

На правах рукописи

Копылова Ирина Владимировна

**Состояние эстрогенчувствительных тканей у девочек с классическими
формами врожденной дисфункции коры надпочечников**

(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:

Петеркова Валентина Александровна

Член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Малиевский Олег Артурович

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

Морозов Дмитрий Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор
директор НИИ детской хирургии
ФГБНУ «Научный центр здоровья детей»

Ведущее учреждение:

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

Защита состоится «__» _____ 2015 года в _____ часов на заседании
диссертационного Совета Д 208.126.01 при ФГБУ «Эндокринологический научный центр»
Минздрава России по адресу: 117036, Москва, ул. Дм. 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, профессор

Суркова Елена Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Распространенность наиболее частого варианта врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН), недостаточности фермента 21-гидроксилазы, достаточно высока и в классических формах в большинстве популяций составляет 1:10000-1:18000 новорожденных [Therrall B.L. 1998, Glatt K. 2005, Merke D.P. 2005]. В настоящее время остается множество нерешенных проблем, касающихся тактики ведения пациенток с ВДКН, начиная с периода новорожденности и заканчивая репродуктивным возрастом. Остается открытым вопрос о женской фертильности, причинах ее снижения и способах предотвращения и лечения бесплодия [Castera's A. 2009, Claahsen-van der Grinten H.L. 2006, Hagenfeldt K. 2008, Johannsen T.H. 2010]. Многие из факторов бесплодия берут свое начало еще в период полового созревания. Актуальность тщательного контроля и изучения течения пубертата у девочек с данной патологией диктуется также физиологическими изменениями, усложняющими подбор адекватной дозы заместительной терапии [Charmandari E. 2004], и необходимостью решения именно в этом возрасте вопроса о показании к интроитопластике, требующейся для возможности половой жизни. Большая часть факторов риска снижения фертильности в репродуктивном возрасте у девочек-подростков обусловлена “недоэстрогенизацией” гениталий (аменорея, ановуляторный цикл, гипоплазия матки, стеноз интроитуса и нижней трети влагалища). Впоследствии это может приводить к бесплодию и снижению сексуальной активности, а также к невынашиванию достигнутой беременности или преждевременным родам [Creighton S.M. 2004, Gastaud F. 2007, Johannsen T.H. 2010]. Принято считать, что недостаточная эстрогенизация внутренних (ВПО) и наружных половых органов (НПО) в пубертате у девочек с ВДКН связана исключительно с неконтролируемой гиперандрогенией, приводящей к снижению продукции эстрогенов яичниками. Достижение адекватного контроля гиперандрогении в этом возрасте крайне важно для предотвращения бесплодия в будущем. Тем не менее, несмотря на раннюю скрининговую диагностику, оптимизацию медикаментозного лечения и хирургического лечения, уровень фертильности все равно остается невысоким [Conway G.S. 2009]. Последние 10 лет активно изучается воздействие пренатального избытка надпочечниковых андрогенов на репродуктивную функцию [Sarma H.N. 2005, Sharma T.P. 2002, Dumesic D.A. 2005]. Но вопрос о влиянии внутриутробной гиперандрогении на постнатальное созревание матки и чувствительность гениталий к эстрогенам до сих пор остается неизученным. Исследование состояния эстрогенчувствительных тканей ВПО и НПО в период полового созревания, его зависимости от вирилизации гениталий при рождении, молекулярно-генетического дефекта и компенсации заболевания, а также определение рецепторной чувствительности тканей НПО к эстрогенам и андрогенам помогли бы лучше понять генез причин бесплодия, обусловленных недостаточной эстрогенизацией.

Степень разработанности темы исследования

Проблеме снижения фертильности пациенток с врожденной дисфункцией коры надпочечников посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных

авторов. Наиболее крупные исследования, посвященные данному вопросу, проведены в Швеции, Франции, Дании, Великобритании, Германии и ряде других стран.

Ведущая роль в патогенезе снижения репродуктивной функции отводится выраженной гиперандрогении, которая является причиной снижения выработки овариальных эстрогенов, а также выступает самостоятельным фактором, ведущим к развитию менструальной дисфункции и синдрома поликистозных яичников [Hagenfeldt K.B. 2004, Holmes-Walker D.J. 1995, Stikkelbroeck N.M. 2004]. Снижение продукции эстрогенов яичниками во многом может объяснить возникновение хронической ановуляции, гипоплазии матки и послеоперационного стеноза интроитуса. Однако, исследования, посвященные изучению патогенеза снижения эстрогенизации ВПО и НПО, а также влиянию на эту проблему степени компенсации заболевания, очень немногочисленны, разрозненны и в большинстве своем проведены на группах пациенток репродуктивного возраста. Принято считать, что становление менструального цикла у девушек с ВДКН зависит только от компенсации заболевания и при удовлетворительном контроле гиперандрогении отмечается своевременное менархе и регулярный цикл [Hagenfeldt K.B. 2004, Trinh L. 2007, Van der Kamp H.J. 2002]. По результатам исследования Сазоновой А.И. нарушения менструального цикла в 72% случаев встречаются при декомпенсации заболевания у женщин с ВДКН репродуктивного возраста и в 59% при удовлетворительной компенсации [Сазонова А.И. 2013]. В работе Johannsen T.H. было выявлено значительное уменьшение объема матки у взрослых женщин с ВДКН, в том числе после беременности и родов, но недостатком исследования являлась малая численность выборки и отсутствие данных о компенсации заболевания у данных пациенток в период пубертата, когда происходит основной рост матки [Johannsen T.H. 2010]. Многочисленные работы посвящены оптимизации методов и сроков выполнения интроитопластики с целью предотвратить формирование стеноза интроитуса [Файзулин А.К. 2011, Фомина М.А. 2010, Creighton S. 2012, Escala J.-M. 2009, Moriya K. 2009]. Было доказано непосредственное участие эстрогенов в заживлении раневой поверхности и торможении образования рубцовой ткани [Ashcroft G.S. 2003, Florian M., 2004, Merlo S. 2009, Pirila E. 2001]. Creighton S. доказано увеличение эластичности тканей влагалища и снижение риска возникновения рубцовых изменений интроитуса у девочек, получавших предоперационно местную терапию эстрогенсодержащими кремами [Creighton S. 2012]. В работе Moriya K. было подтверждено снижение частоты стеноза интроитуса при оценке его диаметра после становления менструального цикла [Moriya K. 2009]. Однако опять же в данных работах не рассматривается компенсация заболевания и ее длительность у пациенток в пубертате, когда окончательно формируется и эстрогенизируется влагалище, а также взаимосвязь развития осложнений с вирилизацией наружных гениталий.

Не изучен вопрос о возможном первоначальном снижении чувствительности тканей к эстрогенам у пациенток с ВДКН и влиянии неудовлетворительной компенсации заболевания в период полового созревания.

Цель исследования

Изучение чувствительности к эстрогенам наружных и внутренних гениталий у девочек с классическими формами ВДКН в период полового созревания

Задачи исследования

1. Проанализировать зависимость строения наружных половых органов, сроков выполнения феминизирующей пластики и потребности в проведении интроитопластики от генотипа, формы заболевания и вирилизации наружных половых органов у девочек с ВДКН в российской популяции
2. Проанализировать особенности становления менструальной функции у девочек-подростков с ВДКН
3. Оценить эстрогенизацию внутренних половых органов и ее зависимость от формы и компенсации заболевания в период полового развития у девочек с ВДКН
4. Оценить степень эстрогенизации наружных гениталий и ее зависимость от вирилизации, формы и компенсации заболевания в период полового развития у девочек с ВДКН
5. Оценить экспрессию эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в слизистой влагалища у девочек с ВДКН в период пубертата в зависимости от формы заболевания, вирилизации наружных половых органов, гормональных показателей, наличия предшествующей интроитопластики и получения эстрогенотерапии
6. Оценить экспрессию эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в малых половых губах у допубертатных девочек с ВДКН в зависимости от формы заболевания, вирилизации наружных половых органов и гормональных показателей.

Научная новизна исследования

Впервые в Российской Федерации проведено изучение особенностей становления и течения пубертата у девочек с классическими формами ВДКН с акцентом на эстрогенизацию внутренних и наружных половых органов в зависимости от генотипа, формы ВДКН, вирилизации наружных гениталий, степени и длительности компенсации заболевания. Впервые проведено иммуногистохимическое исследование эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в тканях наружных гениталий у девочек с ВДКН, в результате чего определены локализация и экспрессия данных рецепторов в слизистой влагалища у девочек с ВДКН в пубертате и в тканях малых половых губ у пациенток допубертатного возраста. Изучена зависимость экспрессии эстрогеновых и андрогеновых рецепторов от вирилизации, формы ВДКН, гормональных показателей, а у пациенток пубертатного возраста и от наличия предшествующей интроитопластики и эстрогенотерапии.

Теоретическая и практическая значимость

По результатам исследования доказана высокая частота нарушений менструального цикла и уменьшение объема матки у всех девочек с ВДКН пубертатного возраста, а также усугубление данных состояний при декомпенсации заболевания. Установлено, что помимо клинических проявлений и гормональных показателей, эхографические параметры матки и цитологическое исследование вагинальных мазков с расчетом индекса

созревания вагинального эпителия в ряде случаев могут использоваться как дополнительные критерии компенсации заболевания при определении эстрогеновой насыщенности и готовности тканей к проведению интроитопластики. Изучена локализация и экспрессия эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в тканях влагалища и малых половых губ у девочек с ВДКН допубертатного и пубертатного возрастов. Доказано снижение экспрессии эстрогеновых рецепторов в эпителии влагалища у пациенток, перенесших интроитопластику и получавших интравагинально эстрогенотерапию.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В пубертатном возрасте 75,3% пациенток с ВДКН (92% девочек с сольтеряющей и 59% с вирильной формой) нуждаются в проведении II этапа феминизирующей пластики (интроитопластики) или бужирования влагалища ввиду анатомического сужения интроитуса, частота которого возрастает параллельно с увеличением выраженности вирилизации гениталий (от 30% при Прадер II до 100% при Прадер IV-V).
2. Более 50% девочек с ВДКН имеют различные нарушения менструального цикла в период полового созревания, которые характерны как для пациенток в состоянии декомпенсации заболевания (68%), так и в компенсации (50%).
3. У пациенток с ВДКН в период пубертата объем матки значительно меньше, чем у девочек с синдромом пубертатной гиперандрогении и в общей популяции. Торможение эстрогензависимого созревания матки усугубляется гиперандрогенией в период становления пубертата.
4. Эстрогеновая насыщенность слизистых интроитуса и влагалища у пациенток с ВДКН в период пубертата зависит от текущего состояния компенсации. Атрофические изменения вагинального эпителия, отмечающиеся при сильной декомпенсации заболевания, наиболее выражены у пациенток с сольтеряющей формой ВДКН.
5. Экспрессия эстрогеновых и андрогеновых рецепторов у девочек с ВДКН в тканях влагалища и малых половых губ в допубертатном и пубертатном периодах не зависит от формы ВДКН и вирилизации наружных гениталий. У некоторых пациенток отмечается снижение экспрессии эстрогеновых рецепторов при неизменной экспрессии андрогеновых рецепторов во влагалище, что снижает чувствительность данной ткани к эстрогенам

Степень достоверности и апробация результатов работы

Поставленные в работе задачи основаны на проведении глубокого анализа результатов отечественных и зарубежных исследований, посвященных изучению течения заболевания и фертильности пациенток с ВДКН. Основные научные положения работы аргументированы и обобщены на достаточном количестве наблюдений. Полученные в работе результаты согласуются с данными работ, опубликованных по теме исследования. Материал диссертации проанализирован с использованием методов математической статистики, применяющихся при проведении медицинских исследований. Достоверность основных положений диссертации, выводов и практических рекомендаций основана на верной методологии исследования и высокой степени доказательности проведенной работы.

Результаты работы были доложены 02 сентября 2014 года на межотделенческой конференции ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на I Российско-Германская конференции по проблемам диабетологии и эндокринологии (Москва, 2013), II всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» с участием стран СНГ (Москва, 2014), на Европейских конгрессах детских эндокринологов (ESPE) (Милан, сентябрь 2013 г., Дублин сентябрь 2014 г.).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 10 работ в отечественных и зарубежных журналах, из них 3 статьи - в отечественных рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных для опубликования основных результатов диссертационных работ. Опубликованные работы в достаточной мере отражают основные результаты и положения диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания проведенных исследований и обсуждения их результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций и списка использованной литературы, который включает 12 отечественных и 163 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 43 рисунками.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на результатах наблюдения и обследования 256 девочек с классическими формами ВДКН (162 пациентки (63,3%) с сольтеряющей формой (СТ) и 94 (36,7%) – с простой вирильной (ПВ)), наблюдавшихся в ФГБУ Эндокринологическом научном центре Минздрава РФ в Институте детской эндокринологии (директор – член-корр. РАН, проф. Петеркова В.А.). Медиана возраста на момент исследования составляла 8,1 лет (3,5; 14,6). В исследование не были включены девочки с неклассическими формами заболевания. На данной когорте пациенток проведен анализ строения наружных половых органов, зависимости их вирилизации от формы и генотипа, а также проанализирована потребность и возраст проведения феминизирующей пластики (ретроспективная часть).

На момент исследования 87 девочек (СТ форма – 43, ПВ – 44) находились в состоянии пубертата и имели половое развитие согласно классификации Таннер (1968): в 9,3% случаев (n=8) – Таннер 2; в 27,9% (n=24) – Таннер 3, в 24,4% (n=21) – Таннер 4, в 38,4% (n=34) – Таннер 5. В данной когорте оценивались особенности становления менструального цикла, ультразвуковые параметры матки и яичников, результаты визуального гинекологического осмотра, цитологического исследования вагинальных мазков. Девочки, имеющие данные гормонального профиля как минимум за предшествующий исследованию год (n=68), были разделены на две группы: с удовлетворительной компенсацией и декомпенсацией заболевания. Учитывая отсутствие в мире четких лабораторных критериев компенсации ВДКН и возможность наличия

повышенного уровня 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) при отсутствии клинико-лабораторных симптомов гиперандрогении у девочек с достаточной дозой глюкокортикоидных препаратов [Speiser P.W. 2010; Joint LWPES/ESPE SAN Working Group 2002], нами были использованы следующие критерии компенсации: средний показатель 17-ОНП за предшествующий исследованию год менее 50 нмоль/л, средний уровень тестостерона (Тс) менее 2 нмоль/л и регулярный менструальный цикл. При сочетании хотя бы двух критериев 36 пациенток (52,9%) были отнесены к группе компенсации (17-ОНП - 20,6 нмоль/л (4,2; 39,9), Тс - 0,48 нмоль/л (0,3; 0,9)); 30 девочек (44,1%) были включены в группу декомпенсации (17-ОНП - 123,6 нмоль/л (91,9; 168,7), Тс - 2,5 нмоль/л (1,5; 5,4)). Две пациентки (2,9%) были исключены из исследования ввиду наличия клинико-лабораторных симптомов передозировки глюкокортикоидными препаратами.

Иммуногистохимическое исследование эстрогеновых (ЭРа и ЭРβ) и андрогеновых (АР) рецепторов в тканях малых половых губ (МПП) и влагалища было проведено на послеоперационном материале, полученном в ходе плановых I и II этапов феминизирующей пластики у 21 пациентки с ВДКН (13 девочек допубертатного возраста (2,4 года (2,1;4) и 8 девочек в возрасте 16,75 лет (15,2;17,65), соответственно). Хирургическое лечение и получение информированного согласия на проведение феминизирующей пластики проводились в отделении гинекологии Измайловской детской клинической городской больницы (зав. отделением - Глыбина Т.М.).

Методы исследования:

Клиническое обследование включало определение антропометрических показателей, оценку степени маскулинизации НПО (у неоперированных пациенток) и стадии полового созревания. Рост измерялся с помощью механического стадиометра (Harpender stadiometr, Holtain Ltd, UK). Для оценки степени отклонения роста пациенток от среднего в популяции рассчитывался коэффициент стандартного отклонения (SDS) роста. Вес измерялся на напольных калиброванных весах в килограммах. Для расчета всех антропометрических данных была использована программа Auxology 1,0 b17.

Оценка степени вирилизации НПО осуществлялась по шкале Prader (1955г), стадии полового созревания - по шкале Tanner (1968г).

Гинекологический осмотр, включающий оценку эстрогенизации слизистой в зоне гименального кольца и результатов проведенных пластических операций на НПО, в том числе ширины интроитуса, проводился в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (сотрудник отделения эндокринной гинекологии, к.м.н. Яровая И.С.) и в отделении гинекологии Измайловской детской городской клинической больницы №3 (Глыбина Т.М.).

Становление менструального цикла. Анализировался возраст менархе и характер менструального цикла. Нарушение менструального цикла (НМЦ) расценивалось как первичная аменорея при отсутствии менархе у пациентки при достижении возраста 16 лет при развитых женских вторичных половых признаках; как вторичная аменорея - при отсутствии менструаций более 6 месяцев в любой период времени после менархе, как опсоменорея – при превышении средней продолжительности менструального цикла более

40 дней. Также отмечалось наличие или отсутствие дисфункциональных маточных кровотечений (ДМК).

Гормональное обследование (17-ОНП, Тс, эстрадиол (Э2), активность ренина плазмы (АРП)) выполнено в лаборатории ФГБУ ЭНЦ (зав. отделением гормонального анализа, д.м.н. Гончаров Н.П.). Уровень общего Тс и Э2 определялся методом усиленной хемилюминесценции с помощью автоматического иммунохимического анализатора Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, США). Для оценки концентрации 17-ОНП и активности ренина плазмы в сыворотке использован радиоиммунный анализ (Immunotech, ISO 9001-13485, Франция/Чехия). Для всех вышеуказанных показателей использовались референсные значения, принятые в лаборатории ФГБУ ЭНЦ для стадии полового созревания Таннер 5 (тестостерон – 0,7-1,8 нмоль/л; 17-ОПГ – 0,5-6,9 нмоль/л; эстрадиол – 97-592 пмоль/л).

Молекулярно-генетическое исследование на наличие 12-и частых мутаций в гене *CYP21A2* выполнено в лаборатории генетики и клинической иммунологии ФГБУ ЭНЦ (рук.- к.м.н. С.А. Прокофьев) методом аллель-специфической ПЦР.

Для анализа корреляции генотип-фенотип пациентки были разделены на 4 подгруппы в зависимости от носительства мутантных аллелей в гомо-, геми- или гетерозиготном состоянии и степени дефицита фермента 21-гидроксилазы): генотип 0 - активность 21-гидроксилазы 0% (мутантные аллели del, Δ8bp, Q318X, R356W), группа А (АА, А0)– активность фермента <1% (I2splice), группа В (ВВ, ВА, В0) – активность фермента 1-5% (I172N); группа С (СС, СВ, СА, С0) - мутации Р30L, V281L, Р453S [Krone N et al., 2009].

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проводилось у всех девочек трансабдоминально на аппаратах Hewlett Pakard Image Point, Agilent Sonos 4500, США (отделение функциональной диагностики ФГБУ ЭНЦ, зав. отд., к.м.н. Солдатова Т.В.). Объем матки был рассчитан по формуле $A \times B \times C \times 0,5233$, где А – длина матки вместе с шейкой, В – ширина, С – переднее-задний размер (толщина) матки.

Цитологическое исследование вагинальных мазков. Забор материала для цитологического исследования производился в ходе гинекологического осмотра в ФГБУ ЭНЦ и в ИДГКБ№3. Мазки были получены с латеральных стенок средней трети влагалища и высушены на воздухе. Окрашивание стекол по методу Романовского в модификации Паппенгейма и последующее цитологическое исследование проводились автором в лаборатории патоморфологии ФГБУ ЭНЦ (консультант: Руднева Е.А.). Морфологическая оценка препаратов заключалась в подсчете 200 клеток в нескольких полях зрения на микроскопе Zeiss Primo Star, после чего производился подсчет процента каждого типа клеток эпителия влагалища - кариопикнотичных поверхностных (%КП), промежуточных (%ПР) и базально-парабазальных клеток (%ПБ). Затем вычислялся индекс созревания (ИС), являющийся маркером эстрогеновой насыщенности слизистой влагалища ($ИС = (\% ПР \times 0.5) + \% КП$) [Willhite L.A. 2001].

Иммуногистохимическое определение эстрогеновых (ЭРа и ЭРβ) и андрогеновых (АР) рецепторов проведено автором на базе центра коллективного пользования, факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова (консультант: к.б.н. Сысоева В.Ю.). Операционный материал фиксировался в 4% формалине и заключался в

парафин. Исследование выполнено на парафиновых срезах толщиной 3 мкм по стандартной иммуногистохимической методике на иммуностейнере Autostainer Link 48 (Dako, США) с использованием коммерческих мышиных моноклональных антител против ЭР α (клон 6F11, в разведении 1:80); ЭР β (клон EMR02, разведение 1:50); AP (клон AR27, разведение 1:100) (Novocastra) с предварительной демаскировкой антигенов в соответствии с протоколом производителя. Проявление реакции осуществлялось системой визуализации Peroxidase Detection System (Novocastra, Великобритания). В качестве негативного контроля была использована ткань миндалин, в качестве положительного – ткань эндометрия (для ЭР α), кожи (для ЭР β), карциномы простаты (для AP), рекомендованные в описании к коммерческим антителам. Для серо-негативного контроля был использован мышиный IgG (FLEX Negative Control Mouse Cocktail; Dako). Морфометрический анализ проведен на микроскопе Zeiss Axioscop 40, оснащенном камерой AxioCam MRc5 Zeiss. Оценка процента иммунопозитивных клеток проведена в 6-10 полях зрения с последующим вычислением медианы и 25-75 перцентилей для каждого маркера в образце.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica («StatSoft Inc.», США, версия 8.0) с помощью непараметрических критериев статистического анализа. Данные в работе представлены в виде медианы с указанием 25—75 перцентилей (Me (X_{1/4}; X_{3/4})). Для сравнения двух групп по количественным и порядковым качественным признакам применялся тест Манна—Уитни, по качественным номинальным признакам – критерий χ^2 (хи-квадрат) по Пирсону, при анализе частот двух бинарных признаков – точный критерий Фишера. Для анализа связи двух признаков использовался анализ ранговой корреляции по Спирмену. Критический уровень значимости различий принимался равным 0,05.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Вирилизация наружных половых органов, сроки выполнения феминизирующей пластики и потребность в проведении интроитопластики у девочек с ВДКН в российской популяции

У большинства пациенток (56,9%) при рождении отмечались гипертрофия клитора и широкий уrogenитальный синус (по шкале Прадера – III), 15,5% имели только гипертрофию клитора и высокую заднюю спайку (Прадер II). В 20,1% случаев отмечалась выраженная гипертрофия клитора, узкий уrogenитальный синус, открывающийся у основания клитора (Прадер IV), у 7,5% девочек наблюдалось полностью мужское строение НПО (Прадер V).

Из 140 девочек с проведенным молекулярно-генетическим исследованием гена *CYP21* 33 (23,6%) имели генотип 0, у 46 (32,9%) был генотип А, у 36 (25,7%) – генотип В. Генотип С был отмечен у 9 девочек (6,4%, СТ/ПВ=1/8), у которых в одном из аллелей при компаундных гетерозиготных мутациях были выявлены P30L (5), P453S (3), V281L (1). У 16 (11,4%) пациенток не было выявлено часто встречаемых мутаций в одном или в двух аллелях.

Вирилизация НПО при рождении была более выражена у пациенток с СТ, чем с ПВ формой заболевания (Прадер III (III; IV) vs Прадер III (II; III), $p<0,0001$). Девочки с генотипами 0 и А имели более высокую степень вирилизации по сравнению с девочками с генотипом В (Прадер III (III; IV) при генотипах 0 и А vs Прадер III (II; III) при генотипе В, $p<0,0001$ и $p=0,0002$, соответственно). У пациенток с генотипом С отмечалась выраженная вирилизация НПО (Прадер IV (III; IV)), которая была статистически значимо выше, чем у девочек с генотипом В ($p=0,006$) и не отличалась от таковой при генотипах 0 и А ($p=0,75$, $p=0,48$, соответственно) (Рисунок 1), что можно объяснить преобладанием в данной группе пациенток с мутацией Р30L ($n=5$) и вирилизацией наружных гениталий при рождении по Прадеру III-V.

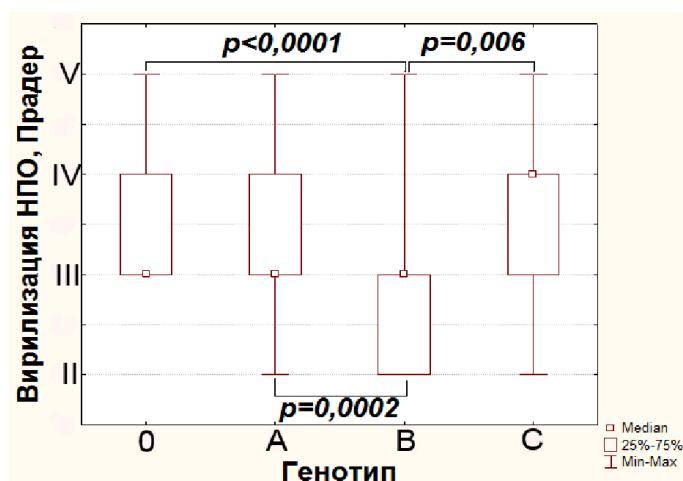


Рисунок 1. Вирилизация наружных половых органов при рождении у девочек с ВДКН при разных генотипах

Феминизирующая пластика НПО традиционно проводилась в 2 этапа. Возраст проведения I этапа (резекция клитора и рассечение урогенитального синуса) составил 3,58 года (2,3; 6,0) и положительно коррелировал с возрастом диагностики заболевания ($r_s=0,4$, $p<0,05$), составлявшим 31 день (10; 886). Из 27 девочек, имевших при рождении только гипертрофию клитора разной степени выраженности и высокую заднюю спайку (Прадер II), 13 пациенток (48,1%) не нуждались в проведении пластики гениталий.

Наличие анатомического стеноза интроитуса и необходимость проведения интроитопластики проанализированы у 77 пациенток пубертатного возраста (16,8 лет (15,17; 17,8); Таннер 4 (4; 5)). Стеноз интроитуса выявлен у 58 (75,3%) пациенток, у остальных 19 (24,7%) девочек отмечался достаточный для ведения половой жизни вход во влагалище. В 94,8% ($n=55$) случаев девочкам со стенозом была рекомендована хирургическая коррекция и только у 3 (5,2%) пациенток было достаточно проведения бужирования. У пациенток с СТ формой ВДКН стеноз интроитуса отмечался в 92,1% случаев, что достоверно чаще, чем у девочек с ПВ формой (59% случаев) ($p=0,001$) (Рисунок 2).

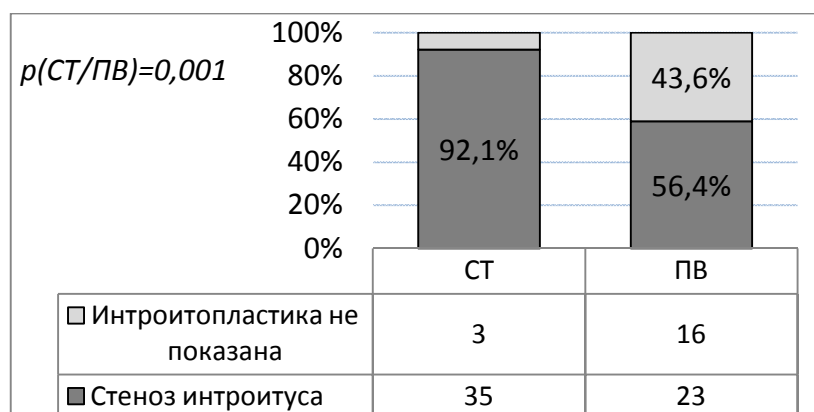


Рисунок 2. Частота стеноза интроитуса у пациенток с сольтерющей (СТ) и простой вирильной (ПВ) формами ВДКН

Частота стеноза составляла 100% у пациенток с выраженной вирилизацией НПО при рождении по Прадеру IV и V (n=13), 70% при вирилизации Прадер III (23 случаев из 34) и 30% при Прадер II (3 из 10). Интроитопластика проведена 35 пациенткам. Возраст операции составил 16,9 лет (15,6; 17,9). Интроитопластика проводилась достоверно позже пациенткам с СТ по сравнению с ПВ формой: 17,14 лет (16,7; 17,9) vs 16,1 (14,3; 16,9) лет, $p=0,025$. Не выявлено значимой корреляционной связи между возрастом проведения операции и возрастом менархе ($r_s=0,019$, $p>0,05$).

Становление менструальной функции у пациенток с ВДКН

Возраст менархе (n=66) в пубертатной группе составил 13,0 лет (12,0; 14,0), что сопоставимо с популяционными данными - 12,6 лет (12,5-13,0) [Богданова Е.А. 2011, Rosenfield R.L. 2009]. Этот показатель был достоверно выше у пациенток с генотипами 0 (14,0 лет (13,0; 16,0)) и А (14,0 лет (13,0; 14,5)) по сравнению с девочками, имеющими генотип В (12,5 лет (12,0; 13,0)) ($p=0,012$ и $p=0,018$, соответственно). При СТ форме ВДКН менархе отмечалось позднее, чем при ПВ форме (14,0 лет (13,0; 15,0) vs 13,0 лет (11,5;14,0), $p=0,043$) (Рисунок 3).

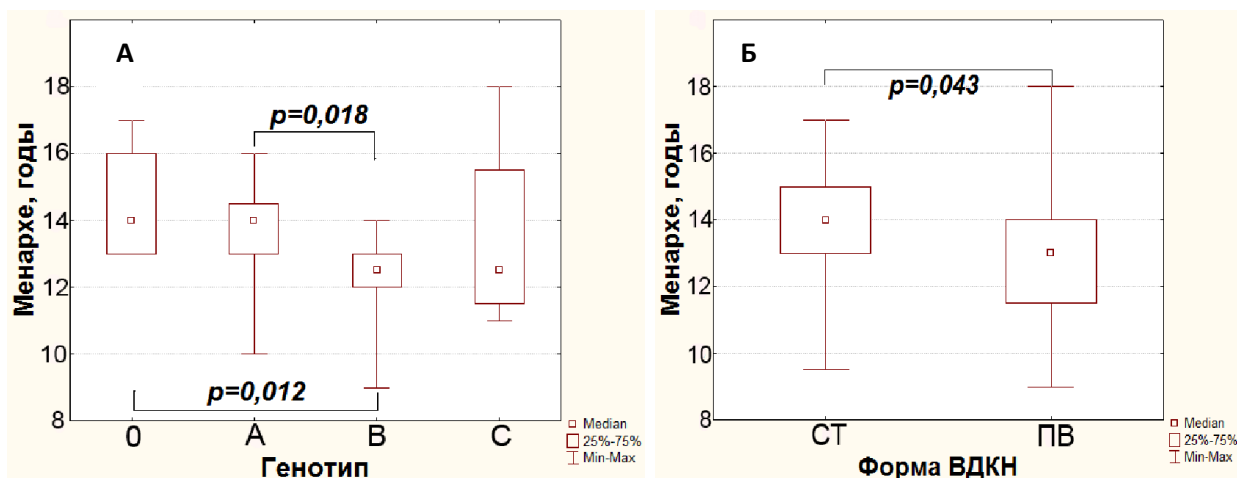


Рисунок 3. Сравнение возраста менархе у пациенток с разными генотипами (А) и формами (Б) ВДКН. СТ – сольтерющая форма, ПВ – простая вирильная

Регулярный менструальный цикл (РМЦ) имели 32 пациентки (44,4%), остальные 40 (55,6%) имели различные нарушения менструального цикла (НМЦ): первичная аменорея – 9,7% случаев (n=7), опсоменорея - 19,5% (n=14), вторичная аменорея –20,8% (n=15), ДМК –5,6% (n=4). У всех пациенток с опсоменореей, вторичной аменореей и ДМК период после менархе достигал более 1 года, его медиана составляла 2,6 года (1,8; 5,3). Частота НМЦ не различалась у девочек с СТ (48,6%, 17 случаев из 35) и с ПВ (65,7%, 23 случая из 37) формами ($p(СТ/ПВ)=0,34$).

Частота НМЦ была высокой как у девочек с декомпенсацией (68%), так и с удовлетворительной компенсацией ВДКН (50%) в течение предшествующего исследованию года, и статистически значимо не различалась между обеими группами ($p=0,26$) (Рисунок 4).

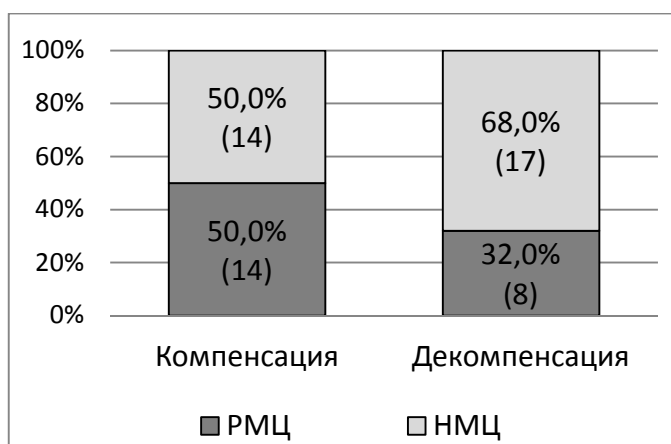


Рисунок 4. Частота регулярного менструального цикла (РМЦ) и нарушений цикла (НМЦ) в группах пациенток с компенсацией и декомпенсацией ВДКН (n=53)

У девочек с декомпенсацией чаще встречались первичная и вторичная аменореи (n=17, из них 3 случая первичной аменореи, 9 – вторичной аменореи и 5 – опсоменореи). У пациенток с компенсацией НМЦ были преимущественно обусловлены опсоменореей и ДМК (n=14, из них опсоменорея в 6 случаях, первичная аменорея – 2, вторичная аменорея – 2 и в 4 случаях – ДМК).

Таким образом, 55,6% пациенток с ВДКН имеют различные нарушения менструальной функции. Высокая частота НМЦ как в группе с декомпенсацией (68%), так и с компенсацией ВДКН (50%) в течение предшествующего исследованию года и отсутствие достоверных различий между ними ($p=0,26$) свидетельствуют о том, что во-первых, для достижения регулярного цикла необходимо длительное поддержание нормального уровня андрогенов, а во-вторых, что даже при нормальных показателях Тс и 17-ОНП риск хронической ановуляции у пациенток с ВДКН достаточно высок.

Эстрогенизация внутренних половых органов у пациенток с ВДКН в пубертате

Эхографические размеры матки и яичников в зависимости от компенсации ВДКН оценивались у пациенток, у которых с момента менархе прошло более 1 года (n=45, возраст 17,5 (15,7; 19,0) лет, Таннер 5 (4; 5)). Значимой разницы в размерах матки и

яичников между девочками с компенсацией (n=23) и декомпенсацией (n=22) заболевания в течение предшествующего исследованию года выявлено не было (Таблица 1).

Таблица 1. Эхографические параметры матки и яичников у девочек с компенсацией и декомпенсацией ВДКН (n=45) и нормативные значения для стадии полового развития Таннер 5

Показатель	Компенсация (n=23)	Декомпенсация (n=22)	p (комп/декомп)	Норма для Таннер 5*
17-ОНП, нмоль/л	13,8 (4,1; 42,2)	109,8 (83,9; 150)	<0,0001	0,5-6,9
Тс, нмоль/л	0,66 (0,25; 1,6)	3 (1,45; 5,1)	<0,0001	0,7-1,8
Э2, пмоль/л	162 (95,1; 196,5)	166,2 (131; 230)	0,39	97-592
Объем яичников, мл	7,12 (4,46; 11,3)	7,5 (5,6; 9,5)	0,9	6,88±0,27
Длина тела матки, см	4,3 (4,0; 4,5)	4,0 (3,7; 4,6)	0,33	4,5±0,3
Ширина матки, см	3,6 (3,1; 3,9)	3,4 (3,1; 3,7)	0,27	3,9±0,3
Толщина матки, см	2,6 (2,1; 2,8)	2,4 (2,0; 2,8)	0,33	3,0±0,1
Шейка матки, см	2,7 (2,5; 3)	2,7 (2,6; 2,9)	0,84	2,5±0,1
Объем матки, мл	30,5 (21,8; 37,4)	27,2 (21,1; 33,4)	0,34	43 (12-82)

* Богданова Е.А., 2011; Мартыш Н.С., 1990; Holm K. et al., 1995

Однако отмечено уменьшение размеров матки в обеих группах ВДКН по сравнению с аналогичными нормативными показателями в популяции для стадии полового созревания Таннер 5. Объем яичников у девочек с ВДКН был сопоставим с таковым в популяции (Таблица 1).

Достоверных различий в объеме матки между девочками с различными генотипами и формами ВДКН не отмечалось. При проведении корреляционного анализа не было выявлено значимой взаимосвязи объема матки и яичников с возрастом, ростом, стадией полового созревания и со сроком, прошедшим с момента менархе. Эхографические параметры матки и яичников не коррелировали со средними показателями 17-ОНП, Тс и Э2. Чтобы ограничить влияние избытка ароматизированных андрогенов на определяемый в крови уровень эстрадиола, из исследуемой группы были исключены пациентки со средним уровнем Тс более 3 нмоль/л (n=10). В результате чего была выявлена умеренная положительная корреляция между показателем «истинного» Э2 и объемом матки ($r_s = 0,4$, $p < 0,05$), и шириной матки ($r_s = 0,43$, $p < 0,05$).

Учитывая полученное уменьшение объема матки у девочек с ВДКН вне зависимости от компенсации заболевания в течение предшествующего исследованию года, было заподозрено влияние допубертатной гиперандрогении на замедление темпов роста матки, в связи с чем для девочек с компенсацией ВДКН (n=23) была подобрана группа сравнения из 12 пациенток с синдромом пубертатной гиперандрогении (ГА) с исключенным диагнозом ВДКН, у которых отмечался правильный порядок появления вторичных половых признаков в анамнезе и манифестация ГА после менархе. Эхографические параметры матки у них соответствовали аналогичным показателям в популяции, а объем яичников превышал принятые популяционные нормативы (Таблица 2).

Таблица 2. Размеры матки при компенсации ВДКН и синдроме пубертатной гиперандрогении (ГА)

Показатель	Компенсация ВДКН (23)	ГА (12)	<i>p</i> (ВДКН/ГА)
Возраст, годы	17,0 (15,8; 17,8)	16,5(15,4; 17,2)	0,29
Таннер	5 (4; 5)	5 (4; 5)	0,6
17-ОНП, нмоль/л	13,8 (4,1; 42,2)	4,5 (2,8; 5,51)	0,011
Тс, нмоль/л	0,66 (0,25; 1,6)	1,65 (1,15; 1,85)	0,005
Э2, пмоль/л	161,9 (95,1; 196,5)	136,3 (111,9; 152,6)	0,86
Объем яичников, мл	7,12 (4,46; 11,3)	10,3 (8,3; 12,8)	0,026
Длина тела матки, см	4,3 (4,0; 4,5)	4,4 (4,0; 4,8)	0,21
Ширина матки, см	3,6 (3,1; 3,9)	4,05 (3,7; 4,35)	0,03
Толщина матки, см	2,6 (2,1; 2,8)	2,8 (2,5; 2,95)	0,07
Объем матки, мл	30,5 (21,8; 37,4)	42,8 (34,7; 52,02)	0,0074

В группе компенсации ВДКН имело место значимое уменьшение размеров матки, в основном за счет ширины. Уровень Тс и объем яичников были достоверно выше в группе девочек с ГА, чем у пациенток с ВДКН ($p=0,005$ и $p=0,026$, соответственно), а разница в показателях Э2 между группами отсутствовала ($p>0,05$) (Таблица 2).

Полученный результат мог свидетельствовать не только о наличии гипоплазии матки у пациенток с ВДКН, но и о том, что длительность компенсации заболевания в течение 1 года перед проведением ультразвукового исследования недостаточна для созревания матки и достижения размеров, соответствующих возрасту и стадии полового развития (Таннер 5). Интересным представлялся вопрос о том, какой вклад вносит в созревание матки гиперандрогения в период становления пубертата. Данные гормонального профиля в период раннего пубертата (Таннер 2-3) были проанализированы у 26 пациенток (13 - в компенсации в начале пубертата, 13 – в декомпенсации). Не было выявлено разницы в объемах матки у девочек в группах декомпенсации и компенсации в раннем пубертате (32,8 мл (17,3; 35,2) vs 25,7 мл (23,3; 36,1), $p=0,74$). Сохранялось достоверное снижение объема матки в обеих группах по сравнению с группой девочек с ГА ($p(\text{компенсация/ГА}) = 0,034$; $p(\text{декомпенсация/ГА}) = 0,01$) (Рисунок 5).

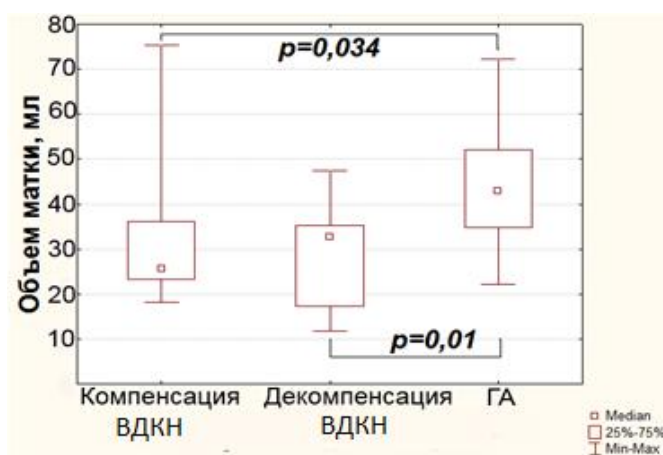


Рисунок 5. Объем матки у пациенток с ВДКН в зависимости от компенсации ВДКН в периоде становления пубертата (Таннер 2-3) в сравнении с группой девочек с пубертатной гиперандрогенией

С целью проведения оценки эхографических размеров матки у девочек с разной компенсацией ВДКН в пубертате, начиная с его становления (Таннер 2-3) и заканчивая стадией полового созревания Таннер 4-5, пациентки были разделены на 3 подгруппы: подгруппа 1 – компенсация ВДКН на протяжении всего полового созревания (при стадиях 2-5 по Таннеру); подгруппа 2 – субкомпенсация, т.е. декомпенсация заболевания в период становления пубертата и удовлетворительная компенсация при Таннер 4-5, либо компенсация в раннем пубертате и декомпенсация в последний год; подгруппа 3 – декомпенсация на протяжении всего периода полового созревания (Таблица 3).

Таблица 3. Характер компенсации ВДКН на протяжении всего пубертатного периода у пациенток с периодом после менархе более 1 года (n=26)

Подгруппа, число пациенток	1 (n=7)	2 (n=11)	3 (n=8)
Компенсация в раннем пубертате (Таннер 2-3)	+	-/+	-
Компенсация при стадиях Таннер 4-5	+	+/-	-

Примечание: компенсация – «+», декомпенсация – «-».

Не было выявлено значимых различий в размерах матки между тремя подгруппами (с компенсацией, суб- и декомпенсацией ВДКН в пубертате), но отмечалось достоверное снижение объема матки у пациенток из подгруппы 2 (25,7 мл (21,1; 37,4)) и подгруппы 3 (33,1 мл (16,1; 34,7)), находившихся в состоянии суб- и декомпенсации заболевания в период полового созревания, по сравнению с девочками с ГА (42,8 мл (34,7; 52,02)) ($p=0,027$ и $p=0,017$, соответственно) (Рисунок 6). Такой результат был обусловлен уменьшением преимущественно толщины и ширины матки у девочек с декомпенсацией заболевания в отличие от пациенток с пубертатной гиперандрогенией, что подтверждает тот факт, что именно эти параметры являются наиболее чувствительными к воздействию эстрогенов. Объем матки у пациенток из группы 1, имевших удовлетворительную компенсацию на протяжении всего пубертата, был меньше, но статистически значимо не отличался от аналогичного показателя в группе с ГА (30,5 мл (23,2; 39,7) vs 42,8 мл (34,7; 52,02), $p=0,1$).

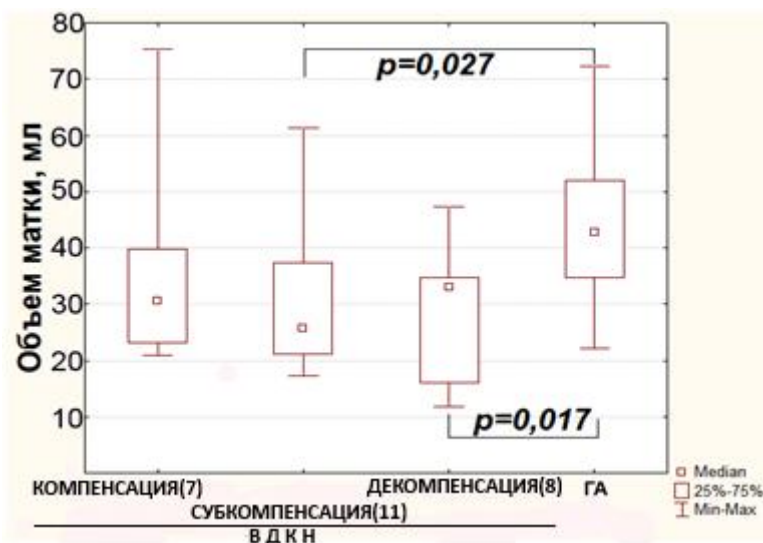


Рисунок 6. Объем матки у пациенток с разной компенсацией ВДКН в течение полового созревания в сравнении с пациентками с пубертатной гиперандрогенией

После повторного анализа с использованием более узких критериев компенсации ВДКН (17-ОНП менее 30 нмоль/л, Тс менее 2 нмоль/л) были получены аналогичные результаты.

Таким образом, максимальное уменьшение объема матки по сравнению с популяционными данными и пациентками с синдромом пубертатной гиперандрогении наблюдается у девочек с ВДКН, которые были декомпенсированы на протяжении всего становления пубертата, что говорит о влиянии гиперандрогении в этот период на рост матки. Однако, даже у девочек с удовлетворительной компенсацией имеет место небольшой объем матки, достоверно не отличающийся от такового при декомпенсации заболевания. Помимо пубертатной гиперандрогении, это может объясняться влиянием на рост этого органа других факторов, таких как избыток андрогенов в пренатальном периоде.

Эстрогенизация наружных половых органов у пациенток с ВДКН в пубертате

В ходе проспективного гинекологического осмотра 32 пациенток с ВДКН в периоде после менархе, в 66% случаев (n=21) наблюдалась удовлетворительная и в 34% (11) – слабая эстрогенизация зоны гименального кольца, что проявлялось в сухости и цианотичности слизистых. У девочек с компенсацией на момент осмотра в 80% случаев (16 случаев из 20) отмечалась удовлетворительная эстрогенизация, тогда как у пациенток в декомпенсации она отмечалась в 41,7% случаев (5 из 12), а остальные 58,3% имели слабую эстрогенизацию слизистых (p (компенсация/декомпенсация) = 0,034).

Достоверных различий в частоте встречаемости стеноза интроитуса у пациенток со сниженной и нормальной эстрогенизацией не отмечалось (61,1% (11 случаев из 18) при удовлетворительной эстрогенизации vs 75% (9 случаев из 12) при низкой, $p=0,69$). Таким образом, наличие входа во влагалище, достаточного для ведения половой жизни, у некоторых пациенток со степенью вирилизации по Прадеру II и III нельзя объяснить только достижением оптимальной эстрогенизации слизистой зоны гименального кольца в пубертате. С другой стороны, стеноз интроитуса у девочек с такой же вирилизацией может являться следствием сниженной чувствительности к действию эстрогенов.

Цитологическое исследование вагинальных мазков

Морфологическая оценка мазков проведена у 19 пациенток (возраст 15,9 лет (14,9; 16,9), Таннер 4 (3; 5), СТ/ПВ = 9/10; 11 девочек в состоянии компенсации, 8 – в декомпенсации). В качестве контроля была набрана группа здоровых девочек (n=12) соответствующего возраста и стадии полового развития с периодом после менархе >1 года и регулярным менструальным циклом.

Расчетный индекс созревания вагинального эпителия (ИС) был достоверно выше у пациенток с компенсацией, чем с декомпенсацией ВДКН (61,5% (56; 64,5) vs 47,9% (41,5; 53,5), $p=0,0007$) (Таблица 4). Количество поверхностных клеток (КП) было меньше у пациенток с выраженной гиперандрогенией, чем у девочек с удовлетворительной компенсацией (3,25% (0,0;10) vs 23% (12;29), $p=0,0016$). Глубокие парабазальные (ПБ) клетки полностью отсутствовали в мазках у девочек с удовлетворительным контролем гиперандрогении и встречались только при декомпенсации ВДКН (Рисунок 7 А, Б).

Таблица 4. Сравнение цитологических индексов в подгруппах пациенток с компенсацией и декомпенсацией ВДКН

	Компенсация	Декомпенсация	p (компенсация/декомпенсация)
n	11	8	
% поверхностных клеток (КП)	23 (12; 29)	3,25 (0,0; 10)	p=0,0016
% парабазальных клеток (ПБ)	0,0 (0,0; 0,0)	8,5 (0,0; 20,25)	p=0,003
% промежуточных клеток (ПР)	77 (71; 88)	86,5 (72,5; 93,5)	0,32
Индекс созревания (ИС) %	61,5 (56; 64,5)	47,9 (41,5; 53,5)	p=0,0007

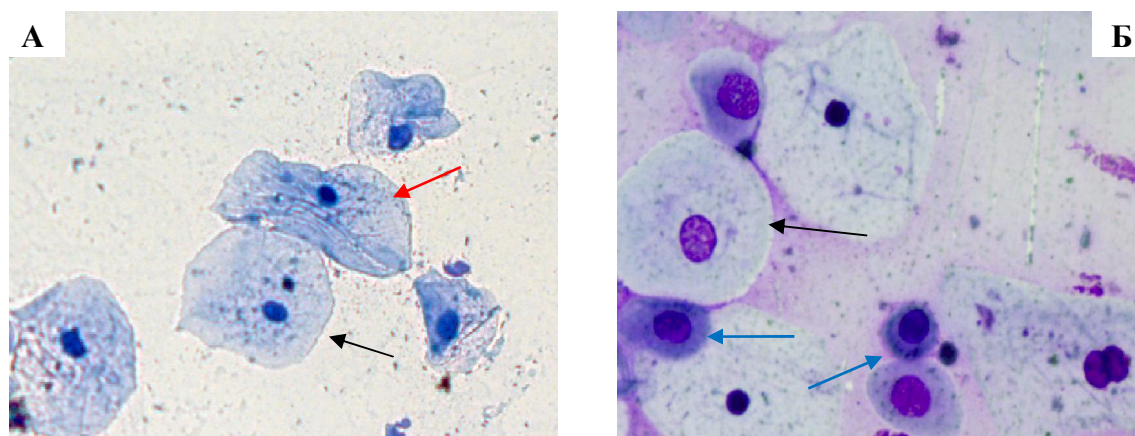


Рисунок 7. А – цитологическая картина мазка пациентки с компенсацией ВДКН (красная стрелка - поверхностная клетка с кариопикнозом, черная – зрелая промежуточная клетка), x400; Б – мазок пациентки с декомпенсацией ВДКН и вторичной аменореей (синие стрелки - парабазальные клетки, черная – незрелая промежуточная), x1000

Полученные данные о созревании эпителия влагалища у девочек с компенсацией ВДКН сопоставимы с цитологической картиной мазков у женщин репродуктивного возраста, у которых индекс созревания колеблется от 60 до 80% в зависимости от стадии менструального цикла [Шабалова И.П., 2001, Willhite L.A. 2001].

Не было выявлено значимой разницы в ИС между пациентками с удовлетворительной и слабой эстрогенизацией зоны гименального кольца, определяемой в ходе гинекологического осмотра (59% (56; 62,5%) vs 53,5% (43,2; 56,7), $p=0,086$), что свидетельствует о том, что визуальный осмотр не всегда точно отражает истинную эстрогенизацию слизистой влагалища.

При корреляционном анализе была выявлена умеренная отрицательная взаимосвязь ИС с гормональными показателями (Тс и 17-ОНП), измеренными перед обследованием ($r_s = -0,58$ и $r_s = -0,47$, соответственно, $p < 0,05$), и положительная связь Тс с количеством парабазальных клеток ($r_s = 0,57$, $p < 0,05$), что является свидетельством нарастания атрофии слизистой влагалища при повышении уровня андрогенов. Значимой корреляции данных маркеров созревания с уровнем Э2 в крови выявлено не было, что подтверждает неинформативность исследования этого гормонального показателя для оценки степени эстрогеновой насыщенности.

В подгруппе с декомпенсацией ВДКН было выявлено статистически значимое снижение индекса созревания вагинального эпителия при СТ форме (39,7% (26,5; 47,5)) по

сравнению с девочками с ПВ (53,2% (48,3; 53,7)), $p=0,05$), что было обусловлено увеличением количества парабазальных клеток глубоких слоев эпителия при СТ форме по сравнению с ПВ (20,5% (20;47) vs 0% (0,0;3,5), $p=0,02$). При этом не было выявлено разницы в показателях Тс и 17-ОНП у девочек с СТ и ПВ формами ВДКН ($p=0,88$ и $p=0,18$, соответственно). Таким образом, у пациенток с СТ формой заболевания в состоянии декомпенсации отмечается более выраженная атрофия слизистой влагалища. Причиной этих различий в индексе созревания может служить разная чувствительность к изменению баланса андрогенов/эстрогенов у девочек с сольтерющей формой и вирильной формами ВДКН. Не было выявлено значимых различий в индексе созревания у пациенток с компенсацией ВДКН и у здоровых девочек из группы контроля (ИС 61,5% (56;64,5) vs 61,1% (57,6; 65,0), соответственно, $p=0,95$).

Полученные результаты подтверждают высокую чувствительность вагинального эпителия к колебанию уровня андрогенов/эстрогенов и тот факт, что для изменения степени его созревания достаточна небольшая длительность гиперандрогении.

Эстрогеновые и андрогеновые рецепторы в тканях влагалища у девочек с ВДКН в пубертате

Иммуногистохимическое исследование проведено на послеоперационном материале, полученном при проведении интроитопластики 8 пациенткам пубертатного возраста (16,75 лет (15,2; 17,65), СТ/ПВ = 3/5). Выраженная вирилизация НПО при рождении (Прадер IV) имела место у 2 пациенток, умеренная (Прадер III) - у 4, слабая (Прадер II) – у одной девочки. Все девочки к моменту оперативного лечения также находились в компенсации ВДКН (17-ОНП 13,8 нмоль/л (5,54; 31,9), Тс 0,2 нмоль/л (0,17-0,5)). У 3 пациенток отмечалось нарушение менструального цикла по типу опсоменореи, остальные 5 девочек имели регулярный цикл. Материал для ИГХ-исследования представлял собой участок стенки дистальной части влагалища вблизи интроитуса.

Количество ЭР α -позитивных клеток в эпителии влагалища составило 49,5% (41,8; 58,7). Рецепторы локализовались в ядрах клеток парабазального и промежуточного слоев эпителия. В строме ЭР α были выявлены в фибробластах и гладкомышечных клетках (Рисунок 8 А). Иммунореактивность в эпителии была статистически значимо выше, чем в строме (61,3% (55,7; 65,7) против 23,7% (14,3; 43,9), соответственно, $p<0,01$) (Рисунок 9). Доля АР-позитивных клеток составила всего 6,6% (3,6; 16,5), что существенно ниже по сравнению с другими исследованными рецепторами (Рисунок 8 Б). В эпителии АР локализованы только в базальном слое, а в строме встречались единичные АР-позитивные фибробласты. Число АР-позитивных клеток в вагинальном эпителии было ниже, но статистически значимо не отличалась от такового в строме (5,4% (2; 18,1) против 8,4% (2,3; 18,8), соответственно, $p>0,05$) (Рисунок 9). Умеренное количество клеток, несущих ЭР β (48,1% (34,5; 67,7)) было выявлено в парабазальном, промежуточном и в единичных случаях в поверхностном слоях эпителия. В строме ЭР β локализовались в фибробластах и в эндотелии сосудов. Иммунореактивность ЭР β в эпителии статистически значимо не отличалась от таковой в строме (55,7% (40,9; 80,3) против 45,1% (32,7; 62,7), соответственно, $p>0,05$) (Рисунок 9). Распределение ЭР и АР в эпителии и строме

влагалища согласуется с результатами аналогичных работ, проведенных у здоровых женщин репродуктивного возраста [Hodgins M.B. 1998, Pelletier G. 2000, Taylor A.H. 2008]

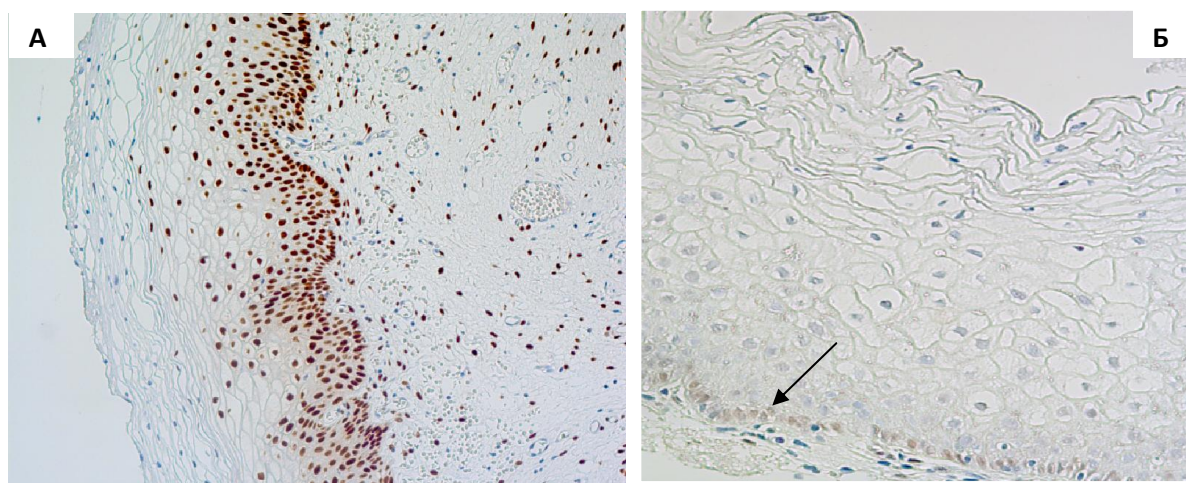


Рисунок 8. А - ядерное окрашивание эстрогеновых рецепторов α в клетках эпителия и фибробластах стромы влагалища (коричневая окраска), $\times 200$; Б – ядерное окрашивание андрогеновых рецепторов в базально-парабазальных клетках эпителия влагалища, $\times 400$

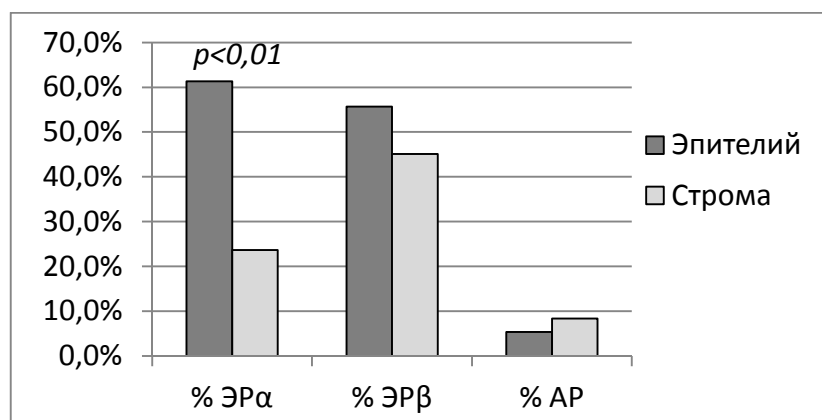


Рисунок 9. Распределение количества клеток, экспрессирующих эстрогеновые (ЭР α и ЭР β) и андрогеновые (АР) рецепторы в слизистой влагалища у девочек с ВДКН в период пубертата

У 2 из 8 пациенток отмечался постоперационный рубцовый стеноз интроитуса после первой интроитопластики. В течение месяца перед повторной операцией они получали локальную эстрогенотерапию (эстриолсодержащий крем Овестин). Среди девочек, которым интроитопластика проводилась впервые, одна пациентка получала Новинет в течение 4 месяцев перед операцией в связи со вторичной аменореей. Было выявлено снижение экспрессии ЭР α во влагалище у пациенток, которым оперативное лечение проводилось повторно и которые получали лечение эстрогенами (Рисунок 10). У пациенток с первичной интроитопластикой процент ЭР α -позитивных клеток составил 51,6% (46,6; 61,6), тогда как у девочек с постоперационным рубцовым стенозом этот показатель соответствовал 38,34% (35,5; 41,18), $p=0,045$. Доля клеток, экспрессирующих ЭР α у пациенток, получавших эстрогенотерапию составила 41,18% (35,5; 42,5) vs 55,8% (52,5; 61,6) у пациенток без нее, $p=0,025$.

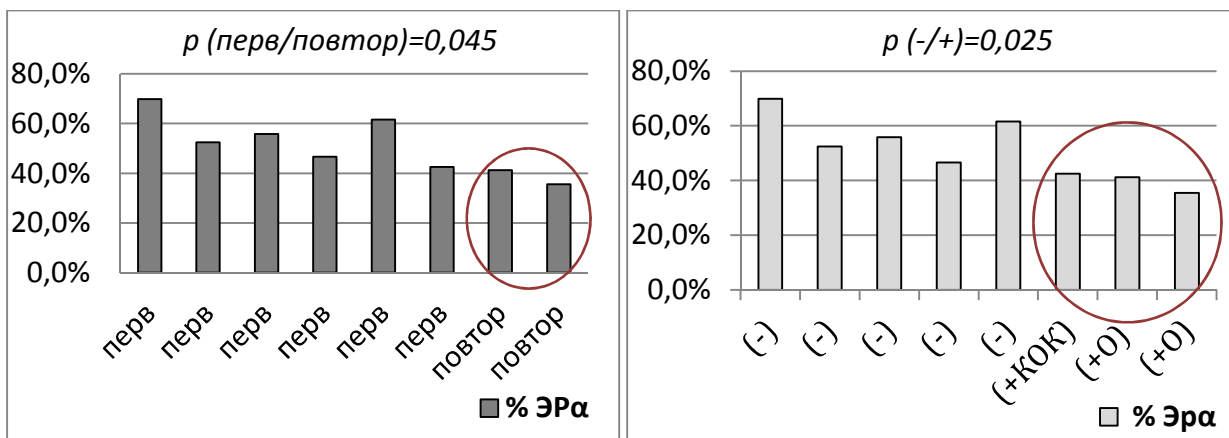


Рисунок 10. А – количество ЭРа-положительных клеток во влагалище у пациенток с первичной (перв) и повторной (повтор) интроитопластикой; Б – количество ЭРа-положительных клеток у пациенток без терапии эстрогенами (-), на фоне Новинета (+КОК) и местной эстрогенотерапии (+О)

По данным литературы при использовании у женщин репродуктивного и менопаузального возраста комбинированных оральных контрацептивов и местной терапии эстрогенами отмечается увеличение экспрессии и иммунореактивности ЭРа и ЭРβ в вагинальной стенке [Blakeman P.J. 2000, Bryś M. 2009, Fu X. 2003]. Таким образом, снижение экспрессии ЭРа у девочек с ВДКН, подвергающихся повторной интроитопластике, может говорить о снижении у них чувствительности к местной терапии эстрогенами. Статистически значимой разницы в количестве АР-положительных клеток у девочек с ВДКН в зависимости от кратности проведения II этапа пластики и получения эстрогенотерапии выявлено не было ($p=0,74$ и $p=0,29$, соответственно).

Не было выявлено значимой корреляции между количеством ЭР- и АР-положительных клеток и уровнем Тс и 17-ОНП в сыворотке крови, что может объясняться удовлетворительной компенсацией пациенток перед проведением II этапа феминизирующей пластики, соответственно низким содержанием андрогенов в крови.

Также достоверная корреляция отсутствовала между числом клеток, экспрессирующих вышеперечисленные рецепторы, и вирилизацией наружных половых органов. Число клеток, несущих рецепторы, и их локализация во влагалище не различались между пациентками с СТ и ПВ формами, а также с регулярным и нерегулярным менструальным циклом. Последнее подтверждается и в других исследованиях, доказывающих отсутствие влияния возраста, фазы и характера менструального цикла на экспрессию рецепторов к эстрогенам и андрогенам [Ildgruben A. 2005; Pérez-López F.R. 1993].

Эстрогеновые и андрогеновые рецепторы в малых половых губах девочек с ВДКН допубертатного возраста

Распределение данных рецепторов было исследовано также в участках крайней плоти (препуциум), прилежащей к гипертрофированному клитору и являющейся производной малых половых губ (МПП), у 13 пациенток с ВДКН допубертатного возраста (2,4 года (2,1; 4), СТ/ПВ = 11/2), которым была проведена клиторопластика. У 8 пациенток

отмечалась умеренная вирилизация (Прадер III), Прадер IV имел место у 4 девочек, у 1 пациентки отмечалась только гипертрофия клитора и высокая задняя спайка (Прадер II). К моменту оперативного лечения девочки находились в компенсации (17-ОНП 8,7 нмоль/л (0,5; 33,4), Тс – 0,18 нмоль/л (0,17-0,245), активность ренина плазмы (АРП) – 1,95 нг/мл/ч (0,5; 3,4)).

Количество ЭРа-позитивных клеток в тканях МПГ составило 16,8% (12,7; 22,8). ЭРа локализовались в клетках ПБ слоя эпидермиса, в фибробластах и гладкомышечных клетках дермы (Рисунок 11 А). На внутренней поверхности МПГ, прилежащей к клитору, иммунореактивность ЭРа в дерме была выше, по сравнению с наружной поверхностью. Статистически значимой разницы в общем количестве клеток, экспрессирующих ЭРа в эпидермальном слое (14,7% (11,8; 25,3)) по сравнению с дермальным (18,2% (16,3; 31,8)) выявлено не было ($p>0,05$) (Рисунок 12). Количество клеток, несущих андрогеновые рецепторы, составило 11,1% (8,1; 17,6). АР локализовались преимущественно в клетках прилежащих к базальному слою эпидермиса, в эпителиальных клетках протоков желез и в незначительном количестве в дерме (Рисунок 11 Б). Иммунореактивность АР на внутренней поверхности МПГ в эпидермальном слое была ниже, чем на наружной. Число окрашенных клеток АР в эпидермисе было статистически значимо выше, чем в дерме (15,95 % (10,2; 18,7) против 1,8% (1,5; 3), соответственно, $p<0,01$) (Рисунок 12). Эстрогеновые рецепторы β интенсивно экспрессировались (93,57% (86,2; 95,7)) в клетках всех слоев эпидермиса, фибробластах дермы, в эндотелии сосудов, эпителиальных клетках протоков апокринных желез и гладкомышечных клетках малых половых губ. Распределение и соотношение эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в эпидермисе и дерме МПГ сопоставимы с данными литературы о локализации рецепторов стероидных гормонов в вульве здоровых женщин репродуктивного возраста [Hodgins M.B. 1998, Nieves M.A. 2008, Taylor A.H. 2008].

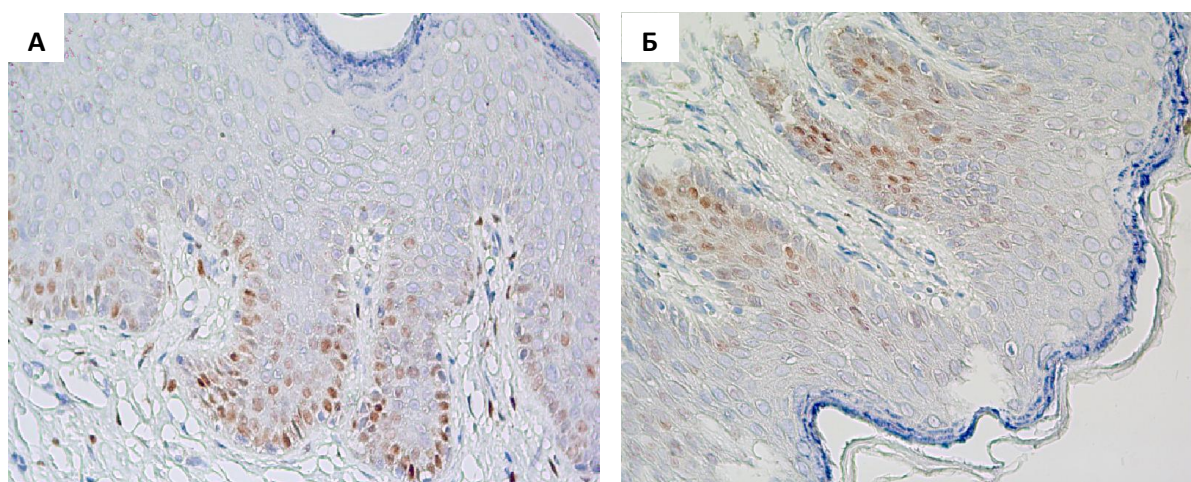


Рисунок 11. А - ядерное окрашивание эстрогеновых рецепторов α в клетках базально-парабазального слоя эпидермиса малых половых губ; Б - ядерное окрашивание андрогеновых рецепторов в эпидермисе малых половых губ, х400

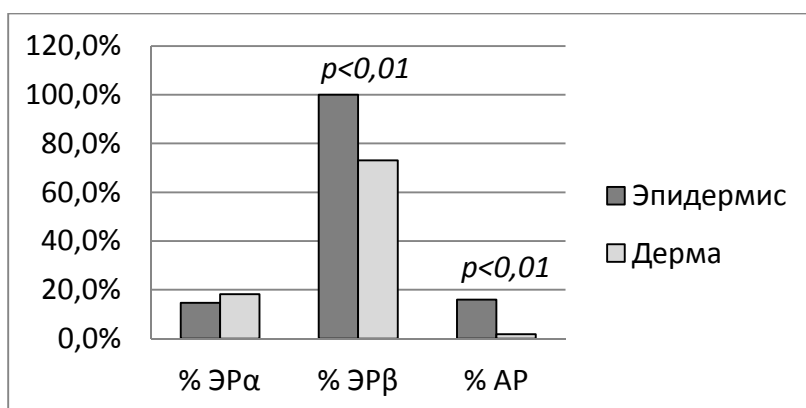


Рисунок 12. Распределение и соотношение количества клеток, экспрессирующих эстрогеновые (ЭР α и ЭР β) и андрогеновые (АР) рецепторы в тканях малых половых губ у девочек с ВДКН допубертатного возраста

Не было выявлено значимой корреляции между общим числом ЭР- и АР-позитивных клеток в тканях МПГ и показателями Тс и 17-ОНП в крови, что может быть опять же объяснено тем, что пациентки при обследовании находились в компенсации заболевания и имели одинаково низкие уровни этих гормонов. Достоверная корреляция отсутствовала между количеством иммунопозитивных клеток и вирилизацией гениталий. Между группами пациенток младше 4 лет ($n=10$) и старше 6 лет с начавшимся адренархе ($n=3$) не было выявлено различий в количестве ЭР α -, ЭР β - и АР-позитивных клеток ($p=0,61$, $p=0,64$ и $p=0,7$, соответственно). Статистически значимая разница между пациентками с преобладавшими в группе степенями вирилизации наружных гениталий при рождении (Прадер III и Прадер IV) в количестве эстрогеновых α и β , и андрогеновых рецепторов также отсутствовала (ЭР α 15,4% (12; 18,35) при Прадер III против 20,8% (14,7; 25) при Прадер IV, $p=0,5$); ЭР β 94% (86,2; 96,2) при Прадер III против 92,6% (88,1; 96,07) при Прадер IV, $p=0,9$) и АР 15,6% (7,08; 20,9) при Прадер III против 10,4% (6,04; 11,9) при Прадер IV, $p=0,2$).

Таким образом, можно заключить, что закладка в эмбриогенезе рецепторов стероидных гормонов в тканях малых половых губ и влагалища у пациенток с ВДКН происходит в тех же структурах, что и у здоровых женщин, а экспрессия этих рецепторов не зависит от формы и вирилизации наружных гениталий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

1. В пубертатном возрасте 75,3% пациенток с ВДКН имеют анатомическое сужение входа во влагалище (стеноз интроитуса), которое в 94,8% случаев требует проведения интроитопластики и в 5,2% - проведения бужирования. При сольтеряющей форме частота стеноза достоверно выше, чем при вирильной и возрастает параллельно с увеличением выраженности вирилизации гениталий при рождении (от 30% при Прадер II до 100% при Прадер IV и V).
2. Возраст менархе у девочек с ВДКН соответствует 13 годам и сопоставим с данными в общей популяции. При наличии генотипа 0 и А и, соответственно, сольтеряющей форме ВДКН, менархе отмечается в среднем на 1 год позже (14,0 лет), чем при простой вирильной (13 лет). Отмечается высокая частота нарушений менструального цикла не только у пациенток в состоянии декомпенсации ВДКН (68%), но и у девочек с удовлетворительной компенсацией (50%).
3. Вне зависимости от генотипа и формы заболевания у девочек с ВДКН в период пубертата отмечается значительное уменьшение объема матки по сравнению с аналогичным показателем у пациенток с пубертатной гиперандрогенией (ГА) и в общей популяции. На эстрогензависимое созревание матки оказывает влияние компенсация заболевания в раннем пубертате.
4. Степень эстрогенизации тканей интроитуса и влагалища, которая обуславливает результаты интроитопластики у пациенток с ВДКН, в период пубертата зависит только от текущего состояния компенсации. При декомпенсации заболевания отмечается тенденция к атрофии слизистой вагинального эпителия, которая более выражена при сольтеряющей форме, чем при простой вирильной.
5. Распределение рецепторов к эстрогенам и андрогенам у девочек с ВДКН в тканях влагалища и малых половых губ не нарушено. Их экспрессия в допубертатном и пубертатном периодах не зависит от формы ВДКН и вирилизации наружных гениталий. У пациенток с ВДКН, подвергающихся повторной интроитопластике, отмечается снижение экспрессии рецепторов к эстрогенам в слизистой влагалища при неизменной экспрессии андрогеновых рецепторов, что указывает на снижение местной чувствительности к эстрогенам.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем пациенткам с классическими формами ВДКН в периоде полового созревания необходимо проведение клинического осмотра и исследование гормональных показателей в крови (17-гидроксипрогестерон, тестостерон) каждые 3 месяца, а также проведение комплексного динамического обследования каждые 6 месяцев.
2. Помимо клинического осмотра и исследования гормонального профиля, у девочек с ВДКН целесообразно проведение ультразвукового исследования органов малого таза и цитологической оценки влагалищного мазка как дополнительных методов обследования при оценке степени компенсации заболевания и общей эстрогеновой насыщенности в период полового созревания.
3. Цитологическое исследование мазков может использоваться как дополнительный метод определения готовности тканей наружных половых органов к проведению интроитопластики, особенно у пациенток с сольтеряющей формой ВДКН.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Копылова И.В., Карева М.А., Глыбина Т.М., Петеркова В.А. Менструальная функция и размеры матки у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т58. - №4 (2) – С. 28-29.
2. Копылова И.В., Карева М.А., Петеркова В.А. Менструальная функция у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников// Материалы I национального форума «Репродуктивное здоровье как фактор демографической стабилизации», Ростов-на-Дону. – 2012. - С. 16-17.
3. Копылова И.В., Карева М.А., Гарунова М.Б., Сибирская Е.В., Глыбина Т.М. Факторы риска снижения фертильности у девочек-подростков с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников// Материалы Первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века», Москва. – 2012. - С. 78-79.
4. Копылова И.В., Глыбина Т.М., Яровая И.С., Карева М.А. Размеры матки у девочек с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников// Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии», Москва. - 2013. - С. 24-26
5. Копылова И.В., Карева М.А. Факторы риска снижения фертильности у пациенток с врожденной дисфункцией коры надпочечников (обзор литературы)// **Проблемы эндокринологии.** – 2013.- Т.59. - № 3. – С. 51-56.
6. Копылова И.В., Яровая И.С., Карева М.А. Корреляция генотип-фенотип у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников// Материалы I Научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья девочек», Москва. - 2013. – С. 75-77
7. Kopylova I., Yarovaya I., Glybina T., Kareva M. Reduced uterus body length in girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH)// Hormone Research in Paediatrics, Abstracts 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, Milan, Italy.- 2013. – Vol. 80 (suppl 1). - P. 204

8. Копылова И.В., Блох С.П., Карева М.А., Яровая И.С., Руднева Е.А., Гарунова М.Б., Сибирская Е.В., Глыбина Т.М. Эстрогенизация наружных половых органов у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников в период пубертата// **Проблемы репродукции.** – 2014.- №2. – С. 35-42.
9. Kopylova I., Blokh S., Orlova E., Yarovaya I., Kareva M. The Vaginal Maturation Index as a marker of local sensitivity to estrogens in girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH) during puberty// *Hormone Research in Paediatrics, Abstracts 53rd Annual Meeting for European Society for Paediatric Endocrinology, Dublin, Ireland.* – 2014. – Vol. 82 (suppl 1). - P. 287
10. Копылова И.В., Сыроева В.Ю., Глыбина Т.М., Карева М.А. Экспрессия эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в тканях наружных половых органов у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников // **Проблемы эндокринологии.** – 2014. - Т.60. - №6. – С. 14-20.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АР – андрогеновый рецептор
- ВДКН – врожденная дисфункция коры надпочечников
- ВПО – внутренние половые органы
- ГА – синдром пубертатной гиперандрогении
- ДМК – дисфункциональные маточные кровотечения
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИС – индекс созревания
- КП – поверхностные кардиоциклические клетки эпителия влагалища
- МПП – малые половые губы
- НМЦ – нарушения менструального цикла
- НПО – наружные половые органы
- ПБ – парабазальные клетки эпителия влагалища
- ПВ – простая вирильная форма врожденной дисфункции коры надпочечников вследствие дефицита 21-гидроксилазы
- ПР – промежуточные клетки эпителия влагалища
- РМЦ – регулярный менструальный цикл
- СТ – сольтерьяющая форма врожденной дисфункции коры надпочечников вследствие дефицита 21-гидроксилазы
- Тс – тестостерон
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- Э2 – эстрадиол
- ЭР – эстрогеновый рецептор
- ЭР α , ЭР β – изоформы эстрогенового рецептора (α и β)
- 17-ОНП – 17-гидроксипрогестерон
- CYP21A2 (CYP21)* – ген 21-гидроксилазы