряд преимуществ: является надежным методом определения в образцах молекул с маленькой молекулярной массой, обладает способностью количественно оценивать содержание целого ряда разнородных соединений в ходе одного анализа и с использованием единого внутреннего стандарта, применяемого одновременно для нескольких определяемых стероидов; при этом не требует больших временных затрат для профподготовки образцов и позволяет использовать малые объемы сыворотки, что является большим преимуществом для диагностики заболеваний у новорожденных и детей грудного возраста. И, наконец, специфичность метода ТХМС не уступает таковой при использовании других методов определения стероидов крови [57, 62, 67, 82, 108, 154, 155]. Согласно данным некоторых зарубежных работ, благодаря наличию вышеперечисленных характеристик, применение метода ТХМС существенно снижает число ложноположительных результатов, полученных по скринингу на ВДКН, что позволяет рекомендовать его как приоритетный для диагностики АГС, особенно в сомнительных случаях наличия заболевания [33, 34, 46, 62, 66, 82, 108, 113, 154, 155]. Согласно консенсусу по дефициту 21-гидроксилазы, диагностика заболевания должна быть основана на двукратном исследовании уровня 17-ОНП: одним из иммунных методов, а при наличии положительных результатов - методом ТХМС [117]. Нельзя не отметить, что проведение

ТХМС требует специального дорогостоящего оборудования и большого количества реагентов, а также высококвалифицированных сотрудников, выполняющих анализ. Вместе с тем, Vogeser M. и Seger C. (2008) [140] в своем исследовании доказали, что расходы на проведение ТХМС сопоставимы с таковыми при использовании иммунных методов, особенно при одновременном определении целого ряда гормонов. Поэтому, в настоящее время, несмотря на свои преимущества, метод ТХМС только начинает активно внедряться в повседневную практику врача.

Как было продемонстрировано выше, изолированное определение базального уровня 17-ОНП (как в ходе неонатального скрининга, так в более позднем возрасте при подозрении на НК21ОН) является не всегда достаточным для подтверждения заболевания. Более того, при использовании базального 17-ОНП в качестве скрининг-метода диагностики НК21ОН должны строго соблюдаться такие условия, как забор крови в утренние часы, исключение приема глюкокортикоидов перед анализом, во взрослом возрасте - исследование в определенную фазу менструального цикла. Согласно результатам исследования Храмовой Е.Б. (2007) [12] и Фоминой С.В. (2007) [11] изолированное определение базального 17-ОНП не является достаточным критерием для диагностики НК21ОН более чем в 90% случаев. По последним данным наиболее достоверным уровнем базального 17-ОНП для диагностики НК21ОН следует считать повышение уровня более 15 - 20 нмоль/л [9, 55]; Dewailly D. с соавт. (2002) [42] считают, что уровень 17-ОНП менее 6 нмоль/л и более 15 нмоль/л обладает высокой негативной и позитивной прогностической ценностью соответственно. В руководстве Эндокринологического общества утверждается, что базальный уровень 17ОНП <6 нмоль/л позволяет с уверенностью исключить наличие ВДКН, и лишь пациенткам с уровнем 17ОНП, превышающим этот показатель, должно назначаться дальнейшее обследование с целью уточнения

диагноза: проба с аналогами АКТГ, молекулярно-генетическое обследование [117].

Проба с введением аналогов АКТГ (синактен - соединение из первых 24 аминокислот, входящих в состав 39-аминокислотной цепи эндогенного АКТГ) в некоторых странах считается «золотым стандартом» диагностики как классических, так и неклассических форм дефицита 21-гидроксилазы и в большинстве стран является заключительным этапом подтверждения ВДКН и исключения других нарушений стероидогенеза в надпочечниках, в том числе, заподозренных по результатам неонатального скрининга (дефицит 11 β -гидроксилазы, 3 β -ГСД и прочее). Проба с аналогом АКТГ короткого действия (синактеном) включает в себя определение базальных (до введения АКТГ) и стимулируемых (через 30 и 60 минут после введения препарата) уровней 17-ОНП и кортизола; при использовании препарата продленного действия (синактен-депо) уровень показателя гормонального профиля исследуются через 12 и 24 часа. В зависимости от показателей 17-ОНП, полученного в ходе пробы, заболевание исключают, диагностируют классическую или неклассическую форму ВДКН, либо устанавливают гетерозиготное носительство [92]. Существующие в настоящее время критерии диагностики НК21ОН основаны на проведении стандартного теста с «коротким» синактеном, применение которого в России невозможно из-за отсутствия на фармакологическом рынке. В материалах диссертационной работы Храмовой (2007) [12] показано, что стимулированный уровень 17-ОНП более 50 нмоль/л в 80% случаев подтверждается наличием дефекта в гене *CYP21* и может рассматриваться в качестве значимого критерия диагностики НК21ОН. J. Marcondes (2006) [77] также считает, что НК21ОН не вызывает сомнений при повышении стимулированного уровня 17-ОНП выше 14 нг/мл или даже 17 нг/мл. При промежуточных значениях стимулированного уровня 17-ОНП (10 - 17 нг/мл) дифференциальная диагностика должна обязательно включать

генетическое исследование. По данным многоцентрового исследования, уровень 17-ОНП может иметь широкий диапазон колебаний: базальный - от 0,3 до 156,0 нг/мл (медиана 6,2 нг/мл); АКТГ-стимулированный - от 12,6 до 185,2 нг/мл (медиана 44,7 нг/мл) [86]. По мнению New M.I. с соавт. (1983) [92], верхний пороговый уровень 17-ОНП при НК21ОН обычно не превышает 100 нг/мл. В последние годы в отечественной эндокринологии активно дискутируется вопрос о возможности применения так называемого низкодозированного теста с аналогами АКТГ (5 мкг) [13], однако, по результатам исследования Witchell S.F. с соавт. (1997, 1998), несмотря на полученную достаточно высокую чувствительность метода, было доказано, что использование его ограничено в некоторых клинических ситуациях [152, 153]. Следует также подчеркнуть, что до настоящего момента отсутствуют единые критерии дифференциальной диагностики по уровню 17-ОНП пациентов с неклассической формой заболевания и здоровых носителей: по результатам проведенных исследований, только в половине случаев уровень стимулированного 17-ОНП позволяет дифференцировать гетерозиготных носителей мутаций в гене *CYP21* от здоровых людей [44, 70, 152].

Помимо 17-ОНП, в качестве дополнительных гормональных критериев может использоваться определение уровней тестостерона, прогестерона, андростендиона, 21-дезоксикортизола (21-Д), при этом повышение значений последнего является наиболее патогномичным для данного заболевания [52].

1.2.2. Молекулярная диагностика дефицита 21-гидроксилазы.

До начала 90-х годов диагностика неклассических форм дефицита 21-гидроксилазы основывалась на крайне вариабельных клинических

проявлениях и биохимических исследованиях активности ферментной системы стероидогенеза [119, 120, 146]. Совершенствование методов молекулярно-генетического анализа расширяют возможности верификации стертых форм заболевания, позволяют проводить пренатальную диагностику дефицита 21-гидроксилазы и прогнозировать течение заболевания. Дефицит 21-гидроксилазы обусловлен наличием мутаций в гене *CYP21*. Ген, кодирующий фермент 21-гидроксилазу (*CYP21A2*), расположен на коротком плече 6 хромосомы вблизи от главного комплекса гистосовместимости (HLA). В непосредственной близости от гена *CYP21A2* находится псевдоген - *CYP21P* (*CYP21B2*). Оба гена состоят из 10 экзонов и 9 интронов и на 98% имеют идентичную нуклеотидную последовательность. Ген *CYP21A2* кодирует активный фермент 21-гидроксилазу, тогда как *CYP21P* содержит 9 патогенных мутаций (делеции и точковые мутации) и является неактивным [60, 73, 97, 120, 135]. Близость этих двух генов делает возможным обмен гомологичными участками и, таким образом, способствует возникновению мутаций в активном гене. Этот феномен объясняет высокую распространенность дефицита 21-гидроксилазы по сравнению с другими формами ВДКН и подтверждается тем, что почти все мутации, выявленные в активном гене, идентичны патогенным мутациям псевдогена [58, 60, 73]. Считается, что около 95% всех описанных при дефиците 21-гидроксилазы мутаций трансформируются с псевдогена на активный ген [73, 121], остальные 5% - это очень редкие, спонтанно возникающие мутации, обычно в пределах одной семьи или небольшой популяции [48, 143]. Все известные мутации в гене *CYP21*, выявленные методами аллель-специфической ПЦР и секвенированием, можно разделить на 3 большие группы: делеции (15 - 20%), крупные генные конверсии и точковые мутации (80 - 85%) [60, 73, 88, 97]. Несмотря на большое количество описанных мутаций, характерных для дефицита 21-гидроксилазы, по

данным многочисленных исследований наличие ВДКН не подтверждается молекулярно-генетически в 5 - 30% случаев, причем большее количество не диагностированных мутаций приходится именно на неклассическую форму дефицита 21-гидроксилазы [22, 96, 143]. Все найденные и изученные мутации *CYP21* классифицируются по степени потери активности 21-гидроксилазы. Speiser P.W. с соавт. (1992) [119] предложили разделить всех пациентов на 3 группы: в группе А пациенты с сольтеряющей формой дефицита 21-гидроксилазы (активность фермента менее 2%), группу В составили пациенты с вирильной формой заболевания (активность фермента 3%) и в группе С - пациенты с НК21ОН и активностью фермента более 20%. В большинстве случаев (до 98 - 99%) генотип коррелирует с фенотипом [78, 150]. Однако, имеются сообщения о несоответствии имеющегося генетического дефекта с фенотипическими проявлениями заболевания (гормональными и клиническими), что авторы связывают с возможным наличием экстраадrenalового синтеза 21-гидроксилазы, различной интенсивностью гиперандрогении и чувствительностью тканей к андрогенам [53, 150].

На сегодняшний день описано более 170 мутаций в гене *CYP21* [18, 130], кодирующем фермент 21-гидроксилазу, 12 наиболее частых мутаций в Европейской популяции определены среди Российского населения [5, 7, 22, 27, 28, 35, 38, 47, 51, 53, 59, 63, 71, 107, 125, 128, 143]. Описанные в литературе генетические нарушения при НК21ОН ассоциируются с точковыми мутациями в гене *CYP21*, которые представляют собой однонуклеотидные замены в кодирующей части гена, приводящие к замене одной аминокислоты на другую в полипептидной цепи. Согласно литературным данным, найдено более 20 мутаций, являющихся причиной НК21ОН, однако, к настоящему времени хорошо изучены три основные мутации: V281L, P30L, P453S [8, 22, 26, 28, 35, 38, 47, 51, 53, 59, 78, 98, 124, 125, 133, 134, 143, 147]. В последние годы появились сведения еще о

нескольких мутациях, являющихся причиной НК21ОН - R339H, R369W, I230T [128]. Среди них с наибольшей частотой встречается V281L (до 94 %) в зависимости от популяции, причем как среди носителей, так и среди больных [3, 26, 28, 7, 51, 53, 104, 107, 124, 133, 144]. Вторая по распространенности мутация, характерная для НК21ОН, - P30L, которая встречается в среднем в 2 - 4% в большинстве популяций [22, 26, 28, 144], достигая максимума в европейской (10 - 20%) и японской популяции (более 80% случаев) [124, 125, 133, 143]. При наличии мутации V281L синтез фермента 21-гидроксилазы снижается на 20 - 50%, при наличии мутации P30L - до 30-60%, что, возможно, объясняет тот факт, что у пациентов с последней мутацией симптомы заболевания, как правило, более выражены по сравнению с теми, у кого выявляется мутация V281L [59, 65, 98, 134, 143].

Аутосомно-рецессивный тип наследования, характерный для всех форм дефицита 21-гидроксилазы, реализуется при наследственной передаче заболеваний, для клинической манифестации которых необходимо присутствие мутантного гена в гомозиготном состоянии, то есть, на обеих гомологичных хромосомах, унаследованных от родителей. При наличии «легкой» мутации на одном аллеле гена и более «тяжелой» на другом - так называемая сочетанная (компаундная) мутация - фенотип обычно определяется менее поврежденным аллелем [2, 84]. Однако, в ряде зарубежных работ было продемонстрировано, что одни и те же «легкие» мутации в гомозиготном положении и в составе компаундных гетерозигот с другими «легкими» мутациями, характерными для НК21ОН, демонстрировали неодинаковую активность фермента *in vitro* и, таким образом, являлись причиной как неклассических, так и классических форм дефицита 21-гидроксилазы. Так, например, Menassa R. с соавт. (2008) описали клинические случаи, когда наличие генотипа p.H62L/p.H62L приводило к неклассической форме заболевания, тогда как сочетание

вышеописанной мутации с точковой мутацией P453S (также «мягкая» мутация) приводило к развитию простой вирильной формы ВДКН [79]. Такой же «синергетический» эффект прослеживается у пациентов с генотипом P10L/P453S, V281L/p.1230T и другими мутациями [94, 128]. Возможно, с этим связана вариабельность клинических проявлений НК21ОН.

Наиболее часто в популяциях (до 2/3 случаев) генотип НК21ОН представлен гомозиготной мутацией V281L, вторыми по частоте встречаются компаундные гетерозиготы, в составе которых вышеуказанная мутация сочетается с более «тяжелыми» точковыми мутациями гена *CYP21A2* [22, 47, 78, 144].

В настоящее время в качестве основных методов верификации дефицита 21-гидроксилазы используются аллель-специфическая полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и метод прямого секвенирования гена или его участка. ПЦР обычно является первым этапом диагностики ВДКН: в большинстве генетических лабораторий проводится поиск 10-12 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *CYP21A2*. Второй метод (секвенирование), который позволяет расшифровать всю структуру гена или его участка, более трудоемкий, поэтому чаще применяется в спорных случаях или, когда при наличии клинико-гормональных данных заболевания методом ПЦР наиболее частые мутации идентифицировать не удается [4, 42, 47, 51, 54, 97, 104, 107, 121, 124, 127].

1.3. Распространенность, заболеваемость, частота.

Закон Харди-Вайнберга.

Для описания эпидемиологии любого заболевания используются термины заболеваемость, распространенность и частота заболевания. Заболеваемость – это количество вновь заболевших за единицу времени по

отношению к общей популяции. Распространенность – это процент всех случаев заболевания в данной популяции на данный момент. Частота заболевания – это количество новых случаев заболевания за единицу времени (человек в год). Методы изучения заболеваемости, распространенности и частоты заболевания основаны на учете обращений за медицинской помощью, исходя из данных профилактических медицинских осмотров и массовых освидетельствований населения, а также данных о причинах смерти. В ряде случаев, если речь идет о заболевании, в основе которого лежит первичный биохимический дефект, применяются специальные диагностические тесты, например, скрининг новорожденных, что повышает своевременное «досимптомное» выявление заболевания. Однако, как видно из приведенных определений, все эти методики предполагают наличие характерных клинических симптомов болезни и/или высоко специфических тестов, позволяющих заподозрить то или иное заболевание. В настоящее время человечеству известен целый ряд заболеваний, имеющих так называемое «мягкое», бессимптомное течение, которое не только затрудняет своевременную диагностику, но и не позволяет вычислить так называемую истинную частоту заболевания в популяции. Знания истинной частоты заболевания представляют не только научный интерес; это позволяет оценить вклад заболевания в различные социально значимые состояния, что в свою очередь диктует необходимость разработки новых алгоритмов диагностики и лечения этих заболеваний. К заболеваниям с «мягким» течением относится и изучаемая нами неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы, для диагностики которой у детей раннего возраста существующие лабораторные маркеры обладают низкой чувствительностью и специфичностью. Однако, учитывая наследственный характер изучаемого нами заболевания, распространенность НК21ОН подчиняется популяционно-генетической закономерности. Закон Харди-Вайнберга, сформулированный в 1908 г.

независимо друг от друга математиком Г. Харди в Англии и врачом В. Вайнбергом в Германии, гласит, что процесс наследственной преемственности сам по себе не ведет к изменению частот аллелей и (при случайном скрещивании) частот генотипов по определенному локусу. Более того, при случайном скрещивании равновесные частоты генотипов по данному локусу достигаются за одно поколение, если исходные частоты аллелей одинаковы у обоих полов. Равновесные частоты генотипов задаются произведениями частот соответствующих аллелей. Если имеются только два аллеля, А и а, с частотами р и q, то частоты трех возможных генотипов выражаются уравнением:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

в котором:

- р – частота встречаемости аллеля А;
- q – частота встречаемости аллеля а;
- q^2 – частота встречаемости генотипа аа;
- p^2 – частота встречаемости генотипа АА;
- pq – частота встречаемости генотипа Аа.

Таким образом, если скрещивание случайно, то частоты генотипов связаны с частотами аллелей простым уравнением квадрата суммы. Приведенная выше формула получила название уравнения Харди–Вайнберга [116].

1.3.1. Распространенность дефицита 21-гидроксилазы в различных популяциях.

Средняя распространенность классических форм дефицита 21-гидроксилазы высока и составляет в среднем 1 на 10000 - 15000 новорожденных [23, 37, 53, 54, 80, 103, 119, 131], с наибольшей частотой встречаемости среди таких популяций, как Юпик-эскимосы (1:282) [101] и

жители региона Реюньон во Франции (1:2100) [103], с наименьшей - в популяции Китая (1:28000) [74]. В российской популяции по последним данным эта величина равна около 1:8892 новорожденных [16]. Вышеприведенные данные о частоте классических форм дефицита 21-гидроксилазы получены, в основном, исходя из данных неонатального скрининга на ВДКН, за исключением исследования популяции Китая, где распространенность была вычислена по закону Харди-Вайнберга из частоты носителей гетерозиготных мутаций при исследовании 1000 случайных образцов [74]. Начиная с 1999 года в зарубежной литературе стали появляться сведения, что данные неонатального скрининга не позволяют определить истинную распространенность дефицита 21-гидроксилазы (даже классических форм при наличии специфичного маркера заболевания и характерной клинической картины). Так, группой авторов из Новой Зеландии было продемонстрировано, что частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы по данным неонатального скрининга составила 1:23344 новорожденных [37], что соответствовало бы частоте носительства 1:77, тогда как исследование 603 образцов пятен крови новорожденных выявило частоту носительства равную 1:35, что существенно выше ожидаемой [53]. Проведенное в 2005 году группой авторов из Австрии исследование среди 200 добровольцев (100 жителей Югославии, среди которых население Боснии, Хорватии, Сербии, Македонии, социалистический край Воеводины и 100 человек - другие представители средней Европы) показало, что истинная частота гетерозигот и, следовательно, распространенность заболевания в несколько раз выше ожидаемой в мире (1:10 и 1:55 соответственно) [26]. Похожие результаты были опубликованы в 2008 году при исследовании частоты носительства среди жителей Испании: почти каждый 10 человек среди 144 обследуемых являлся носителем хотя бы одной мутации,

характерной для классической формы дефицита 21-гидроксилазы, что также оказалось выше ожидаемой в мире (1:55) [104].

Что касается НК21ОН, литературные данные о распространенности этой формы заболевания скудны и также весьма вариабельны, что объясняется, во-первых, влиянием национальных и этнических факторов, а, во-вторых, неодинаковыми подходами для вычисления данного показателя в разных популяциях. При этом, было ярко продемонстрировано, что частота встречаемости неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы значительно превалирует над таковой при классических вариантах и является одним из самых распространенных моногенных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования [90]. Как было показано в исследовании Therrell B. et al. в 1998 году [131], неонатальный скрининг на ВДКН позволяет идентифицировать классические формы дефицита 21-гидроксилазы в 86%, а неклассические - лишь в 13%: так, распространенность НК21ОН среди жителей Техаса по данным неонатального скрининга составила 1:35870, что в десятки раз ниже таковой в среднем в популяции (1:1000). Это делает невозможным расчет истинной распространенности НК21ОН, используя гормональные маркеры (неонатальный скрининг) или данные обращаемости за медицинской помощью (то есть по совокупности клинических симптомов), что было продемонстрировано выше. Первая попытка вычислить распространенность НК21ОН принадлежит Speiser P.W. с соавт. (1988) [120], которые, обследуя семьи детей с классическими и неклассическими формами дефицита 21-гидроксилазы различных этнических групп, вычислили частоту гена для НК21ОН, опираясь на гормональные критерии, предложенные New M.I. с соавт. 1983 г. [92] (различные уровни 17-ОНП, базальные и стимулированные аналогами АКТГ у пациентов с классической, неклассической формой заболевания и носителей), и высказали предположение о тесной взаимосвязи гена *CYP21* с генами

главного комплекса гистововместимости (HLA). Так, наибольшая частота НК21ОН, вычисленная с помощью закона Харди-Вайнберга по частоте гена в популяции, была выявлена у евреев рода Ашкенази (1/27 или 3,7% популяции), с несколько меньшей частотой НК21ОН была представлена у испаноговорящих народов и славян (1/53 и 1/63 соответственно), реже всего заболевание встречалось у итальянцев (1/333) и «остальных» европейцев (1:1000). Средняя частота заболевания среди всех представленных популяций составила 1/111. В своем исследовании Speiser P.W. с соавт. (1988) [120] доказали тесную взаимосвязь гена *CYP21*, детерминирующего развитие дефицита 21-гидроксилазы, с генами главного комплекса гистововместимости на 6 хромосоме, а именно, с генами, кодирующими 4 компонент комплемента, располагающийся в области между HLA-B и DR: простая вирильная форма была чаще ассоциирована с HLA-B5, сольтеряющая - с HLA-Bw47; DR7 и HLA-B40, а неклассическая форма - HLA-B14; DR1 [118]. Антиген HLA-B8, по объяснению авторов работы, оказывает протекторный эффект, защищая от развития данного заболевания. Эту теорию описывает в своих работах и White P.C. с соавт. (1985) [146]. Sherman S.L. с соавт. (1988) [114], используя ту же выборку пациентов, что и Speiser P.W., применили более совершенную методику вычисления частоты заболевания, учитывая расщепление и сцепление генов, с использованием имеющихся клинико-гормональных данных и HLA-типирования. Полученные данные по частоте гена в популяции были сравнимы с таковыми в исследовании Speiser P.W. (1988) [120]. Более того, опираясь на полученные данные, авторы продемонстрировали, что НК21ОН обусловлена, скорее всего, парциальной моделью аутосомно-рецессивного типа наследования с неполной пенетрантностью гена, а не аутосомно-рецессивным типом наследования с рекомбинациями [114].

Дальнейшее изучение показателя распространенности НК21ОН началось с 1990-х годов. В 1999 году опубликована статья группы исследователей из Новой Зеландии, США и Швейцарии, которые провели молекулярно-генетическое исследование (аллель-специфическая ПЦР с исследованием 9 наиболее частых мутаций, включая характерные для НК21ОН V281L и P30L) 603 образцов пятен крови, полученных в ходе неонатального скрининга в одном из центров Новой Зеландии. В результате исследования было вычислено, что 2% (12 образцов из 603) являлись носителями мутаций, характерных для НК21ОН, причем в 100% случаев выявлена V281L. Таким образом, распространенность заболевания в Новой Зеландии, исходя из частоты носителей, составила 1:10000 [53]. Вторым крупным исследованием по изучению распространенности НК21ОН среди населения средней Европы явилась работа ученых из Австрии: методом аллель-специфической ПЦР образцов крови 200 человек разных этнических групп носительство гетерозиготных мутаций, характерных для НК21ОН, было выявлено у 4% обследуемых. Таким образом, частота гетерозигот составила 1:25, а вычисленная распространенность заболевания составила 1:2500 [26]. Среди выявленных носителей в 87,5% обнаружена характерная мутация V281L, в остальных случаях - P30L (12,5%). В 2008 году изучение показателя распространенности НК21ОН продолжила группа авторов из Испании, которые провели молекулярно-генетическое исследование (секвенирование) образцов крови 144 добровольцев (95 женщин, 49 мужчин), в ходе которого мутации, характерные для НК21ОН, были выявлены в 17 из 144 образцов, то есть частота носительства составила 12% или 1/8, а распространенность заболевания, вычисленная по закону Харди-Вайнберга, - 1:255. Важно отметить, что в 16 из 17 образцов (то есть практически в 100% случаев) была выявлена мутация V28L [104].

Данные об истинной распространенности НК21ОН в российской популяции до настоящего времени отсутствуют.

1.4. Принципы лечения дефицита 21-гидроксилазы.

Основной целью лечения КФ21ОН является замещение функции надпочечников, а именно уровня кортизола (препаратами глюкокортикоидов) и альдостерона (препаратами минералокортикоидов) [54, 68, 117]. Учитывая отсутствие выраженного снижения уровня глюко- и минералокортикоидов при НК21ОН, целью терапии заболевания является подавление избыточной секреции АКТГ и КРГ соответственно гипофиза и гипоталамуса и, следовательно, снижение продукции андрогенов корой надпочечников. Вместе с тем, четких критериев назначения терапии до настоящего момента не разработано. Обычно, лечение пациентов с НК21ОН проводится при наличии клинических проявлений гиперандрогении: в младшем возрасте - при преждевременном адренархе, прогрессивном ускорении темпов роста и костного созревания; в более старшем возрасте - при выраженных явлениях гирсутизма, акне, нарушениях менструального цикла, невынашивании беременности и бесплодии у женщин, а также андрогенной дермопатии и олигоспермии у мужчин [122, 149]. В зависимости от возраста применяются различные препараты и схемы их назначения. Супрессивная терапия глюкокортикоидами применяется в основном у детей и подростков. Поскольку при НК21ОН остаточная активность фермента 21-гидроксилазы составляет в среднем 30 - 50%, то для подавления избыточной секреции АКТГ требуются меньшие дозы глюкокортикоидных препаратов, чем при классических формах ВДКН [68, 78, 117, 145, 148]. Согласно международному консенсусу по диагностике и лечению дефицита 21-

гидроксилазы (как классических, так и неклассических форм), принятому в 2002 году, препаратом выбора у детей с открытыми зонами роста является гидрокортизон. Во-первых, 3-х кратная схема приема гидрокортизона лучше имитирует суточную секрецию кортизола, во-вторых, считается, что более короткий период полураспада препарата по сравнению с другими глюкокортикоидами, оказывает меньшее негативное влияние на линейный рост [68]. У детей пубертатного и постпубертатного периода возможно назначение таких препаратов, как преднизолон, метипред, которые наиболее близки по своей активности к эндогенному кортизолу, и дексаметазон. Подбор доз, а также сроки лечения определяются индивидуально, опираясь на клиническую картину (проявления синдрома гиперандрогении, в том числе оценка показателей роста, скорости роста, костного возраста у детей) и данные гормонального профиля (значения 17-ОНП, АКТГ, тестостерона у лиц женского пола и мальчиков до половой зрелости) на фоне лечения. Показателями эффективности терапии является уменьшение выраженности гиперандрогении, нормализация темпов роста и физического развития, отсутствие явной прогрессии костного возраста [68]. При этом уровень 17-ОНП может сохраняться умеренно повышенным, не смотря на адекватную дозировку глюкокортикоидов. Целевые значения 17-ОНП - от 3 до 30 ммоль/л, а уровни тестостерона и других андрогенов должны находиться в референсных пределах, соответствующих полу и возрасту пациента. Средние расчетные дозы глюкокортикоидов в пересчете на гидрокортизон составляют 6 - 15 мг/м²/день; возможно назначение повышенных доз препарата при стрессовых ситуациях (тяжелые интеркуррентные заболевания, оперативные вмешательства и др.) [139, 145, 151].

У женщин репродуктивного периода с нарушениями менструального цикла, наличием акне и не выраженным гирсутизмом препаратами выбора являются пероральные контрацептивы с антиандрогенным эффектом [117].

При этом, в своем исследовании Fanta M. с соавт. (2009) показал, что ранняя и адекватная терапия глюкокортикоидами у пациентов с НК21ОН предотвращает развитие персистирующей ановуляции в старшем возрасте [49]. Использование антиандрогенных препаратов (ципротерона ацетат (андрокур), флутамид) показано при наличии у пациенток выраженного гирсутизма и андрогенной алопеции [117]. Также, в индивидуальных случаях при использовании комбинированной схемы лечения применение контрацептивов/антиандрогенов позволяет снизить потребность в глюкокортикодах, предотвращая тем самым возможные побочные эффекты [68].

1.5. Клинические описания детей раннего возраста с неклассической формой дефицита 21-гидроксилазы.

Как уже было сказано выше, клинические проявления НК21ОН стерты и, порой, очень отсрочены, что позволяет диагностировать заболевание только в старшем возрасте. Внедрение скрининга на АГС позволило диагностировать НК21ОН уже в период новорожденности, исходя из незначительно повышенных уровней 17-ОНП при отсутствии клинической картины АГС. По данным доступной зарубежной литературы первые зафиксированные случаи незначительно повышенных уровней 17-ОНП у новорожденных в ходе скрининга на ВДКН, позволяющих заподозрить НК21ОН, принадлежат Pang S.Y. с соавт. [103] и датированы 1988 годом. В 1993 году Wedell A. с соавт. [143] описывает еще 5 случаев НК21ОН у новорожденных, диагностированных на основании повышения уровня 17-ОНП в ходе неонатального скрининга. Подробный клинико-гормональный и молекулярно-генетический анализ 12 случаев НК21ОН представлен зарубежными исследователями в 4 крупных исследованиях за

период 1991 - 2008 года [69, 115, 124, 125]. По данным неонатального скрининга на АГС у всех пациентов было выявлено незначительное повышение уровня 17-ОНП (от 18 до 57 нмоль/л) с постепенным нарастанием показателя в ходе динамического наблюдения в большинстве случаев при отсутствии клинических проявлений надпочечниковой недостаточности и синдрома гиперандрогении. Лабораторные данные демонстрируют нормальные показатели кортизола во всех случаях; уровни АКТГ оказались выше референсных значений у 4 из 12 пациентов (30% наблюдений). Всем пациентам проводились стимуляционные пробы с аналогами АКТГ, в ходе которых уровень 17-ОНП оценивался в соответствии с принятыми критериями [92]. Все 12 случаев НК21ОН были подтверждены молекулярно-генетически. У 10 пациентов заболевание было обусловлено наличием мутации Р30L, характерной для НК21ОН, на одном аллеле, в сочетании с мутациями, характерными для классических форм АГС, на другом аллеле: R356W и I172N, I2spl. В исследовании Shinagawa Т. с соавт. (2007) [115] причиной НК21ОН у пациентки оказалась нехарактерная для японской популяции мутация V281L в гомозиготном положении. Как было отмечено самими авторами, мутация V281L, столь часто встречающаяся в европейской популяции, является очень редкой в японской популяции, а в данном наблюдении, скорее всего, объясняется происхождением родителей пробанда.

В 1 случае в ходе молекулярно-генетического анализа у пациентки были выявлены мутации I123N, V237E и M239K в гомозиготном положении. У одного пациента [124] в ходе молекулярно-генетического исследования были обнаружены 2 мутации в составе компаундной гетерозиготы, обе из которых ассоциированы с практически полной потерей ферментативной активности 21-гидроксилазы и, таким образом, сольтеряющей формой заболевания (R356W/707del8). При этом до двухлетнего возраста (возраст ребенка на момент исследования - 2 года)

клинические проявления заболевания также отсутствовали. В ходе скрининга уровень 17-ОНП у этого ребенка был сравним с таковым у остальных трех пациентов, однако, на фоне стимуляции аналогами АКГГ 17-ОНП соответствовал сольтерьющей форме заболевания. Подобные случаи были описаны и ранее [119, 150] и объясняются авторами тем, что, возможно, фенотипические проявления заболевания регулируются некими факторами, не имеющими отношения к поврежденному локусу гена *CYP21*: например, наличием экстраадrenalовой активности 21-гидроксилазы, не одинаковой степенью конверсии 17-ОНП в андрогены или различной чувствительностью тканей к активным андрогенам [75].

При обследовании пациентов в динамике у 10 из 12 детей (83%) данных за клинические проявления надпочечниковой недостаточности и/или синдрома гиперандрогении (ускорение темпов роста, костного созревания, преждевременное половое развитие) отмечено не было, ни один из названных пациентов лечения не получал. Двум детям было назначено лечение препаратами гидрокортизона [69]. Девочке лечение гидрокортизоном в дозе 12 мг/сутки было рекомендовано по причине плохой прибавки в весе, а также высоких базальных уровней 17-ОНП и 21-дезоксикортизола. В 11-месячном возрасте препарат был отменен, а в 3 года 8 месяцев в связи с ускорением темпов роста и костного созревания лечение было возобновлено в дозе 10 мг/сутки и в последующем увеличено до 15 - 18 мг/сутки в связи с отсутствием клинической компенсации заболевания. На момент последнего обследования (12,5 лет) пациентка продолжала получать терапию гидрокортизоном в дозе 25 мг/сутки; ее рост составил 149,7 см, что несколько ниже ее целевого роста по родителям (153,5 см). Пациенту, являющемуся родным братом вышеописанной пациентки, было также начато лечение препаратами гидрокортизона, однако, в более старшем возрасте (8,5 лет) и по причине прогрессирующего с 4,5 лет ускорения темпов роста и костного

созревания. Дозы препарата колебались от 18 до 28 мг/сутки. Конечный рост пациента составил 159,4 см (целевой рост по родителям - 166,5 см). В возрасте 9 лет на фоне респираторного заболевания у пациента были отмечены нарушения водно-электролитного баланса в виде гипонатриемии и гиперкалиемии, купирующиеся повышенными дозами гидрокортизона.

Анализ отечественных и зарубежных литературных источников показал, что изучение демографических, клинико-лабораторных и молекулярно-генетических характеристик НК21ОН является до настоящего времени актуальным вопросом современной эндокринологии. Высокая распространённость НК21ОН продемонстрирована в различных популяциях; четко описаны и обоснованы методики расчета истинной частоты заболевания с использованием законов популяционной генетики. Несмотря на это, в российской популяции исследования истинной распространенности НК21ОН и демографическая обоснованность полученных данных до настоящего не проводились.

Диагностика и лечение пациентов старшей возрастной группы, особенно женщин репродуктивного периода с НК21ОН, широко освещаются в литературе, тогда как в раннем и младшем возрасте заболевание остается изученным недостаточно, в основном, ввиду трудностей диагностики. Несмотря на продемонстрированную некоторыми зарубежными авторами более высокую информативность и внедрение метода ТХМС для исключения нарушений стероидогенеза у новорожденных, диагностический потенциал метода для диагностики НК21ОН у детей раннего возраста раскрыт не полностью. До настоящего времени существующие критерии диагностики по методу разработаны только в нескольких лабораториях и только для классических форм АГС, тогда как вычисленные высокочувствительные и специфичные

диагностические критерии основных маркеров НК21ОН в раннем возрасте с использованием ТХМС нами встречены не были. Опыт применения ТХМС среди отечественных исследователей не накоплен.

При высокой частоте НК21ОН в различных популяциях и появившейся возможности ранней диагностики заболевания по результатам неонатального скрининга клинические и гормональные данные таких пациентов представлены в единичных зарубежных работах.

Несмотря на достаточно изученный патогенез и возможности лечения заболевания, четкие алгоритмы ведения пациентов при ранней постановке диагноза НК21ОН в доступной литературе не разработаны.

Таким образом, отсутствие данных об истинной распространенности НК21ОН в российской популяции, а также четких клинико-гормональных критериев и рекомендаций по тактике ведения пациентов с НК21ОН в раннем возрасте, побудило нас провести данное исследование.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования

1. Изучение распространенности заболевания

Для оценки частоты встречаемости НК21ОН проанализирована распространенность 2 наиболее частых мутаций (V281L и R30L), характерных для данного заболевания. Объектом исследования оказались случайно отобранные 938 образцов пятен крови в Медико-генетической лаборатории МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (зав. отд.- к.м.н. С.Г. Калиненко), полученные при проведении неонатального скрининга на АГС у новорожденных детей, родившихся в течение одного календарного года на территории Московской области. Критериями включения в группу являлись клинические данные, соответствующие доношенности новорожденного, отсутствие тяжелых врожденных заболеваний, а также славянская природа фамилии матери новорожденного. Уровень 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) при отборе образцов не учитывался. Молекулярно-генетический анализ выполнялся с использованием аллель-специфической полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и секвенирования гена *CYP21*. После получения результатов молекулярно-генетического анализа в исследуемых образцах изучался уровень 17-ОНП, полученный в ходе тестирования новорожденного на АГС. Для изучения демографических особенностей распространения НК21ОН в российской популяции были изучены «частые» фамилии матерей новорожденных (чьи образцы крови были взяты для генетического анализа) с помощью специального картографического метода. Карты распространения гаплогрупп были созданы с помощью программного обеспечения GeneGeo [1].

2. Клинико-лабораторные и молекулярно-генетические исследования пациентов

Изучение клинико-гормональных особенностей НК21ОН и результатов молекулярно-генетического исследования осуществлялись на основании обследования 137 пациентов, находящихся на обследовании и лечении в институте детской эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (директор – член - корр. РАН, профессор Петеркова В.А.) и отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (заведующий отделением - д.м.н. Тюльпаков А.Н.) в 2009 - 2014 гг. Из 137 пациентов 113 были дети раннего возраста, обследование которых проводилось по поводу повышения уровня 17-ОНП, выявленного в ходе неонатального скрининга на АГС. Данные, полученные при обследовании этих пациентов, решали различные задачи нашей работы, ввиду чего они были разделены на группы. Часть детей (50 человек) включены в ретроспективное исследование, остальным 63 пациентам проводилось проспективное исследование клинико-гормонального и генетического статуса. Среди детей раннего возраста было 66 мальчиков (58,4%) и 47 девочек (41,6%). Согласно общепринятым критериям доношенности (срок гестации более 37 недель и вес более 2000 г) выделяли доношенных и недоношенных детей. Возраст обследования колебался от 11 до 425 дней. Распределение пациентов по полу, возрасту и доношенности представлено в таблице 1.

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов раннего возраста.

Показатель/признак	Пациенты, включенные в исследование, n=113
Мальчики/девочки	66 (58,4%)/47 (41,6%)
Доношенные (ГВ>37 недель, вес >2000г) Недоношенные (ГВ<37 недель, вес <2000 г)	83 (73,5)/30 (26,5%)
Возраст при обследовании	65,8 [21,0;83,5] дней

Примечание: ГВ – гестационный возраст

Изучение клинико-гормональных особенностей и молекулярно-генетических характеристик НК21ОН у детей раннего возраста и понимание необходимости разработки алгоритма проспективного наблюдения и ведения этой категории пациентов побудило нас расширить исследование и дополнительно ретроспективно проанализировать еще одну подгруппу из 24 детей старшего возраста, у которых заболевание было диагностировано на основании жалоб и клинико-anamnestических данных. В подгруппу вошли 18 девочек и 6 мальчиков в возрасте 3 - 16 лет.

Всем пациентам при первичном и повторных обращениях проводилось общеклиническое обследование (оценка роста, веса, прогнозируемого роста по родителям, общего клинического осмотра с прицельным осмотром области наружных гениталий), молекулярно-генетический анализ, а также исследование уровня 17-ОНП радиоиммунным методом (РИА) и методом тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС). При необходимости обследование дополнялось исследованием уровней адренкортикотропного гормона (АКТГ), кортизола, тестостерона и активности ренина плазмы (АРП). При

динамическом наблюдении пациентов с НК21ОН помимо рутинных гормональных обследований при достижении возраста 1 года и старше проводилась оценка костного возраста, а части пациентам - ультразвуковое исследование надпочечников.

Методы исследования

1. Методы изучения распространенности

1.1 Объем наблюдений

В первой части работы нами вычислялся показатель распространенности НК21ОН. Для определения необходимого объема наблюдений использовалась статистическая формула для вычисления числа наблюдений (относительные величины) [6]:

$$n = \frac{t^2 pq}{\Delta^2}$$

n - необходимый объем наблюдений

t - доверительный коэффициент

p - показатель (%), взятый из предыдущих исследований, а если аналогичные исследования не проводились, то берется максимальная величина pq, то есть равная 50%

Δ - ошибка

P - вероятность безошибочного прогноза (t=3 при P=99%, t= 2 при P=95%)

С учетом максимальной частоты встречаемости НК21ОН в популяции евреев Ашкенази (3,7% или 1:27), p принято равным 3,7%, q соответственно равным 96,3%. В обычных условиях $\Delta = 5\%$, но, так как $\Delta > p$, то Δ рассчитывается, как p/3 и равно 1,23. t = 2 (вероятность безошибочного прогноза 95%).

Тогда по формуле $n = 2^2 \times 3,7 \times 96,3 / 1,23^2 = 938$

Число наблюдений получилось равным 938. Имея ввиду большую разрозненность данных относительно частоты встречаемости НК21ОН в различных популяциях, можно принять $p = q = 50\%$, $\Delta = 5$, тогда количество образцов даже при $t = 3$ (вероятность безошибочного прогноза 99%) в соответствии с формулой будет равным 900.

1.2 вычисление частоты заболевания

После получения результатов молекулярно-генетического анализа в 938 образцах вычисление частоты НК21ОН проводилось с учетом частот гетерозигот по двум искомым мутациям по формуле Харди-Вайнберга [2]:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Где p^2 - доля гомозигот по одному из аллелей; p - частота этого аллеля; q^2 - доля гомозигот по альтернативному аллелю; q - частота соответствующего аллеля; $2pq$ - доля гетерозигот

1.3 Компьютерный метод построения карт

Для оценки возможности применения данных о распространенности НК21ОН, полученной на территории Московской области, на популяцию России в целом мы проанализировали фамилии матерей новорожденных с помощью картографического метода [1]. Нами изучены так называемые «частые» фамилии. Принадлежность фамилии к «частой» определялась с учетом магистрального списка, который содержит данные о средних частотах каждой фамилии в основных регионах России. Далее частоты фамилий суммировались и на карте изображались в виде «фамильных ландшафтов», где частоты фамилий представлены в виде ареалов от темного (высокая частота) до светлого (низкая частота) тонов. Нами построены и проанализированы карты фамилий для всей выборки в целом ($n=938$) и для обследуемых, у которых была обнаружена мутация V281L в

гетерозиготном положении ($n=39$). В рамках метода для каждой карты создается ее точная цифровая модель (ЦМ). Для этого на специальную картографическую основу (оцифрованная контурная карта в определенной картографической проекции и масштабе, гидрография, административные границы и так далее) покрывается густой равномерной сеткой, на которую наносятся изученные популяции. Для каждого узла сетки по совокупности всех исходных данных рассчитывается ожидаемое (интерполированное) значение признака в данной точке пространства. Интерполяция проводится методом средневзвешенной интерполяции с использованием ортогональных полиномов 0 степени. При этом каждая популяция (лежащая в пределах заданного радиуса) участвует в расчете значения узла сетки с собственным весом, обратно пропорциональным 6 степени расстояния от популяции до рассчитываемого узла сетки. По их совокупности взвешенных значений всех исходных популяций (в пределах заданного радиуса) рассчитывалась средняя частота, присваиваемая узлу сетки. После проведения расчета для всех узлов сетки получаем равномерную числовую матрицу. Она и является цифровой моделью карты: все дальнейшие статистические расчеты и преобразования проводятся именно с ней, то есть с точными значениями для каждого узла сетки. Для создания карт фамилий использовалась область, соответствующая территории расселения «исконно» русских фамилий, представленных в работе, для этого соседние территории отсекались, и программой не учитывались.

Картографический образ получается в результате объединения значений ЦМ в интервалы (интервалы указаны в легендах вместе с гистограммой, указывающей долю площади, занятой данным интервалом частот) и их окрашивания. Нарастание интенсивности окраски интервала соответствует нарастанию концентрации признака: наименьшие значения - окрашены самыми светлыми тонами; наибольшие значения признака -

интенсивно темными тонами. При чтении карты следует всегда помнить, что изменчивость признака непрерывна и что границы между интервалами относительны: интервалы могут быть заданы иные - более дробные, более общие, смещенные и так далее. И хотя образ карты при изменении интервалов несколько видоизменяется, общая закономерность распределения признака (зафиксированная в ЦМ) остается неизменной.

В легендах карт всех признаков приведена следующая информация: К - число исходных популяций, указанных на карте темными точками; N - число узлов равномерной сетки ЦМ, характеризующих картированную территорию; MIN, MAX, AVR - минимальное, максимальное и среднее значение частоты признака для картированной территории. В нижней части второго окна легенды приведены шкалы интервалов, соответствующих избранному масштабу.

2. Клинические методы обследования

Общеклинические обследования проводились на базе института детской эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (директор – член – корр., профессор Петеркова В.А.) и отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (заведующий отделением - д.м.н. Тюльпаков А.Н.) и включали в себя сбор анамнеза жизни, заболевания и семейного анамнеза, оценку физического развития, клинический осмотр по общепринятой методике. Оценка показателей роста (см), веса (кг), индекса массы тела (ИМТ, $\text{кг}/\text{м}^2$) с расчетом соответствующих стандартных отклонений для каждого показателя (SDS), расчет площади поверхности тела (S , м^2) проводились с помощью приложения Auhology (Munich Auhology Project, Kromeyer-Hauschild et al., 2001). Расчет целевого роста по родителям производился с использованием соответствующих формул:

(рост отца + рост матери + 13/2) - для мальчиков; (рост отца + рост матери + 13/2) - для девочек.

3. Гормональные методы исследования

3.1. «Традиционные» гормональные исследования выполнялись в лаборатории гормонального анализа ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (руководитель – профессор, д.м.н. Н.П. Гончаров). Уровень 17-ОНП и активность ренина плазмы (АРП) исследовались радиоиммунным методом (РИА) с использованием наборов IMMUNOTECH (Франция). Определение уровня кортизола сыворотки крови проводилось с использованием автоматического анализатора VITROS Eci (Johnson & Johnson, Ortho-Clinical Diagnostics), уровня АКТГ - с помощью автоматического анализатора Cobas e 411 (Германия).

Уровни гормонов оценивались с учетом нормативных значений, приведенных для каждого из методов.

3.2. Метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС)

Для одномоментного исследования стероидов сыворотки крови (17-ОНП, 11-дезоксикортизол, 21-дезоксикортизол, андростендион, кортизол, прогестерон, тестостерон) применялся метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС). Анализ получил название мультистероидного профиля крови.

При выполнении настоящей работы были использованы следующие химические реагенты:

- стероидные гормоны: тестостерон, кортизол, кортикостерон, 21-дезоксикортизол, 11-дезоксикортизол, 17-гидроксипрогестерон, прогестерон, андростендион (Cambridge Isotope Laboratories, США);

- дейтерированный d8-17-гидроксипрогестерон, дейтерированный d8-кортикостерон (Cambridge Isotope Laboratories, США);
- метанол ("Merck", Германия);
- вода ("Merck", Германия);
- ацетонитрил ("Merck", Германия);
- этилацетат ("Merck", Германия);
- источник жидкого азота

Стандартные растворы стероидных гормонов для построения калибровочных кривых для каждого стероида готовили последовательным разбавлением исходных растворов в метаноле до соответствующих концентраций.

Для проведения анализа использовали систему, состоящую из хроматографа «FX-15 UHPLC System» (Perkin Elmer), масспектрометра ABSciex QTRAP 5500 и персонального компьютера.

Протокол пробоподготовки образцов для анализа основан на опыте зарубежных исследователей и представляет собой разработку лаборатории наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (зав. отд., д.м.н. А.Н. Тюльпаков). Для пробоподготовки использовали 250 мкл исследуемой сыворотки с добавлением 50 мкл одного из внутренних стандартов. Для экстракции использовались растворы ацетонитрила с водой в соотношении 1:1, этилацетата; жидкий азот. По завершению пробоподготовки супернатант образцов переносили в малую виалку и анализировали методом ТХМС с использованием вышеназванной системы. Результат, полученный в виде хроматограммы, анализировали вручную и с использованием специального программного обеспечения «Analyst software».

4. Инструментальные методы обследования

4.1 Оценка костного возраста (рентгенография кистей с захватом лучезапястного сустава) проводилась по методике Таннера - Вайтхауса с использованием атласа TW20 и программы Auxology (Munich Auxology Project, Kromeyer-Hauschild et al., 2001).

4.2 Ультразвуковое исследование надпочечников проводилось по принятой методике в учреждениях г. Москвы.

5. Генетические методы исследования

5.1 Изучение показателя распространенности НК21ОН на 938 образцах пятен крови предполагало поиск двух искомых мутаций (V281L и P30L) с помощью специально разработанного в отделении наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России метода (зав. отд., д.м.н. А.Н. Тюльпаков).

ДНК выделялась с использованием наборов Diatom Pre DNA 100 и Promega (США).

Для выявления мутации V281L при ПЦР использовались следующие олигонуклеотиды: F1, CGGACCTGTCCTTGGGAGACTAC (прямой праймер, специфичный для экзона 3 гена *CYP21A2*), 1688T, GGTCCACTGCAGCCATGTGCAA (обратный праймер, специфичный для мутации V281L), иR1, CCTCTCCCAGACCGTCTCATC (обратный праймер, внутренний контроль). При наличии мутации V281L ожидалась амплификация 2 ПЦР-продуктов: F1-1688T (993 п.о.) и F1-R1 (1635 п.о.), при отсутствии мутации - 1 ПЦР-продукт F1-R1 (1635 п.о.) (Рис. 1).

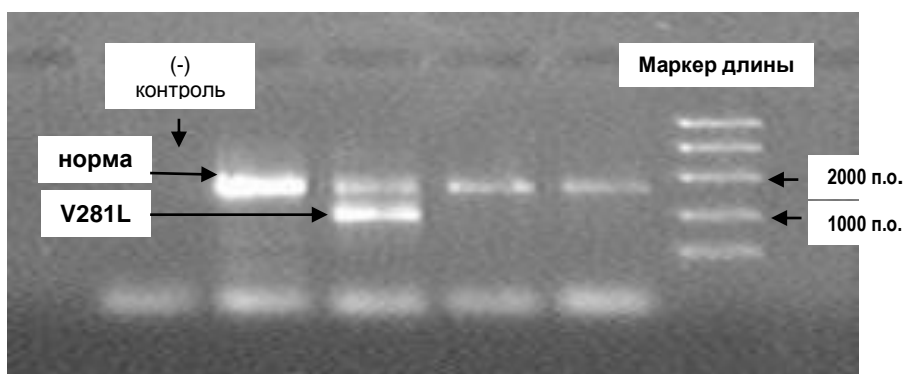


Рисунок 1. Детекция мутации V281L методом ПЦР.

Для выявления мутации P30L при ПЦР использовались следующие олигонуклеотиды: F2, GCGATTTCAGGAAGGCCTATTAGG (прямой праймер, внутренний контроль), 92T, CTCGGAGCCTCCACCTCCT (прямой праймер, специфичный для мутации P30L), и R2, TCCAGAGCAGGGAGTAGTCTC (обратный праймер, специфичный для экзона 3 гена *CYP21A2*). При наличии мутации P30L ожидалась амплификация 2 ПЦР-продуктов: F2-R2 (1146 п.о.) и F2-92T (640 п.о.), при отсутствии мутации — 1 ПЦР-продукт F2-R2 (1146 п.о.).

Наличие мутации в каждом случае подтверждалось секвенированием гена *CYP21*.

5.2 Молекулярно-генетические исследования у пациентов, составляющих клиническую часть исследования

Геномную ДНК выделяли из периферических лейкоцитов с использованием наборов Promega по протоколу.

Детекцию 10 точковых мутаций в гене *CYP21A2* методом аллель-специфической ПЦР проводили в лаборатории генетики и клинической иммунологии (руководитель - к.м.н. С.А. Прокофьев) по методике A.Wedell и H. Luthman с модификациями [143].

Прямое секвенирование гена *CYP21A2* или отдельных экзонов проводилось в лаборатории молекулярной генетики на базе отделения

наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (зав. отд. - д.м.н. А.Н. Тюльпаков) на автоматическом секвенаторе «Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer» (США).

б. Статистический анализ данных.

Весь представленный фактический материал подвергнут обработке методом математической статистики с определением достоверности полученных данных. Статистический анализ проводился на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2003 при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001) и программы BIOSTATISTICA 4.03 (S.A.Glantz, McGraw-Hill, перевод на русский язык – «Практика», 1998).

Проверка гипотезы о гауссовском (нормальном) распределении количественных признаков по критериям Колмогорова - Смирнова в форме Лиллиефорса и Шапиро - Уилка позволила судить о характере распределения (нормальное или ненормальное) и обосновать применение соответственно параметрических или непараметрических критериев статистики. Для количественных признаков рассчитывались: средние (M), стандартные отклонения (SD), минимальные (min) и максимальные (max) значения, медианы (Me), перцентили [25;75]. Полученные результаты при нормальном типе распределения данных представляли в виде $M \pm SD$, при ненормальном распределении - в виде Me [25;75]. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку для оценки значимости межгрупповых различий использовали t-критерий Стьюдента для нормальных выборок, U-тест Манна-Уитни (U) - для ненормального распределения. Для сравнения трех независимых групп использовался критерий Крускала - Уолиса (H). Для оценки взаимосвязи признаков проводили корреляционный анализ с использованием коэффициента

корреляции Спирмена (r). Для сравнения измерений, выполненных двумя разными методами, применялся метод Блэнда-Альтмана.

Используя принцип решающей матрицы, оценивали показатели диагностических тестов (истинно отрицательные результаты (ИО), истинно положительные результаты (ИП), ложно отрицательные результаты (ЛО), ложно положительные результаты (ЛП)) и информативность данных признаков (чувствительность, специфичность, точность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата).

Указанные статистические показатели рассчитывали по формулам:

- Чувствительность = $\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})$
- Специфичность = $\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})$
- Точность = $(\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛП} + \text{ЛО})$
- Прогностическая ценность положительного результата = $\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП})$
- Прогностическая ценность отрицательного результата = $\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО})$

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

С целью графического представления данных и расчета оптимального значения величины порога отсечения исследуемых признаков использовался метод построения ROC-кривой (Receiver Operating Characteristic) с использованием программы статистического анализа SPSS 17.0 Portable Rus. Для получения численного значения клинической значимости теста использован показатель AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой).

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Распространенность неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы в российской популяции.

Изучение распространенности НК21ОН осуществлялось на основании исследования 2 мутаций в образцах пятен крови, полученных в ходе неонатального скрининга на АГС у доношенных здоровых новорожденных со славянской фамилией матери. Молекулярно-генетический анализ 938 пятен крови, выполненный в нашем исследовании был достаточен для получения корректных значений распространенности НК21ОН, поскольку необходимый объем наблюдений (для достоверности полученной величины не менее 95%), рассчитанный с использованием статистической формулы для относительных величин, составил не менее 900 случаев.

Истинную распространенность заболевания мы определяли с помощью закона популяционной генетики (закон Харди-Вайнберга), зная частоту гетерозигот (носителей) среди выборки новорожденных Московской области. Рассчитанное необходимое число наблюдений (для достоверности полученной величины 95%) с использованием статистической формулы для относительных величин, получилось равным 938. В результате аллель-специфической ПЦР среди 938 исследуемых образцов в 41 была обнаружена мутация V281L (в гетерозиготном положении). Наличие мутации было проверено секвенированием соответствующего участка гена в каждом из образцов: в двух образцах наличие мутации не подтвердилось, то есть число носителей оказалось равным 39. Интересно отметить, что при секвенировании в некоторых

образцах были выявлены дополнительные мутации в гетерозиготном состоянии (Табл. 2), причем во всех случаях встречались мутации из разряда «частых», которые обычно определяются в ходе аллель-специфической полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для верификации диагноза при подозрении на АГС.

Таблица 2. Дополнительные мутации, выявленные в гене CYP21 в ходе секвенирования образцов с мутацией V281L.

№	Порядковый номер образца	Доп.мутации
1	106	c.920_921insT
2	170	c.920_921insT
3	335	c.920_921insT, Q318X
4	416	c.920_921insT
5	552	c.920_921insT, Q318X, R356W
6	636	c.920_921insT
7	656	Q318X, R356W
8	808	c.920_921insT
9	820	c.920_921insT
10	827	Q318X, R356W
11	867	c.920_921insT, Q318X, R356W
12	933	Q318X, R356W

В ходе аллель-специфической ПЦР ни в одном из 938 исследуемых образцов мутации P30L выявлено не было. Таким образом, частота гетерозигот по мутации V281L оказалась равной 1:24. Доля гомозигот для мутации V281L, рассчитанная по закону Харди-Вайнберга, оказалась равной 1:2206. Учитывая возможность ассоциации НК21ОН с компаунд-гетерозиготностью по мутации V281L, а также с другими более редкими мутациями, можно утверждать, что 1:2206 является минимальной частотой распространенности данного заболевания в исследованной популяции.

Нами также был проанализирован уровень 17-ОНП в группе носителей (n = 39) и в образцах, где мутаций выявлено не было (n = 899), и получены следующие результаты: среднее значение 17-ОНП в первой группе составило $4,70 \pm 2,85$ нмоль/л, минимальное значение 17-ОНП - 2

нмоль/л, максимальное - 15,4 нмоль/л; во второй группе образцов среднее значение 17-ОНП оказалось равным $6,04 \pm 3,11$ нмоль/л, при этом минимальный уровень показателя - 2,1 нмоль/л, максимальный - 16,6 нмоль/л (Рис. 2). Для определения достоверности разности между показателями 17-ОНП в изучаемых группах коэффициент Стьюдента t был вычислен в группе образцов с мутацией ($n = 39$) и сопоставимой по количеству группе случайно отобранных образцов без мутации ($n = 39$). Полученный коэффициент t , равный 1, позволяет утверждать, что с вероятностью безошибочного прогноза $P > 95\%$ различия значений показателя 17-ОНП в этих группах не достоверны.

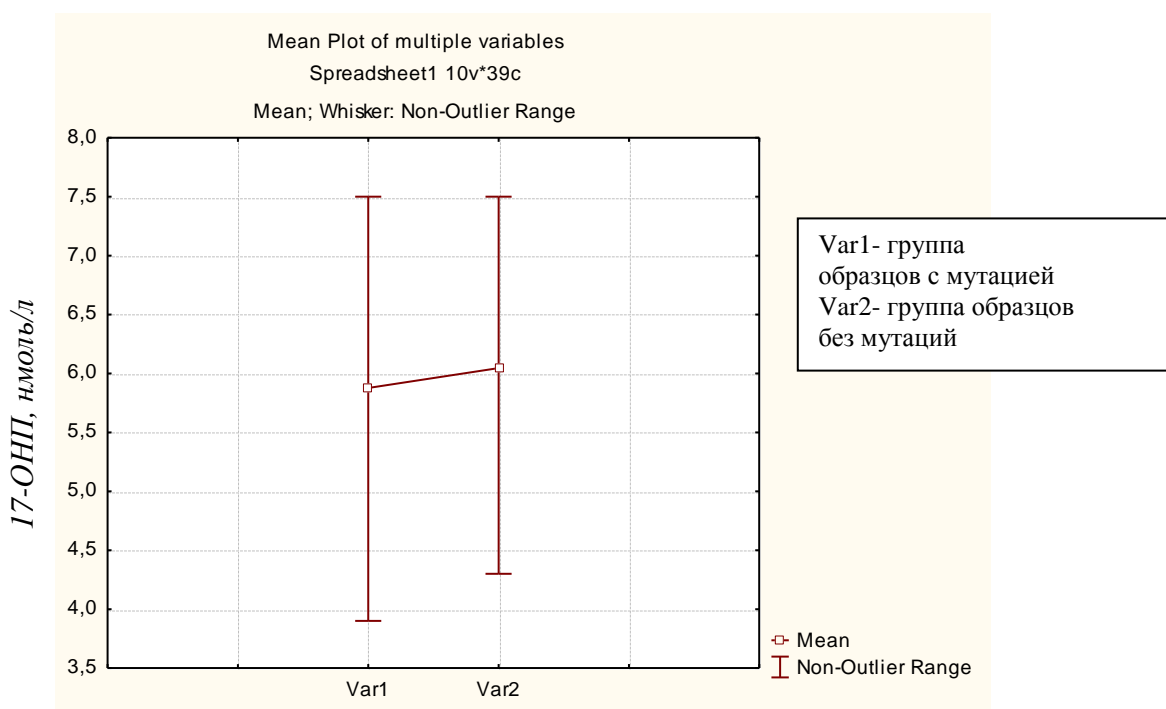


Рисунок 2. Уровень 17-ОНП в образцах с мутацией ($n = 39$) и сопоставимой по количеству группе без мутаций ($n = 39$).

Для сравнения нами также был рассчитан показатель распространенности НК21ОН по данным скрининга. Так, в ФГБУ ЭНЦ за период 2007 - 2011 гг. были диагностированы 7 случаев НК21ОН (дети, родившиеся на территории Московской области), заподозренных на

основании повышенного уровня 17-ОНП по результатам неонатального скрининга. Учитывая количество детей, родившихся в Московской области за период 2007 - 2011 гг. - 279607 по данным федеральной службы государственной статистики [17] - частота заболевания оказалась равной 1:27960, что в более чем 10 раз ниже истинной частоты НК21ОН, рассчитанной нами по закону Харди-Вайнберга. Естественно, мы не отрицаем тот факт, что через наш федеральный центр (и в том числе через врачей-эндокринологов) прошли все дети, у которых за указанный период был выявлен незначительно повышенный уровень 17-ОНП по результатам неонатального скрининга. С другой стороны, учитывая факт большого числа ложноположительных результатов скрининга, мы предполагаем, что эта цифра не может быть сильно выше.

Полученные нами данные отражают частоту носителей и распространенность изучаемого нами заболевания в популяции Московской области. А как получить данные о частоте НК21ОН в российской популяции, не прибегая к трудоемкому исследованию аналогичных выборок отдельно в каждом регионе России? На помощь приходят фамилии, которые, как показано, являются квазигенетическими маркерами: то есть, не прибегая к исследованию биологического материала с их помощью возможно изучение генетики популяций (частот аллелей) путем определения уровня инбридинга, оценки генетических расстояний, описания генетического ландшафта. Однако, в нашем случае такой задачи не стоит, так как данные о частоте уже получены. Другое преимущество заключается в том, что имея данные о фамилиях даже в небольшой выборке, можно провести компьютерный картографический анализ изменчивости частот встречаемости фамилий в изучаемой популяции и ответить тем самым на вопрос: можно ли перенести данные малой выборки на всю популяцию в целом?! Географическая изменчивость

распространенных русских фамилий отражает не только события районного масштаба, но и этнос русского народа в целом [1].

В рамках применяемой нами методики изучению подлежали так называемые «частые» фамилии в каждом из пяти основных регионов России (Северный, Южный, Центральный, Восточный и Западный), с учетом магистрального списка, который содержит данные о средних частотах фамилий в каждом из них. Далее частоты фамилий суммировались и на карте изображались в виде «фамильных ландшафтов», где частоты фамилий представлены в виде ареалов от темного (высокая частота) до светлого (низкая частота) тонов. Нами были построены и проанализированы карты фамилий для всей выборки в целом ($n = 938$) и для обследуемых, у которых была обнаружена мутация V281L в гетерозиготном положении ($n = 39$). Для наглядности материала построены карты частот отдельных фамилий.

Из 938 фамилий мы отобрали 707 «частых» фамилий, вычислили частоту встречаемости каждой фамилии в изучаемых нами популяциях и суммировали частоты фамилий (рис. 3, стр. 61).

На рисунке 3 продемонстрировано, что наши фамилии встречались преимущественно в центральном, западном и северном регионах России, которые, больше чем южный регион, являются исконно русскими, так как исторически на юге отмечается высокая интенсивность миграции населения и большая частота «местных» фамилий.

Отдельно нами были проанализированы фамилии обследуемых, у которых была выявлена искомая мутация V281L (рис. 4, стр.62). Из 39 фамилий были исключены 9 «редких» фамилий и, таким образом, анализируемая выборка оказалась равной 30.

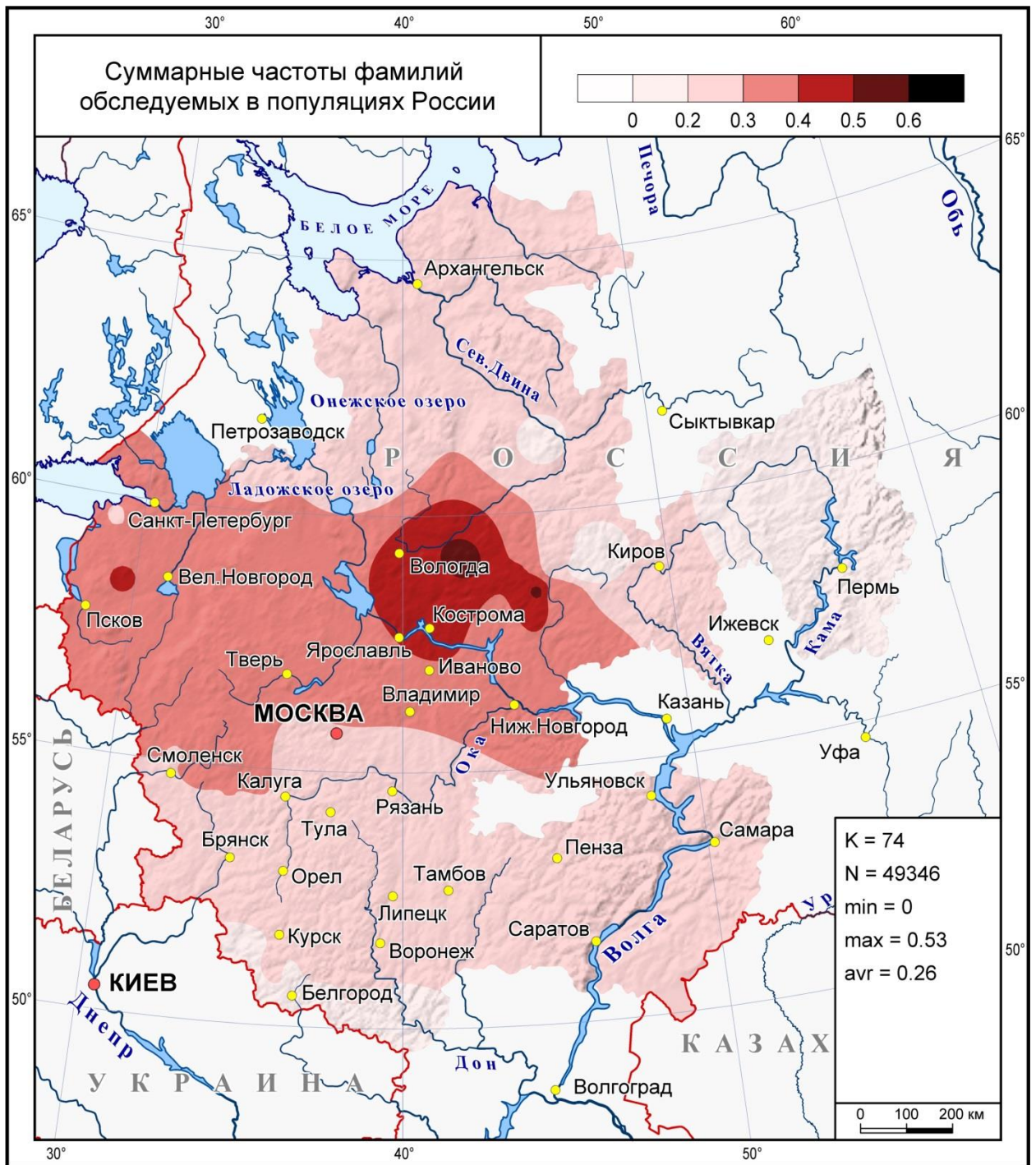


Рисунок 3. Суммарные частоты изученных фамилий обследуемых в популяциях России (n = 707).

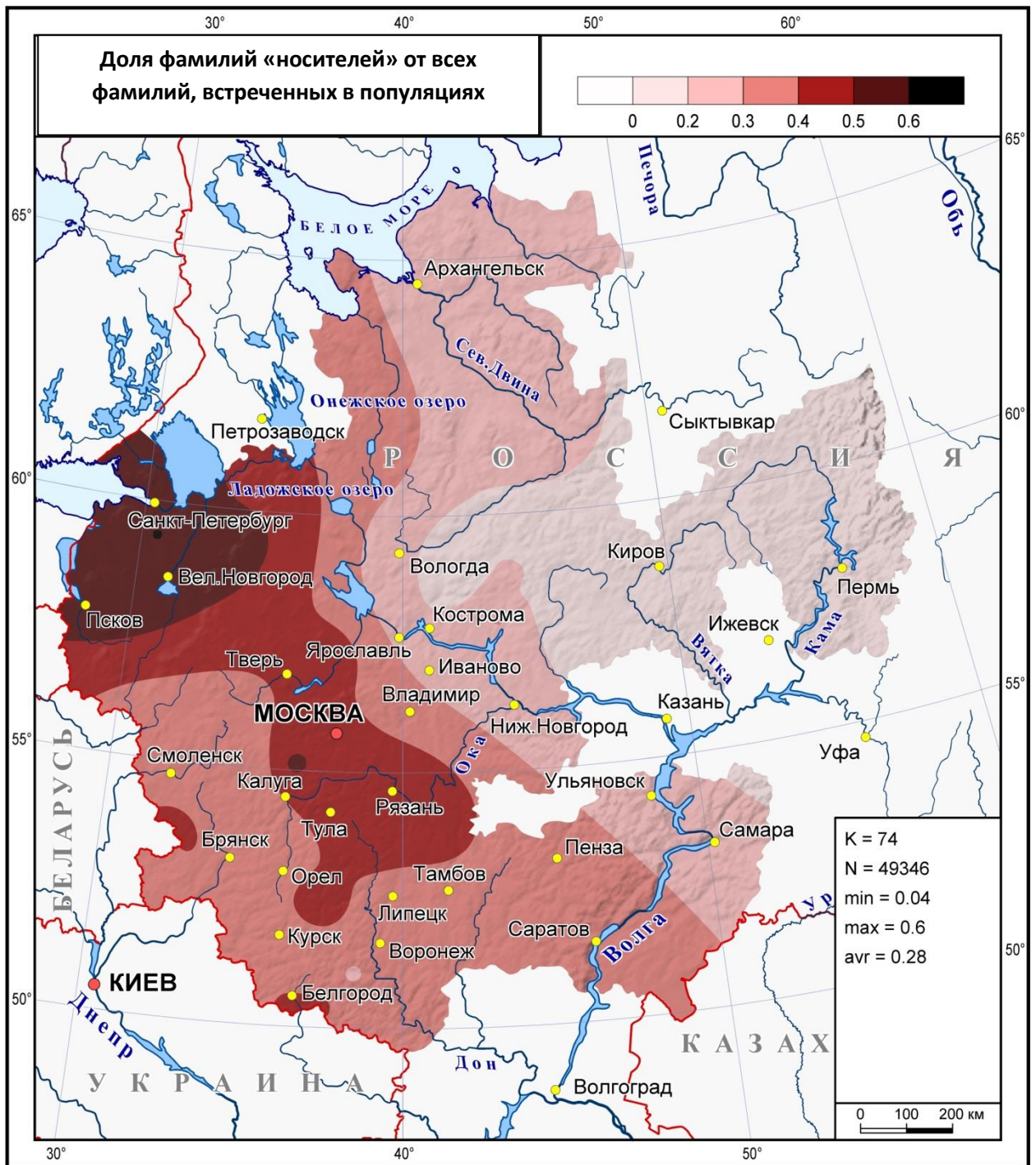


Рисунок 4. Частоты фамилий «носителей» относительно всех фамилий, встреченных в популяциях России (n = 30).

На рисунке 4 (стр.62) видно, что «носители» также встречались на территории «исконно русского» ареала с захватом и южных территорий. Считается, что мигрирующее население, частично отражающее этнос южного региона, представлено, в основном представителями народов Кавказа, среди которых частота встречаемости НК21ОН предположительно выше, чем у «исконно русского» населения, что и объясняет, скорее всего, такой «фамильный ландшафт». Также, хочется отметить, что как среди 707 изученных фамилий, почти в абсолютном большинстве встречались «всеобщие» фамилии, то есть фамилии, которые распространены во всех основных русских регионах и отражающие черты «фамильного портрета» русского народа. Так, из «топ-50» всеобщих фамилий [1] в выборке из 707 фамилий встретились 44 «всеобщие» фамилии (88%).

Таким образом, все выше описанное говорит, что, несмотря на небольшой объем выборки, взятой только на территории Московской области, анализ имеющихся фамилий позволяет нам утверждать, что полученная нами минимальная частота НК21ОН, равная 1:2206 – это распространённость заболевания по России в целом. Причем, принимая во внимание большой процент миграции, нарастающий с каждым годом на территории России, результаты исследования отражают распространённость заболевания у «исконно русского» населения.

В результате проведенного исследования на основании молекулярно-генетического анализа рассчитан показатель распространенности НК21ОН в российской популяции, который оказался равным 1:2206 новорожденных; а минимальная частота носителей (на примере мутации V281L) – 1:24. Применение картографического метода анализа фамилий матерей новорожденных позволило утверждать, что полученные данные о распространённости заболевания на территории Московской области справедливы для популяции России в целом. Изучая две наиболее распространенные мутации, характерные для НК21ОН, мы доказали, что чаще всего в популяции московской области встречается мутация V281L. Наше исследование также продемонстрировало, что неонатальный скрининг на ВДКН не позволяет диагностировать НК21ОН более чем в 90% случаев; а уровень 17-ОНП, полученный в ходе скрининга, не позволяет выявлять носителей мутаций, характерных для неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы. Большая частота как ложноотрицательных, как и ложноположительных результатов скрининга, диктует необходимость разработки новых методов диагностики НК21ОН у новорожденных для ранней постановки диагноза НК21ОН, о которых пойдет речь в следующих главах нашей работы.

3.2. Применение метода тандемной хромато-масспектрометрии для оценки стероидного профиля у детей с подозрением на врожденную дисфункцию коры надпочечников

Изучение информативности метода тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС) и радиоиммунного метода (РИА) в диагностике АГС проводили на основании ретроспективного изучения результатов обследования 50 детей, у которых в ходе скрининга на ВДКН (при первичном тестировании и/или ретестировании) были выявлены повышенные значения 17-ОНП. Всем детям методами РИА и ТХМС проведено измерение 17-ОНП.

В зависимости от клинических проявлений заболевания дети разделены на 2 подгруппы. В 9 наблюдениях (18%) наряду с повышенными значениями 17-ОНП были выявлены клинические признаки дефицита 21-гидроксилазы и/или мутации в гене *CYP21A2*, что позволило нам диагностировать классические формы дефицита 21-гидроксилазы (КФ21ОН). Эти дети отнесены в подгруппу 2 ("подгруппа КФ21ОН"). В остальных случаях (41 ребенок - 82%) ни один ребенок с повышенными уровнями 17-ОНП не имел клинических проявлений ВДКН и наиболее частых мутаций в гене *CYP21A2*. Эти пациенты составили основную подгруппу наблюдения (подгруппа «здоровых» пациентов, подгруппа 1). В основной подгруппе пациентов было 22 мальчика и 19 девочек. Учитывая общепринятые критерии доношенности, основную подгруппу пациентов составили 22 доношенных ребенка (срок гестации более 37 недель и вес более 2000 г) и 19 недоношенных новорожденных (срок гестации менее 37 недель и вес менее 2000 г - 18 человек, сроком гестации менее 37 недель и весом менее 2000 г - 1 человек). Возраст обследуемых колебался от 7 дней до 45 дней, медиана возраста составила 30,0 [20,0;42,5] дней (табл. 3, стр.66).

Таблица 3. Характеристика пациентов, обследованных по поводу повышения уровня 17-ОНП при неонатальном скрининге (ретроспективное исследование).

Показатель/признак	«здоровые»	Пациенты с классическими вариантами дефицита 21-гидроксилазы (КФ21ОН)
Количество детей	n = 41	n = 9
Мальчики/девочки	n = 22/n=19	n =5/n = 4
Недоношенные (ГВ<37 недель, вес <2000 г)	n = 19	n = 0
Возраст при обследовании	30,0 [20,0;42,5] дней	14 [11;19] дней

Примечания: ГС - гестационный возраст

В основной подгруппе пациентов по результатам тестирования медиана значений 17-ОНП составила 36,0 [26,0;58,0] нмоль/л, по ретестированию - 39,5 [21,9;59,0] нмоль/л. При пересчете обоих показателей у доношенных и недоношенных новорожденных были получены следующие результаты: медиана 17-ОНП, полученного в ходе тестирования на АГС у доношенных равна 38 [33;103] нмоль/л, у недоношенных - 33,2 [23,0;40,0] нмоль/л; по ретестированию уровень 17-ОНП у доношенных соответствовал 59 [41;71] нмоль/л у недоношенных - 32 [23;42] нмоль/л.

Расчет критерия Манна-Уитни показал наличие значимых различий показателя 17-ОНП у доношенных и недоношенных новорожденных по ретестированию ($U = 44$, $U_{0,05} = 54$) при отсутствии таковых по результатам тестирования ($U = 77$, $U_{0,05} = 72$). Что интересно и не было нами ожидаемо, уровень 17-ОНП по ретестированию, значимо отличающийся в двух подгруппах, оказался выше у доношенных новорожденных (рис. 5).

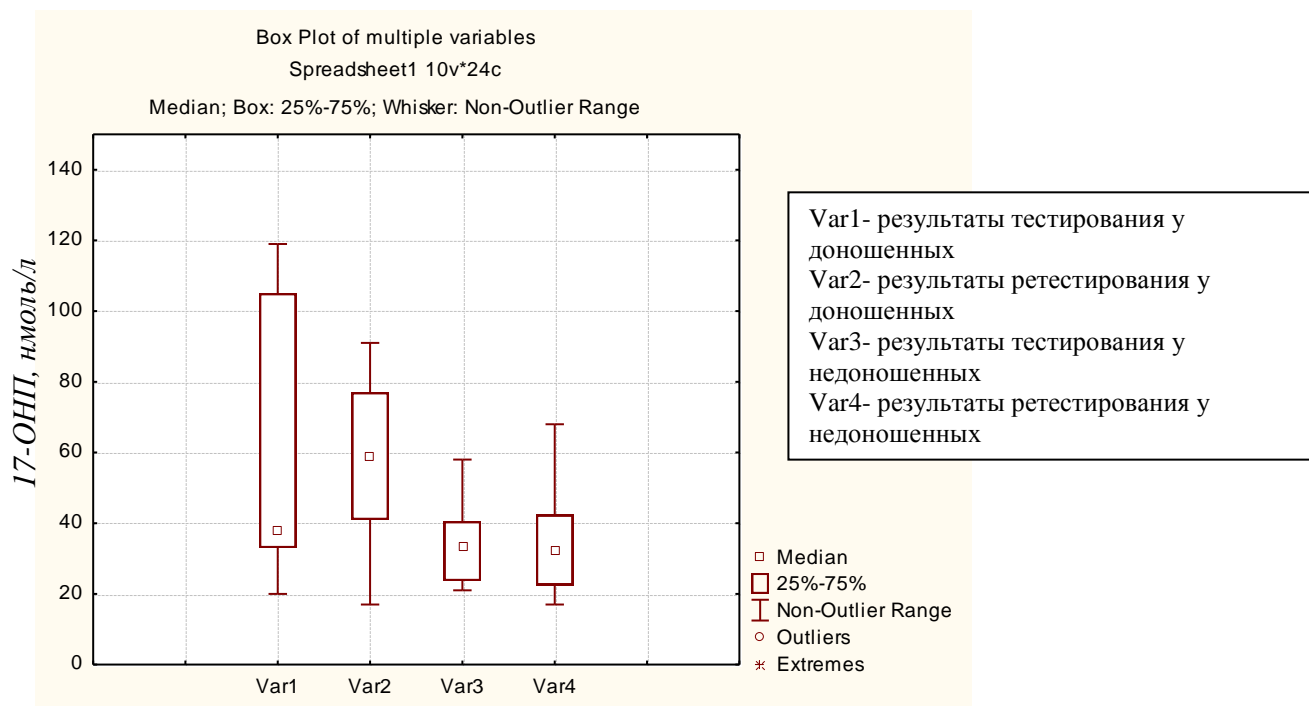


Рисунок 5. Уровни 17-ОНП в ходе тестирования и ретестирования на АГС у доношенных и недоношенных новорожденных в подгруппе «здоровых».

В подгруппе 2 (пациенты с КФ21ОН) оценка уровня 17-ОНП по результатам неонатального скрининга не проводилась.

У 41 «здорового» новорожденного (подгруппа 1) медиана 17-ОНП, измеренного методом РИА, составила 82 [44;119] нмоль/л, что более чем в 10 раз превышает референсные значения используемых наборов; при этом минимальный уровень показателя оказался равным 16,7 нмоль/л, максимальный - 356 нмоль/л. Медиана 17-ОНП по данным ТХМС составила 3,1 [1,5;7,1] нмоль/л, что значительно ниже значений показателя, измеренного методом РИА. При этом минимальный уровень 17-ОНП оказался равным 0,2 нмоль/л, максимальный - 16,22 нмоль/л (табл. 4).

Таблица 4. Значения 17-ОНП у «здоровых» и пациентов с КФ21ОН.

Показатель/признак	«здоровые»		КФ21ОН
17-ОНП, РИА	82 [44;119]		230 [15;476]
	доношенные 56 [32;137]	недоношенные 84,5 [68,8;102,6]	
17-ОНП, ТХМС	3,1 [1,5;7,1]		700 [261;1078]
	доношенные 2,4 [1,1;4,9]	недоношенные 6 [2;8]	

Ни у одного пациента исследуемой подгруппы по результатам молекулярно-генетического исследования гена *CYP21A2* частых мутаций выявлено не было. Учитывая отсутствие клинических признаков заболевания, несмотря на значительное повышение 17-ОНП по методу РИА, все пациенты оставались без терапии под динамическим наблюдением. Контрольное обследование в течение первого года жизни (оценка клинических данных, повторное исследование 17-ОНП методом РИА) выявило нормализацию уровня 17-ОНП у всех пациентов, что позволило нам, учитывая результаты генетического исследования, исключить ВДКН и расценить подъем 17-ОНП при первичном скрининге и/или ретестировании, как ложноположительные результаты. Отсутствие необходимости проведения этим детям секвенирования гена *CYP21A2* мы объясняем тем фактом, что в нашем исследовании по изучению распространенности НК21ОН в российской популяции (глава 3.1.) при проведении секвенирования 41 образца с мутациями V281L только в 12 были выявлены дополнительные мутации, среди которых все входят в спектр наиболее частых, детектируемых при проведении аллель-специфической ПЦР.

Мы также проанализировали уровень 17-ОНП, исследованный методом РИА и ТХМС, у детей с генетически подтвержденными классическими формами дефицита 21-гидроксилазы (n = 9). Так, у 9 больных медиана значений 17-ОНП по данным РИА составила 230 [15;476] нмоль/л, а по данным ТХМС - 700 [261;1078] нмоль/л, что отличается в 3 раза. На рисунке 6 мы продемонстрировали отличия

уровня 17-ОНП, измеренного методом РИА и методом ТХМС, в двух исследуемых подгруппах пациентов.

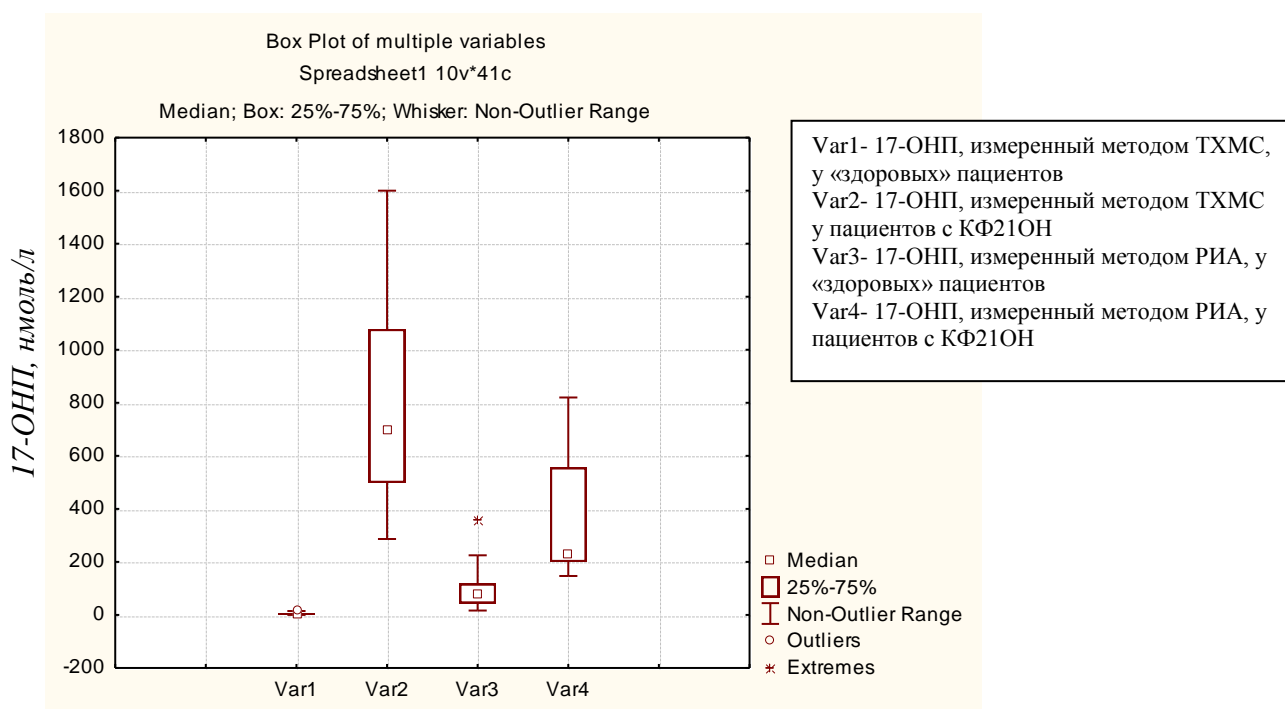


Рисунок 6. Уровни 17-ОНП, измеренного методами РИА и ТХМС, в группе пациентов с КФ21ОН и у «здоровых».

На рисунке 6 видно, что уровни 17-ОНП по методу ТХМС значительно в большей степени отличаются между «здоровыми» и пациентами с КФ21ОН (Var1 и Var2), чем по методу РИА (Var3 и Var4); а значения 17-ОНП, измеренные методом ТХМС и РИА (Var1 и Var3) у «здоровых» также в большей степени отличаются между собой по сравнению с больными (Var2 и Var4).

При этом, вычисленный критерий Манна - Уитни показывает наличие достоверных отличий показателя 17-ОНП между подгруппами по обоим методам: $U = 9,5$ $U_{0,05} = 40$ (РИА) и $U = 57$ $U_{0,05} = 153$ (ТХМС).

С целью выявления закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренными методами РИА и ТХМС, у пациентов с ложноположительным повышением 17ОНП мы рассчитали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s): значения показателя, равные 0,291, говорят о слабой

положительной корреляции значений 17-ОНП, полученных методом РИА и методом ТХМС ($p = 0,053$). С целью выявления закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренными двумя методами, мы также использовали метод Бленда-Альтмана. При применении этого метода мы оценивали показатель средней разности и стандартное отклонение разности. Показатель средней разности, характеризующий систематическое расхождение результатов при сравнении двух методов, которое в нашем исследовании составило 87,7, говорит о наличии систематического расхождения измерений, полученных двумя разными методами; стандартное отклонение разности, отражающее степень разброса результатов, которое составило 65,61, существенно отличается от полученных каждым методом измерений. Совокупность этих данных позволяет сделать вывод, что измерения 17-ОНП, полученные методом РИА и ТХМС, слабо согласуются друг с другом, а также существует зависимость разности измерений от величины 17-ОНП, определенного разными методами (рис.7).

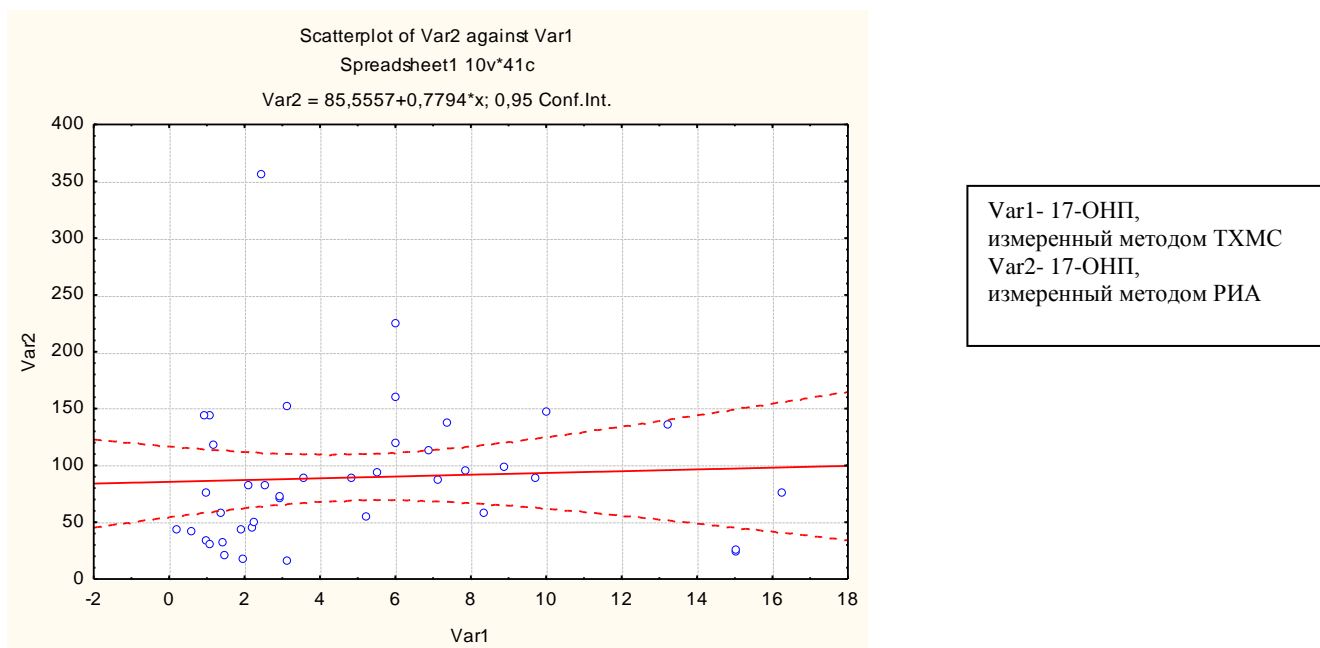


Рисунок 7. Диаграмма рассеяния для оценки закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренного двумя методами (РИА и ТХМС) у «здоровых» пациентов.

В доказательство отсутствия корреляции и согласованности между методами измерения 17-ОНП мы, используя принцип решающей матрицы,

оценивали показатели диагностических тестов (истинно отрицательные результаты, истинно положительные результаты, ложноотрицательные результаты, ложноположительные результаты) и информативность данных признаков (чувствительность, специфичность, точность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата) (табл. 5). Исходя из этих данных, мы получили, что метод ТХМС является более специфичным (87% против 26%), точным (89,6% против 37,5%) и прогностически более ценным по сравнению с методом РИА для определения показателя 17-ОНП у детей раннего возраста.

Таблица 5. Сравнение информативности двух методов исследования 17-ОНП (РИА и ТХМС) с использованием метода разрешающей матрицы

Метод исследования	Показатель				
	Чувствительность	Специфичность	Точность	Прогностическая ценность положительного результата	Прогностическая ценность отрицательного результата
РИА	100%	26%	37,5%	16,2%	100%
ТХМС	100%	87%	89,6%	58,3%	100%

В настоящее время при выборе пороговых значений 17-ОНП играют роль гестационный возраст, и в ряде стран, включая Россию, вес новорожденного. При выборе порога повышения 17-ОНП при проведении скрининга для доношенных и недоношенных детей в России были приняты следующие критерии: доношенным новорожденным считать ребенка с гестационным возрастом более 37 недель и весом более 2000 г, а недоношенным - ребенка со сроком гестации менее 37 недель и весом менее 2000 г. В нашем исследовании при сравнении показателей 17-ОНП по критерию Манна - Уитни среди «здоровых» пациентов в группе доношенных (22 человека) и недоношенных детей (19 человек) оказалось, что значения 17-ОНП по методу ТХМС достоверно не отличаются у недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными: $Me = 2,4 [1,1;4,9]$ нмоль/л против $6 [2;8]$ нмоль/л соответственно, $U = 194 (U_{0,05} = 146)$. Аналогичные результаты

были получены при сравнении 17-ОНП, полученного методом РИА: Ме 17-ОНП у недоношенных равна 84,5 [68,8;102,6] нмоль/л, у доношенных - 56 [32;137] нмоль/л, $U = 284$ ($U_{0,05} = 146$). При сравнении показателей 17-ОНП в трех подгруппах новорожденных с различными сроками гестации (32 - 35 недель; 36 - 37 недель и 38 недель и более) значения критерия Крускала - Уоллиса (H) демонстрируют зависимость значений 17-ОНП, измеренного методом ТХМС от возраста новорожденного: уровень 17-ОНП тем больше, чем меньше гестационный возраст ($H = 6,496$; $p = 0,039$) (Рис. 8). Достоверных отличий 17-ОНП, измеренного методом РИА в этих 2 группах, получено не было ($H = 13,566$; $p = 0,134$).

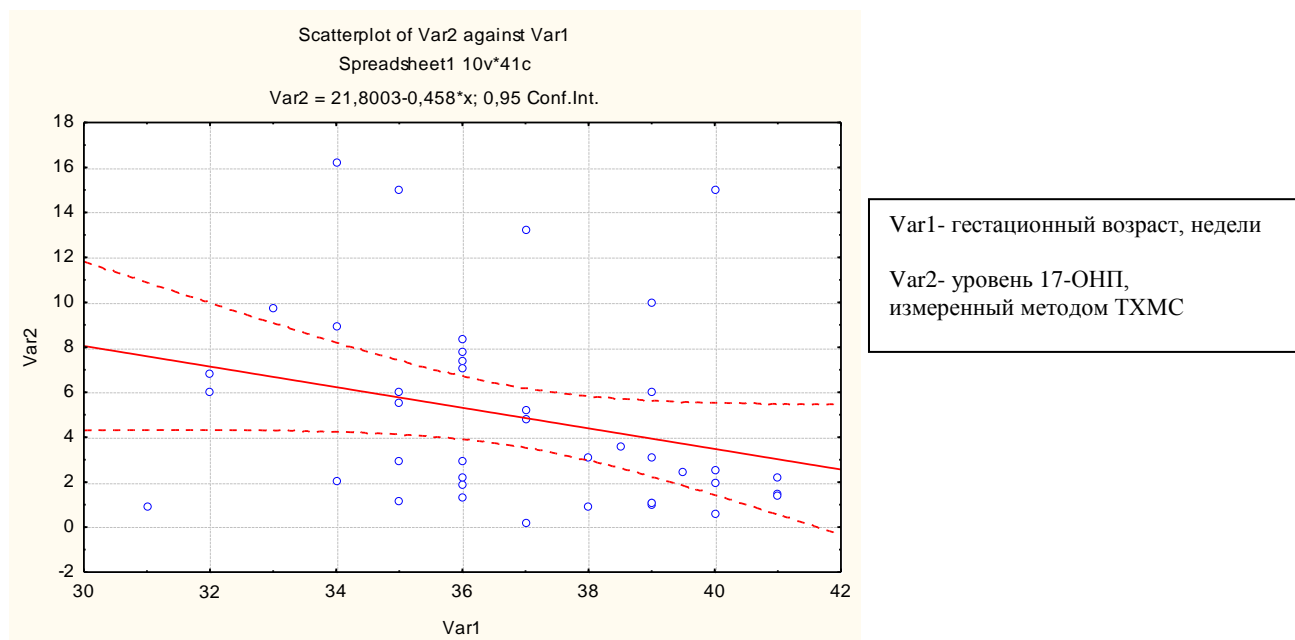


Рисунок 8. Зависимость уровня 17-ОНП от гестационного возраста на примере подгруппы «здоровых» пациентов.

Как уже упоминалось ранее, другим критерием определения референсного значения 17-ОНП в России является вес новорожденного. Так, при весе более 2 кг, независимо от срока гестации, уровень 17-ОНП определяется как для доношенного ребенка. Однако, в ряде зарубежных работ показано отсутствие прямой зависимости между весом ребенка и степенью его зрелости при рождении. Поэтому, с целью уточнения информативности и диагностической значимости

веса новорожденного для определения верхнего порога 17-ОНП нами была проанализирована зависимость значений 17-ОНП от веса у новорожденных со сроком гестации менее 37 недель. Разделение пациентов на 2 группы (более и менее 2000г) статистически не верно ввиду критично маленькой численности пациентов с весом менее 2000 г. Поэтому мы сформировали 2 группы детей: 1 - с весом от 1500 до 2500 г ($n = 12$) и 2 - с весом более 2500 г ($n = 29$). С учетом расчета критерия Манна - Уитни уровень 17-ОНП статистически значимо не отличается как по данным РИА, так и по данным ТХМС: ($U = 317$, $U = 296$ соответственно ($U_{0,05} = 116$)). Таким образом, использование веса новорожденного при выборе референсных значений 17-ОНП может приводить к увеличению числа ложноположительных результатов.

Учитывая разную активность стероидогенеза у мальчиков и девочек в период новорожденности, нами было проведено сравнение показателей 17-ОНП у пациентов женского и мужского пола среди «здоровых» пациентов. По методу ТХМС медиана 17-ОНП у мальчиков ($n = 22$) оказалась равной 6 [2,4;9,5] нмоль/л, у девочек ($n = 19$) - 2,2 [1,2;3,3] нмоль/л; по методу РИА медианы показателя 17-ОНП были равными соответственно 88 [45;133] нмоль/л у мальчиков и 73 [45;93] нмоль/л у девочек. При расчете критерия Манна - Уитни оказалось, что достоверных различий уровня 17-ОНП у мальчиков и девочек ни по одному из методов выявлено не было: $U = 162$, $U_{0,05} = 145$ для ТХМС, $U = 268$, $U_{0,05} = 145$ для РИА. При попытке оценить достоверность разницы уровня 17-ОНП у детей разного пола среди доношенных (девочек - 12, мальчиков - 10) и недоношенных новорожденных (девочек - 7 человек, мальчиков - 12) с использованием критерия Манна - Уитни (U) мы получили следующие результаты. У доношенных новорожденных по данным ТХМС уровень 17-ОНП достоверно выше у мальчиков, чем у девочек: $Me_{\text{мальчики}} = 5,2$ [3,1;10,0] нмоль/л, $Me_{\text{девочки}} = 1,44$ [1,0;2,5] нмоль/л, ($U = 29$, $U_{0,05} = 30$) (Рис. 9). При сравнении показателей 17-ОНП методом РИА статистически достоверных отличий уровня 17-ОНП среди полов у доношенных пациентов нами выявлено не было: $Me_{\text{мальчики}} = 56$ [25;137] нмоль/л,

Me_{девочки} = 64 [40;103] нмоль/л, ($U = 95$, $U_{0,05} = 30$). У недоношенных новорожденных статистически значимых отличий значений 17-ОНП по данным обоих методов в зависимости от половой принадлежности нами также выявлено не было: $U = 68$, $U_{0,05} = 24$ для ТХМС; $U = 91$, $U_{0,05} = 24$ для РИА. Полученные результаты свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований с целью пересмотра нормативных значения для метода ТХМС у доношенных новорожденных в зависимости от пола.

Подобные расчеты в подгруппе пациентов с КФ21ОН нами не проводились ввиду малой численности составляющих ее пациентов.

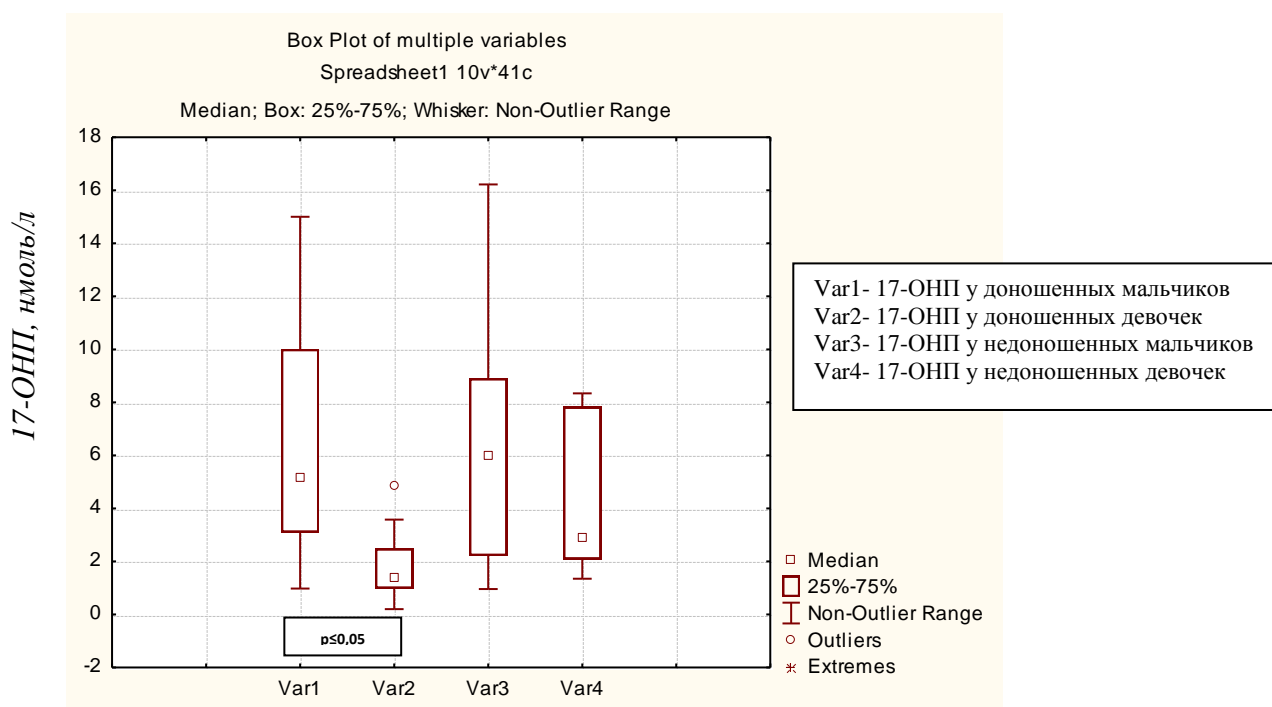


Рисунок 9. Уровни 17-ОНП, измеренного методом ТХМС, у доношенных и недоношенных новорожденных в зависимости от половой принадлежности в подгруппе «здоровых».

При наличии дефицита 21-гидроксилазы наряду с повышением уровня 17-ОНП наблюдается повышение и других маркеров заболевания: 21-дезоксикортизола (21-Д), андростендиона (А) и других стероидов, что не наблюдается у здоровых детей с умеренно повышенным 17-ОНП. Возможность одновременного исследования этих показателей при использовании ТХМС

является еще одним его важным преимуществом в сравнении с иммунными методами анализа. В настоящем исследовании помимо оценки 21-Д, мы рассчитывали для каждого пациента коэффициент $((17\text{-ОНП} + \text{андростендион}) / \text{кортизол})$ ((17-ОНП+А)/F). Стероиды, составляющие вышеназванный коэффициент, выбраны нами не случайно. Учитывая литературные данные, физиологию работы коры надпочечников у детей раннего возраста, а также результаты собственных наблюдений, продемонстрировано, что при наличии ферментного блока при дефиците 21-гидроксилазы помимо повышения уровня 17-ОНП и 21-Д, имеет место более низкий уровень кортизола и повышенный уровень андростендиона. Уровень тестостерона, который может повышаться у пациентов при снижении активности 21-гидроксилазы, мы не учитывали ввиду того, что в первые несколько месяцев у мальчиков имеет место так называемый мини-пубертат, для которого также характерно повышение уровня тестостерона до пубертатных цифр.

Так, медиана показателя 21-Д в подгруппе 1 составила 0,87 [0,34;3,08] нмоль/л, тогда как у детей с КФ21ОН этот показатель оказался равным 103 [60;116] нмоль/л, что с учетом рассчитанного показателя Манна - Уитни достоверно выше ($U = 45$, $U_{0,05} = 109$) (Рис.10).

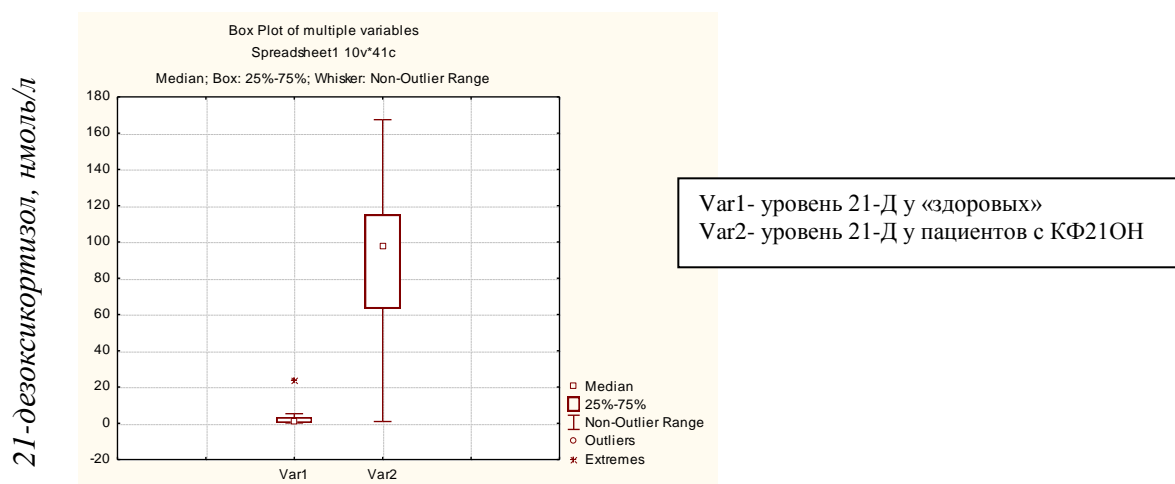
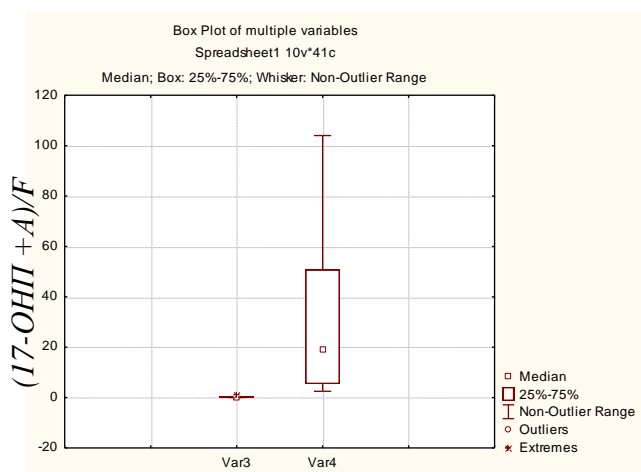


Рисунок 10. Уровень 21-дезоксикортизола у пациентов с КФ21ОН и «здоровых» детей.

При расчете коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$ получены следующие результаты: в основной подгруппе детей медиана коэффициента составила 0,08 [0,02;0,30], тогда как в подгруппе детей с классическими вариантами дефицита 21-гидроксилазы этот показатель составил 19,4 [10,5;50,8], что также достоверно выше, чем у детей без заболевания ($U = 24$, $U_{0,05} = 109$) (Рис.11).



Var1- уровень $(17\text{-ОНП}+A)/F$ у «здоровых»
 Var2- уровень $(17\text{-ОНП}+A)/F$ у пациентов с КФ21ОН

Рисунок 11. Значения коэффициента $(17\text{-ОНП} + A)/F$ у пациентов с КФ21ОН и «здоровых» детей.

Таким образом, для исключения диагноза АГС, помимо измерения уровня 17-ОНП, в качестве дополнительных критериев в рамках метода ТХМС возможна оценка уровня 21-Д и коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$, что невозможно при стандартном исследовании гормонов методами иммуноанализа.

При попытке проведения аналогичных расчетов в основной группе детей по критериям доношенности мы получили следующие результаты. Медианы значений 21-дезоксикортизола оказались равными 0,63 [0,22;1,45] нмоль/л у доношенных и 1,91 [0,71;3,27] нмоль/л у недоношенных детей. При расчете критерия Манна - Уитни достоверных отличий значений 21-дезоксикортизола в группе доношенных и недоношенных детей нами получено не было: $U = 106$, $U_{0,05} = 105$. Медиана коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$ составила 0,04 [0,02;0,12] и 0,63 [0,22;1,45] соответственно для доношенных и недоношенных новорожденных. Критерий Манна-Уитни, соответствующий $U = 78$ ($U_{0,05} = 105$), говорит о

достоверном различии показателя в исследуемых группах, что, скорее всего, при отсутствии различий по 17-ОНП в этих группах (что было показано нами ранее) объясняется более низким уровнем кортизола у недоношенных по сравнению с доношенными.

Наличие данных о разных сроках становления ферментных систем у новорожденных предиктовало необходимость определения зависимости уровня 17-ОНП от срока забора крови. Для достоверности все вычисления мы проводили на группе доношенных новорожденных ($n = 22$). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s), показал, что уровень 17-ОНП не коррелирует с возрастом забора крови у новорожденного, как по данным ТХМС ($r_s = 0,021$, $p < 0,05$), так и по данным РИА ($r_s = 0,001$, $p < 0,05$). Однако, ввиду того, что возраст обследуемых колебался в узких пределах ($Me = 30 [20,0;42,5]$, минимальный показатель (min) - 7 дней, максимальный (max) - 60 дней), несмотря на полученную слабую степень прямой корреляции значений, вывод о том, что уровень 17-ОНП не зависит от сроков забора крови у новорожденных сделать на основании этих данных нельзя.

Суммируя все вышесказанное, нами продемонстрировано, что неонатальный скрининг на АГС может сопровождаться большим количеством ложноположительных результатов, что требует проведения дополнительного обследования новорожденных для исключения нарушений стероидогенеза. Для дообследования новорожденных детей с сомнительными результатами неонатального скрининга, а, возможно, и как второй этап скрининга, мы предлагаем использование метода тандемной хромато-масспектрометрии ввиду его высокой специфичности, достигающей 87,0%, точности - 89,6% и прогностической ценности положительного результата - 58,3% по сравнению с методом РИА (соответственно 26,0%, 37,5% и 16,2%), который широко используется в большинстве лабораториях до настоящего времени, для исследования уровня 17-ОНП у детей раннего возраста. Нами продемонстрировано, что для разработки нормативов для 17-ОНП, как основного маркера АГС, определяющим критерием должен служить гестационный возраст новорожденного. Помимо этого, нами показано, что одним из преимуществ метода ТХМС является одномоментное определение других маркеров АГС (21-дезоксикортизол, андростендион), оценка которых в сопоставлении с другими клинико-лабораторными данными пациента помогут верифицировать/исключить диагноз.

3.3. Клинико-гормональные и молекулярно-генетические характеристики детей раннего возраста с генетически верифицированной неклассической формой дефицита 21-гидроксилазы.

Имеющиеся сведения о возможности ранней диагностики НК21ОН на основании результатов неонатального скрининга, а также отсутствие большого опыта наблюдения таких детей в раннем и младшем возрасте побудило нас к поиску пациентов с НК21ОН среди новорожденных с сомнительными результатами скрининга и отсутствием клинико-лабораторной картины классических форм АГС.

В течение двухлетнего периода нами было обследовано 63 ребенка, направленных в отделение наследственных эндокринопатий также в связи с выявленными по результатам неонатального скрининга повышенными уровнями 17-ОНП. Из 63 детей у 20 пациентов была диагностирована неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН). Основным критерием диагностики заболевания являлось наличие мутаций, сочетание которых позволяло поставить этот диагноз. Среди оставшихся 43 человек у 12 оказалась одна из классических форм АГС; у 31 пациента в ходе клинического и молекулярно-генетического исследования диагноз ВДКН был полностью исключен.

Из 20 детей с НК21ОН было 10 мальчиков и 10 девочек. Медиана гестационного возраста пациентов составила 39 [38,5;39,5] недель, при этом со сроком гестации менее 37 недель было двое детей (35 и 36 неделя соответственно). Однако, возраст их первичного обследования (2 и 3 месяца) соответствовал сроку гестации более 37 недель, что позволило нам отнести этих пациентов к доношенным. Вес новорожденных колебался в пределах от 2600 до 4100 г, медиана веса составила 3200 [2900;3470] г, детей с массой менее 2000 г не было. Медиана роста пациентов при рождении оказалась равной 51 [50;53] см с разбросом значений от 47 до 55 см. Таким образом, все дети изучаемой группы

были не только доношенными, но и морфологически зрелыми. Медиана возраста при первичном обследовании составила 75 [67,5;120] дней (табл. 6). Только у двух детей изучаемой группы со слов родителей отмечались срыгивания, однако, таких симптомов, как прогрессивная потеря или плохой набор веса, клинические проявления надпочечниковой недостаточности и/или гиперандрогении при осмотре ни у одного ребенка выявлено не было.

Таблица 6. Характеристика пациентов, обследованных по поводу повышения уровня 17-ОНП при неонатальном скрининге (проспективное исследование).

Показатель/признак	«клинически здоровые»	КФ21ОН	НК21ОН
Количество детей	n=31	n=12	n=20
Мальчики/девочки	n=22/n=9	n=7/n=5	n=10/n=10
Недоношенные (ГВ<37 недель, вес <2000 г)	n=9	n=0	n=2
Возраст при обследовании, дни	120 [60;135]	90 [40;140]	75,0 [67,5;120,0]

Примечания: ГС- гестационный возраст

При анализе течения беременности и родов у матерей пациентов с НК21ОН были получены следующие результаты: из имеющихся данных о 17 матерях, в 52% (у 9 из 17) отмечалось нормальное физиологическое течение беременности и родов, отсутствовали в анамнезе самопроизвольные выкидыши и/или замершие беременности. При этом, во всех 9 случаях дети родились физиологическим путем, осложнений в родах отмечено также не было. 8 пациентов родились доношенными, 1 пациент на сроке гестации 35 - 36 недель. Почти в половине случаев (48%) имел место отягощенный гинекологический анамнез: у двух матерей в анамнезе имелась замершая беременность и внутриутробная гибель плода, у 7 женщин - угроза прерывания беременности на ранних; осложненные роды имели место у 1 пациентки.

В изучаемой подгруппе пациентов с НК21ОН был также проведен тщательный анализ гормональных данных (табл. 7).

Таблица 7. Гормональные данные пациентов с НК21ОН, выявленных в ходе неонатального скрининга.

Показатель	Значения показателя, Me[25;75]
17-ОНП, нмоль/л Скрининг (1 тест)	33,2 [21,0;37,5]
17-ОНП, нмоль/л Скрининг (ретест)	42,5 [31,5;63,8]
17-ОНП, РИА, нмоль/л	134,9 [56,7;154,0]
17-ОНП, ТХМС, нмоль/л	58,1 [36,7;115,3]
21-дезоксикортизол, нмоль/л	4,0 [2,2;5,6]
Коэффициент (17-ОНП+андростендион)/кортизол	0,3 [0,2;0,6]
Кортизол, РИА, нмоль/л	337,5 [251,3;455,8]
Кортизол, ТХМС, нмоль/л	171,9 [113,4;250]
АКТГ, пг/мл	40,1 [23,5;96,8]
АРП, нг/мл/час	9,0 [2,3;12,7]

Медиана значений 17-ОНП в группе пациентов с НК21ОН по результатам тестирования в ходе неонатального скрининга на ВДКН составила 33,2 [21,0;37,5] нмоль/л с минимальным уровнем показателя 17,5 и максимальным - 105 нмоль/л, по результатам ретестирования - 42,5 [31,5;63,8] нмоль/л, с разбросом значений от 20,0 до 90,0 нмоль/л. Таким образом, медианы значений 17-ОНП превышают нормативные значения для используемых наборов (норма до 17 нмоль/л, DELFIA, Неоскрин) в 2 и 2,5 раза соответственно.

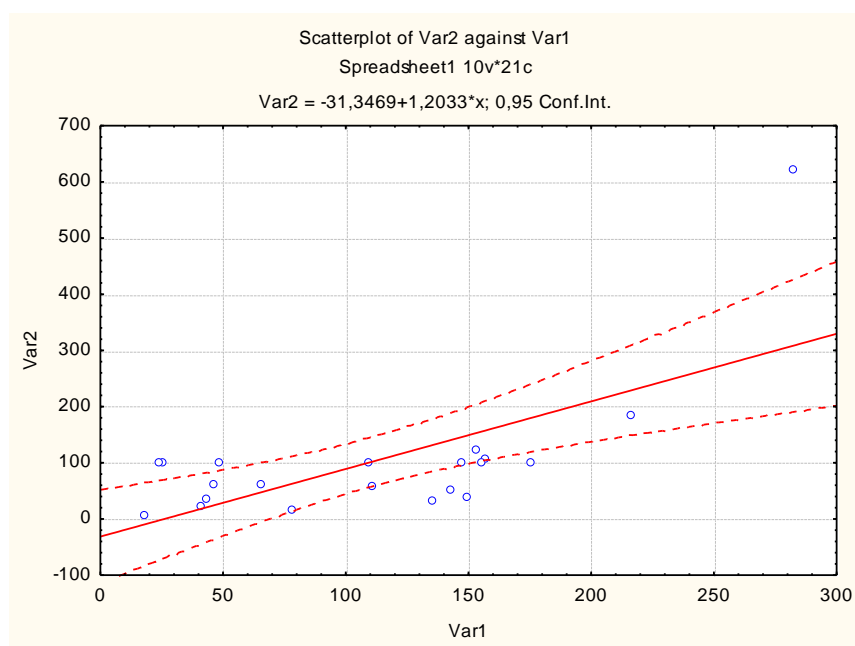
При анализе гормональных данных пациентов к моменту первичного обращения в стационар были получены следующие результаты. Медиана значений 17-ОНП, исследованного методом РИА, составила 134,9 [56,7;154,0] нмоль/л, минимальный уровень показателя - 23,5, максимальный - 282,3 нмоль/л. Медиана 17-ОНП, измеренного в рамках мультистероидного профиля крови

(метод ТХМС) - 58,1 [36,7;115,3], с разбросом показателя от 15,5 до 622 нмоль/л (табл.7). Провести сравнительный анализ данных с учетом критериев, используемых для выборок с ненормальным типом распределения, не представляется возможным ввиду отсутствия разработанных норм для метода ТХМС. Поэтому мы попытались ответить на вопрос, насколько согласуются между собой используемые методы определения 17-ОНП.

С целью выявления закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренными методами РИА и ТХМС, мы использовали коэффициент корреляции Спирмена (r), который оказался равным 0,76. Высокое значение коэффициента корреляции говорит о тесной линейной связи, однако для оценки согласованности этого недостаточно. Поэтому к данной выборке мы применили метод Бленда-Альтмана (рис. 12, стр.83). Показатель средней разности, характеризующий систематическое расхождение результатов при сравнении двух методов оказался равным 80,9, что говорит о наличии систематического расхождения измерений, полученных двумя разными методами. Стандартное отклонение разности, отражающее степень разброса результатов, которое составило 92,3, что отличается от полученных каждым методом измерений. В-третьих, отсутствует зависимость разности измерений от величины 17-ОНП и ТХМС, слабо согласуются друг с другом, несмотря на высокий коэффициент корреляции (табл. 8). Помимо самих измерений в таблице приведены усредненные по каждому больному значения 17-ОНП и разности этих долей.

Таблица 8. Сравнение двух методов определения 17-ОНП у пациентов с НК21ОН (метод Бленда-Альтмана).

17-ОНП РИА	17-ОНП, ТХМС	разность	среднее значение
110,7	58	52,6	84
156,9	106,7	49,8	131
40,6	22,5	18,05	31
134,9	34,1	100,8	84
153	123,9	30,9	138
282,3	622	339,7	452
149,5	39,3	110	94
216,2	183,6	32,6	199
142,4	52,5	89,8	97
77,8	15,4	62,3	46
65,4	62,7	3,3	64
46,2	60,6	14,4	53
17,6	8,6	9	13
42,8	34,7	8,1	38



Var1- 17-ОНП,
измеренный методом РИА
Var2- 17-ОНП,
измеренный методом ТХМС

Рисунок 12. Диаграмма рассеяния для оценки закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренного двумя методами, у пациентов с НК21ОН.

Мы также проанализировали уровень 17-ОНП в зависимости от половой принадлежности и оценили корреляцию между уровнем 17-ОНП и сроком забора крови у детей с НК21ОН. Как по методу РИА, так и по методу ТХМС,

достоверных отличий уровня 17-ОНП у мальчиков и девочек нами получено не было: $U = 48$, $U_{0,05} = 31$ (РИА); $U = 14$, $U_{0,05} = 7$ (ТХМС). Рассчитанный коэффициент ранговой корреляции Спирмена позволил сделать следующие выводы: $r = -0,09$ говорит о слабой отрицательной корреляции между уровнем 17-ОНП, измеренного методом РИА, и сроком забора крови у ребенка; $r = 0,2$ - о слабой положительной корреляции при использовании метода ТХМС.

Как и в предыдущей главе, мы проанализировали уровень 21-Д и рассчитали коэффициент (17-ОНП+андростендион)/кортизол ((17-ОНП+А)/F). При расчете показателей медиана 21-дезоксикортизола в изучаемой группе составила 4,0 [2,2;5,6] нмоль/л; медиана значений коэффициента (17-ОНП+А)/F оказалась равной 0,3 [0,2;0,6] (табл. 7, стр.81).

Учитывая тот факт, что генетическая верификация НК21ОН подразумевает наличие у больного либо гомозиготной мутации, обуславливающей развитие заболевания (как минимум 2 из которых встречаются в популяциях чаще остальных), либо присутствие в генотипе компаундной гетерозиготы (плюс как минимум 10 частых мутаций), то результаты молекулярно-генетического анализа могут широко варьировать. Так, в группе пациентов с НК21ОН ($n = 20$) по данным молекулярно-генетического анализа у 15 детей (то есть в 75% случаев) встречалась мутация V281L, причем у 10 пациентов (62,5%) в гомозиготном состоянии, в остальных случаях - в сочетании с другими гетерозиготными мутациями, характерными, как для классических, так и для неклассических форм заболевания. Среди оставшихся 5 пациентов у 4 нами была выявлена мутация R30L, также характерная для неклассической формы НК21ОН, в гомозиготе или сочетании с другими мутациями, у 1 пациентки «тяжелая» мутация Q318X сочеталась с ранее не описанной мутацией - G130D (последняя выявлена путем секвенирования гена *CYP21A2*) (табл. 9).

Таблица 9. Результаты молекулярно-генетического обследования детей с НК21ОН.

<i>Пациент</i>	<i>Выявленные мутации в гене CYP21</i>
Пациентка В.	V281I/V281L
Пациент М.	V281I/V281L
Пациентка А.	V281I/V281L
Пациентка Т.	V281I/V281L
Пациентка В-2	P30L/P30L
Пациент Н.	I172N/P30L
Пациентка А.	Q318X/G130D
Пациентка А.-2	I2spl/V281L
Пациентка М.	I2spl P453S/V281L
Пациентка Е.	V281L/V281L L306 insT
Пациент Р.	V281I/V281L
Пациент К.	P30L/P30L
Пациент А.	P30L/I2spl
Пациент Е.	V281L/P30L
Пациент Г.	V281L/V281L
Пациент А.-2	V281L/V281L
Пациентка Э.	V281L/V281L
Пациентка Е.	V281L/V281L
Пациент Т.	V281L/V281L
Пациент Ф.	V281L/I172N

Ввиду наличия ферментативного дефекта 21-гидроксилазы у пациентов с НК21ОН, предопределяющего снижение синтеза кортизола и альдостерона и, как следствие, повышение уровня АКТГ, для оценки функционального состояния коры надпочечников нами были оценены уровни кортизола, адренокортикотропного гормона (АКТГ) и активности ренина плазмы (АРП). Измерения кортизола проводились двумя используемыми методами (РИА и ТХМС). Медиана значений кортизола, измеренного на автоматическом анализаторе, оказалась равной 337,5 [251,3;455,8] нмоль/л, медиана кортизола, измеренного методом ТХМС, - 171,9 [113,4;250] нмоль/л. Уровня кортизола ниже референсных значений (автоматический анализатор) нами выявлено ни в одном случае не было. Медиана значений АКТГ плазмы крови у пациентов с НК21ОН

составила 40,1 [23,5;96,8], с разбросом значений от 4,8 до 115 пг/мл (норма 7 до 60) (табл. 7). Повышенный уровень АКТГ был выявлен у 6 из 18 пациентов (33%). Таким образом, сочетание нормального уровня кортизола у всех пациентов и АКТГ в 2/3 случаев с отсутствием активных жалоб и патогномичных клинических проявлений у пациентов с НК21ОН позволяет сделать вывод об отсутствии у большинства пациентов с НК21ОН надпочечниковой недостаточности, несмотря на высокие уровни 17-ОНП по РИА при поступлении, что еще раз доказывает, что повышение уровня 17-ОНП носит ложноположительный характер. Однако, факт повышения АКТГ (хотя и незначительного) у 33% пациентов исследуемой группы требует дальнейшего изучения. Что касается уровня АРП, то медиана значений показателя у пациентов с НК21ОН получилась равной 9,0 [2,3;12,7] нг/мл/ч, с разбросом показателя от 1,4 до 21,6. Повышение АРП выше нормативных значений встречалось у 65% пациентов. Умеренное повышение АРП также без клинических проявлений минералокортикоидного дефицита может быть обусловлено частичной резистентностью к минералокортикоидам, характерной для детей первого года жизни, и не было расценено нами, как проявление минералокортикоидной недостаточности.

Учитывая разную степень нарушения функции фермента 21-гидроксилазы у пациентов с мутациями V281L и P30L, а также наличие их либо в гомозиготном состоянии, либо в сочетании с более «тяжелыми» мутациями, мы предприняли попытку разделить пациентов на 3 группы в зависимости от молекулярно-генетического дефекта *CYP21A2* для оценки разницы показателя 17-ОНП. В группу 1 вошли пациенты с мутацией V281L в гомозиготном состоянии (10 человек), в группу 2 пациенты, у которых V281L сочеталась с другими мутациями (4), группу 3 составили дети с мутацией P30L в гомозиготном положении или в сочетании с мутациями, характерными для вирильной или сольтеряющей формы заболевания (5). Статистически значимых результатов получить нам не удалось ввиду, скорее всего, малых объемов выборок, однако, по методу РИА медиана 17-

ОНП имела тенденцию к более высоким значениям в группе 3, чем в группе 1 и 2 (183,7 по сравнению с 36,7 и 43,6 ммоль/л), что ожидаемо с учетом имеющихся молекулярно-генетических дефектов. Для достоверности вышесказанного требуется дальнейшее изучение этого вопроса.

Единого мнения на предмет тактики ведения и лечения пациентов с рано диагностированной НК21ОН в мире не существует. Поэтому часть пациентов с НК21ОН (6 из 20 человек - 30%) поступали в наше отделение уже на фоне лечения препаратами глюкокортикоидов, в ряде случаев - дополнительно минералокортикоидами; остальная часть оставалась под динамическим наблюдением.

Мы подробно проанализировали две подгруппы этих детей.

Медиана возраста начала терапии в группе детей, находящихся на лечении, составила 3 [2,5;3,5] месяца. В таблице 10 подробно представлены причины назначения и дозы используемых препаратов.

Таблица 10. Клинико-гормональные и молекулярно-генетические данные пациентов с НК21ОН, получающие заместительную гормональную терапию.

Пациент	Возраст начала терапии	Причина назначения	терапия	Мутации в гене CYP21A2
Пациентка А.	7 мес.	17-ОНП - 276 нмоль/л, АКТГ 111 пг/мл (7-60), АРП 21,6 нг/мл/ч (0,5-1,9)	Кортеф-18,7 мг/м2/сутки, кортинефф-50 мкг/сутки	Q318X/G130D
Пациентка А.-2	3 мес.	17-ОНП - 175 нмоль/л, АКТГ 96 пг/мл (7-60)	Кортеф- 7 мг/м2,	V281I/V281L
Пациентка В.	2 мес.	Частые срыгивания, гипертрофия клитора (за счет кожной складки), 17-ОНП- 150,5 нмоль/л	Кортеф 20 мг/м2/сутки и кортинефф 100 мкг/сутки	I2spl/V281L
Пациент Д.	3 мес.	Частые срыгивания, гипонатриемия в анамнезе, 17-ОНП- 282,3 нмоль/л (0,7-9,1), АКТГ- 105,7 пг/мл (7-60), АПР- 12,4 нг/мл/ч (0,5-1,9)	Кортеф 25 мг/м2/сутки, кортинефф 50 мкг/сутки	P30L/I172N
Пациентка Э.	2 мес.	17ОНП 253,9 нмоль/л, АКТГ 99 пг/мл (7-60)	Преднизолон 1 мг/сутки (14,2 мг/м2 по гидрокортизону)	V281L/V281L
Пациент А.	5 мес.	17ОНП 216,2 нмоль/л,	Кортеф 8 мг/м2/сутки	I2spl /P30L

Как видно из таблицы 10, основной причиной назначения заместительной терапии являлись гормональные сдвиги сыворотки крови: значительное повышение уровня 17-ОНП выше 150 нмоль/л (медиана показателя 235 [195;259] нмоль/л), умеренное повышение уровня АКТГ от 96 до 111 пг/мл, в ряде случаев - повышение уровня АРП и электролитные нарушения. У двоих пациентов отмечалась клинико-лабораторная картина электролитных нарушений. Ни у одной пациентки вирилизации не было. Дозы назначаемых глюкокортикоидов колебались от 7 до 25 мг/м2, что сопоставимо с дозами, применяемыми при лечении классических вариантов АГС. Интересно отметить, что в 4 из 6 случаев в ходе молекулярно-генетического исследования в гене *CYP21A2* выявлено сочетание мутации, характерной для неклассической формы, с мутациями, характерными для вирильной/сольтеряющей формы дефицита 21-гидроксилазы, что возможно, объясняет гормональные изменения и необходимость

заместительной терапии. У пациентки А. имела место ранее не описанная мутация G130D в компаунд-гетерозиготе с тяжелой мутацией Q318X. Предположение о том, что данная неизвестная мутация относится к «неклассическим», основано на отсутствие вирилизации у пациентки и явлений сольтеряющего криза до семимесячного возраста.

В ходе проведения нашей работы все дети, находившиеся на заместительной терапии, периодически проходили контрольное обследование, включающее оценку антропометрических показателей, костного возраста по достижению возраста 1 года, а также гормональных показателей крови на фоне проводимой терапии.

Оставшиеся 14 пациентов с НК21ОН по причине отсутствия жалоб, характерных клинических симптомов, выраженных гормональных и электролитных сдвигов по результатам обследования были оставлены без лечения с рекомендациями о необходимости повторного обследования в 1 год жизни при ранней постановке диагноза, через год – в случае поздней диагностики. Двое пациентов на осмотр в год не явились по причине нежелания родителей, 2 пациентов - по причине дальности проживания, оставшиеся двое на момент написания работы не достигли возраста 12 месяцев.

При повторном обследовании было запланировано проведение общего клинического осмотра, оценка темпов роста, костного созревания, повторное исследование гормонального профиля с обязательным исследованием уровня 17-ОНП методом РИА, при необходимости - ТХМС; в качестве дополнительных критериев отсутствия надпочечниковой недостаточности - исследование уровней кортизола сыворотки крови и АКТГ; АРП плазмы крови - по показаниям.

В ходе динамического наблюдения ни у одного пациента на момент повторного осмотра не было жалоб, клинических проявлений надпочечниковой недостаточности, явлений гиперандрогении и/или преждевременного полового

созревания (ППР). Явлений сольтеряющего криза со слов родителей за год жизни отмечено также не было ни в одном случае. У одной пациентки, у которой к моменту первичного обследования отмечалась гипертрофия клитора за счет кожной складки, к 1 году жизни прогрессии вирилизации не выявлено. У того же ребенка на фоне двукратно перенесенного ОРВИ с фебрилитетом отмечалась вялость, слабость, снижение аппетита, в связи с чем по рекомендациям врачей ребенок в домашних условиях получал заместительную терапию глюкокортикоидами в дозе 3 мг/сутки (около 5-6 мг/м²) до нормализации температуры тела с постепенной отменой препарата.

Антропометрические данные детей изучаемой подгруппы представлены в таблице 11.

Таблица 11. Антропометрические данные пациентов с НК21ОН, находившихся на динамическом наблюдении (без лечения), в ходе повторного обследования в декретированные сроки.

№	Пациент	Рост-1, см	возраст повторного обследования, мес.	Рост -2, см	скорость роста, см/год	SDS роста	прогнозируемый рост по родителям, см
1	Пациент М.	53	22	88	16	+0,77	178,5
2	Пациентка Т.	48	12	75	27	-0,03	166
3	Пациентка В.	54	12	80,5	26	+1,5	166
4	Пациентка Е.	48	12	80	32	+1,8	158
5	Пациент Е.	47	12	71	24	-1,5	182
6	Пациент Г.	50	16	79,8	25,5	+0,2	174
7	Пациент А.-2	53	24	92,3	19,6	+1,69	179
8	Пациентка Е.-2	51	12	78	27	+0,28	168

Примечания. Рост-1- рост при рождении. Рост-2 – рост на момент повторного обследования

Медиана возраста пациентов при повторном обследовании составила 12 [12;17] месяцев, один пациент был обследован в 2 года по причине первичного обращения в 1 год и 1 мес. (Пациент А.-2), один пациент - в 1 год 10 мес. (Пациент М.) по причине неявки в декретированный срок. Медиана SDS роста среди детей за 1 год составила 0,08 [0,77;1,65], минимальный показатель равен - 1,5 SD, максимальный - + 2,18. Медиана скорости роста у детей, проходивших

обследование к 12 месяцам жизни, оказалась равной 27,0 [26,3;28,3] см/год, что соответствует общепринятым нормам по прибавке роста у детей до 1 года жизни (25-26 см). Медиана SDS роста у этих пациентов соответствовала - 0,03 [0,20;1,50] см. Только у одной пациентки (Пациентка Е.) SDS роста оказалась +1,8 SD, скорость роста также выходила за нормативные пределы и составила 32 см за 1 год жизни. Таким образом, к 1 году почти у абсолютного большинства пациентов наряду с клиническими данными отсутствовали антропометрические признаки преждевременного созревания. У пациента А.-2, обследованного к двум годам жизни, скорость роста оказалась 19,6 см за второй год жизни, что несколько превышает принятые стандарты (15 см/год), при этом SDS роста соответствовало +1,69. Антропометрические показатели пациента М. к 22 месяцам жизни не выходили за пределы нормативных пределов: SDS роста = +0,77 см, скорость роста соответствовала 16 см/год. Хочется подчеркнуть, что интерпретация SDS роста и скорости роста невозможна без расчета прогнозируемого роста по родителям. Из данных таблицы видно, что у одного пациента (Пациент А.-2) прогнозируемый рост по родителям составляет 179 см, что может объяснять более высокую скорость роста и стандартное отклонение по росту. У второй пациентки с SDS роста +1,8 прогнозируемый рост по родителям составил всего 158 см, поэтому приближающийся к верхней границе норме SDS ее роста требует наблюдения в динамике.

Всем пациентам, находившимся без лечения, к 1 году жизни исследовался уровень 17-ОНП методом РИА (в сомнительных случаях дополнялся исследованием гормонов крови методом ТХМС), уровни кортизола, АКТГ; АРП - в случае отрицательной динамики по уровню остальных показателей, а также при высоких значениях АРП, полученных ранее у пациента. Данные отображены в таблице 12.

Таблица 12. Гормональные и рентгенологические данные пациентов с НК21ОН, находившихся на динамическом наблюдении (без лечения), в ходе повторного обследования.

№	Пациент	17-ОНП, РИА, нмоль/л	Кортизол, нмоль/л (150-650)	АКТГ, пг/мл (7-60)	АРП, нг/мл/час (1,9-5,0)	Рентгенография кистей, атлас TW20, года
1	Пациент М.	40,6/27	491/278	15,1/1	1,4/нет	36 мес. (ПВ=22 мес.)
2	Пациентка Т.	134,9/150	357/508	95,4/26,8	1,7/6,4	18 мес. (ПВ=12 мес.)
3	Пациентка В.	153/115	502/317	115/67	13,4/5,4	14 мес. (ПВ=12 мес.)
4	Пациентка Е.	109,5/111,4	434/460	61,2/62,8	2,8/1,2	23 мес. (ПВ= 12 мес.)
5	Пациент Е.	142,4/183	323/347	35/161	10,6/?	6 мес. (ПВ= 12 мес.)
6	Пациент Г.	77,8/97,6	114/552	49,7/19,5	2,4/нет	19 мес. (ПВ= 12 мес.)
7	Пациент А.-2	65,4/180,5	463/278	34,4/11,8	1,8/прямой ренин 50,8 (норма до 50)	38 мес. (ПВ= 24 мес.)
8	Пациентка Е.-2	46,2/12,8	346/430	34,1	10,4	9 мес. (ПВ= 12 мес.)

Примечания.

Через / указаны цифры соответствующих показателей на момент первичного и повторного обследования

TW20- атлас Таннера - Уатхауса для подсчета костного возраста

ПВ - паспортный возраст на момент выполнения процедуры

Нет - исследование не проводилось

? - данных нет

Проанализировав полученные результаты, мы видим, что явное нарастание показателя 17-ОНП по методу РИА было отмечено у пациента А.-2 (в 3 раза), у которого к двум годам скорость роста была незначительно выше нормы, SDS роста с учетом роста родителей не превышала предиктивных значений, а показатели АКТГ, кортизола и прямого ренина плазмы соответствовали норме. Костный возраст опережал паспортный на 1 год и 4 мес. По результатам ТХМС уровень 17-ОНП оказался 18,3 нмоль/л, 21-дезоксикортизол - 12 нмоль/л (по предыдущему исследованию - 47,6), при этом уровни других стероидов (кортизол, андростендион) значимо не изменились по сравнению с предыдущим исследованием. Учитывая совокупность данных, было принято решение продолжить динамическое наблюдение за ребенком с исследованием аналогичных показателей через 1 год при отсутствии жалоб. Среди пациентов с незначительным нарастанием 17-ОНП (пациенты 2, 4, 5, 6) у пациентов 2 и 6 отсутствовала отрицательная динамика по другим гормональным показателям

крови, опережение костного возраста не превышало 6 месяцев по сравнению с паспортным возрастом, при этом у обоих детей показатели скорости роста и SDS роста соответствовали возрастным нормам, в связи с чем пациенты также отпущены для динамического наблюдения. У пациентки 4 с высокой скоростью роста на 1 году жизни (36 см/год) и SDS роста ближе к верхней границе нормы (+1,8) с учетом роста родителей, помимо нарастания уровня 17-ОНП, сохранялся не «задавленный» АКТГ, а костный возраст опережал паспортный более чем на 1 год. Уровни кортизола и АРП были в пределах референсных значений. Пациентка приглашена на контрольное обследование через 6 месяцев, на которое она не явилась. У пациента 5, наряду с отмеченным, хоть и незначительным, нарастанием уровня 17-ОНП с 142,4 до 183 нмоль/л, выявлено резкое повышение АКТГ с 35 до 161 пг/мл при нормальном уровне кортизола. В связи с этим было проведено исследование стероидов крови методом ТХМС, по результатам которого уровень 17-ОНП соответствовал 230 нмоль/л, 21-дезоксикортизола - 69,7 нмоль/л. Несмотря на удовлетворительные антропометрические показатели и отсутствие значимого опережения костного возраста, нарастание 17-ОНП по обоим методам, значимое повышение АКТГ и характер генетических нарушений (V281L/P30L), послужили поводом для назначения препаратов глюкокортикоидов, от чего родители в настоящее время приняли решение воздержаться. По нашей рекомендации, учитывая наличие у пациента только двух мутаций, обе из которых встречаются при НК21ОН, не отражающих тяжесть течения заболевания, проведено молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21A2* у родителей, которые оказались носителями вышеназванных мутаций.

Части пациентам в условиях районных поликлиник и частных центров г. Москвы (по желанию родителей) было проведено ультразвуковое исследование надпочечников, по результатам которых ни у одного пациента патологии выявлено не было.

Для определения тактики ведения пациентов с рано диагностированной НК21ОН ввиду отсутствия четко разработанных протоколов, мы также проанализировали данные детей старшей возрастной группы ($n = 24$), у которых диагноз был заподозрен на основании жалоб и/или клинической картины преждевременного полового созревания/гиперандрогении или другим причинам. Исследование носило ретроспективный характер. Из 24 человек преобладающее большинство составляли девочки (18 из 24 - 75%). Возраст первичного обследования пациентов в группе колебался от 2 до 16 лет, медиана показателя – 9,0 [7,5;12,0] лет. Интересно отметить, что при сборе анамнеза заболевания выяснилось, что медиана возраста появления первых патогномичных симптомов заболевания оказалась 7,0 [5,5;8,0] лет, с колебаниями значений от 2 до 16 лет. У мальчиков сроки манифестации заболевания варьировали от 7 до 10 лет, медиана – 7 [6;7] лет, среди девочек этот показатель соответствовал 6 [5,2;6,7] годам. С учетом критерия Манна - Уитни сроки манифестации симптомов НК21ОН среди полов достоверно не отличаются: $U = 33,5$, $U_{0,05} = 15$. Важным является то, что сроки первичного обследования значимо отличаются от сроков манифестации симптомов заболевания и составляют: в группе мальчиков - 9,5 [9;10] лет, у девочек - 8 [7;9] лет. Интересно отметить, что у двоих пациентов мужского пола жалобы и клинические проявления НК21ОН отсутствовали, а причиной обращения к эндокринологу стали случайно выявленные повышенные уровни 17-ОНП (7 и 18,3 нмоль/л, соответственно) при подготовке к оперативному лечению сопутствующих заболеваний. У 4 оставшихся мальчиков причиной обращений явилось адренархе, появившиеся с 7-летнего возраста в 2 случаях, в 1 случае - с 6 лет, сопровождающееся ускорением линейного роста. Среди 18 девочек адренархе являлось основной жалобой у 11 пациенток (61%), манифестирующее с возраста от 2 до 8 лет, медиана возраста соответствовала 5,5 [3,5;6,0] годам. У 7 пациенток из 18 были следующие проявления заболевания при манифестации: у 3 девочек отмечалось нарушение менструального цикла (возраст манифестации 12 - 16 лет), у 2 пациенток имел место выраженный гирсутизм (13 - 14 лет), у одной

девочки был неправильный пубертат (с 8 лет адренархе без телархе), у одной пациентки ранее телархе (7 лет) сопровождалось ускорением темпов роста и гипертрофией клитора (рис. 13).

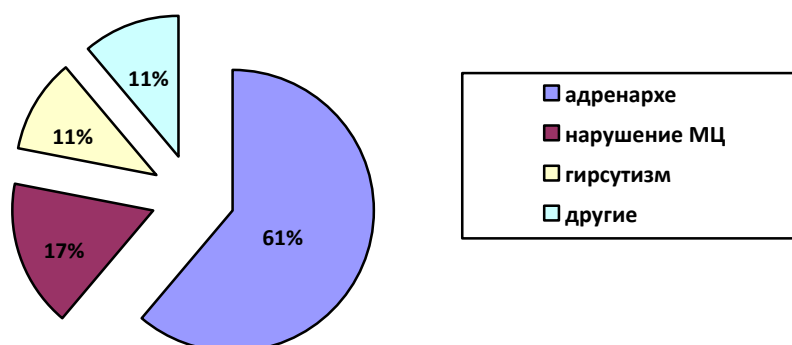


Рисунок 13. Распределение симптомов манифестации НК21ОН у девочек.

Как было показано выше, как в группе в целом, так и при делении пациентов по половому признаку, сроки манифестации НК21ОН и сроки первичного обследования отличаются в 2 раза. На рисунке 14 также продемонстрировано, что данная тенденция сохраняется при делении пациенток с НК21ОН в зависимости от ведущих симптомов.

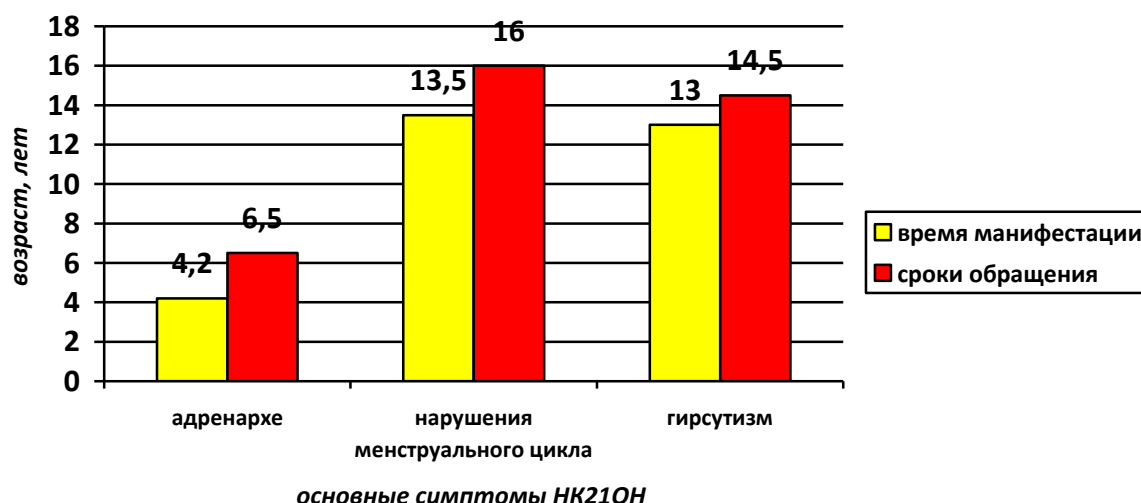


Рисунок 14. Сроки появления симптомов и сроки их манифестации у пациенток с НК21ОН.

Что касается антропометрических показателей, то медиана SDS роста по группе на момент первичного обращения за медицинской помощью составила

0,93 [0,13;2,09]. У 4 пациенток с преждевременным адренархе SDS роста выходило за пределы нормы. Однако, из-за отсутствия в большинстве случаев предыдущих измерений роста и данных о росте их родителей достоверная оценка этих данных невозможна.

При анализе гормональных показателей оценивался уровень 17-ОНП, кортизола, в ряде случаев - АКТГ. Медиана 17-ОНП, измеренного методом РИА, составила 57,6 [22;147] нмоль/л, с разбросом показателя от 7,7 до 452 нмоль/л. При сопоставлении 17-ОНП, полученного в группе с НК21ОН у детей 1 года жизни ($n = 20$, $Me = 138,7$ [68,0;154,5]) с настоящими данными, критерий Манна-Уитни, соответствующий $U = 172,5$ ($U_{0,05} = 154$), говорит об отсутствии различий показателя, измеренного методом РИА в разных возрастных группах. Подобные вычисления для метода ТХМС не проводились ввиду малого числа измерений 17-ОНП в рамках ТХМС у пациентов старшей группы.

Для анализа зависимости время появления первых симптомов заболевания и уровня 17-ОНП мы рассчитали коэффициент корреляции Спирмена: $r = 0,16$ говорит о слабой положительной корреляции между заданными параметрами ($p < 0,05$).

Для оценки работы надпочечников нами проанализированы уровни кортизола и АКТГ у пациентов с НК21ОН без лечения: Me кортизола оказалась равной 334 [295;421] нмоль/л, min - 162, max - 604 нмоль/л, при этом для АКТГ медиана показателя составила 16,3 [14,7;18,5] пг/мл с разбросом значений от 10 до 34,3 пг/мл. Таким образом, ни у одного пациента с НК21ОН данных за надпочечниковую недостаточность получено нами не было. При анализе костного возраста у 12 пациентов медиана опережения костного возраста относительно паспортного составила 2 [0,5;2,95] года, min - 0 лет max - 4 года. Коэффициент корреляции (r) между уровнем 17-ОНП и опережением костного возраста при первичном обращении оказался равным 0,23, что говорит о слабой положительной корреляции признаков ($p < 0,05$). 9 пациентам из 24 для

верификации диагноза также проводился тест с синактен-депо и определением кортизола и 17-ОНП через 12 и 24 часа соответственно. Уровень 17-ОНП на фоне пробы колебался от 14,7 до 485 нмоль/л, Me 17-ОНП = 73,1 [60;220] нмоль/л, Me кортизола = 1186 [881,5;1625,0] нмоль/л, min - 483 нмоль/л, max - 1700 нмоль/л.

Из 24 пациентов 18 человек находились на лечении препаратами глюкокортикоидов: 10 человек на терапии кортефом, остальные - преднизолоном. Преднизолон назначался в основном пациентам после 12 летнего возраста, а также пациенткам с нарушением менструального цикла (НМЦ). По имеющимся данным из историй болезни, основной причиной назначения лечения являлось сочетание высокого уровня 17-ОНП с выраженным ускорением темпов роста и костного созревания, а также НМЦ. Медина суточной дозы глюкокортикоидов по гидрокортизону составила 10,0 [9,0;11,5] мг/м²/сутки, максимально используемая доза - 14 мг/2/сутки, что сопоставимо с дозами, применяемыми для лечения КФ21ОН.

Полученные нами результаты наблюдения пациентов раннего возраста и группы детей старшего возраста с НК21ОН позволили нам разработать алгоритм ведения пациентов с рано верифицированной НК21ОН (приложение, Рисунок 23, стр. 161).

При отсутствии клинических признаков надпочечниковой недостаточности или гиперандрогении в сочетании с лабораторной картиной крови (незначительно повышенный уровень 17-ОНП без нарастания показателя в динамике, нормальные уровни АКТГ и кортизола) ребенок остается под динамическим наблюдением, а повторное обследование назначается через 1 год. При сохранении компенсации по заболеванию (то есть при отсутствии отрицательной динамики клинико-лабораторных показателей через год), мы считаем целесообразным обязательный повторный осмотр пациентов с НК21ОН, начиная с 5-летнего возраста, учитывая гендерные различия и обращая особое внимание на преждевременное появление адренархе, как наиболее частой причины НК21ОН в данном возрастном периоде.

Важно отметить, что первые клинические симптомы заболевания могут не сопровождаться ускорением темпов роста и нарастанием уровня 17-ОНП относительно предыдущих исследований, однако, для оптимизации ростового прогноза и выбора тактики ведения пациента мы считаем обязательным исследование костного возраста в декретированные сроки.

При наличии жалоб и клинико-лабораторной картины декомпенсации по заболеванию (при первичном или последующих наблюдениях) решается вопрос о начале заместительной терапии (препараты глюко- и/или минералокортикоидов) или повторное полное обследование пациента через 3 месяца для выбора тактики дальнейшего ведения (заместительная терапия/дальнейшее наблюдение).

Таким образом, по результатам наблюдения пациентов с НК21ОН (на примере разных возрастных групп) мы сделали следующие выводы. Во-первых, мы продемонстрировали, что неонатальный скрининг на АГС позволяет выявить случаи НК21ОН у детей раннего возраста, однако, для подтверждения/исключения заболевания требуется проведение дополнительного обследования. На данном этапе мы можем говорить, что единственным критерием диагностики НК21ОН может являться результат молекулярно-генетического исследования гена *CYP21A2*, причем почти в абсолютном большинстве случаев достаточно проведения аллель-специфической ПЦР с детекцией 10 частых мутаций. Такие факты, как плохая «согласованность» методов РИА и ТХМС при доказанной нами ранее (глава 3.2) высокой информативности метода ТХМС по сравнению с РИА, а также отсутствие возможности проведения генетической верификации диагноза рутинно, говорит о необходимости пересмотра схемы обследования пациентов с подозрением на НК21ОН в раннем возрасте с включением в алгоритм исследования стероидов сыворотки крови методом

ТХМС. Однако, со своей стороны это требует разработки нормативных критериев для основных стероидов и критериев диагностики НК21ОН по методу ТХМС.

Во-вторых, по результатам наблюдения детей с НК21ОН нами показано, что в раннем возрасте у таких пациентов отсутствуют клинические проявления надпочечниковой недостаточности (НН) и/или гиперандрогении. В течение первых лет жизни и в старшем возрасте клинические признаки НН не ожидаются, а незначительный подъем уровня АКТГ у части пациентов в раннем возрасте (чего не встречается в старшем возрасте), как маркер НН, обычно сопровождается нарастанием или высокими показателями 17-ОНП при нормальном уровне кортизола. Гиперандрогения манифестирует у пациентов с НК21ОН в среднем с 7 [5,5;8,0] лет; при этом необходимо учитывать гендерные различия.

В-третьих, мы еще раз продемонстрировали, что наиболее часто при молекулярно-генетическом исследовании у пациентов с НК21ОН встречается мутация V281L; вторая по частоте - P30L. При этом тяжесть заболевания определяется, в том числе, и молекулярно-генетическим дефектом.

На основании проанализированных нами данных сформулирован алгоритм обследования пациентов, у которых диагноз НК21ОН поставлен на первом году жизни. Однако, в каждом индивидуальном случае тактика ведения ребенка с НК21ОН, особенно в раннем возрасте, остается дискуссионной.

3.4. Критерии диагностики неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы и разработка референсных значений основных стероидов сыворотки крови с использованием метода тандемной хромато-масспектрометрии.

3.4.1. Критерии диагностики неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы у детей раннего возраста с использованием тандемной хромато-масспектрометрии.

Учитывая низкую выявляемость НК21ОН при доказанной нами высокой частоте ее встречаемости в российской популяции, а также полученные в вышеописанном исследовании (глава 3.2) данные о возможности использования ТХМС в качестве приоритетного метода для диагностики нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста, мы провели следующее исследование. Мы задали себе несколько вопросов: 1) можно ли с помощью метода ТХМС диагностировать НК21ОН, не прибегая к молекулярно-генетическому исследованию, как к методу «первой линии» диагностики заболевания? 2) если можно, то какие маркеры мы можем использовать, и где граница между нормой и патологией?

Для разработки критериев диагностики НК21ОН у детей раннего возраста по методу ТХМС в качестве материала для исследования мы взяли уже известную нам выборку из 63 детей (проспективное исследование, глава 3.3): 20 человек - пациенты с НК21ОН, 12 пациентов - с КФ21ОН, 31 человек - «здоровые» дети.

Напомним, что среди пациентов с НК21ОН было 10 мальчиков и 10 девочек; все дети изучаемой группы были доношенными и морфологически зрелыми. Медиана возраста при первичном обследовании составила 75 [67,5;120] дней.

В подгруппе «здоровых» из 31 ребенка было 9 человек, родившихся на сроке гестации менее 37 недель, маловесных пациентов (вес менее 2000 г) не было. Медиана гестационного возраста составила 38 [35;39] недель, медиана веса новорожденных - 2980 [2735;3360] г. Рост обследуемых на момент рождения колебался в пределах от 47 до 57 см с медианой показателя 50 [47-51] см. Медиана возраста при первичном обследовании - 120 [60;135] дней. В исследуемой подгруппе среди 31 ребенка было 22 мальчика и 9 девочек. У недоношенных новорожденных медиана роста составила 47 [47;49] см, веса - 2690 [2500;2800] г. При этом только у одного ребенка рост соответствовал 45 см при весе 2500 г и у одного ребенка вес оказался равным 2200 г при росте 47 см. Учитывая эти данные, несмотря на срок гестации менее 37 недель, такие показатели как рост более 47 см и вес новорожденного более 2500 г при отсутствии возможности клинической оценки состояния каждого ребенка при рождении, в соответствии с общепринятыми рекомендациями в педиатрии позволяют говорить о морфофункциональной зрелости этих детей. Также, к моменту первичного обследования (Me = 60 [45;85] дней) возраст всех пациентов соответствовал критериями доношенности.

В подгруппе пациентов с КФ21ОН все дети были доношенными новорожденными, среди которых было 7 мальчиков и 5 девочек. Анализ показателей гестационного возраста, росто-весовых показателей при рождении не проводился. Медиана возраста при первичном обращении составила 90 [40;140] дней. Относительно небольшая выборка пациентов 3 подгруппы, несмотря на высокую распространенность дефицита 21-гидроксилазы, обусловлена несколькими причинами. Более высокая чувствительность метода РИА (измерение 17-ОНП) для диагностики классических форм дефицита 21-гидроксилазы у детей первого года жизни в отличие от НК21ОН, а также характерная клиничко-лабораторная картина заболевания с момента его манифестации диктует отсутствие необходимости в дополнительном

исследовании гормонов методом ТХМС. С другой стороны, пациенты, поступающие в отделения, на базе которых проводилась наша работа, обычно уже находились на заместительной терапии препаратами глюко- и минералокортикоидов, что также исключает возможность исследования у них спектра стероидов методом ТХМС на «чистом» фоне.

Используя результаты обследования этих подгрупп, нами проведен подробный сравнительный анализ различных гормональных показателей.

Сравнительная оценка уровня 17-ОНП, полученного в ходе скрининга на АГС проводилась в подгруппе с НК21ОН и в группе «здоровых». Медиана значений 17-ОНП в группе пациентов с НК21ОН по результатам тестирования в ходе неонатального скрининга на ВДКН составила 33,2 [21,0;37,5] нмоль/л, по ретестированию - 42,5 [31,5;63,8] нмоль/л. По аналогии медианы значений 17-ОНП у «здоровых» детей составили 21,0 [20,0;25,5] нмоль/л в ходе тестирования, с разбросом показателей от 13,0 до 42,0 нмоль/л, и 25,2 [19,1-31,2] нмоль/л по результатам ретестирования с минимальным значением 17-ОНП 11,4 нмоль/л, максимальным – 94,0 нмоль/л (табл. 13). Для оценки различий показателя 17-ОНП у пациентов в этих двух подгруппах нами был вычислен критерий Манна - Уитни. Полученные данные с учетом критического значения показателя позволили нам сделать вывод, что достоверные различия значений 17-ОНП в двух подгруппах получены по ретестированию ($U = 125,5$, $U_{0,05} = 195$), при этом более высокие показатели соответствовали группе пациентов с НК21ОН. По результатам тестирования значения 17-ОНП достоверно не отличались: $U = 82$, $U_{0,05} = 73$ (рис. 15).

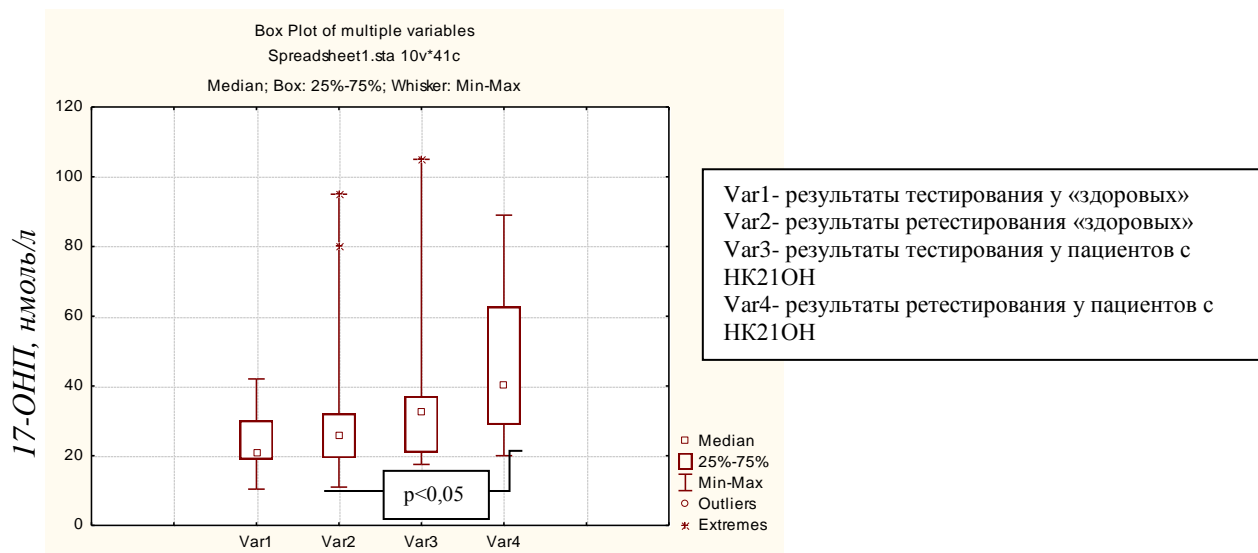


Рисунок 15. Уровень 17-ОНП в ходе неонатального скрининга на АГС у «здоровых» и пациентов с НК21ОН.

При анализе гормональных данных 3 подгрупп пациентов к моменту первичного обращения в стационар были получены следующие данные (табл. 13).

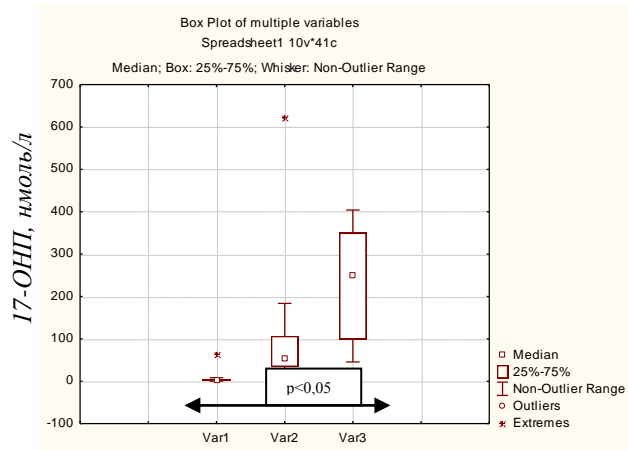
Таблица 13. Гормональные данные пациентов, обследованных по причине повышения уровня 17-ОНП в ходе неонатального скрининга на АГС (проспективное исследование).

Показатель/признак	«здоровые»	КФ21ОН	НК21ОН
17-ОНП, нмоль/л Скрининг (1 тест)	21,0 [20,0;25,2]	данных нет	33,2 [21,0;37,5]
17-ОНП, нмоль/л Скрининг (ретест)	25,0 [19,1-31,2]	данных нет	42,5 [31,5;63,8]
17-ОНП, РИА, нмоль/л	49,5 [36,3;81,3]	308,5 [173,0;471,0]	138,7 [68,5;154,5]
17-ОНП, ТХМС, нмоль/л	2,1 [1,4;3,9]	277,6 [153,6;350,3]	58,1 [36,7;115,3]
21-дезоксикортизол, нмоль/л	0,11 [0,06;1,30]	71,5 [42,0;166,0]	4,0 [2,2;5,6]
Коэффициент (17-ОНП+андростендион)/кортизол	0,020 [0,009;0,050]	1,50 [0,87;3,88]	0,3 [0,2;0,6]
Кортизол, автоматический анализатор, нмоль/л	256,0 [134,5;328,5]	Не оценивали	335 [250;463]
Кортизол, ТХМС, нмоль/л	281 [154-393]	Не оценивали	171,9 [113,4;250,0]
АКТГ, пг/мл	40,2 [21,9;51,9]	Данных нет	42,4 [25,3;98,3]
АРП, нг/мл/час	4,2 [1,1;13,2]	Данных нет	9,0 [2,3;12,7]

В подгруппе детей с НК21ОН медиана 17-ОНП по РИА составила 138,7 [68,5;154,3] нмоль/л, по данным ТХМС - 58,1 [36,7;115,3] нмоль/л. При этом, по результатам аналогичных измерений в подгруппе пациентов с ложноположительным подъемом 17-ОНП («здоровые») медиана показателя, измеренного методом РИА, оказалась равной 49,5 [36,3;81,3] нмоль/л, а по методу ТХМС - 2,1 [1,4;3,9] нмоль/л. У пациентов с КФ21ОН Me 17-ОНП по ТХМС = 277,6 [153,6;350,3] нмоль/л, по РИА = 308,5 [173,0;471,0] нмоль/л. Следует отметить, что уровень 17-ОНП по методу РИА был повышен у всех «здоровых» пациентов и отличался от уровня 17-ОНП, измеренного ТХМС более чем в 25 раз. Этот факт ставит под сомнение возможность применения РИА для исследования уровня 17-ОНП у пациентов раннего возраста при сомнительных результатах скрининга.

Для проверки достоверности отличия уровня 17-ОНП в 3 подгруппах пациентов по обоим методам мы попарно сравнили значения 17-ОНП с применением критерия Манна-Уитни и получили следующие результаты. По методу РИА уровень 17-ОНП достоверно отличается у пациентов с КФ21ОН и «здоровых» ($U = 5$, $U_{0,05} = 108$) и КФ21ОН и пациентов с НК21ОН ($U = 29$, $U_{0,05} = 84$); тогда как в подгруппах «здоровые» и пациенты с НК21ОН показатель критерия находится в зоне неопределённости ($U = 130$, $U_{0,05} = 146$), что говорит о том, что РИА не позволяет дифференцировать пациентов с ложноположительным подъемом 17-ОНП по скринингу и пациентов с НК21ОН. В противоположность вышесказанному при использовании метода ТХМС мы получили достоверные различия 17-ОНП во всех трех подгруппах: $U = 1$, $U_{0,05} = 124$ (подгруппа с КФ21ОН и «здоровые»), $U = 10$, $U_{0,05} = 149$ (при сравнении пациентов с НК21ОН и «здоровых») и $U = 27$, $U_{0,05} = 51$ (между подгруппами КФ21ОН и НК21ОН) (рис. 16).

A



Var1- уровень 17-ОНП у «здоровых»
Var2- уровень 17-ОНП у пациентов с НК21ОН
Var3- уровень 17-ОНП у пациентов с КФ21ОН

B

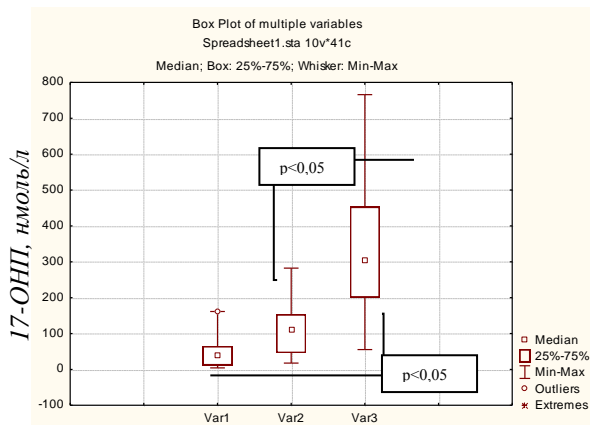


Рисунок 16. Уровень 17-ОНП, измеренный методом ТХМС (А) и РИА (В), у пациентов с НК21ОН, КФ21ОН и «здоровых».

Для подтверждения вышесказанного нами были вычислены показатели чувствительности, точности, специфичности и прогностической ценности обоих методов для определения уровня 17-ОНП с помощью метода разрешающей матрицы. Вычисленные показатели представлены в таблице 14.

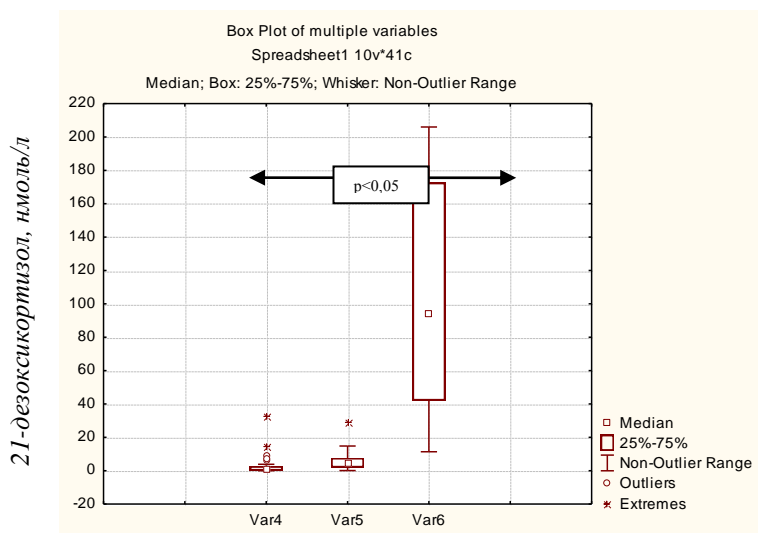
Таблица 14. Сравнение информативности двух методов исследования 17-ОНП (РИА и ТХМС) с использованием метода разрешающей матрицы.

Метод исследования	Показатель				
	Чувствительность	Специфичность	Точность	Прогностическая ценность положительного результата	Прогностическая ценность отрицательного результата
РИА	100%	21,8%	53%	46,8%	100%
ТХМС	100%	94,0%	96%	91,0%	100%

Исходя из полученных данных, мы еще раз продемонстрировали, что метод ТХМС оказался: во-первых, более специфичным, то есть дает меньшее число ложноположительных результатов при отсутствии искомого заболевания; во-вторых, почти в 2 раза более точным; в-третьих, прогностически более ценным по сравнению с РИА для определения показателя 17-ОНП у детей до года. Эти результаты сопоставимы с ранее полученными данными.

Как и в предыдущем исследовании, в качестве дополнительных критериев диагностики мы вычисляли и оценивали уровни 21-дезоксикортизола (21-Д) и коэффициента (17-ОНП+андростендион)/кортизол $((17\text{-ОНП}+A)/F)$ во всех 3 подгруппах (табл. 13).

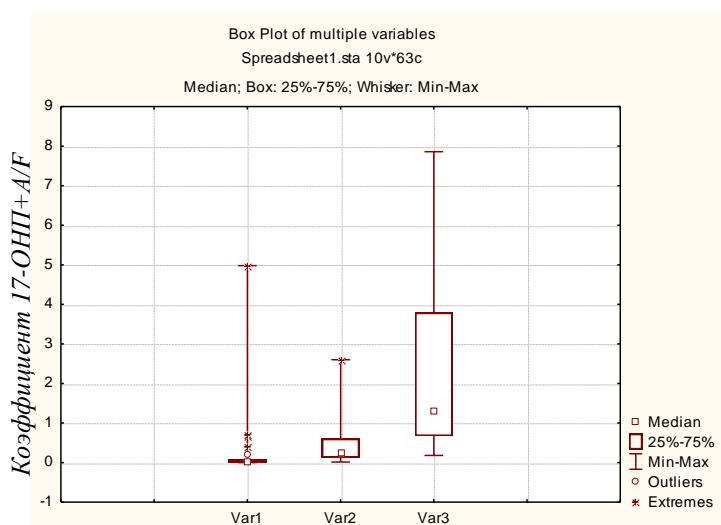
Медиана 21-дезоксикортизола в подгруппе «здоровых» детей составила 0,11 [0,06;1,3] нмоль/л, тогда как у пациентов с НК21ОН - 4,0 [2,2;5,6] нмоль/л, а при КФ21ОН - 71,5 [42;166] нмоль/л. При вычислении критерия Манна - Уитни с учетом критического значения показателя мы получили, что уровни 21-Д достоверно отличаются во всех 3 подгруппах при попарном сравнении групп: $U=6,5$, $U_{0,05} = 124$ (подгруппа КФ21ОН и «здоровые»), $U = 49,5$, $U_{0,05} = 137$ (при сравнении пациентов с НК21ОН и «здоровых») и $U = 22,5$, $U_{0,05} = 47$ (между подгруппами с КФ и НК21ОН) (рис. 17).



Var1- «здоровые»
 Var2 - пациенты с НК21ОН
 Var3 - пациенты с КФ21ОН

Рисунок 17. Уровень 21-дезоксикортизола, измеренный методом ТХМС, у пациентов с НК21ОН, КФ21ОН и «здоровых».

Медиана значений коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$ оказалась равной 0,020 [0,009;0,050] у «здоровых», 0,3 [0,2;0,6] у пациентов с НК21ОН и 1,5 [0,87;3,88] у детей с КФ21ОН (табл. 12). При вычислении критерия Манна-Уитни мы продемонстрировали, что уровни изучаемого коэффициента также достоверно отличаются во всех 3 подгруппах при попарном сравнении подгрупп: $U = 4$, $U_{0,05} = 124$ (подгруппа с КФ21ОН и «здоровые»), $U = 98$, $U_{0,05} = 137$ (при сравнении пациентов с НК21ОН и «здоровых») и $U = 4$, $U_{0,05} = 47$ (между подгруппами с КФ и НК21ОН) (рис. 18).



Var1- «здоровые»
 Var2- пациенты с НК21ОН
 Var3- пациенты с КФ21ОН

Рисунок 18. Значения коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$ у пациентов с НК21ОН, КФ21ОН и «здоровых».

В прошлой главе, посещённой пациентам с рано диагностированной НК21ОН, для оценки функционального состояния коры надпочечников мы анализировали показатели кортизола, АКТГ и АРП (табл. 13). Имея аналогичные данные в подгруппе «здоровых» пациентов, мы провели сравнительную оценку показателей с использованием критерия Манна - Уитни. Так, медиана значений кортизола (автоматический анализатор) у «здоровых» пациентов оказалась равной 256,0 [134,5;328,5] нмоль/л, у детей с НК21ОН - 335 [250;463] нмоль/л. Медиана кортизола в двух подгруппах, измеренного методом ТХМС, оказалась равной 171,9 [113,4;250,0] нмоль/л и 281 [154;393] нмоль/л соответственно. При сравнении уровней кортизола в двух подгруппах при использовании разных методов измерения достоверных отличий выявлено не было ($p < 0,05$). Уровень кортизола ниже рефересных значений (автоматический анализатор) был выявлен только у одного пациента в группе «здоровых» и составил 48,8 нмоль/л. Однако, дальнейшее клиническое наблюдение и повторное гормональное исследование (кортизол, АКТГ) позволили нам исключить у ребенка надпочечниковую недостаточность. Медиана значений АКТГ плазмы крови у пациентов с НК21ОН составила 42,4 [25,3;98,3] пг/мл; в группе «здоровых» - 40,2 [21,9;51,9] пг/мл, что при применении критерия Манна - Уитни говорит об отсутствии достоверных различий между группами ($U = 121$, $U_{0,05} = 68$). Как мы уже говорили, повышенный уровень АКТГ был выявлен у трети пациентов с НК21ОН, тогда как повышение показателя среди «здоровых» пациентов (110,9 пг/мл) был зафиксирован только у одного ребенка, причем в случае с пониженным уровнем кортизола. Что касается уровня АРП, то медиана значений показателя у пациентов с НК21ОН получилась равной 9,0 [2,3;12,7] нг/мл/ч, во второй группе детей - 4,2 [1,1;13,2] нг/мл/ч. С учетом полученного критерия Манна - Уитни ($U = 47,5$, $U_{0,05} = 34$) можно говорить об отсутствии различий значений АРП в исследуемых группах, а умеренное повышение АРП также без клинических проявлений минералокортикоидного дефицита может быть обусловлено

частичной резистентностью к минералокортикоидам, характерной для детей первого года жизни.

Таким образом, сочетание нормального уровня кортизола и АКТГ с отсутствием активных жалоб и патогмоничных клинических проявлений в подгруппе «здоровых» позволяет сделать вывод об отсутствии у этих пациентов надпочечниковой недостаточности, несмотря на высокие уровни 17-ОНП по методу РИА при поступлении, что еще раз доказывает повышение уровня 17-ОНП носит ложноположительный характер.

С учетом полученных данных о достоверно отличающихся уровнях 17-ОНП, 21-дезоксикортизола и анализируемого нами коэффициента $(17\text{-ОНП}+А)/F$ в 3 подгруппах пациентов, мы попытаемся определить критерии диагностики НК21ОН с использованием этих показателей.

Для вычисления оптимального значения величины порога отсечения для изучаемых показателей применялся ROC-анализ. Референсные или нормативные значения вычислялись в соответствии с перцентилями: P25% (25 перцентиль) соответствовал нижней границе нормы, P75% (75 перцентиль) - верхней границе нормы.

А. 17-ОНП.

Для анализа уровня 17-ОНП взяты следующие выборки:

1 - дети с ложноположительным повышением 17-ОНП по скринингу, включающая доношенных к моменту исследования показателя пациентов из ретроспективного исследования ($n = 36$, группа 1а), и пациентов из проспективного исследования ($n = 31$, группа 1б),

2 - группа пациентов с генетически верифицированной НК21ОН ($n = 20$).

Отсутствие частых мутаций в гене *CYP21A2* и значимых клинико-лабораторных отклонений у пациентов группы 1а и 1б позволило нам использовать полученные методом ТХМС значения 17-ОНП для определения референсных интервалов показателя для детей исследуемой возрастной группы. Этот факт подтверждается также полученными достоверными различиями значений 17-ОНП по методу ТХМС в группе детей с НК21ОН и группе «здоровых» пациентов.

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности показателя 17-ОНП для верификации НК21ОН у детей до года и построения характеристической кривой выявлена отличная прогностическая способность 17-ОНП (согласно экспертной шкале значений AUC, таблица 15), так как площадь под кривой (AUC) составила 0,992 (95% доверительный интервал равен 0,977-1,00, $p < 0,0001$) (рис. 19, таблица 16, стр.111).

Как следует из таблицы 17 (стр.112), оптимальным порогом отсечения (cut-off) для 17-ОНП, обеспечивающим максимальную чувствительность и специфичность теста (или минимум ошибок I и II рода), оказалось значение - 8,47 нмоль/л. В этой точке чувствительность равна 100%, что означает: у 100% пациентов с наличием НК21ОН тест будет положительным, то есть уровень 17-ОНП больше или равен 8,47 нмоль/л. Специфичность равна 90%, следовательно, у 10 человек из 100, у которых нет НК21ОН, тест будет положительным, то есть больше или равен 8,47 нмоль/л.

Таблица 15. Экспертная шкала значений AUC.

<i>Интервал AUC</i>	<i>Качество модели (показателя)</i>
0,9-1,0	Отличное
0,8-0,9	Очень хорошее
0,7-0,8	Хорошее
0,6-0,7	Среднее
0,5-0,6	Неудовлетворительное

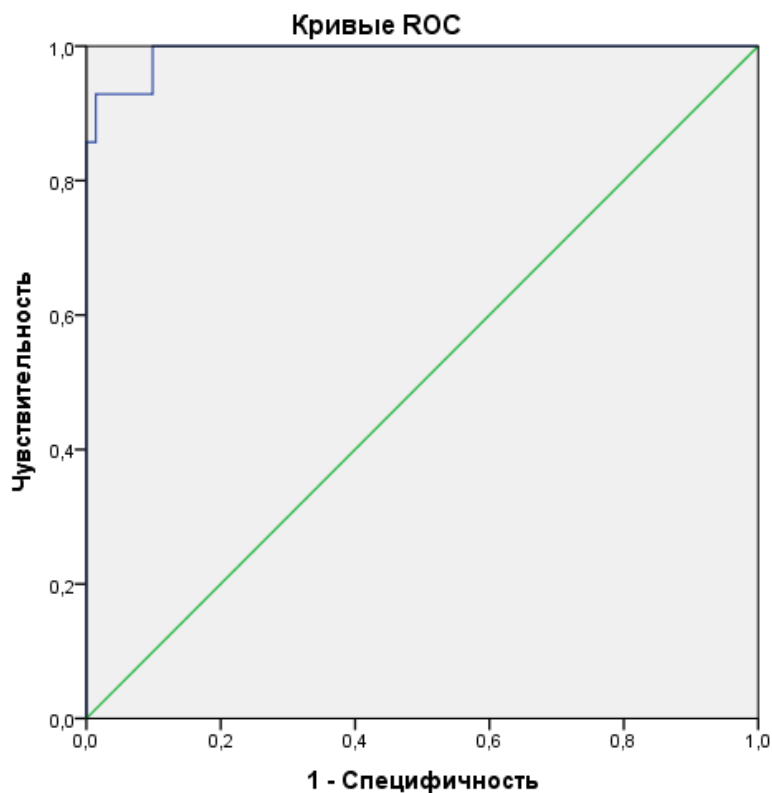


Рисунок 19. ROC-кривая для показателя 17-ОНП.

Таблица 16. Параметры ROC- анализа для 17-ОНП. Площадь под кривой (AUC).

Тестовая переменная(ые): gr

Площадь	Стандартная. ошибка ^a	Асимптотическая значение. ^b	Асимптотический 95% Доверительный интервал	
			Нижняя граница	Верхняя граница
,992	,008	,000	,977	1,000

Таблица 17. Координаты для ROC-кривой.

Тестовая переменная(ые): gr

Положительное если больше или равно ^a	Чувствительность	1 - Специфичность
-,8000	1,000	1,000
,2300	1,000	,986
.....		
,9400	1,000	,915
,9700	1,000	,901
1,0150	1,000	,873
1,0600	1,000	,859
1,1150	1,000	,845
.....		
8,0650	1,000	,127
8,3200	1,000	,113
8,4700	1,000	,099
8,7500	,929	,099
9,3050	,929	,085
9,8550	,929	,070
.....		
115,3350	,214	,000
153,8200	,143	,000
402,8350	,071	,000
623,0000	,000	,000

Референсные значения 17-ОНП, измеренные методом ТХМС, в 1а группе пациентов соответствуют 1,3 - 6,0 нмоль/л. В подгруппе 2б норма для 17-ОНП оказалась равной 1,6 - 4,8 нмоль/л. Рассчитанный для этих двух выборок критерий Манна - Уитни показал отсутствие достоверных различий 17-ОНП у пациентов в группе 1а и 1б ($U = 275$, $U_{0,05} = 370$), что позволило объединить данные этих групп и обозначить нормы для 17-ОНП как 1,5 - 5,6 нмоль/л ($n = 67$).

Б. 21-дезоксикортизол

С учетом полученных достоверных отличий показателя 21-дезоксикортизол в подгруппе пациентов с НК21ОН и «здоровых» детей, было также произведено вычисление оптимального значения величины порога отсечения для данного показателя с применением ROC-анализа. Материалами послужили аналогичные выборки пациентов, что и при оценке 17-ОНП.

В ходе ROC-анализа и построения характеристической кривой выявлена хорошая прогностическая способность показателя 21-дезоксикортизол (согласно экспертной шкале значений AUC, табл. 15), так как площадь под кривой (AUC) составила 0,801 (95% доверительный интервал равен 0,668-0,933, $p < 0,0001$) (рис. 20, табл. 18).

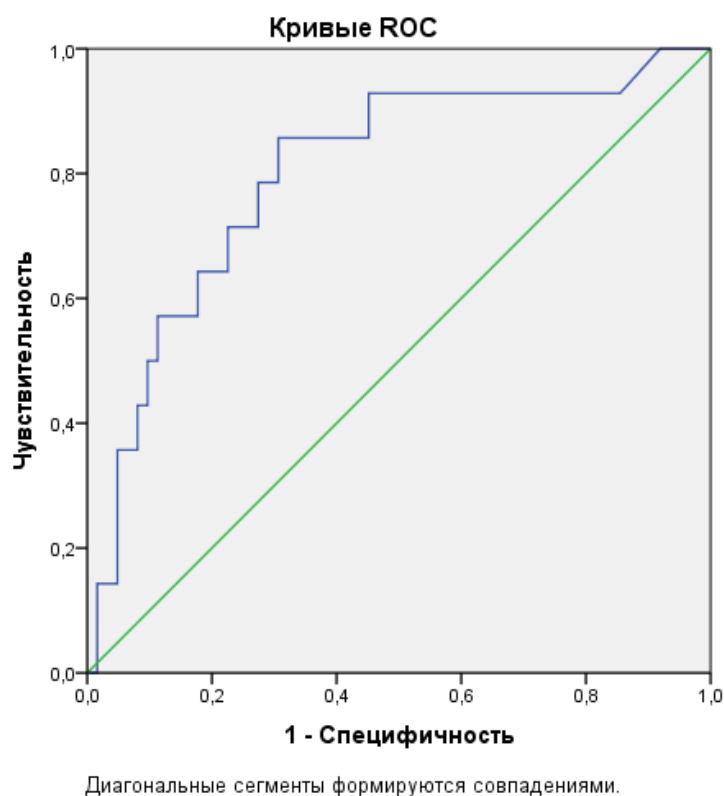


Рисунок 20. ROC-кривая для показателя 21-дезоксикортизол.

Таблица 18. Параметры ROC- анализа для 21-дезоксикортизола. Площадь под кривой (AUC).

Тестовая переменная(ые): НОРМА

Площадь	Стандартная ошибка ^a	Асимптотическая значение.. ^b	Асимптотический 95% Доверительный интервал	
			Нижняя граница	Верхняя граница
,801	,068	,000	,668	,933

Как следует из таблицы 19, оптимальным порогом отсечения (cut-off) для 21-Д, обеспечивающим сочетание максимальной чувствительности и специфичности теста (или минимум ошибок I и II рода), оказалось значение, равное 4,85 нмоль/л. В этой точке чувствительность равна 50%, а специфичность - 90%, что означает, что у пациентов с НК21ОН тест будет положительным в половине случаев, а при отсутствии заболевания он будет положительным (то есть 21-дезоксикортизол равен или больше 4,85) только у 10 человек из 100.

Таблица 19. Координаты для ROC- кривой.

Тестовая переменная(ые): НОРМА

Положительное если больше или равно ^a	Чувствительность	1 - Специфичность
-1,0000	1,000	1,000
,0150	1,000	,952
...		
,3650	,929	,645
,4350	,929	,613
...		
1,8700	,786	,306
1,9550	,786	,290
...		
2,4550	,714	,242
2,7000	,714	,226
...		
4,6950	,500	,113
4,8550	,500	,097
5,1650	,429	,097
...
30,6800	,000	,016
33,7000	,000	,000

Несмотря на полученную нами хорошую прогностическую способность данного показателя, информативность 21-дезоксикортизола значительно уступает таковой для 17-ОНП, и, следовательно, не может использоваться в качестве единственного маркера НК21ОН.

Используя данные «здоровых» детей референсные значения 21-Д в 2 группах (1а и 1б) практически не отличались и оказались равными 0,34 - 3,1 и 0,3 - 4,7 нмоль/л соответственно. Объединение двух подгрупп позволило предположить, что нормативные значения для 21-дезоксикортизола оказываются в пределах 0,3 - 3,4 нмоль/л. При этом критерий Манна - Уитни демонстрирует значимые отличия показателя у «здоровых» и пациентов с НК21ОН: $U = 166$, $U_{0,05} = 232$. В дополнении к более низкой чувствительности показателя 21-дезоксикортизол по сравнению с 17-ОНП, мы видим, что порог отсеечения для 21-дезоксикортизола находится очень близко к верхней границе нормы (4,85 и 3,4 нмоль/л соответственно) в отличие от 17-ОНП (8,47 и 5,6 нмоль/л соответственно), что еще раз доказывает необходимость оценивать в ходе ТХМС в первую очередь именно уровень 17-ОНП.

Несмотря на полученные различия значений коэффициента $(17\text{-ОНП}+A)/F$ между исследуемыми подгруппами пациентов, расчетом оптимального порога отсеечения мы не озадачились, так как с одной стороны, показатели 17-ОНП обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для верификации НК21ОН; с другой стороны, большая вариабельность показателя кортизола в зависимости от возраста может снижать информативность теста.

3.4.2 Референсные значения основных стероидов сыворотки крови с использованием метода тандемной хромато-масспектрометрии.

В ходе анализа гормонального профиля методом ТХМС у «здоровых» пациентов раннего возраста в рамках ретроспективного и проспективного исследований, помимо вышеупомянутых 17-ОНП, 21-дезоксикортизола, кортизола и андростендиона, для каждого пациента определены уровни нижеперечисленных стероидов: 11-дезоксикортизол, прогестерон, тестостерон, кортикостерон.

Используя значения P25% и P75% для каждого показателя вычислены референсные интервалы для доношенных детей первых трех месяцев жизни (n = 67) (табл. 20). Возрастной диапазон (1 – 3 месяца) выбран, исходя из медианы возраста обследуемых, которая составила 65,8 [21,0;83,5] дней.

Таблица 20. Референсные значения стероидов у детей первых трех месяцев жизни с использованием метода ТХМС.

<i>Показатель</i>	<i>Норма, нмоль/л</i>
11-дезоксикортизол	0,4 - 1,4
21-дезоксикортизол	0,3 - 3,4
кортизол	73 - 391
прогестерон	0,2 - 0,9
тестостерон	М - 0,6 - 7,5, Ж - 0,13 - 0,2
кортикостерон	1,7 - 22,4
17-ОНП	1,49 - 5,6
андростендион	0,3 - 1,2

Наличие 11-дезоксикортизола в рамках метода позволяют также исключать вторую по частоте форму АГС, обусловленную дефицитом 11 β -гидроксилазы. В нашем исследовании ни у одного ребенка повышенного значения данного показателя зафиксировано не было.

Естественно, полученные нами данные носят предварительный характер ввиду относительного малого объема выборки и отсутствия более критичного деления пациентов по возрастному показателю и гестационному возрасту.

Разработка критериев диагностики НК21ОН и референсных значений основных гормонов у детей первых трех месяцев жизни, позволило нам предложить рациональное использование ТХМС, как метода «первой линии», для диагностики нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста и усовершенствовать алгоритм обследования пациентов с сомнительными результатами скрининга (приложение, рис. 22, стр. 160). В разработанном алгоритме мы предлагаем всем пациентам с сомнительными результатами неонатального скрининга на АГС при отсутствии клинических признаков надпочечниковой недостаточности исследование стероидов сыворотки крови методом ТХМС. В случае нормальных показателей 17-ОНП (1,49 – 5,5 нмоль/л) в сочетании с нормальным содержанием других показателей стероидного профиля крови диагноз АГС (в том числе НК21ОН) исключается. В случае сомнительных значений 17-ОНП (5,6 - 8,5 нмоль/л), в сочетании с измененными значениями 21-дезоксикортизола и/или тестостерона и/или кортизола, возможно, повторное исследование стероидов методом ТХМС через 1 - 2 месяца или проведение молекулярно-генетического анализа гена *CYP21* на частые мутации. При получении значений 17-ОНП выше 8,5 нмоль/л, сопровождающееся повышением значений 21-дезоксикортизола (выше 4,8 нмоль/л) и/или тестостерона и/или снижением кортизола, диагноз НК21ОН сомнений не вызывает, а для его полной верификации рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа гена *CYP21* на частые мутации.

Таким образом, четвертая часть нашей работы позволила получить следующие результаты. Во-первых, нами вычислены ориентированные нормы основных стероидов сыворотки крови по методу ТХМС у детей первых трех месяцев жизни, применение которых позволит исключить не только НК21ОН, но и другие, менее частые, формы нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста. Во-вторых, применение метода ТХМС позволило нам разработать высокоспецифичный критерий диагностики НК21ОН по уровню 17-ОНП. Полученные результаты легли в основу алгоритмов диагностики и ведения пациентов с НК21ОН на 1 году жизни.

Глава 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Врожденная дисфункция коры надпочечников, обусловленная дефицитом 21-гидроксилазы, является распространенным наследственным заболеванием и самой частой формой среди 7 известных вариантов адреногенитального синдрома (АГС) [54, 80, 87, 93, 121, 122, 148, 149]. Высокая летальность при несвоевременной диагностике классических форм АГС неизбежно обусловила внедрение новых методов диагностики и разработку алгоритмов ведения и лечения пациентов с данной патологией. В отличие от классических форм, так называемый «мягкий», неклассический вариант дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН), первые упоминания о котором появилось уже в 1957 году [41], изучен еще недостаточно, особенно у детей младшей возрастной группы. Причина этому – поздняя манифестация заболевания и большая вариабельность клинических проявлений и исходов заболевания [29, 31, 50, 54, 63, 80, 90, 121, 136]. До настоящего времени ни в одном литературном источнике нам не встречалось четко отработанных алгоритмов диагностики и лечения НК21ОН у данной группы пациентов. Большой интерес, проявляемый в последнее время исследователями всего мира к неклассическим вариантам врожденной дисфункции коры надпочечников (особенно, дефициту 21-гидроксилазы), вполне объясним и обусловлен, во-первых, продемонстрированной многими зарубежными исследователями высокой распространённостью заболевания в различных популяциях [26, 53, 104], во-вторых, весомым вкладом НК21ОН в развитие репродуктивных нарушений у женщин [21, 29, 45, 50, 149]. Более того, ввиду совершенствования лабораторных методов исследования стероидов сыворотки крови, появилась возможность не только диагностировать заболевание уже на первом году жизни, но и пренебрегать большим количеством неоправданных исследований для исключения НК21ОН [33, 34, 46, 62, 66, 112].

В связи с этим, в настоящей работе мы задались целью изучить истинную распространенность НК21ОН в российской популяции, а также проанализировать клинико-гормональные особенности заболевания и предложить оптимальные алгоритмы диагностики и ведения таких пациентов в раннем возрасте.

Первая часть проведенной нами работы, основанная на молекулярно-генетическом исследовании 938 образцов пятен крови доношенных новорожденных, позволила рассчитать минимальный показатель распространенности НК21ОН на примере популяции Московской области с помощью формулы Харди-Вайнберга, который оказался равным 1:2206 новорожденных, и минимальную частоту носителей (на примере мутации V281L) – 1:24. Полученные результаты совпадают с данными, приведенными S. M. Baumgartner-Parzer с соавт. (2005) [26], где частота гетерозигот составила 1:25, а вычисленная распространенность заболевания - 1:2500 при анализе 200 образцов. В имеющихся литературных источниках мы встретили еще два крупных исследования, по результатам одного из которых частота НК21ОН оказалась выше полученной нами (1:255) [104], а в другом - значительно ниже (1:10000) [53], с выборкой пациентов 603 и 144 соответственно. Это еще раз подтверждает вариабельность частоты встречаемости НК21ОН в различных популяциях, несмотря на использование одних и тех же методов расчета показателя, и объясняется, скорее всего, влиянием национальных и этнических факторов.

Примененный в настоящей работе картографический метод изучения фамилий матерей новорожденных, чьи образцы пятен крови были взяты для изучения показателя распространенности, позволил «перенести» данные о частоте НК21ОН, рассчитанные на небольшой выборке Московской области, на популяцию России в целом. Полученные «фамильные ландшафты» отображают частоту НК21ОН у «исконно русского» народа (рис.3, глава 3.1, стр. 61). Ранее подобные методы для изучения частоты НК21ОН в популяциях не применялись.

Изучая две наиболее распространенные мутации, характерные для НК21ОН, мы доказали, что чаще всего в популяции Московской области встречается мутация V281L, при этом ни в одном из 938 образцов носительство мутации P30L обнаружено не было, что в соответствии с данными зарубежных исследований доказывает, что частота встречаемости мутации V281L в большинстве популяций значительно превалирует над частотой встречаемости P30L и составляет в среднем 85 - 95% по отношению к другим мутациям [26, 53, 104].

Результаты нашего исследования, основанные на сравнении истинного показателя распространенности НК21ОН и показателя, вычисленного с учетом результатов неонатального скрининга на АГС, также продемонстрировали, что неонатальный скрининг на ВДКН не позволяет диагностировать НК21ОН более чем в 90% случаев. На этот факт указывает в своем исследовании Therrell V.L. с соавт. (1998) [131], который доказал, что неонатальный скрининг на ВДКН позволяет идентифицировать классические формы дефицита 21-гидроксилазы в 86%, а неклассические - лишь в 13%.

Анализируя значения 17-ОНП, полученные в ходе скрининга, мы сделали вывод, что уровень 17-ОНП не позволяет выявлять носителей мутаций, характерных для неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы. В литературе подобные исследования нам не встречались.

Таким образом, настоящее исследование впервые дало представление об истинной распространенности НК21ОН в российской популяции, показало несостоятельность скрининговых программ для выявления НК21ОН, а также доказало признанную в большинстве популяций высокую частоту мутации V281L.

Высокий показатель распространенности, продемонстрированный как зарубежными авторами, так и результатами нашего исследования, а также большая частота ошибок скрининга, диктует необходимость разработки новых методов диагностики НК21ОН у новорожденных для ранней постановки диагноза, своевременной медикаментозной коррекции и профилактики

отрицательных исходов заболевания. Проведенные нами ретроспективное и проспективное исследования 113 пациентов раннего возраста с незначительно повышенными уровнями 17-ОНП продемонстрировали, что неонатальный скрининг на АГС дает большое количество ложноположительных результатов. Так, в наших наблюдениях из 92 обследованных пациентов без учета классических форм дефицита 21-гидроксилазы в 78% случаев (72 пациента) повышение уровня 17-ОНП оказалось ложным, что совпадает с данными многих зарубежных авторов [19, 61, 82, 95]. По мнению исследователей, низкая специфичность и чувствительность стандартных методов измерения стероидов крови, приводящих к гипер- и гиподиагностике заболевания, обусловлена целым рядом факторов, таких как технические характеристики метода, особенности физиологии организма новорожденных и другие. Ввиду этого, начиная с 1993 года в практику начал внедряться метод tandemной хромато-масспектрометрии (ТХМС), который благодаря большому количеству преимуществ позволяет избежать недостатков традиционных иммунных методов исследования, в том числе для измерения 17-ОНП, и существенно снизить число ложноположительных результатов, полученных по скринингу на ВДКН [34, 62, 66, 82, 109, 154]. В некоторых развитых странах метод ТХМС является не только методом выбора для дифференциальной диагностики нарушений стероидогенеза у новорожденных в сомнительных случаях, но и успешно применяется на втором этапе скрининга с определением, как 17-ОНП, так и других стероидов крови: 21-дезоксикортизола, 11-дезоксикортизола и показателя (17-ОНП+андростендион)/кортизол, что в целом существенно повышает информативность скрининговых программ [112, 113]. Вместе с тем, несмотря на явные преимущества метода, до настоящего момента лишь единичные лаборатории предлагают нормативные значения для основных стероидов сыворотки крови по методу ТХМС; а критерии диагностики в рамках метода разработаны только для классических форм АГС. Внедрение ТХМС в повседневную практику во многом ограничено необходимостью наличия

дорогостоящего оборудования и высококвалифицированных специалистов. Поэтому, в большинстве стран и, в том числе, в России до настоящего момента отсутствует возможность широкого «рутинного» использования ТХМС. Ввиду этого, пациентам с сомнительными результатами скрининга на АГС для исключения нарушений стероидогенеза часто проводятся дополнительные обследования, включающие в себя многократное определение уровня 17-ОНП (вплоть до нормализации показателя), исследование дополнительных лабораторных маркеров надпочечниковой недостаточности, и в ряде случаев - молекулярно-генетическое исследование. Отсутствие четкого алгоритма обследования таких детей приводит к возрастанию числа неоправданных заборов крови, отсрочке постановки диагноза, что является не только стрессорным фактором для самого пациента и его семьи, но и увеличивает финансовые затраты государства на обследование таких пациентов.

В нашей работе при сопоставлении информативности ТХМС и радиоиммунного метода (РИА) для определения уровня 17-ОНП у детей раннего возраста оказалось, что ТХМС обладает значительно большей специфичностью (94%), точностью (96%) и прогностической ценностью положительного результата (91%) по сравнению с РИА (21,8%, 53% и 46,8% соответственно). Полученные данные согласуются с результатами большинства исследователей, проводивших подобные работы [34, 62, 66, 112, 154], и позволяют нам предложить метод тандемной хромато-масспектрометрии в качестве метода «первой линии» для дообследования новорожденных детей с сомнительными результатами неонатального скрининга, а также, возможно, для применения на втором этапе неонатального скрининга на АГС.

Данные нашего исследования показали, что для разработки референсных значений 17-ОНП в рамках ТХМС целесообразно оценить и учитывать некоторые качественные характеристики, предположительно влияющие на уровень 17-ОНП новорожденного. Нами продемонстрировано, что определяющим критерием должен служить гестационный возраст ребенка (уровень 17-ОНП тем выше, чем

меньше срок гестации), причем при использовании различных критериев деления новорожденных на группы в зависимости от гестационного возраста, данная тенденция сохраняется, что соответствует результатам, полученным зарубежными исследователями [19, 61, 137]. Достоверной корреляции показателей веса новорожденного с уровнем 17-ОНП нами отмечено не было, что не противоречит результатам, полученным в 2005 году Van der Kamp H.J. с соавт. [137]. Вместе с тем, эти же авторы отмечают более высокий уровень 17-ОНП у новорожденных с критически малым весом (менее 1 кг) по сравнению с другими группами детей, чего нам не удалось оценить в нашей работе по причине отсутствия такой выборки пациентов. Принимая во внимание гендерные различия, мы показали, что у доношенных новорожденных по данным ТХМС уровень 17-ОНП достоверно выше у мальчиков, чем у девочек. При делении новорожденных по полу и сроку гестации, уровни 17-ОНП, измеренные методом ТХМС, у мальчиков и девочек значимо не отличаются, о чем также свидетельствуют данные зарубежных источников [108, 138]. Наконец, как и в работе Schwarz E. (2009) [113] нами показано отсутствие корреляции между уровнем 17-ОНП и сроками забора крови у новорожденного с подозрением на АГС.

Поскольку внедрение метода ТХМС в повседневную практику в рамках программы неонатального скрининга на АГС потребует подключения дополнительных финансовых ресурсов и подготовки высококвалифицированных специалистов, в настоящее время использование ТХМС можно рекомендовать только в качестве дополнительного метода обследования детей с сомнительными результатами скрининга. Имея достаточную выборку пациентов ($n = 67$), у которых не подтвердилось ни одно из известных нарушений стероидогенеза, сопровождающееся повышением 17-ОНП (группа «здоровые»), и отсутствовали изменения по результатам молекулярно-генетического анализа гена *CYP21A2*, мы использовали результаты их обследования для определения референсных значений основных стероидов сыворотки крови по методу ТХМС для детей первых трех месяцев. В нормативах, использующихся различными

лабораториями, пациенты, как правило, дифференцируются не только на доношенных и недоношенных, по гендерным различиям, но и по возрасту в днях (до 1 месяца) и месяцах (до года). Влияние этих качественных характеристик на уровни стероидов крови доказано и в нашей работе, однако, ввиду относительно небольшой выборки пациентов ($n = 67$), нам удалось рассчитать пока только общие нормативы для детей первых трех месяцев (медиана возраста первичного обследования составила 65,8 [21,0;83,5] дней) (табл. 20, стр. 116) и сравнить полученные значения с нормативами, предлагаемыми другими лабораториями.

Так, рассчитанные нами референсные значения для 17-ОНП (1,49 - 5,6 нмоль/л) совпадают с данными ряда зарубежных лабораторий: нижняя граница уровня 17-ОНП от 0,23 до 0,4, верхняя граница от 2,56 до 6,6 нмоль/л [20] (табл. 21); 0,35 - 5,6 нмоль/л от 1 до 12 месяцев [106]. Полученный нами уровень 21-дезоксикортизола, соответствующий 0,3 - 3,4 нмоль/л, практически совпадает с данными, предложенными американскими исследователями для оценки показателя в рамках неонатального скрининга (норма до 4,8 нмоль/л) [112]. Однако, в отличие от полученных нами результатов, при получении значения 21-дезоксикортизола ниже 4,8 нмоль/л авторы предполагают исключение только классических форм без учета пациентов с НК21ОН. Теми же исследователями по скринингу предложена оценка коэффициента (17-ОНП+андростендион)/кортизол: уровни показателя менее 7,5 нмоль/л, по мнению авторов, исключают классические варианты АГС. Напротив, в наших наблюдениях значения коэффициента (17-ОНП+андростендион)/кортизол у пациентов с классическими вариантами АГС укладывались в указанные нормативы, что, скорее всего, объясняется вариабельными значениями уровня кортизола у детей до года и требует дальнейших разработок в этом направлении. Сравнение других вычисленных нами показателей с зарубежными данными [20] приведены в таблице 21.

Таблица 21. Нормативные значения некоторых стероидов сыворотки крови по методу ТХМС: сравнение собственных результатов с данными лаборатории aruplab.com.

Стероид	Собственные данные, нмоль/л	Данные лаборатории aruplab.com, нмоль/л (с учетом возраста и пола ребенка)
17-ОНП	1,49-5,6	3 дня: 0,23-2,56, 4-30 дней: д- 0,23-3,5, м- до 6,9, 1-2 мес.: д- 0,4-3,5, м-до 6,9, 3-5 мес.: д- 0,4-3,5, м- 0,1-3,1, 6-12 мес.: д- до 4,93, м- до 5,1
Тестостерон	м-0,6-7,5, ж-0,13-0,2	н/р: м-2,5-13,8, д-0,6-2,13, 1-5 мес.: м- 0,12-12,6, д- до 0,6, 6-24 мес.: м- до 1,23, д- до 0,18
Андростендион	0,3-1,2	1-7 дней: 0,6-10,4, до 1 мес.: 0,5-2,4, 1-5 мес.: 0,18-2, 6-24 мес.: до 0,45

Нормативные показатели уровня тестостерона, как по данным лаборатории aruplab.com, так и по нашим данным, оказались более высокими у мальчиков, чем у девочек, причем пик уровня тестостерона у мальчиков приходится на возраст 0 - 5 месяцев. Поскольку большая часть пациентов мужского пола обследована нами именно в этом возрасте, верхний порог для этого показателя оказался достаточно высоким. Полученные в нашем исследовании значения андростендиона, с учетом возраста пациентов, сопоставимы с приведенными нормативами для возрастной группы 1 - 5 месяцев. Следовательно, обследованных нами детей с ложным повышением 17-ОНП по скринингу, (с учетом клинических и анамнестических данных) можно было считать здоровыми, и рассматривать эту группу пациентов в качестве контрольной.

Более того, мы еще раз убедились, что методы, применяемые в большинстве стран, в том числе и в России, для определения значения 17-ОНП у новорожденных, дают высокий процент ложноположительных результатов. Безусловно, дальнейшая разработка нормативов должна быть продолжена на большей выборке пациентов с обязательным делением по возрасту согласно рекомендациям и данным зарубежных исследований.

Доказанные в настоящем исследовании высокая информативность и преимущества использования метода ТХМС для исключения врожденных форм нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста дает возможность рекомендовать метод как приоритетный для определения 17-ОНП с учетом различий по гестационному возрасту, весу и, вероятно, полу новорожденного. А предложенные нами нормативы для основных стероидов крови по методу ТХМС у детей первых трех месяцев жизни могут быть рекомендованы к использованию в практике врача.

Значительная часть нашей работы была посвящена диагностике и ведению пациентов с НК21ОН в раннем возрасте, а также изучению клинико-гормональных и молекулярно-генетических особенностей заболевания в этом возрастном периоде. Большинство доступных отечественных и зарубежных работ приводит описания пациентов с НК21ОН в старшем возрасте, когда диагностика заболевания основана на клинико-лабораторной картине синдрома гиперандрогении, и лишь единичным исследователям удалось диагностировать НК21ОН в период новорожденности благодаря внедрению исследования на ВДКН в программу неонатального скрининга [69, 115, 124, 125].

Причиной «подозрения» на НК21ОН у таких пациентов послужил незначительно повышенный или так называемый «сомнительный» уровень 17-ОНП, выявленный в ходе скрининга на АГС, при отсутствии клинической картины надпочечниковой недостаточности (в том числе сольтеряющего синдрома), а также вирилизации у новорожденных женского пола. В нашем исследовании из 92 детей, удовлетворяющих этим критериям, у 20 (22%) был подтвержден диагноз НК21ОН; у остальных детей (72 человека - 78%) повышение 17-ОНП оказалось ложным. Эти данные, с одной стороны, демонстрируют возможность диагностики НК21ОН в рамках неонатального скрининга, но, с другой стороны, еще раз подчеркивают низкую способность скрининговых программ в выявлении НК21ОН, несмотря на доказанную высокую частоту заболевания в популяции. Учитывая отсутствие специфичных лабораторных

маркеров заболевания у детей до года, единственным критерием диагностики НК21ОН у наших пациентов являлся результат молекулярно-генетического исследования, то есть наличие характерных для НК21ОН мутаций в гене *CYP21*: «мягкая» мутация с сохранной ферментативной активностью 2 - 50% в гомозиготном положении или сочетание «мягкой» и «тяжелой» мутации (0 - 5% активности фермента), при которых фенотип определяется менее пораженным аллелем.

Нами проведен подробный анализ клинических, лабораторных и молекулярно-генетических данных в группе пациентов с НК21ОН, а также сравнительная оценка показателей с группой «здоровых» детей (то есть с ложным повышением 17-ОНП). Доступные литературные источники приводят подробные описания в совокупности только 12 пациентов с НК21ОН, диагностированной по результатам неонатального скрининга.

Так, по нашим данным уровень 17-ОНП у пациентов с НК21ОН по результатам скрининга превышал нормы используемых наборов 2 - 2,5 раза и составил 33,2 [21,0;37,5] и 42,5 [31,5;63,8] нмоль/л по тестированию и ретестированию соответственно, при этом значимо отличался по ретестированию в группе пациентов с НК21ОН и у пациентов без мутаций ($p < 0,05$). По данным зарубежных исследователей уровень 17-ОНП по скринингу варьировал в пределах 6 - 19 нг/мл при норме до 5 нг/мл, то есть также превышал норму в среднем от 2 до 4 раз [69, 124, 125]. Оценка показателей отдельно по тестированию и ретестированию, а также сравнение показателя в группе пациентов с НК21ОН и детей с ложным повышением 17-ОНП авторами не проводилась. Ни у одного из 20 обследованных нами пациентов с НК21ОН клинических симптомов надпочечниковой недостаточности и/или гиперандрогении отмечено не было, на что также обращают внимание авторы ряда зарубежных исследований [69, 115, 124, 125]. По данным лабораторного обследования треть наших пациентов имела повышенный уровень АКТГ при нормальных значениях кортизола, причем повышение АКТГ обычно сопровождало высокий уровень 17-ОНП. Из 12

описанных в литературе пациентов 4 имели повышение уровня АКТГ (также треть пациентов), при этом во всех случаях имело место нарастание уровня 17-ОНП при повторных его измерениях [124]. Стимуляционные тесты с аналогами АКТГ, использующиеся в некоторых исследованиях [69, 115, 124, 125], нашим пациентам не проводились.

Согласно результатам молекулярно-генетического обследования, в нашей выборке пациентов с НК21ОН превалирует мутация V281L - 75% случаев, которая в половине случаев оказалась в гомозиготном состоянии, что не противоречит данным большинства авторов, проводивших исследования молекулярно-генетических особенностей пациентов НК21ОН [26, 53, 104, 142]. Вместе с тем, из 12 описанных пациентов с НК21ОН, диагностированных в период новорожденности, мутация V281L (в гомозиготном положении) встречалась только у одной пациентки [115]; а в подавляющем большинстве выявлена вторая, характерная для НК21ОН, мутация P30L (в гомозиготе или в составе компаунд-гетерозиготы) [69, 124, 125], что, скорее всего, объясняется этническими особенностями генотипа японской популяции. Интересно отметить, что в наших наблюдениях у 19 из 20 обследованных пациентов с НК21ОН выявлены мутации, входящие в спектр так называемых «частых», и только у одной пациентки для подтверждения диагноза потребовалось проведение секвенирования гена *CYP21A2*. Результаты, полученные исследователями из Японии, также демонстрируют, преобладание «частых» мутаций у пациентов с НК21ОН: только в одном из 12 описанных случаев аллель-специфическая ПЦР не позволила диагностировать заболевание, и по результатам секвенирования выявлены 3 дополнительные мутации, не являющиеся «частыми» [69].

Учитывая отсутствие выраженного снижения уровня глюко- и минералокортикоидов при НК21ОН, что обычно встречается при классических формах заболевания, целью терапии НК21ОН является подавление избыточной секреции АКТГ и КРГ соответственно гипофиза и гипоталамуса и, следовательно, снижение продукции андрогенов корой надпочечников [121, 149]. В наших

наблюдениях медикаментозную терапию глюко- и, в некоторых случаях, минералокортикоидами получали 30% пациентов (6 детей). При этом, всем 6 больным лечение было начато еще до поступления к нам на обследование, поэтому мы имели возможность только ретроспективно проанализировать их клиничко-лабораторные данные и сформулировать показания для назначения препаратов. Лечение проводилось при повышении уровня 17-ОНП более 150 нмоль/л или нарастании значений показателя в динамике наряду с умеренным повышением уровня АКТГ, и, в ряде случаев, АРП, сопровождающееся электролитными сдвигами. При назначении глюкокортикоидов дозы препарата в наших наблюдениях колебались от 7 до 25 мг/м², что соответствует схеме терапии классических вариантов АГС [68, 117, 121, 149]. Из 12 пациентов с НК21ОН, описанных в иностранной литературе, лечение гидрокортизоном потребовалось только 1 пациентке с генотипом P30L/I172N/R356W по причине плохой прибавки в весе (вирилизации не было) и высокого уровня 17-ОНП, из расчета 12 мг/сутки с постепенной отменой препарата к 11 месяцам жизни под контролем клиничко-лабораторных данных [69].

Проспективное наблюдение за 14 пациентами с верифицированной НК21ОН, оставшихся без лечения, позволило нам оценить динамику клиничко-гормональных данных. В случаях диагностики заболевания в первые месяцы жизни ребенка первый декретированный срок обследования мы предложили по достижении им возраста 12 месяцев, а при выявлении заболевания ближе к 12 месяцам жизни - повторное обследование проводили ближе к 2 годам. Клиничский осмотр и сбор анамнеза продемонстрировали, что ни у одного нашего пациента к году жизни не было жалоб, клиничских проявлений надпочечниковой недостаточности, явлений гиперандрогении и/или преждевременного полового созревания, что сопоставимо с данными Kashimada K. с соавт. (2008) [69]. В наших наблюдениях лишь у одной девочки в течение первого года жизни двукратно на фоне острой респираторной вирусной инфекции, протекающей с субфебрильной лихорадкой, отмечалась вялость,

слабость, снижение аппетита, в связи с чем по рекомендациям врачей ребенок в домашних условиях поручал заместительную терапию глюкокортикоидами в дозе 3 мг/сутки (около 5 - 6 мг/м²) до нормализации температуры тела с последующей постепенной отменой препарата. Повторное обследование продемонстрировало также отсутствие антропометрических признаков преждевременного созревания у подавляющего большинства наших пациентов, что совпадает с результатами Kashimada К. с соавт. (2008) [69], которые представили кривые роста четырех наблюдаемых ими детей.

Имеющиеся клиничко-антропометрические данные обследованных нами пациентов сопоставлялись в каждом случае с результатами лабораторных исследований (17-ОНП, АКТГ, кортизол, АРП), полученных в динамике. Результаты наблюдений показали, что только у одного нашего пациента возрастные изменения антропометрических показателей сопровождались явным нарастанием уровня 17-ОНП, АКТГ и АРП и незначительным ускорением костного возраста; в остальных случаях при наличии умеренного увеличения 17-ОНП уровни остальных лабораторных показателей и данные рентгенографии кистей оказались в пределах допустимых нормативных значений. К сожалению, Kashimada К. с соавт. (2008) [69] не приводят подробные гормональные характеристики наблюдаемых 4 пациентов к первому году жизни, что, возможно, обусловлено отсутствием значимых изменений этих параметров в группе наблюдения. В этой же работе японские исследователи демонстрируют результаты динамического наблюдения своих пациентов в более старшем возрасте: в 2 из 4 случаев в 3 и 4,5 года соответственно было отмечено ускорение темпов роста и костного созревания детей, что послужило поводом для назначения препаратов гидрокортизона с коррекцией терапии по уровню 17-ОНП и клиничко-антропометрическим показателям. Интересно отметить, что в обоих случаях, несмотря на нормализацию либо снижение уровня андрогенов крови, ускорение костного созревания приостановить не удавалось даже при увеличении доз глюкокортикоидов [69].

Небольшая часть нашей работы была также посвящена ретроспективному анализу группы из 24 пациентов с диагностированной по обращаемости НК21ОН. В группе старших детей ($n = 24$) наиболее частой причиной обращения к эндокринологу оказалось появление преждевременного пубархе (61%). У девочек первые симптомы манифестировали в возрасте 6 [5,5;6,7] лет, у мальчиков несколько позже - в 7 [6;7] лет, при этом возраст первичного обследования в целом по группе составил 9,0 [7,5;12,0] лет. Медиана стандартного отклонения роста (SDS роста) по группе на момент первичного обращения за медицинской помощью составила 0,93 [0,13;2,09], а показатели костного возраста у половины пациентов опережали паспортный на 2 [0,5;2,95] года. Уровень 17-ОНП слабо коррелировал со степенью ускорения костного созревания.

Полученные нами результаты наблюдения пациентов раннего возраста (с верифицированной по неонатальному скринингу НК21ОН) и группы старшего возраста (диагностика НК21ОН по обращаемости) легли в основу алгоритма дальнейшего ведения пациентов с рано верифицированной НК21ОН (приложение, Рисунок 23, стр. 161). При отсутствии клинических признаков надпочечниковой недостаточности или гиперандрогении в сочетании с лабораторной картиной крови (незначительно повышенный уровень 17-ОНП без нарастания показателя в динамике, нормальные уровни АКТГ и кортизола) ребенок остается под динамическим наблюдением, а повторное обследование назначается через 1 год. При сохранении компенсации по заболеванию (то есть при отсутствии отрицательной динамики клинико-лабораторных показателей через год), мы считаем целесообразным обязательный повторный осмотр пациентов с НК21ОН, начиная с 5-летнего возраста. Также, мы настоятельно рекомендуем обращать внимание родителей, прежде всего, на появление преждевременного адренархе, даже при отсутствии ускорения роста; а в случаях отсутствия антропометрических сдвигов и нарастания уровня 17-ОНП относительно предыдущих исследований, для оптимизации ростового прогноза мы считаем обязательным исследование костного возраста. При наличии жалоб и клинико-

лабораторной картины декомпенсации по заболеванию (при первичном или последующих наблюдениях) решается вопрос о начале заместительной терапии (препараты глюко- и/или минералокортикоидов) или повторное полное обследование пациента через 3 месяца для выбора тактики дальнейшего ведения (заместительная терапия/дальнейшее наблюдение).

Еще одним важнейшим результатом нашей работы стала разработка диагностически значимых уровней основных маркеров НК21ОН по методу ТХМС для выявления заболевания у детей раннего возраста. При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности для 17-ОНП и 21-дезоксикортизол в группе пациентов раннего возраста с НК21ОН и у «здоровых» пациентов оказалось, что показатель 17-ОНП обладает отличной прогностической способностью для диагностики НК21ОН в раннем возрасте, а величина, равная или превышающая 8,47 нмоль/л с чувствительностью 100% и специфичностью 90% позволяет поставить диагноз в первые месяцы жизни, не прибегая к многочисленным дополнительным исследованиям. При анализе показателя 21-дезоксикортизола в ходе ROC-анализа выявлена хорошая прогностическая способность показателя, однако, полученная нами точка отсечения, соответствующая 4,85 нмоль/л, оказалась недостаточно чувствительной (чувствительность = 50%), что делает возможным применение 21-дезоксикортизола только как вспомогательного маркера НК21ОН в раннем возрасте. Как было отмечено выше, подобные критерии диагностики классических форм АГС предлагает Sarafoglou K. с соавт. (2012) [112]; систематизированные критерии диагностики НК21ОН у детей до года в имеющихся литературных источниках нами встречены не были.

Разработанные нами высокоинформативные маркеры НК21ОН и референсные интервалы для основных стероидов сыворотки крови, измеренных методом ТХМС, позволили нам усовершенствовать алгоритм обследования пациентов с сомнительными результатами скрининга. В предложенном Московским Городским Центром неонатального скрининга «Алгоритме

неонатального скрининга на АГС в г. Москве» [16] (приложение, рис. 21, стр. 159), по нашему мнению, некоторые положения требуют уточнения с целью оптимизации обследования данного контингента пациентов. Во-первых, согласно данному алгоритму, пациенты с незначительным повышением 17-ОНП, позволяющим с учетом клинико-лабораторных данных исключить классические варианты АГС, зачастую оказываются в стационаре, и вынуждены проходить обследование в течение не менее 7 - 10 дней согласно стандарту, за время которого, в основном, дожидаются результатов молекулярно-генетического анализа, единственного в настоящее время высоко информативного диагностического метода выявления неклассических вариантов АГС. Во-вторых, многие пациенты, не госпитализированные в стационар, передаются под наблюдение в городской эндокринологический диспансер (ГЭД), где им в течение нескольких лет с высокой кратностью проводится динамический контроль уровня 17-ОНП и, при необходимости, других показателей сыворотки крови. Все это, естественно, сопряжено не только с психологическими аспектами (неоднократный забор крови у ребенка раннего возраста, стресс для родителей пациента), но и с дополнительной нагрузкой на медицинский персонал и дополнительные финансовые затраты. Важно отметить, что часть пациентов «теряется» в цепочке «роддом - медико-генетический центр - городской диспансер» и остается, таким образом, не дообследованными. Нами не проводился подробный анализ экономической составляющей этой цепочки, однако, даже при ориентировочном подсчете расходов на однократное исследование у ребенка с подозрением на АГС необходимых показателей (17-ОНП, кортизол, АКТГ, АРП, уровни натрия и калия крови) стоимость такого лабораторного теста сопоставима или даже несколько выше стоимости однократного анализа спектра стероидов методом ТХМС. Также, по нашему опыту, многим пациентам очень часто без проведения дополнительного обследования сразу рекомендуется проведение молекулярно-генетического

анализа крови (в том числе, дорогостоящее секвенирование гена *CYP21*); а части пациентам неоправданно назначается лечение препаратами гидрокортизона.

Продемонстрированная в нашей работе высокая информативность метода ТХМС для определения стероидов сыворотки крови у детей раннего возраста, а также разработка критериев диагностики НК21ОН и референсных значений основных гормонов у детей первых месяцев жизни, позволили нам предложить рациональное использование ТХМС, как метода «первой линии» для диагностики нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста и определить место для ТХМС в алгоритме обследования пациентов с сомнительными результатами скрининга (приложение, рис. 22, стр. 160). В предложенном нами алгоритме (приложение, рис. 22, стр. 158) всем пациентам с сомнительными результатами неонатального скрининга на АГС (уровень 17-ОНП 17 - 70 нмоль/л для доношенных и 30 - 70 для недоношенных) при отсутствии клинических признаков надпочечниковой недостаточности рекомендовано исследование стероидов сыворотки крови методом ТХМС. В случае нормальных показателей 17-ОНП (1,49 – 5,5 нмоль/л), а также уровней 21-дезоксикортизола (0,3-3,4) и других показателей стероидного профиля крови диагноз АГС (в том числе НК21ОН) исключается, и пациенту не требуется проведение других уточняющих методов обследования. В случае сомнительных значений 17-ОНП (5,6 - 8,5 нмоль/л), т.е. значений, находящихся за пределами нормативных, но не превышающих порог отсеечения, а также повышенных уровней 21-дезоксикортизола и/или тестостерона и/или снижении кортизола, возможно, повторное исследование стероидов методом ТХМС через 1 -2 месяца или проведение молекулярно-генетического анализа гена *CYP21* на частые мутации. При получении значений 17-ОНП выше 8,5 нмоль/л, сопровождающееся повышением значений 21-дезоксикортизола (выше 4,8 нмоль/л) и/или тестостерона и/или снижением кортизола, диагноз НК21ОН сомнений не вызывает, а для его полной верификации рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа гена *CYP21* на частые мутации.

Уточнение и демонстрация очень высокого показателя истинной распространенности НК21ОН в российской популяции, составляющего 1:2206 с долей носительства гена (по самой частой мутации V281L) 1:24, заставляет изменить отношение к заболеванию, проявлять настороженность врачей-педиатров, неонаталогов и эндокринологов и, как следствие, будет способствовать внедрению новых и развитию уже имеющихся высокоинформативных методов и протоколов, позволяющих диагностировать заболевание в ранние сроки, а также совершенствованию алгоритмов ведения таких пациентов в разные возрастные периоды.

В нашей работе уже сделан первый шаг для оптимизации ведения пациентов с НК21ОН, диагностированной в раннем возрасте на основании данных неонатального скрининга. Первый опыт применения метода ТХМС в России для диагностики нарушений стероидогенеза у детей раннего возраста продемонстрировал высокую чувствительность (100%), специфичность (94%), точность (96%) и прогностическую ценность (92%) ТХМС по сравнению с радиоиммунным анализом (РИА) при определении 17-ОНП. В рамках метода ТХМС также разработаны референсные значения основных стероидов сыворотки крови для исключения не только НК21ОН, но и других врожденных нарушений стероидогенеза у детей первых трех месяцев жизни, а вычисленный пороговый критерий для 17-ОНП (8,47 нмоль/л) позволяет практически однозначно подтвердить наличие НК21ОН, не прибегая к дополнительным лабораторным исследованиям. Применение ТХМС у пациентов с сомнительными результатами неонатального скрининга на АГС в качестве метода «первой линии» в рамках предложенного алгоритма (приложение, рис. 22, стр. 160) способствует упрощению и рационализации схемы обследования таких пациентов. Полученный в процессе нашей работы опыт обследования и лечения детей с НК21ОН в различных возрастных группах лег в основу алгоритма ведения пациентов с НК21ОН с рано диагностированным заболеванием (приложение, рис. 23, стр.161).

ВЫВОДЫ

1. Минимальная частота неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) в российской популяции составляет 1:2206 новорожденных, а частота гетерозигот по мутации V281L – 1:24.
2. Данные неонатального скрининга на адреногенитальный синдром позволяют выявить только 1 из 10 пациентов с НК21ОН.
3. У пациентов с верифицированной НК21ОН на первом году жизни отсутствуют клинические проявления надпочечниковой недостаточности (НН) и/или синдрома гиперандрогении. У трети пациентов лабораторным маркером НН является незначительный подъем уровня АКТГ при нормальном уровне кортизола, что обычно сопровождается высокими показателями 17-ОНП (более 150 нмоль/л).
4. У 75% пациентов генотип НК21ОН представлен мутацией V281L в гомо- или гемизиготном состоянии, или в сочетании с другими частыми мутациями.
5. При дообследовании новорожденных детей с сомнительными результатами неонатального скрининга методом выбора является тандемная хромато-масспектрометрия (ТХМС). Информативность ТХМС при определении уровня 17-ОНП у детей раннего возраста составляет: чувствительность - 100%, специфичность - 94%, точность - 96%, прогностическая ценность положительного результата - 91,6%, прогностическая ценность отрицательного результата - 100%.
6. При использовании ТХМС уровень 17-ОНП $\geq 8,5$ нмоль/л является чувствительным (100%) и специфичным (90%) маркером НК21ОН в раннем возрасте. Высокая информативность показателя 17-ОНП исключает необходимость проведения теста с аналогами АКТГ для диагностики НК21ОН у детей до года.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем новорожденным с сомнительными результатами неонатального скрининга на адреногенитальный синдром для исключения нарушений стероидогенеза (в том числе НК21ОН) в качестве метода «первой линии» показано исследование стероидов сыворотки крови методом tandemной хромато-масспектрометрии (ТХМС) с учетом предложенного нами алгоритма и разработанных нормативных значений стероидов сыворотки крови (приложение, рис. 22, стр.160).
2. Для молекулярно-генетической верификации диагноза НК21ОН методом выбора является аллель-специфическая ПЦР (диагностика частых мутаций), которая лишь в сомнительных случаях дополняется секвенированием или обследованием родителей пациента.
3. Предложен алгоритм ведения пациентов с НК21ОН, диагностированной в раннем возрасте (приложение, рис. 23, стр.161).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- А - андростендион
АГС - адреногипоталамический синдром
АКТГ - адренокортикотропный гормон
АРП - активность ренина плазмы
ВДКН - врожденная дисфункция коры надпочечников
ГВ – гестационный возраст
ГРГ - гонадотропин-рилизинг гормон
ГЭД - городской эндокринологический диспансер
Д - доношенные новорожденные
ИМТ – индекс массы тела
КРГ – кортикотропин-рилизинг гормоны
КФ21ОН - классические варианты дефицита 21-гидроксилазы
ЛГ - лютеинизирующий гормон
Н - недоношенные новорожденные
НН - надпочечниковая недостаточность
НК21ОН - неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы
НМЦ - нарушения менструального цикла
ППР - преждевременное половое развитие
ПЦР - полимеразно-цепная реакция
РИА - радиоиммунный анализ
СПКЯ - синдром поликистозных яичников
ТХМС - тандемная хромато-масспектрометрия
ЦМ - цифровая модель
CYP21A2 (CYP21) - ген 21-гидроксилазы
CYP21B2, CYP21P - псевдоген 21-гидроксилазы
HLA - главный комплекс гистосовместимости
HLA-B
HLA-B8
HLA-B14
HLA-B40
HLA-Bw4
HLA-B5
DR
DR1
DR7
Me - медиана
ROC - receiver operating characteristic
SDS - standard deviation score
3 β -ГСД - 3 β - стероиддегидрогеназа
11-ДОК - 11-дезоксикортикостерон
17-ОНП - 17-гидроксипрогестерон
(17-ОНП+А)/F - 17-гидроксипрогестерон + андростендион/кортизол
17-ОНPr - 17-гидроксипрегненолон
21-Д - 21-дезоксикортизол

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балановская Е.В. Русский генофонд на Русской равнине // Балановская Е.В., Балановский О.П.- Москва: ООО "ЛУЧ", 2007. - с. 165 - 216
2. Бочков И.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика (Руководство для врачей) // АМН СССР. - М., Медицина. - 1984.- 368 с.
3. Гродницкая Е.Э., Курцер М.А. Частота неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников, связанной с недостаточностью 21-гидроксилазы среди женщин с гиперандрогенией // Проблемы репродукции. - 2011.- 1.- с. 47 - 50
4. Дедов И.И., Петеркова В.А., Колесникова Г.С., Семичева Т.В., Карева М.А., Кузнецова Э.С, Акжигитова Д.А., Батенева Е.И., Ивойлов В.С., Лоскутова Л.А., Орловский И.В. Молекулярная диагностика классических форм врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицита стероид-21-гидроксилазы) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции. // Молекулярная медицина. - 2004. - №2. - с.60 - 64
5. Денисенкова Е.В., Бочков Н.П., Калинин Н.Ю., Толстова В.Д., Байдакова В.Д., Воскобоева Е.Ю. Результаты скрининга новорожденных на наследственные болезни в г.Москве // Медицинская генетика. – 2008.- №6. – с. 3 - 12
6. Лисицын Ю.П. Задачи к практическим занятиям по общественному здоровью и здравоохранению: учебно-методическое пособие // Лисицын Ю.П., Полунина Н.В., Нестеренко Е.И. и др.; под общ. ред. Ю.П. Лисицына. - 4-е изд., перераб. и доп. - М., 2005. - с.41
7. Осинская Н.С., Плотникова Е.В., Соболева Е.Л., Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Потин В.В., Анализ спектра мутационных повреждений гена 21-гидроксилазы у больных с адреногенитальным синдромом // Генетика человека. - 2000. - Том 36. - №8. - с. 1147 - 1149

8. Петеркова В.А. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей: пособие для врачей // Петеркова В.А., Семичева Т.В., Кузнецова Э.С. и др. - М. – 2003. – 45 с.
9. Петеркова В.А., Колесникова Г.С., Семичева Т.В., Яровая И.С., Атаманова Т.М., Рубцов П.М., Иванова О.Н., Панфилова Е.В., Прокофьев С.А. Карева М.А. Неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников у девочек-подростков // Проблемы эндокринологии. - 2006. - N 5. - с.26-31
10. Соболева Е. Л. Диагностика и патогенетическая терапия врожденной гиперплазии коры надпочечников и синдрома поликистозных яичников: дис. ... докт.мед.наук / Е.Л. Соболева. - Санкт-петербург, 2011. - 282 с.
11. Фомина С. В. Клиническая, гормональная и молекулярно-генетическая диагностика неклассической формы 21-гидроксилазной недостаточности в женской популяции: автореф. дис. ... канд. мед. наук // С.В. Фомина. - Самара, 2007. – 22 с.
12. Храмова Е.Б. Эпидемиология, скрининг, диагностика врожденной дисфункции коры надпочечников в западно-сибирском регионе: дис. ... докт.мед.наук // Е.Б.Храмова - Тюмень, 2007. - 266 с.
13. Чагай Н.Б., Фадеев В.В., Бакулина Е.Г. Низкодозированный тест с адренокортикотропным гормоном в диагностике неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников // Проблемы эндокринологии. - 2010. №2.- с. 10-14
14. Шайтарова А.В. Скрининг врожденной дисфункции коры надпочечников: причины и следствия ошибок метода: дис. ... канд.мед.наук // А.В. Шайтарова - Тюмень, 2011. – 131 с.
15. Положение об организации проведения массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания: приказ Минздравсоцразвития РФ "О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания" от 22.03.2006. - N 185. - Москва, 2006.

16. Материалы V Научно-практической конференции "Эндокринологические аспекты в педиатрии. - 21.11.2011 г.
17. Федеральная служба государственной статистики. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.gks.ru>
18. Allele nomenclature for Cytochrome P450 enzymes. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>
19. Allen D.B., Hoffmann G.L., Fitzpatrick P., Laessig R., Maby S., Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels // J Pediatr. - 1997. - Vol. 130. - №1. - P.128 –133
20. ARUP Laboratories © 2006. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.arupconsult.com/index.html>
21. Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H.F., Futterweit W., Janssen O.E., Legro R.S., Norman R.J., Taylor A.E., Witchel S.F.; Androgen Excess Society. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline // J Clin Endocrinol Metab. - 2006. - Vol. 91. - P.4237 – 4245
22. Bachega T.A., Billerbeck A.E., Madureira G., Marcondes J.A., Longui C.A., Leite M.V., Arnhold I.J., Mendonca B.B. Molecular Genotyping in Brazilian Patients with the Classical and Nonclassical Forms of 21-Hydroxylase Deficiency // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1998. - Vol. 83. - №12. - P. 416-419
23. Balsamo A., Cacciari E., Piazzzi S., Cassio A., Bozza D., Pirazzoli P., Zappulla F. Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia- Romagna region of Italy, 1980–1995 // Pediatrics. - 1996. - Vol. 98. - P.362 - 367
24. Balsamo A., Wasniewska M., Di Pasquale G., Salzano G., Baronio F., Bombaci S., De Luca F. Birth length and weight in congenital adrenal hyperplasia according to the different phenotypes // European Journal of Pediatrics. - 2006. - Vol. 165. - № 6. - P. 380 - 383

25. Barra C.B., Silva I.N., Pezzuti I.L., Januário J.N. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // *Rev Assoc Med Bras.* - 2012. - Vol. 58. - №4. - P.459 - 464
26. Baumgartner-Parzer S.M., Nowotny P., Heinze G., Waldhäusl W., Vierhapper H. Carrier Frequency of Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency) in a Middle European Population // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2005. - Vol. 90. - №2. - P. 775-778
27. Baumgartner-Parzer S.M., Nowotny P., Waldhäusl W., Vierhapper H. A rare duplicated 21-hydroxylase haplotype and a de novo mutation: a family analysis // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2003. - Vol.88. - №6. - P.2794-2796
28. Baumgartner-Parzer S.M., Schulze E., Waldhäusl W., Pauschenwein S., Rondot S., Nowotny P., Meyer K., Frisch H., Waldhauser F., Vierhapper H. Mutational Spectrum of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in Austria: Identification of a Novel Missense Mutation // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2001. - Vol. 86. - №10. - P.4771-4775
29. Bidet M., Bellanné-Chantelot C., Galand-Portier M.B., Golmard J.L., Tardy V., Morel Y., Clauin S., Coussieu C., Boudou P., Mowzowicz I., Bachelot A., Touraine P, Kuttenn F. Fertility in women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2010. - Vol. 95. - №3. - P.1182-1190
30. Brosnan P.G., Brosnan C.A., Kemp S.F., Domek D.B., Jelley D.H., Blackett P.R., Riley W.J. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia // *Arch Pediatr Adolesc Med.* - 1999. - Vol.153. - №12. - P.1272 - 1278
31. Cabrera M.S., Vogiatzi M.G., New M.I. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2001. - Vol.86. - №7. - P.3070 - 3078
32. Cameron F.J., Tebbutt N., Montalto J., Yong A.B., Zacharin M., Best J.D., Warne G.L. Endocrinology and auxology of sibships with non-classical congenital adrenal hyperplasia // *Arch Dis Child.* - 1996. - Vol. 74. - P. 406 - 411

33. Cavarzere P., Samara-Boustani D., Flechtner I., Dechaux M., Elie C., Tardy V., Morel Y., Polak M. Transient hyper-17-hydroxyprogesteronemia: a clinical subgroup of patients diagnosed at neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // *Eur J Endocrinol.* - 2009. - Vol. 161. - №2. - P.285 - 292
34. Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns // *Clin Chem.* - 2003. - Vol.49. - №11. P.1797 - 1817
35. Chan A.O., But W.M., Ng K.L., Wong L.M., Lam Y.Y., Tiu S.C., Lee K.F., Lee C.Y., Loung P.Y., Berry I.R., Brown R., Charlton R., Cheng C.W., Ho Y.C., Tse W.Y., Shek C.C. Molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Hong Kong Chinese patients // *Steroids.* - 2011. - Vol. 76. - № 10-11. - P.1057 - 1062
36. Claahsen-van der Grinten H.L., Noordam K., Borm G.F., Otten B.J. Absence of increased height velocity in the first year of life in untreated children with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* - 2006. - Vol. 91. - №4. - P. 205 -1209
37. Cutfield W.S., Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand // *Pediatr J* – 1995. – Vol. 126. – № 1. - P. 118–121
38. Dain L.B., Buzzalino N.D., Oneto A., Belli S., Stivel M., Pasqualini T., Minutolo C., Charreau E.H., Alba L.G. Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients // *Clin Endocrinol (Oxf).* - 2002. - Vol.56. - №2. - P.239 - 245
39. David M., Sempe M., Blanc M., Nicolino M., Forest M.G., Morel Y. Final height in 69 patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Arch Pediatr.* - 1994. - Vol.1. - P.363–367
40. de Peretti E., Forest M.G. Pitfalls in the etiological diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the early neonatal period // *Horm Res.* - 1982. - Vol. 16. - P.10 - 22

41. Decourt J., Jayle M.F., Baulieu E. Clinically late virilism with excretion of pregnanetriol and insufficiency of cortisol production // *Ann Endocrinol (Paris)*. - 1957. - Vol.18. - №3. - P.416 - 422
42. Dewailly D. Nonclassic 21-hydroxylase deficiency // *Semin Reprod Med.* - 2002. - Vol. 20. - № 3. - P.243 - 248
43. Dewailly D., Vantyghem-Haudiquet M.C., Sainsard C., Buvat J., Cappoen J.P., Ardaens K., Racadot A., Lefebvre J., Fossati P. Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1986. - Vol.63. - №2. - P.418 - 423
44. Dolzan V., Prezelj J., Vidan-Jeras B., Breskvar K. Adrenal 21-hydroxylase gene mutations in Slovenian hyperandrogenic women: evaluation of corticotrophin stimulation and HLA polymorphisms in screening for carrier status // *Eur J Endocrinol.* - 1999. - Vol.141. №2. - P.132 - 139
45. Escobar-Morreale H.F., Sanchón R., San Millán J.L. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol. 93. - №2. - P.527 - 533
46. Etter M.L., Eichhorst J., Lehotay D.C. Clinical determination of 17-hydroxyprogesterone in serum by LC-MS/MS: comparison to Coat-A-Count RIA method // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2006. – Vol. 840. - №1. – P.69 - 74
47. Ezquieta B., Oliver A., Gracia R., Gancedo P.G. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population // *Hum Genet.* - 1995. - Vol. 96. - № 2. - P.198 - 204

48. Ezquieta B., Oyarzábal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family // *Horm Res.* – 1999. – Vol. 51. - №3. – P. 135 - 141
49. Fanta M., Hill M., Bel'acek J., Vrbíková J., Cibula D. Comparison of corticoid substitution versus combined oral contraception administration in the treatment of non-classic adrenal hyperplasia: a prospective study // *Gynecol Endocrinol.* - 2009. - Vol. 25. - №6. - P.398 - 402
50. Feldman S., Billaud L., Thalabard J., Raux-Demay M.C., Mowszowicz I., Kuttann F., Mauvais-Jarvis P. Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1992. - Vol. 74. - №3. - P.635-639
51. Ferenczi A., Garami M., Kiss E., Pék M , Sasvári-Székely M , Barta C , Staub M , Sólyom J , Fekete G. Screening for Mutations of 21-Hydroxylase Gene in Hungarian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1999. - Vol.84. - №7. - P. 2369 - 2372
52. Fiet J., Villette J.M., Galons H., Boudou P., Burthier J.M., Hardy N., Soliman H., Julien R., Vexiau P., Gourmelen M. The application of a new highly-sensitive radioimmunoassay for plasma 21-deoxycortisol to the detection of steroid-21-hydroxylase deficiency // *Ann Clin Biochem.* 1994. - Vol. 31. - P.56 - 64
53. Fitness J., Dixit N., Webster D., Torresani T., Pergolizzi R., Speiser P.W., Day D.J. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1999. - Vol.84. - №3. - P.960 - 966
54. Glatt K., Garzon D.L., Popovic J. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *J Spec Pediatr Nurs.* - 2005. – Vol.10. - №3. P.104-114
55. Gönç E.N., Ozön Z.A., Alikasıfoğlu A., Engiz O., Bulum B., Kandemir N. Is basal serum 17-OH progesterone a reliable parameter to predict nonclassical congenital

- adrenal hyperplasia in premature adrenarche? // Turk J Pediatr. - 2011. - Vol. 53. - №3. P:274 - 280
56. Gruñeiro-Papendieck L., Prieto L., Chiesa A., Bengolea S., Bossi G., Bergadá C. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol // Horm Res. - 2001. - Vol.55. - №6. - P.271 - 277
57. Guo T., Taylor R.L., Singh R.J., Soldin S.J. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry // Clin Chim Acta. - 2006. - Vol. 372. - №1-2. - P.76 - 82
58. Harada F., Kimura A., Iwanaga T., Shimozawa K., Yata J., Sasazuki T. Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1987. - Vol.84. - №22. - P.8091 - 8094
59. Helmberg A., Tusie-Luna M.T., Tabarelli M., Kofler R., White P.C. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions // Mol Endocrinol. - 1992. -Vol.6. - №8. - P.1318 - 1322
60. Higashi Y., Hiromasa T., Tanae A., Miki T., Nakura J., Kondo T., Ohura T., Ogawa E., Nakayama K., Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency // J Biochem. – 1991. – Vol.109. - №4. – P. 638 - 644
61. Hingre R.V., Gross S.J., Hingre K.S., Mayes D.M., Richman R.A. Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants // J Clin Endocrinol Metab. - 1994. - Vol.78. - №2. - P.266 - 270
62. Holst J.P., Soldin S.J., Tractenberg R.E., Guo T., Kundra P., Verbalis J.G., Jonklaas J. Use of steroid profiles in determining the cause of adrenal insufficiency // Steroids. - 2007. -Vol.72. - №1. - P.71 - 84
63. Hughes I. Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype // J Pediatr Endocrinol Metab. - 2002. - Vol.15. - №5. - P.1329 - 1340

64. Ibanez L., Bonnin M.R., Zampolli M., Prat N., Alia P.J., Navarro M.A. Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche // *Horm Res.* - 2005. - Vol.44. - P.51 - 56
65. Janjanin N., Dumic M., Skrabic V., Kusec V., Grubic Z., Spehar Uroic A. Five patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (one with associated neuroblastoma) discovered in three generations of one family // *Horm Res.* – 2007. – Vol. 67. - №3. - P. 111-116
66. Janzen N., Peter M., Sander S., Steuerwald U., Terhardt M., Holtkamp U., Sander J. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2007. - Vol.92. - №7. - P.2581-2589
67. Janzen N., Sander S., Terhardt M., Peter M., Sander J. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spots // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008. - Vol.861. - №1. - P.117 - 122
68. Joint LWPES/ESPE CAH Working Group // Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – Vol. 87. - №9. - P.4048 - 4053
69. Kashimada K., ONO M., ONISHI T., Koyama S., Toyoura T., Imai K., Saisho S., Mizutani S. Clinical course of patients with nonclassical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) diagnosed in infancy and childhood // *Endocrine Journal.* - 2008. - № 55 (2). - P. 397-404
70. Kater C.E., Biglieri E.G., Wajchenberg B. Effects of continued adrenocorticotropin stimulation on the mineralocorticoid hormones in classical and nonclassical simple virilizing types of 21- hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1985. - Vol.60. - P.1057–1062

71. Keegan C.E., Killeen A.A. An overview of molecular diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency // *J Mol Diagn.* - 2001. – Vol. 3. - №2. – P.49 - 54
72. Kohn B., Levine L.S., Pollack M.S., Pang S., Lorenzen F., Levy D., Lerner A.J., Rondanini G.F., Dupont B., New M.I. Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1982. - Vol.55. - №5. P.817 - 827
73. Lee H.H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia // *Clin Genet.* – 2001. – Vol. 59. - №5. P.293 - 330
74. Lee H.H., Kuo J.M., Chao H.T., Lee Y.J., Chang J.G., Tsai C.H., Chung B.C. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2000. - Vol. 85. - №2. - P.597 - 600
75. Legro R.S., Shahbahrani B., Lobo R.A., Kovacs B.W. Size polymorphisms of the androgen receptor among female hispanics and correlation with androgenic characteristics // *Obstet Gynecol.* - 1994. - Vol.83. - P.701 - 706
76. Makela S.K., Ellis G. Nonspecificity of a direct 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates // *Clin Chem.* - 1988. - Vol.34. - №10. - P.2070 - 2075
77. Marcondes J.A. Hirsutism: differential diagnosis // *Arq Bras Endocrinol Metabol.* - 2006. - Vol.50. - №6. - P.1108 - 1116
78. Marumudi E., Sharma A., Kulshreshtha B., Khadgawat R., Khurana M.L., Ammini A.C. Molecular genetic analysis of CYP21A2 gene in patients with congenital adrenal hyperplasia // *Indian J Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol.16. - №3. – P.384 - 388. doi: 10.4103/2230-8210.95679.
79. Menassa R., Tardy V., Despert F., Bouvattier-Morel C., Brossier J.P., Cartigny M., Morel Y. p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2008. - Vol.93. - №5. - P.1901-1918

80. Merke D.P., Bornstein S.R. Congenital adrenal hyperplasia // *Lancet*. - 2005. - Vol.365. - № 9477. - P.2125 - 2136
81. Miller W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis // *Endocr Rev*. - 1988. - Vol.9. - №3. - P.295 - 318
82. Minutti C.Z., Lacey J.M., Magera M.J., Hahn S.H., McCann M., Schulze A., Cheillan D., Dorche C., Chace D.H., Lymp J.F., Zimmerman D., Rinaldo P., Matern D. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia // *Clin Endocrinol Metab*. - 2004. - Vol.89. - №8. - P.3687 - 3693
83. Mitchell M.L., Hermos R.J. Cortisol in dried blood screening specimens from newborns with raised 17-hydroxyprogesterone and congenital adrenal hyperplasia // *Clin Endocrinol (Oxf)*. - 1998. - Vol.48. - №6. - P.757 - 760
84. Moran C., Azziz R. 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia: the great pretender // *Semin Reprod Med*. - 2003. - Vol.21. - №3. - P.295-300
85. Moran C., Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Fruzzetti F., Ibañez L., Knochenhauer E.S., Marcondes J.A., Mendonca B.B., Pignatelli D., Pugeat M., Rohmer V., Speiser P.W., Witchel S.F. 21-hydroxylase deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 2000. - Vol.183. - №6. - P.1468 - 1474
86. Moran C., Azziz R., Weintrob N., Witchel S.F., Rohmer V., Dewailly D., Marcondes J.A., Pugeat M., Speiser P.W., Pignatelli D., Mendonca B.B., Bachega T.A., Escobar-Morreale H.F., Carmina E., Fruzzetti F., Kelestimur F. Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia // *J Clin Endocrinol Metab*. - 2006. - Vol.91. - №9. - P.3451-3456
87. Morel Y., Miller W.L. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Adv Hum Genet*. - 1991. - Vol.20. - P.1 - 68
88. Mornet E., Créte P., Kuttann F., Raux-Demay M.C., Boué J., White P.C., Boué A. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three

- clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency // *Am J Hum Genet.* - 1991. - Vol.48. - №1. - P.79 - 88
89. Nebesio T.D., Eugster E.A. Growth and reproductive outcomes in CAN // *International Journal of Pediatric Endocrinology.* - 2010:298937. doi: 10.1155/2010/298937
90. New M.I. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency: nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2006. - Vol.91. - №11. - P.205 - 214
91. New M.I., Gertner J.M., Speiser P.W., del Balzo P. Growth and final height in classical and nonclassical 21- hydroxylase deficiency // *Acta Paediatr Jpn.* 1988. - Vol.30. - P.79 - 88
92. New M.I., Lorenzen F., Lerner A.J., Kohn B., Oberfield S.E., Pollack M.S., Dupont B., Stoner E., Levy D.J., Pang S., Levine L.S. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1983. - Vol.57. - №2. - P.320 - 326
93. New M.I., Wilson R.C. Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralcorticoid excess // *Proc Natl Acad Sci USA.* -1999. - Vol.96. - P.12790 - 12797
94. Nikoshkov A., Lajic S., Holst M., Wedell A., Luthman H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1997. - Vol.82. - №1. - P.194 - 199
95. Nordenström A., Wedell A., Hagenfeldt L., Marcus C., Larsson A. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: 17-hydroxyprogesterone levels and CYP21 genotypes in preterm infants // *Pediatrics.* - 2001. - Vol.108. - №4. - P.68
96. Ordoñez-Sánchez M.L., Ramírez-Jiménez S., López-Gutierrez A.U., Riba L., Gamboa-Cardiel S., Cerrillo-Hinojosa M., Altamirano-Bustamante N., Calzada-León R., Robles-Valdés C., Mendoza-Morfin F., Tusié-Luna M.T. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican

- population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations // *Hum Genet.* - 1998. - Vol.102. - №2. - P.170 - 177
97. Owerbach D., Crawford Y.M., Draznin M.B. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification // *Mol Endocrinol.* - 1990. - Vol.4. - №1. - P.125-131
98. Owerbach D., Sherman L., Ballard A.L., Azziz R. Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency // *Mol Endocrinol.* - 1992. - Vol.6. - P.1211 - 1215
99. Pang S, Clark A. Newborn screening, prenatal diagnosis and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Trends Endocrinol Metab.* – 1990. – Vol.1. - № 6. – P.300 - 307
100. Pang S., Hotchkiss J., Drash A.L., Levine L.S., New M.I. Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1977. - Vol.45. - №5. - P.1003 - 1008
101. Pang S., Murphey W., Levine L.S., Spence D.A., Leon A., LaFranchi S., Surve A.S., New M.I. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1982. - Vol.55. - P.413 - 420
102. Pang S., Shook M.K. Current status of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // *Curr Opin Pediatr.* – 1997. - Vol.9. - №4. – P. 419 - 423
103. Pang S.Y., Wallace M.A., Hofman L., Thuline H.C., Dorche C., Lyon I.C., Dobbins R.H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Pediatrics.* - 1988. - Vol.81. - №6. - P. 866 - 874
104. Parajes S., Quinteiro C., Domínguez F., Loidi L. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency // *PLoS ONE.* - 2008. - Vol. 3. - Issue 5
105. Pinkas H., Fuchs S., Klipper-Aurbach Y., Zvulunov A., Raanani H., Mimouni G., Fisch B., Weintrob N. Non-classical 21-hydroxylase deficiency: prevalence in males

- with unexplained abnormal sperm analysis // *Fertil Steril.* - 2010. - Vol.93. - №6. P. 1887 - 1891. doi: 10.1016
106. Quest, Quest Diagnostics. 2000-2014 Quest Diagnostics Incorporated. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.questdiagnostics.com/home.html>
107. Rabbani B., Mahdiah N., Ashtiani M.T., Larijani B., Akbari M.T., New M., Parsa A., Schouten J.P., Rabbani A. Mutation Analysis of CYP21A2 Gene in Iranian Population // *Genet Test Mol Biomarkers.* - 2012. - Vol.16. - №2. - P.82 - 90
108. Rauh M. Steroid measurement with LC-MS/MS in pediatric endocrinology // *Mol Cell Endocrinol.* - 2009. - Vol.301. - №1-2. - P.272 - 281
109. Rauh M., Gröschl M., Rascher W., Dörr H.G. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction // *Steroids.* - 2006. - Vol.71. - №6. - P. 450 - 458
110. S´anchez L.A., Moran C., Reyna R., Ochoa T., Boots L.R., Azziz R. Adrenal progesterone and androgen production in 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is partially independent of adrenocorticotrophic hormone stimulation // *Fertility and Sterility.* - 2002. - Vol.77. - №4. - P.750-753
111. Saedi S., Dean H., Dent W., Stockl E., Cronin C. Screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia Screening Test overestimates serum 17-hydroxyprogesterone in preterm infants // *Pediatrics.* - 1996. - Vol.97. - №1. - P.100 - 102
112. Sarafoglou K., Banks K., Gaviglio A., Hietala A., McCann M., Thomas W. Comparison of one-tier and two-tier newborn screening metrics for congenital adrenal hyperplasia // *Pediatrics.* - 2012. - Vol.130. - №5. - P.1261-1268. doi: 10.1542/peds.2012 - 1219
113. Schwarz E., Liu A., Randall H., Haslip C., Keune F., Murray M., Longo N., Pasquali M. Use of steroid profiling by UPLC-MS/MS as a second tier test in

- newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the Utah experience. // *Pediatr Res.* - 2009. - Vol.66. - №2. -P.230 - 235
114. Sherman S.L., Aston C.E., Morton N.E., Speiser P.W., New M.I. A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency // *Am J Hum Genet.* - 1988. - Vol. 42. - P.830 - 838
115. Shinagawa T., Horikawa R., Isojima T., Naiki Y., Tanaka T., Katsumata N. Nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency due to a homozygous V281L mutation in CYP21A2 detected by the neonatal mass-screening program in Japan // *Endocr J.* - 2007. - Vol.54. - №6. - P.1021 - 1025
116. Sofaer JA. Dental morphologic variation and the Hardy-Weinberg law // *J Dent Res.* - 1970. - Vol.9. - №6. - P.1505-1508
117. Speiser P.W., Azziz R., Baskin L.S., Ghizzoni L., Hensle T.W., Merke D.P., Meyer-Bahlburg H.F., Miller W.L., Montori V.M., Oberfield S.E., Ritzen M., White P.C.; Endocrine Society Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2010. - Vol.95. - №: 9. - P.4133 - 4160
118. Speiser P.W., Dupont B., Rubinstein P., Piazza A., Kastelan A., New M.I. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency // *Am J Hum Genet.* - 1985. - Vol.37. - №4. - P.650 - 667
119. Speiser P.W., Dupont J., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusie-Luna M.T., Lesser M., New M.I., White P.C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. // *J Clin Invest.* -1992. - Vol.90. -P.584 - 595
120. Speiser P.W., New M.I., White P.C. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1 // *N Engl J Med.* - 1988. - Vol.319. - №1. - P.19-23

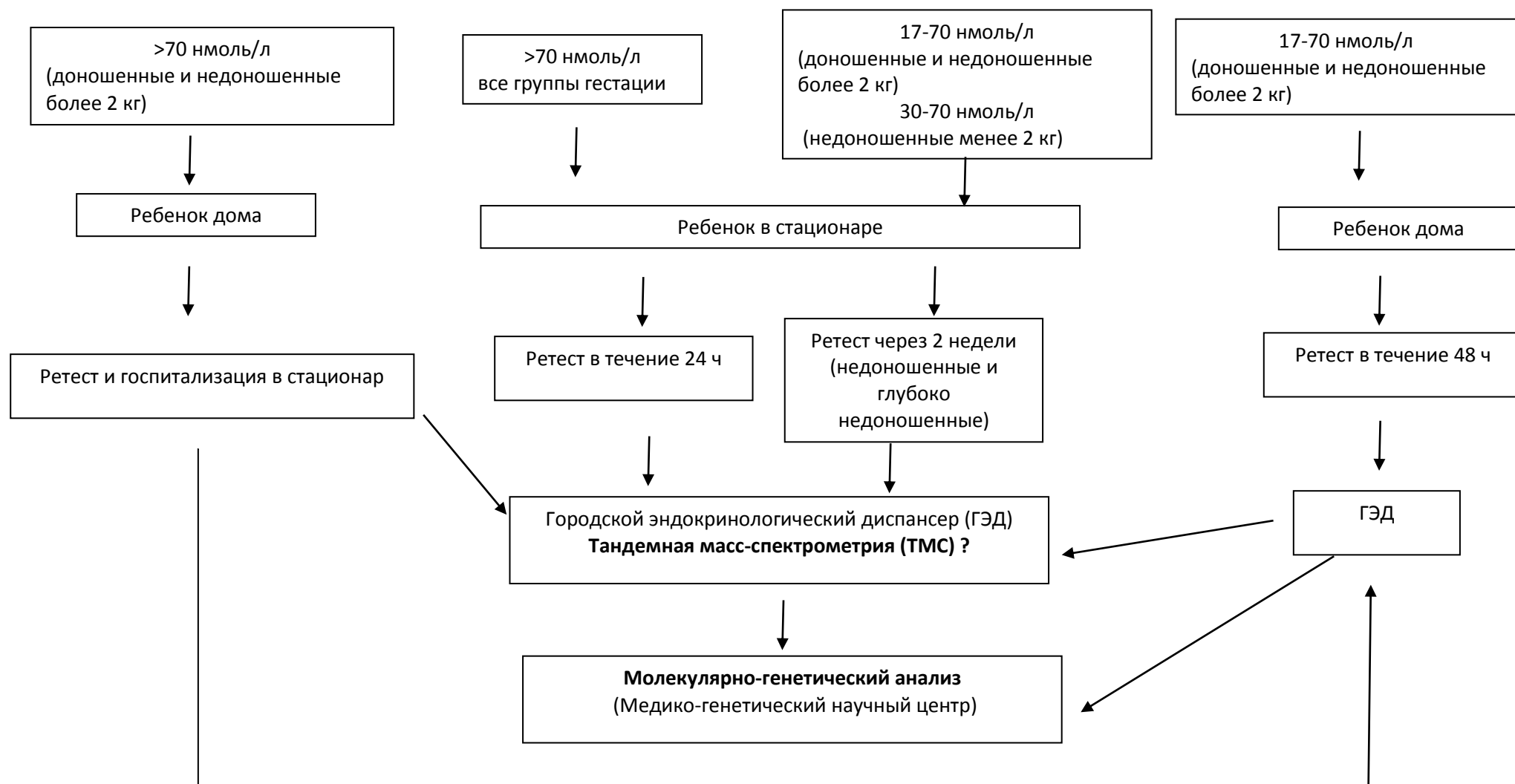
121. Speiser P.W., White P.C. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 1998. - Vol. 49. - №4. – P. 411 - 417
122. Speiser P.W. White P.C. Congenital adrenal hyperplasia // *N Engl J Med*. - 2003. - Vol.349. - P.776 - 788
123. Taieb J., Benattar C., Birr A. S., Lindenbaum A. Limitations of steroid determination by direct immunoassay // *Clin. Chem*. - 2002. - Vol.48. - P.583 - 585
124. Tajima T., Fujieda K., Nakae J., Toyoura T., Shimozawa K., Kusuda S., Goji K., Nagashima T., Cutler G.B. Jr. Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. - 1997. - Vol. 82. - №7. - P. 350 - 356
125. Tajima T., Fujieda K., Nakae J., Mikami A., Cutler G.B. Jr. Mutations of the CYP21 gene in nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency in Japan // *Endocr J*. - 1998. - Vol.45. - №4. - P.493 - 497
126. Tajima T., Fujikura K., Fukushi M., Hotsubo T., Mitsuhashi Y. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan // *Pediatr Endocrinol Rev*. - 2012. - Vol.10. - Suppl 1. - P.72 - 78
127. Tajima T., Mikami A., Fukushi M., Nakae J., Kikuchi Y., Fujieda K. Conventional molecular diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency using mismatched primers and polymerase chain reaction // *Endocr Res*. – 1997. - Vol.23. - №3. – P. 231 - 244
128. Tardy V., Menassa R., Sulmont V., Lienhardt-Roussie A., Lecointre C., Brauner R., David M., Morel Y. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier // *J Clin Endocrinol Metab*. - 2010. - Vol.95. - №3. - P.1288 - 1300
129. Terai I., Yamano K., Ichihara N., Arai J., Kobayashi K. Influence of spironolactone on neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. - 1999. - Vol.81. - №3. - P.179 - 183

130. The Human Gene Mutation Database (HGMD®) [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
131. Therrell B.L., Berenbaum S.A., Manter-Kapanke V., Simmank J., Korman K., Prentice L., Gonzalez J., Gunn S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia // *Pediatrics*. - 1998. - Vol. 101(4 Pt 1). - P.583 - 590
132. Thilen A., Woods K.A., Perry L.A., Savage M.O., Wedell A., Ritzén E.M. Early growth is not increased in untreated moderately severe 21-hydroxylase deficiency // *Acta Paediatr*. - 1995. - Vol. 84. - P.894 - 898
133. Tsai L.P., Cheng C.F., Chuang S.H., Lee H.H. Analysis of the CYP21A1P pseudogene: indication of mutational diversity and CYP21A2-like and duplicated CYP21A2 genes // *Anal Biochem*. - 2011. - Vol. 413. - №2. - P.133-141. doi: 10.1016/j.ab.2011.02.016.
134. Tusie-Luna M.T., Speiser P.W., Dunic M., New M.I., White P.C. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele // *Mol Endocrinol*. - 1991. - Vol.5. - P.685 - 692
135. Tusie-Luna M.T., Traktman P., White P.C. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus // *J Biol Chem*. - 1990. - Vol.265. - №34. - P.20916 - 20922
136. Unluhizarci K., Kula M., Dundar M., Tanriverdi F., Israel S., Colak R., Dokmetas H.S., Atmaca H., Bahceci M., Balci M.K., Comlekci A., Bilen H., Akarsu E., Erem C., Kelestimur F. The prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia among Turkish women with hyperandrogenism // *Gynecol Endocrinol*. - 2009. - Vol.27. - P.1- 5
137. van der Kamp H.J., Oudshoorn C.G., Elvers B.H. et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight // *J Clin Endocrinol Metab*. - 2005. - Vol.90. - №7. - P.3904 - 3907

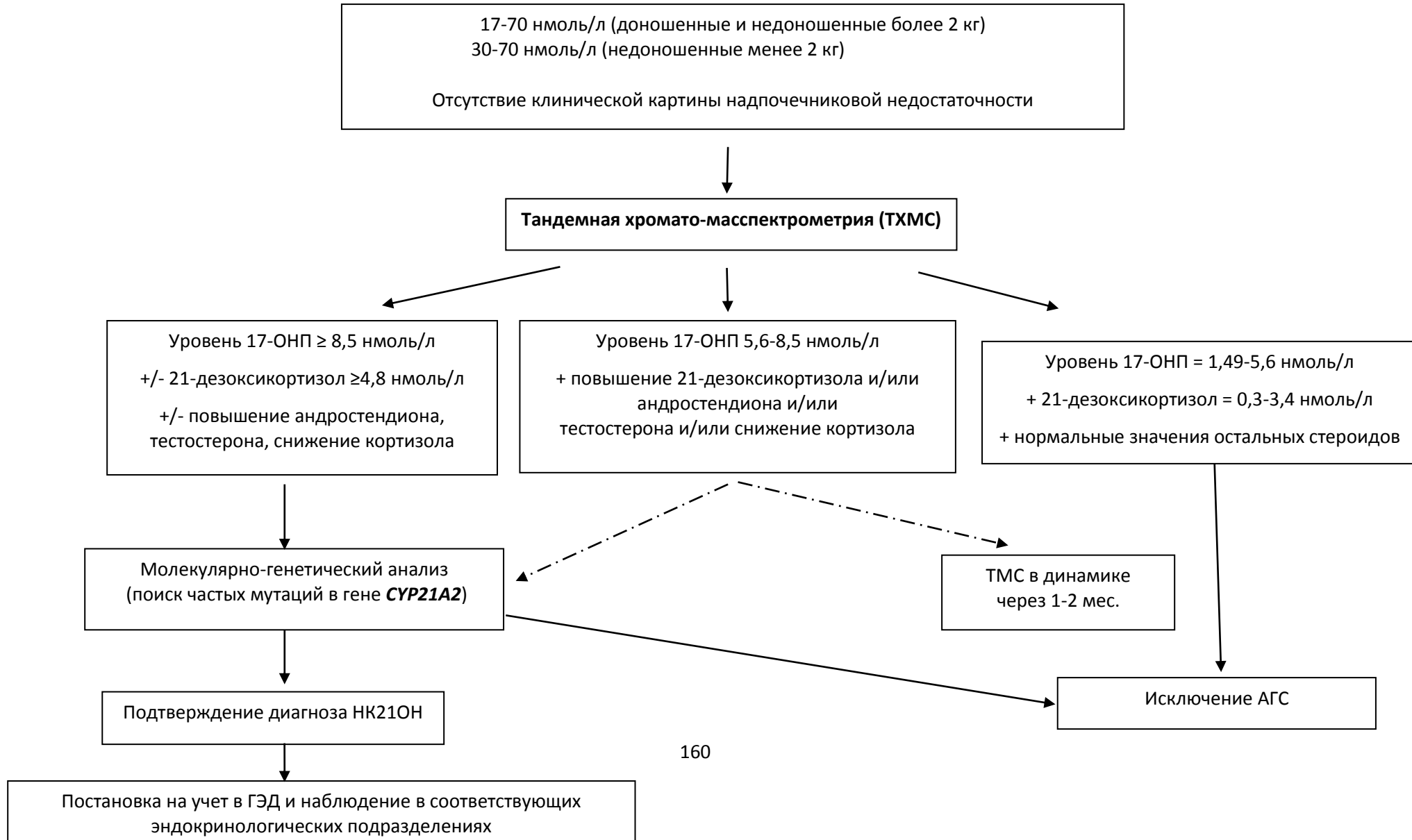
138. Varness T., Allen D., Hoffman G. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia has reduced sensitivity in girls. // *J. Pediatr.* – 2005 – Vol. 147. – P. 493 - 498
139. Vieira A., Paiva S., Baptista C., Ruas L., Silva J., Gonçalves J., Carrilho F., Carneiro M. Late onset congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: revision of literature and preconception genetic study of five couples // *Acta Med Port.* - 2011. - Vol.24. - №1. - P.99 - 110
140. Vogeser M., Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - goals for further developments // *Clin. Biochem.* - 2008. - Vol.41. - P. 649 - 662
141. Votava F., Török D., Kovács J., Möslinger D., Baumgartner-Parzer S.M., Sólyom J., Pribilincová Z., Battelino T., Lebl J., Frisch H., Waldhauser F.; Middle European Society for Paediatric Endocrinology - Congenital Adrenal Hyperplasia (MESPE-CAH) Study Group.. Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia // *Eur J Endocrinol.* - 2005. - Vol.152. №6. - P.869 - 874
142. Waters T.P., Silva N., Denney J.M., Sciscione A.C., Paul D.A. Neonatal hearing assessment in very low birth weight infants exposed to antenatal steroids // *J Perinatol.* - 2008. - Vol.28. - №1. - P.67 - 70
143. Wedell A., Luthman H. Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene // *Hum Genet.* - 1993. -Vol.91. - №5. - P.236 - 240
144. Weintrob N., Brautbar C., Pertzalan A., Josefsberg Z., Dickerman Z., Kauschansky A., Lilos P., Peled D., Phillip M., Israel S. Genotype - phenotype associations in non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency // *Eur. J. Endocrinol.* - 2000. - Vol, 143. - №3. - P.397-403
145. Weintrob N., Dickerman Z., Sprecher E., Galatzer A., Pertzalan A. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in infancy and childhood: the effect of time of initiation of therapy on puberty and final height // *Eur J Endocrinol.* - 1997. - Vol.136. - №2. - P.188 - 95

146. White P.C., Grossberger D., Onufer B.J., Chaplin D.D., New M.I., Dupont B., Strominger J.L. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1985. - Vol.82. - №4. - P.1089 - 1093
147. White P.C., New M.I., Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1986. - Vol.83. - №14. - P.5111-5115
148. White P.C., New M.I., Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia // N Engl J Med. - 1987. - Vol.316. - №24. - P.1519-1524
149. White P.C., Speiser P.W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Endocr Rev. - 2000. - Vol.21. - №3. - P.245-291
150. Wilson R.C., Mercado A.B., Cheng K.C., New M.I. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype // J Clin Endocrinol Metab. - 1995. - Vol.80. - №8. - P.2322-2329
151. Witchel S.F., Azziz R. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia // Int J Pediatr Endocrinol. - 2010: 625105. doi: 10.1155/2010/625105.
152. Witchel S.F., Lee P.A. Identification of heterozygotic carriers of 21-hydroxylase deficiency: sensitivity of ACTH stimulation tests // Am J Med Genet. - 1998. - Vol.76. - P.337 - 342
153. Witchel S.F., Lee P.A., Suda-Hartman M., Trucco M, Hoffman E.P. Evidence for a heterozygote advantage in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // J Clin Endocrinol Metab. - 1997. - Vol.82. - №7. - P.2097 - 2101
154. Wudy S.A., Hartmann M., Svoboda M. Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Horm Res. - 2000. - Vol.53. - №2. - P.68-71
155. Xu R.N., Fan L., Rieser M.J., El-Shourbagy T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS // J Pharm Biomed Anal. - 2007. - Vol.44. - №2. - P.342-355

Алгоритм неонатального скрининга на АГС в г.Москве (cut-off для 17-ОНП – 17 нмоль/л)



Приложение. Рисунок 22 Алгоритм обследования пациентов с сомнительными результатами неонатального скрининга на АГС (cut-off для 17-ОНП - 17 нмоль/л)



Диагноз неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы подтвержден на 1 году жизни

