

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)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Москва, 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Эндокринологический научный центр» Министерства Здравоохранения Российской  
Федерации (Директор – академик РАН Дедов И.И.)

**Научный руководитель:** **Тюльпаков Анатолий Николаевич**

доктор медицинских наук

**Официальные оппоненты:** **Малиевский Олег Артурович**

Доктор медицинских наук, профессор кафедры  
госпитальной педиатрии ГБОУ ВПО «Башкирский  
государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

**Храмова Елена Борисовна**

Доктор медицинских наук, доцент,  
заведующая кафедрой детских болезней  
педиатрического факультета ГБОУ ВПО  
«Тюменская государственная медицинская  
академия» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального  
образования «Российский национальный  
исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 18 марта 2015 г. в 14:00 часов на заседании  
Диссертационного совета Д 208.126.01 в ФГБУ «Эндокринологический научный  
центр» Минздрава России по адресу: 117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Эндокринологический  
научный центр» Минздрава России

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

**Ученый секретарь Диссертационного Совета**

доктор медицинских наук

**Суркова Елена Викторовна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ**

### **Актуальность темы исследования**

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. Различают классические и неклассические варианты заболевания. Наиболее распространенной и хорошо изученной является дефицит 21-гидроксилазы (p450c21) [White P.C 2000, New M.I. 2003, Speiser P.W. 2003]. Средняя распространенность классических форм заболевания в мире составляет в среднем 1 на 10000 - 15000 новорожденных [Therrell B.L. 1998, Glatt K. 2005, Merke D.P. 2005], в российской популяции по данным неонатального скрининга эта величина соответствует в среднем 1:8000 новорожденных.

В последнее время значительно возрос интерес к 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, и составляет по данным мировой литературы от 1:27 до 1:10000 новорожденных [Speiser P.W. 1985, Fitness J. 1999, Baumgartner-Parzer S.M. 2005, Parajes S. 2008]. В российской популяции эти данные до настоящего времени отсутствуют. 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 [Speiser P.W. 1985, Fitness J. 1999, Baumgartner-Parzer S.M. 2005, Parajes S. 2008].

Внедрение исследования на ВДКН в программу неонатального скрининга не только способствовало повышению выявляемости, сокращению сроков диагностики и, таким образом, снижению смертности пациентов раннего возраста с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы, но и позволило диагностировать НК21ОН уже в

период новорожденности. В зарубежной литературе имеются отдельные наблюдения таких пациентов [Kashimada K. 2008, Shinagawa T. 2007, Tajima T. 1997, 1998]. 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 детей 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 [Saedi S. 1996, Brosnan P.G. 1999, Nordenström A. 2001]. 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 маркера дефицита 21-гидроксилазы - 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) - выделяют не только физиологические особенности обменных процессов в организме новорожденного, материнские факторы [Шайтарова А.В. 2011, Nordenström A. 2001, Bolt R. 2002], но и технические особенности используемых методов иммуноанализа [Taieb J. 2002, Votava F. 2005]. 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 [Chase D.H. 2003, Holst J.P. 2007, Janzen N. 2007 Rauh M. 2009, Schwarz E. 2009]. Однако, до настоящего времени роль метода в алгоритме диагностики НК21ОН у детей изучена не полностью. В доступной отечественной литературе результаты применения метода ТХМС для верификации НК21ОН у детей первого года жизни отсутствуют.

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, послужили предпосылкой для проведения настоящего научного исследования.

## **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.

### **Теоретическая и 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.

Продемонстрирована 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**

Диссертация выполнена в соответствии с планом научных исследований ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России и 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.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### *1. Изучение распространенности заболевания*

Для оценки частоты встречаемости НК21ОН проанализирована распространенность 2 наиболее частых мутаций (V281L и P30L), 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. Калининкова), полученные при проведении неонатального скрининга на аденогенитальный синдром (АГС) у новорожденных детей, родившихся в течение одного календарного года на территории Московской области. Для каждого из 938 образцов проводился молекулярно-генетический анализ с использованием аллель-специфической полимеразно-цепной реакции (ПЦР); наличие мутации в каждом случае проверялось полным секвенированием гена *CYP21*. После получения результатов молекулярно-генетического анализа в исследуемых образцах изучался уровень 17-ОНП, полученный в ходе тестирования новорожденного на АГС. По результатам генетического исследования вычислялась частота носительства двух искомых мутаций среди 938 образцов. Далее, с использованием формулы Харди-Вайнберга вычислялась истинная частота заболевания. Для оценки возможности применения данных о распространенности НК21ОН, полученной на территории Московской области, на популяцию России в целом с помощью компьютерного картографического метода проанализированы фамилии матерей новорожденных.

### *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, проф. В.А. Петеркова) и отделении наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России



(зав.отд.- д.м.н. А.Н. Тюльпаков) 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 молекулярно-генетического статуса. В группе из 50 пациентов 9 детей имели один из классических вариантов АГС (КФ21ОН), у 41 пациента диагноз АГС не подтвердился - «здоровые». В группе из 63 человек 31 были «здоровыми», 12 детей имели КФ21ОН, оставшиеся 20 – пациенты с неклассической формой дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН). 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. Для разработки алгоритмов обследования и наблюдения детей с НК21ОН мы дополнительно включили в исследование группу из 24 детей старшего возраста, у которых заболевание было диагностировано на основании жалоб и клинико-анамнестических данных. В подгруппу вошли 18 девочек и 6 мальчиков в возрасте 3 - 16 лет.

Всем пациентам при первичном и повторных обращениях проводились: **общеклиническое обследование и гормональные исследования.**

«Традиционные» гормональные исследования проводились в лаборатории гормонального анализа ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (рук. – профессор, д.м.н. Н.П. Гончаров) и включали в себя исследование уровня 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) и активности ренина плазмы (АРП) с применением радиоиммунологического анализа (РИА) с помощью наборов IMMUNOTECH (Франция); уровня кортизола сыворотки крови - с использованием автоматического анализатора VITROS Eci (Johnson & Johnson, Ortho-Clinical Diagnostics); уровня АКГГ - с помощью автоматического анализатора Cobas e 411 (Германия). Для одномоментного исследования стероидов сыворотки крови (17-ОНП, 11-дезоксикортизол, 21-дезоксикортизол, андростендион, кортизол, прогестерон, тестостерон, кортикостерон) применялся метод тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС). Для проведения анализа использовали систему, состоящую из хроматографа «FX-15 UHPLC System» (PerkinElmer), масс-спектрометра ABSciex QTRAP 5500 и персонального компьютера.

При динамическом наблюдении пациентов с НК21ОН по достижении возраста одного года и старше обследование дополнялось оценкой костного возраста с помощью рентгенографии кистей с захватом лучезапястного сустава по методике Таннера-Вайтхауса с использованием атласа TW20 и программы Auxology (Munich Auxology Project, Kromeyer-Hauschild et al., 2001).

Всем 137 пациентам раннего возраста проведен молекулярно-генетический анализ. Детекция 10 точковых мутаций в гене *CYP21A2* методом аллель-специфической (ПЦР) осуществлялась в лаборатории генетики и клинической иммунологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (рук.- к.м.н. С.А. Прокофьев) по методике A.Wedell и H.Luthman с модификациями [Wedell A. 1993].

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).

*Статистический анализ данных* выполнялся методами математической статистики и осуществлялся на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2003, 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). 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).

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

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Распространенность неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) в российской популяции**

Истинная распространенность НК21ОН в российской популяции определена с помощью закона популяционной генетики (закон Харди - Вайнберга) на основании

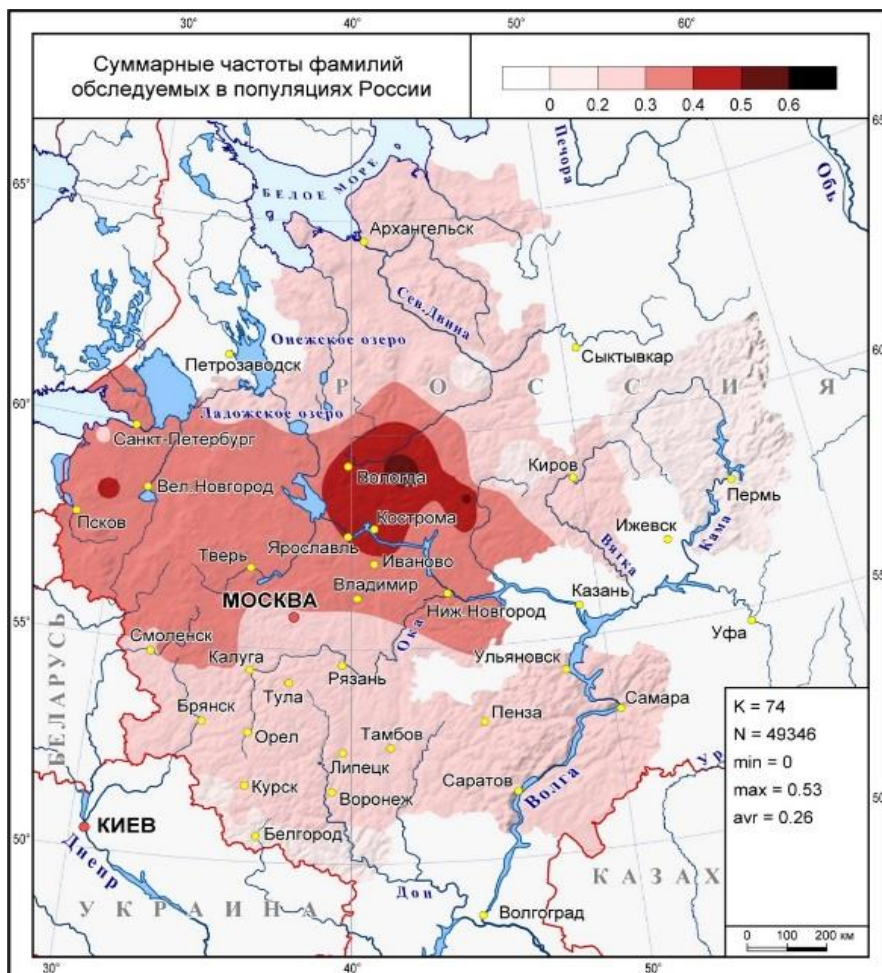
выявления частоты гетерозигот (носителей) среди выборки из 938 новорожденных Московской области. В результате аллель-специфической ПЦР среди 938 исследуемых образцов пятен крови новорожденных в 41 была обнаружена мутация V281L (в гетерозиготном положении). Наличие мутации было проверено секвенированием соответствующего участка гена в каждом из образцов: в двух образцах наличие мутации не подтвердилось, то есть число носителей оказалось равным 39. В ходе аллель-специфической ПЦР ни в одном из 938 исследуемых образцов мутации P30L выявлено не было. Таким образом, частота гетерозигот оказалась равной 1:24. Доля гомозигот (или частота заболевания) в популяции Московской области для мутации V281L, рассчитанная по закону Харди-Вайнберга, оказалась равной 1:2206. Учитывая возможность ассоциации НК21ОН с компаунд-гетерозиготностью по мутации V281L, а также другими более редкими мутациями, показано, что 1:2206 является минимальной частотой распространенности данного заболевания в исследованной популяции.

При анализе уровня 17-ОНП в исследуемых пятнах крови в группе носителей ( $n = 39$ ) и сопоставимой по количеству группе случайно отобранных образцов, где мутаций выявлено не было ( $n = 39$ ), значимых различий не получено ( $t=1$ ,  $p > 0,05$ ).

Картографический метод изучения фамилий матерей новорожденных, чьи образцы пятен крови были взяты для изучения показателя распространенности, позволил «перенести» данные о частоте НК21ОН, полученные в небольшой выборке Московской области, на популяцию России в целом. В рамках применяемой нами методики изучены 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. Согласно вышесказанному, из 938 фамилий были отобраны и проанализированы 707 «частых» фамилий (рис. 1).

На рис. 1 продемонстрировано, что изученные нами 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. Таким образом, полученные нами демографические данные позволили нам утверждать, что 1:2206 - это частота НК21ОН в популяции России.

Для сравнения нами также был рассчитан показатель распространенности НК21ОН по данным неонатального скрининга на ВДКН. Так, в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России 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.



**Рисунок 1. Суммарные частоты фамилий обследуемых в популяциях России**

Учитывая количество детей, родившихся на территории Московской области за период 2007 - 2011 гг. - 279607 по данным федеральной службы государственной статистики - частота заболевания оказалась равной 1:27960, что более чем в 10 раз ниже истинной частоты НК21ОН, рассчитанной нами по закону Харди-Вайнберга.

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

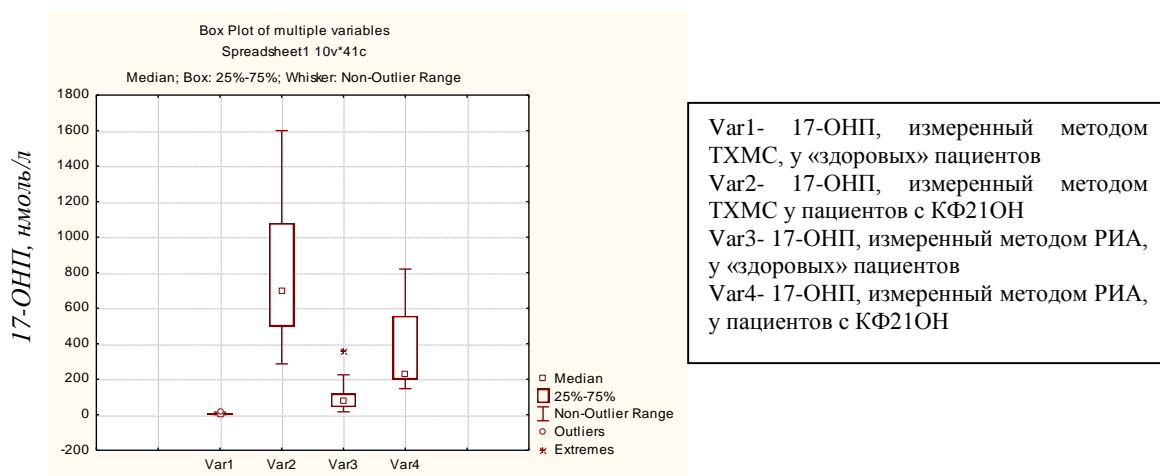
Изучение информативности метода тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС) в диагностике 17-ОНП по сравнению с радиоиммунным анализом (РИА)

проводили на основании ретроспективного изучения результатов обследования 50 детей раннего возраста, у которых в ходе скрининга на ВДКН (при первичном тестировании и/или ретестировании) были выявлены повышенные значения 17-ОНП.

В зависимости от клинических проявлений заболевания дети были 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) (подгруппа КФ21ОН). В остальных случаях (41 пациент - 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).

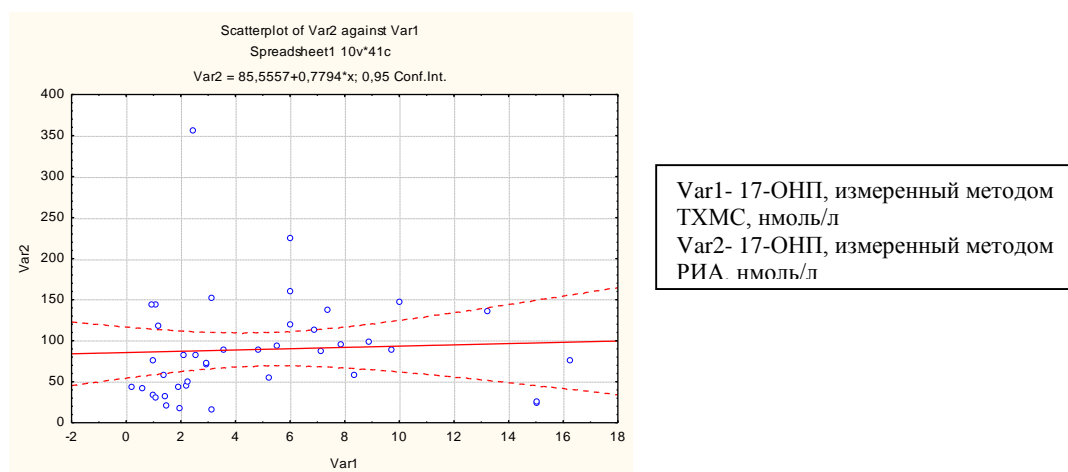
У 41 «здорового» новорожденного медиана 17-ОНП, измеренного методом РИА, составила 82 [44;119] нмоль/л, что более чем в 10 раз превышает референсные значения используемых наборов; медиана 17-ОНП по данным ТХМС составила 3,1 [1,5;7,1] нмоль/л, что значительно ниже значений показателя, измеренного методом РИА.

У 9 пациентов с КФ21ОН 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. При сравнении показателей обеих подгрупп оказалось, 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) (рис.2).



**Рисунок 2. Уровни 17-ОНП, измеренного методами РИА и ТХМС, в подгруппе пациентов с КФ21ОН и у «здоровых».**

Сопоставление показателей 17-ОНП, полученных методами РИА и ТХМС у детей с ложноположительным повышением 17-ОНП (подгруппа "здоровых") свидетельствовало о слабой корреляции между результатами двух методик ( $r_s = 0,291$ ,  $p = 0,053$ ). Применение методики Бленда - Альтмана продемонстрировало наличие систематического расхождения измерений, полученных двумя разными методами и слабую согласованность измерений 17-ОНП, полученных методом РИА и ТХМС (рис.3).



**Рисунок 3. Диаграмма рассеяния для оценки закономерности между уровнями 17-ОНП, измеренного двумя методами (РИА и ТХМС) у «здоровых» пациентов.**

Эти данные ставят под сомнение достаточную информативность метода РИА для измерения 17-ОНП у детей раннего возраста.

Анализ информативности обоих методов для измерения 17-ОНП сыворотки крови показал, что 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 первого года жизни (табл.1).

**Таблица 1. 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%

Эти данные позволяют нам рекомендовать метод ТХМС как приоритетный для исследования уровня 17-ОНП в случае сомнительных результатов неонатального скрининга на ВДКН.

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. Рассчитанный показатель Манна - Уитни показал, что уровень 21-Д и коэффициента  $(17\text{-гидроксипрогестерон} + \text{андростендион}) / \text{кортизол}$  ( $(17\text{-ОНП} + \text{А}) / \text{F}$ ) достоверно отличаются у пациентов с НК21ОН и «здоровых» ( $U = 45$ ,  $U_{0,05} = 109$  и  $U = 24$ ,  $U_{0,05} = 109$  соответственно).

Полученные данные были впоследствии учтены для формирования референсных интервалов для 17-ОНП и 21-Д.

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

В нашем исследовании среди детей раннего возраста ( $n = 113$ ) у 20 (17,7%) был подтвержден диагноз НК21ОН. Учитывая отсутствие специфичных лабораторных маркеров заболевания у детей до года, единственным критерием диагностики являлся результат молекулярно-генетического исследования, то есть наличие характерных для НК21ОН мутаций. Нами проведен подробный анализ клинических, лабораторных и генетических данных в группе пациентов с НК21ОН, а также сравнительная оценка показателей с группой «здоровых» детей.

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 ( $p < 0,05$ ). Ни у одного пациента с НК21ОН из 20 нами обследованных клинических симптомов надпочечниковой недостаточности и/или гиперандрогении отмечено не было. По данным лабораторного обследования у 1/3 детей имел место повышенный уровень АКТГ при нормальных значениях кортизола, причем повышение АКТГ обычно сопровождало высокий уровень или нарастание уровня 17-ОНП в динамике. Уровни 17-ОНП и кортизола на стимуляции (тест с аналогами АКТГ) нами не оценивались.

Что касается результатов молекулярно-генетического обследования, в нашей выборке пациентов превалировала мутация V281L - 75% случаев, при этом более чем в половине случаев мутация оказалась в гомозиготном состоянии (62,5%). Важно отметить, что у 19 из 20 описанных нами пациентов с НК21ОН выявлены мутации,

входящие в спектр так называемых «частых»; только у одной пациентки для подтверждения диагноза потребовалось проведение секвенирования гена *CYP21A2*.

По нашим данным 6 пациентам из 20 (30%) было назначено лечение глюкокортикоидами и, в некоторых случаях, минералокортикоидами. При этом, все 6 человек на момент поступления уже получали терапию, поэтому мы имели возможность только ретроспективно проанализировать их клинико-лабораторные данные и сформировать показания, которые являлись причиной назначения препаратов (табл. 2).

**Таблица 2. Клинико-гормональные и молекулярно-генетические данные пациентов с НК21ОН, получающие заместительную гормональную терапию.**

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

Основными причинами назначения терапии оказались повышение уровня 17-ОНП выше 150 нмоль/л или нарастание показателя в динамике, сопровождающееся умеренным повышением уровня АКТГ, и, в ряде случаев, АРП. Дозы назначаемых глюкокортикоидов у наших пациентов колебались от 7 до 25 мг/м2.

Одной из задач нашего исследования было проспективное наблюдение за пациентами с доказанной НК21ОН, особенно подгруппы детей без лечения (14 человек) для оценки клинико-гормональных данных в динамике. Первый декретированный срок обследования мы предложили 12 месяцев при диагностике заболевания в первые месяцы жизни, а при верификации диагноза ближе к 12 месяцам жизни - к 2 годам. Из 14 человек ввиду различных причин нами проанализированы данные 8 пациентов. Клинический осмотр и сбор анамнеза продемонстрировали, что ни у одного нашего пациента к году жизни не было жалоб, клинических проявлений надпочечниковой недостаточности, явлений гиперандрогении и/или преждевременного полового созревания. Повторное обследование показало, что почти у абсолютного



большинства наших пациентов наряду с клиническими данными отсутствовали антропометрические признаки преждевременного полового созревания (табл.3).

**Таблица 3. Антропометрические данные пациентов с НК21ОН, находившихся на динамическом наблюдении (без лечения), в ходе повторного обследования в 1 год жизни.**

Пациент	Рост-1, см	возраст повторного обследования, мес.	Рост -2, см	скорость роста, см/год	SDS роста	прогнозируемый рост по родителям, см
П.1	53	22	88	16	+0,77	178,5
П.2	48	12	75	27	-0,03	166
П.3	54	12	80,5	26	+1,5	166
П.4	48	12	80	32	+1,8	158
П.5	47	12	71	24	-1,5	182
П.6	50	16	79,8	25,5	+0,2	174
П.7	53	24	92,3	19,6	+1,69	179
П.8	51	12	78	27	+0,28	168

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

Имеющиеся клиничко-антропометрические данные сопоставлялись в каждом случае с данными лабораторных исследований (17-ОНП, АКТГ, кортизол, АРП), исследуемых в динамике (табл.4). При необходимости стероидный профиль крови исследовался методом ТХМС.

**Таблица 4. Гормональные и рентгенологические данные пациентов с НК21ОН, находившихся на динамическом наблюдении (без лечения), в ходе повторного обследования.**

Пациент	17-ОНП, ИФА, 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
П.1	40,6/27	491/278	15,1/1	1,4/нет	36 мес. (ПВ=22 мес.)
П.2	134,9/150	357/508	95,4/26,8	1,7/6,4	18 мес. (ПВ=12 мес.)
П.3	153/115	502/317	115/67	13,4/5,4	14 мес. (ПВ=12 мес.)
П.4	109,5/111,4	434/460	61,2/62,8	2,8/1,2	23 мес. (ПВ= 12 мес.)
П.5	142,4/183	323/347	35/161	10,6/?	6 мес. (ПВ= 12 мес.)
П.6	77,8/97,6	114/552	49,7/19,5	2,4/нет	19 мес. (ПВ= 12 мес.)
П.7	65,4/180,5	463/278	34,4/11,8	1,8/прямой ренин 50,8 (норма до 50)	38 мес. (ПВ= 24 мес.)
П.8	46,2/12,8	346/430	34,1	10,4	9 мес. (ПВ= 12 мес.)

Примечание.

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

Результаты наблюдений показали, что у 1 пациента (П.4) изменения антропометрических показателей (высокая скорость роста на первом году жизни, SDS роста +1,8 при предиктивном росте 158 см) сопровождались высоким уровнем 17-ОНП,

не «задавленным» АКТГ и опережением костного возраста более чем на 1 год. У другого ребенка (П.5) 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; 17-ОНП по методу ТХМС соответствовал 230 нмоль/л, 21-дезоксикортизол - 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.

Наблюдение пациентов с НК21ОН, верифицированных с учетом данных неонатального скрининга и находящихся без лечения ( $n = 14$ ) планируется продолжить по индивидуальному плану с учетом полученного нами и имеющего опыта зарубежных коллег.

Для формирования плана наблюдения детей с рано верифицированной НК21ОН мы ретроспективно проанализировали результаты обследования пациентов из 24 человек, которым диагноз был поставлен с учетом имеющихся жалоб.

В группе старших детей наиболее частой причиной обращения к эндокринологу оказалось появление преждевременного адренархе (61%): у девочек первые симптомы манифестировали в возрасте 6,0 [5,2;6,7] лет, у мальчиков несколько позже - 7 [6;7] лет; при этом медиана возраста первичного обследования в целом по группе составила 9,0 [7,5;12,0] лет. Медиана SDS роста по группе на момент первичного обращения за медицинской помощью составила 0,93 [0,13;2,09] SD, 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 ( $r = 0,23$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Эти данные позволяют нам рекомендовать обязательный повторный осмотр пациентов с НК21ОН (без отрицательной динамики клинико-лабораторных показателей к 1 году жизни) начиная с 5-летнего возраста, и обращать внимание родителей, прежде всего, на появление преждевременного адренархе, даже при отсутствии ускорения роста. При этом, даже при отсутствии антропометрических сдвигов и нарастания уровня 17-ОНП относительно предыдущих исследований, обязательным является исследование костного возраста.

В соответствии с ранее проведенными исследованиями тактика ведения пациентов основана на клинико-гормональных данных и результатах рентгенографии кистей. Основной причиной назначения лечения препаратами глюкокортикоидов

являлось наличие клинических симптомов гиперандрогении с ускорением темпов роста и костного созревания в сочетании с высоким/нарастающим уровнем 17-ОНП.

Полученные нами данные позволили предложить алгоритм обследования и ведения пациентов с рано верифицированной НК21ОН (приложение, рис. 7, стр.28).

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

##### **4.1 Критерии диагностики неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы**

Полученные данные о высокой информативности тандемной хромато-масспектрометрии (ТХМС) при определении 17-ОНП у детей раннего возраста послужило поводом для разработки критериев диагностики заболевания с использованием метода. Для этого в качестве материала была взята уже известная нам выборка пациентов проспективного исследования.

В первую очередь, на примере 63 пациентов проспективного исследования (20 - дети с НК21ОН, 12 - пациенты с КФ21ОН и 31 - «здоровые») мы должны были убедиться, что уровни 17-ОНП, 21-дезоксикортизола (21-Д) и коэффициента (17-ОНП+А)/F достоверно отличаются среди подгрупп. При вычислении критерия Манна - Уитни с учетом критического значения показателя мы показали, что уровни 17-ОНП, 21-Д и коэффициента (17-ОНП+А)/F достоверно отличаются во всех трех подгруппах (табл.5).

**Таблица 5. Сравнение показателей 17-ОНП, 21-Д и коэффициента 17-ОНП+А/Ф с учетом критерия Манна-Уитни.**

Показатель	«здоровые» (1)	КФ21ОН (2)	НК21ОН (3)	<i>U, U 0,05</i>
17-ОНП, ТХМС, нмоль/л	2,1 [1,4;4,9]	277,6 [153,6;350,3]	58,1 [36,7;115,3]	U1-2=1 (U0,05=124) U1-3=10 (U0,05=149) U2-3=27 (U0,05=51)
21-Д, нмоль/л	0,11 [0,06;1,30]	71,5 [42,0;166,0]	4,0 [2,2;5,6]	U1-2=6,5 (U0,05=124) U1-3=49,5 (U0,05=137) U2-3=22,5 (U0,05=47)
Коэффициент (17-ОНП+А)/F	0,020 [0,009;0,050]	1,50 [0,87;3,88]	0,3 [0,2;0,6]	U1-2=4 (U0,05=124) U1-3=98 (U0,05=137) U2-3=4 (U0,05=47)

По уровню 17-ОНП повторно вычислялись показатели чувствительности, точности, специфичности и прогностической ценности обоих методов (РИА и ТХМС) с помощью метода разрешающей матрицы (табл.6).

**Таблица 6. 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%

Нами еще раз продемонстрировано, что метод ТХМС оказался: во-первых, более специфичным, то есть дает меньшее число ложноположительных результатов при отсутствии искомого заболевания (94,0% против 21,8%); во-вторых, почти в 2 раза более точным (96% против 53%); в-третьих, прогностически более ценным при определении показателя 17-ОНП у детей раннего возраста. Эти результаты сопоставимы с ранее полученными данными и позволяют рекомендовать ТХМС, как приоритетный для определения уровня 17-ОНП в сомнительных случаях неонатального скрининга на АГС у детей 1 года жизни.

С учетом полученных данных и достоверно отличающихся уровней 17-ОНП и 21-дезоксикортизола в 3 изучаемых подгруппах пациентов, мы вычисляли критерии диагностики НК21ОН с использованием этих показателей.

Для вычисления оптимального значения величины порога отсечения применялся ROC-анализ. Референсные или нормативные значения показателя вычислялись в соответствии с перцентилями: P25% (25 перцентиль) соответствовал нижней границе нормы, P75% (75 перцентиль) - верхней границе нормы. Для анализа уровня 17-ОНП и 21-Д 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 уровни показателей 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.

#### А. 17-гидроксипрогестерон

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), так как площадь под кривой (AUC) составила 0,992 (95% доверительный интервал равен 0,977 - 1,00,  $p < 0,0001$ ) (рис.4). 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, что 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.

Референсные значения 17-ОНП, измеренные методом ТХМС, в 1а группе пациентов соответствовали 1,3 - 6,0 нмоль/л; в группе 1б 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 1,49-5,6 нмоль/л ( $n = 67$ ).

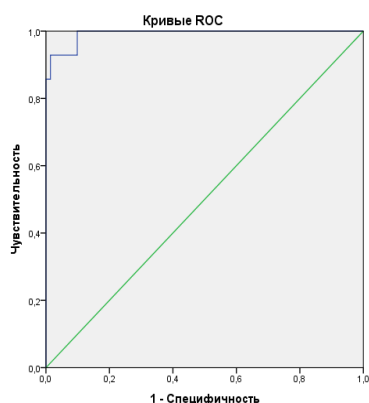


Рисунок 4. ROC-кривая для 17-ОНП.

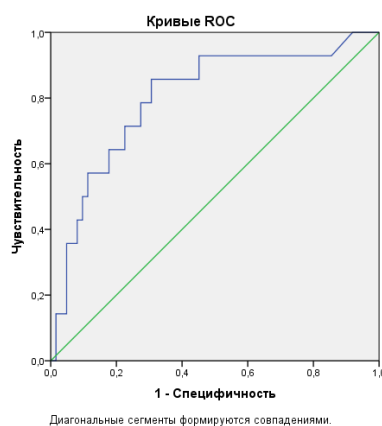


Рисунок 5. ROC-кривая для 21-Д.

## Б. 21-дезоксикортизол

В ходе ROC-анализа и построения характеристической кривой выявлена хорошая прогностическая способность показателя 21-дезоксикортизол (согласно экспертной шкале значений AUC), так как площадь под кривой (AUC) составила 0,801 (95% доверительный интервал равен 0,668 - 0,933,  $p < 0,0001$ ) (рис.5, стр.21). 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.

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

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 групп 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 в группе «здоровых» и пациентов с НК21ОН:  $U = 166$ ,  $U_{0,05} = 232$ .

В дополнении к более низкой чувствительности 21-дезоксикортизола по сравнению с 17-ОНП, мы видим, что порог отсечения 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-ОНП+А)/F между исследуемыми группами пациентов, расчет оптимального порога отсечения нами не проводился, 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.

#### 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 определялись 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. 7).

**Таблица 7. Референсные интервалы стероидов сыворотки крови у детей первых трех месяцев жизни с использованием 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 $\beta$ -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 большого количества возрастных подгрупп.

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 на ВДКН (приложение, рис. 6, стр.27).

## 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 врожденную дисфункцию коры надпочечников для исключения нарушений стероидогенеза (в том числе неклассической формы 21-гидроксилазы) в качестве метода «первой линии» показано исследование стероидов сыворотки крови методом tandemной хромато-массспектрометрии с учетом предложенного нами алгоритма и разработанных нормативных значений стероидов сыворотки крови (приложение, рис. 6, стр.27).
2. Для молекулярно-генетической верификации неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы методом выбора является аллель-специфическая ПЦР (диагностика частых мутаций), которая лишь в сомнительных случаях дополняется секвенированием гена *CYP21* или обследованием родителей пациента.
3. Предложен алгоритм ведения пациентов с неклассической формой дефицита 21-гидроксилазы, диагностированной в раннем возрасте (приложение, рис.7, стр.28).

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Т.А. Ионова, А.Н. Тюльпаков. Изучение показателя распространенности неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников в российской популяции // Материалы первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века». – Москва. – 2012.
2. Т. А. Ионова, Н. Ю. Калинин, А. Н. Тюльпаков, А. Н. Нижник. Сравнительный анализ эффективности методов иммуноанализа и tandemной масс-спектрометрии при ретестировании детей с подозрением на врожденную дисфункцию коры надпочечников // Пробл. Эндокрин. – 2013. - №2. – С. 12-18.
3. Т.А. Ионова. Использование метода tandemной масс-спектрометрии в дифференциальной диагностике синдрома гиперандрогении у детей и подростков // Материалы I научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья девочек». – Москва. – 2013.
4. Т. А. Ионова, А. Н. Тюльпаков, С. Г. Калининкова. Распространенность неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников (на примере популяции Московской области) // Пробл. Эндокрин. – 2013. - №4. – С. 18-22.
5. Т.А. Аносова. Вклад метода tandemной хромато-массспектрометрии в диагностику неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы у детей раннего возраста // Материалы конференции «Инновационные технологии в эндокринологии». – Москва. – 2014.

6. Т.А. Ионова, А.Н. Тюльпаков. Клинико-гормональные особенности неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы у детей первого года жизни, выявленного по результатам неонатального скрининга // Пробл. Эндокрин. – 2014. - №3. – С. 23-29.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

А - андростендион

АГС – адреногенитальный синдром

АКТГ - адренокортикотропный гормон

АРП - активность ренина плазмы

ВДКН - врожденная дисфункция коры надпочечников

ГЭД – городской эндокринологический диспансер

КФ21ОН - классические варианты дефицита 21-гидроксилазы

НН - надпочечниковая недостаточность

НК21ОН - неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы

ППР – преждевременное половое развитие

ПЦР - полимеразно-цепная реакция

РИА – радиоиммунный анализ

ТХМС - тандемная хромато-масспектрометрия

*CYP21, CYP21A2* – ген 21-гидроксилазы

ROC - receiver operating characteristic

SDS - standard deviation score

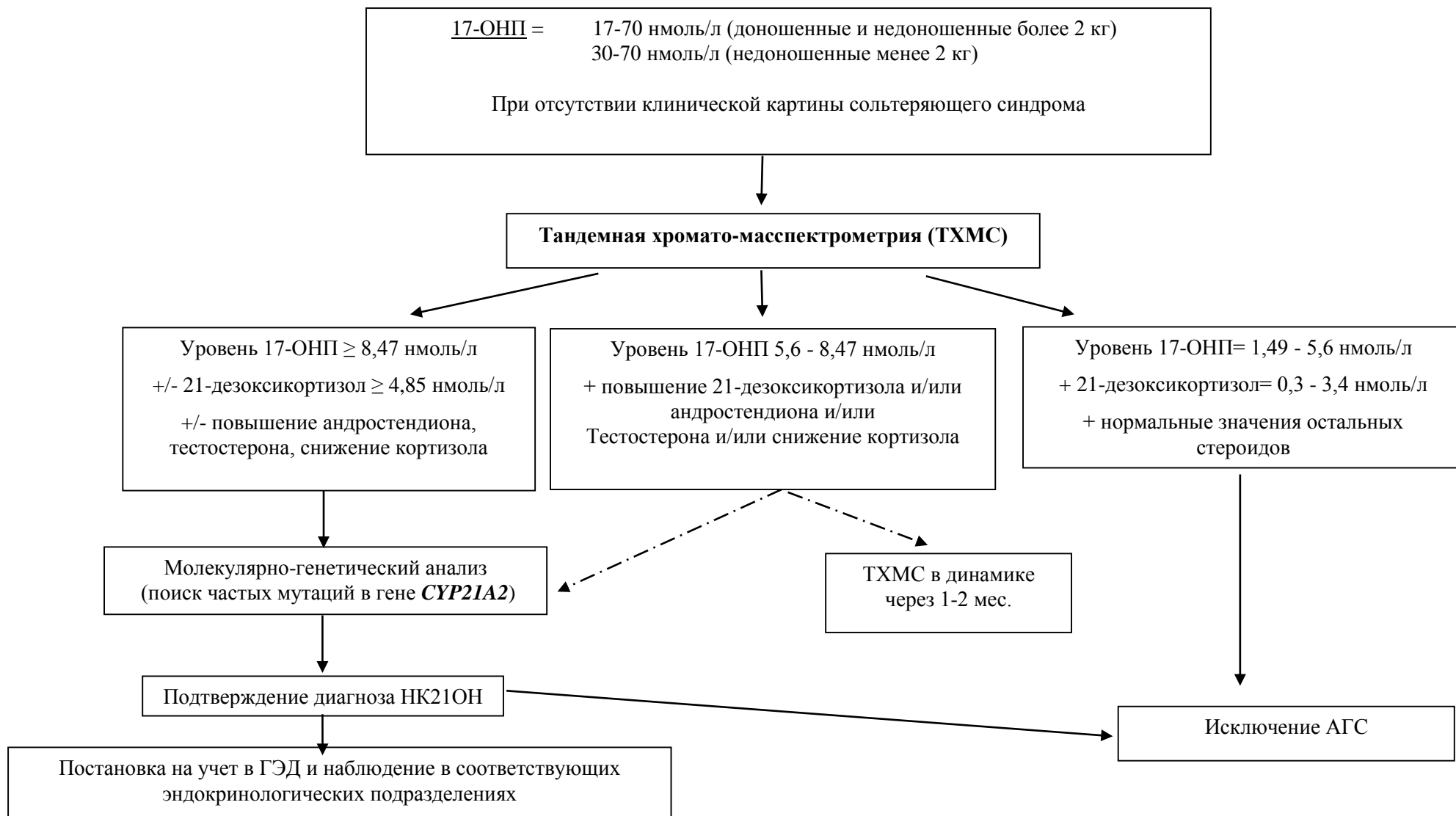
11-ДОК - 11-дезоксикортикостерон

17-ОНП - 17-гидроксипрогестерон

(17-ОНП+А)/F – (17-гидроксипрогестерон + андростендион)/кортизол

21-Д – 21-дезоксикортизол

**Приложение. Рисунок 6. Алгоритм обследования новорожденных при сомнительных результатах неонатального скрининга на ВДКН.**



## Приложение. Рисунок 7. Диагноз неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы подтвержден на первом году жизни.

