

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ЭНДОКРИНОЛОГИИ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

**МАКРЕЦКАЯ НИНА АЛЕКСЕЕВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВРОЖДЕННОГО  
ГИПОТИРЕОЗА: АНАЛИЗ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

14.01.02 – Эндокринология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научный            руководитель:**

доктор    медицинских    наук,  
профессор,    академик    РАН  
Дедов Иван Иванович

Москва 2018

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>3</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>10</b>
1.1. Этиология врожденного гипотиреоза: историческая справка	10
1.2. Эмбриогенез щитовидной железы	13
1.3. Дисгенезия щитовидной железы	15
1.4. Биосинтез тиреоидных гормонов	26
1.5. Дисгормоногенез	29
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>42</b>
2.1. Характеристика исследуемых пациентов	42
2.2. Контрольная группа	43
2.3. Дизайн исследования	43
2.4. Клинические и лабораторные методы исследования	44
2.5. Молекулярно-генетическое исследование	46
2.6. Высокопроизводительное параллельное секвенирование	46
2.7. Мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)	49
2.8. Статистический анализ	49
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	<b>51</b>
3.1. Клиническая характеристика группы пациентов с врожденным гипотиреозом	51
3.2. Результаты ультразвукового исследования щитовидной железы	51
3.3. Результаты молекулярно-генетического исследования	52
3.4. Моногенные изменения и клиническая характеристика пациентов	55
3.5. Дигенные изменения и клиническая характеристика пациентов	84
3.6. Статистическое сравнение пациентов с врожденным гипотиреозом и контрольной группой	89
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>92</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>99</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>100</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b>	<b>102</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>103</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Врожденный гипотиреоз (ВГ) – гетерогенная группа заболеваний, проявляющаяся врожденным дефицитом гормонов щитовидной железы.

По данным литературы частота встречаемости врожденного гипотиреоза составляет 1 на 3000-4000 новорожденных [1]. На сегодняшний день диагностика и лечение ВГ не вызывает затруднений. Программа обследования всех новорожденных на ВГ впервые была запущена в Канаде в 1971 году, и в настоящий момент проводится в большинстве стран мира. В 1993 году в Российской Федерации введена государственная программа неонатального скрининга на ВГ.

К настоящему моменту было идентифицировано 12 генов, ответственных за развитие врожденного гипотиреоза. По функции гены-кандидаты подразделяются на две группы. К первой группе отнесены гены *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, отвечающие за эмбриональное развитие щитовидной железы, соответственно мутации в них обуславливают возникновение различных форм дисгенезии щитовидной железы (ЩЖ) [2]. Вторая группа представлена генами *TPO*, *IYD*, *SLC26A4*, *TG*, *SLC5A5*, *DUOX2*, *DOUXA2*, участвующими в процессе биосинтеза тиреоидных гормонов, в свою очередь мутации в данной группе генов проводят к дисгормоногенезу и, как следствие, формированию зоба [2]. Генетическая верификация диагноза у пациентов с наследственными формами врожденного гипотиреоза, необходима для проведения генетического консультирования в вопросах дальнейшего планирования семьи, и позволит расширить наши представления о молекулярно-генетической природе ВГ.

### **Степень разработанности темы исследования**

Данные об этиологии ВГ на сегодняшний день основаны на результатах ультразвукового исследования и сцинтиграфии ЩЖ. Согласно имеющейся информации, большинство случаев (80–85 %) ВГ обусловлены нарушениями органогенеза железы, приводящими к агенезии, гипоплазии или эктопии органа [2–4]. Остальные 15–20 % случаев вызваны дефектами на одной из стадий биосинтеза тиреоидных гормонов [2–4]. Тем не менее, схожесть фенотипических проявлений различных форм ВГ не позволяет установить точный этиологический диагноз только на основании методов визуализации, и требуют дополнительной молекулярно-генетической диагностики. Проводившиеся ранее исследования по изучению распространённости моногенных форм врожденного гипотиреоза включали в себя анализ лишь отдельных генов-кандидатов [4–11]. Таким образом, истинная частота встречаемости наследственных форм заболевания на сегодняшний день остается неизученной.

Ранее в Российской Федерации не проводилось структурированная оценка частоты моногенных форм ВГ. В связи с чем, является актуальным выполнение молекулярно-генетического анализа (методом высокопроизводительного параллельного секвенирования) пациентам с ВГ, а также проведение оценки генотип-фенотип корреляции.

### **Цель исследования**

Определить частоту моногенных форм заболевания в группе пациентов с врожденным гипотиреозом.

### **Задачи исследования**

1. Используя метод высокопроизводительного параллельного секвенирования, провести молекулярно-генетический анализ 12 генов-кандидатов, ответственных за развитие врожденного гипотиреоза (*TPO*, *SLC5A5*, *PAX8*, *NKX2-5*, *IYD*, *SLC26A4*, *TG*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *DUOX2*, *DOUXA2*, *TSHR*) у пациентов с ВГ и в контрольной группе.
2. Оценить молекулярно-генетические характеристики пациентов с врожденным гипотиреозом.
3. Определить наиболее частые генетические формы ВГ.

### **Научная новизна**

В данной работе впервые в Российской Федерации для молекулярно-генетической диагностики врожденного гипотиреоза был использован метод высокопроизводительного параллельного секвенирования, с помощью которого были изучены особенности наследственных форм ВГ на большой выборке пациентов.

Впервые в Российской Федерации разработана панель праймеров, включающая 12 генов-кандидатов, ответственных за развитие врожденного гипотиреоза (*TPO*, *SLC5A5*, *PAX8*, *NKX2-5*, *IYD*, *SLC26A4*, *TG*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *DUOX2*, *DOUXA2*, *TSHR*), проведен анализ относительной частоты мутаций в каждом из них - изучен вклад отдельных генов-кандидатов в структуру врожденного гипотиреоза.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

На основании полученных данных определена молекулярная основа врожденного гипотиреоза. Выявлено, что самой частой моногенной причиной

развития заболевания являются мутации в генах *TPO*, *DUOX2*.

Продемонстрирована высокая значимость молекулярно-генетического исследования для установки точного этиологического диагноза, результаты которого могут быть использованы при проведении пренатальной диагностики в семьях с верифицированным ранее молекулярно-генетическим диагнозом.

Применение метода высокопроизводительного параллельного секвенирования позволило выявить случаи с дигенным механизмом развития заболевания.

### **Методология и методы исследования**

Целевыми популяциями были пациенты с врожденным гипотиреозом и контрольная группа. Исследование было проведено пациентам из данных групп, соответствующие критериям включения и исключения.

В целях повышения репрезентативности выборки нами проведено внешнее (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, ГБУЗ «Эндокринологический диспансер ДЗМ», а также региональные больницы с отделениями детской эндокринологии) и внутреннее (ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России) информирование о проведении исследования. К популяции риска относились все пациенты, обследованные в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и других лечебных учреждениях, информированных о проведении исследования. В контрольную группу лица набирались только на базе ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Формирование выборок производилось произвольным образом. Отобранные нами критерии соответствия для выборки пациентов с ВГ позволили включить в исследования пациентов с разнообразными симптомокомплексами, что повысило качественные характеристики выборки. Предметом исследования являлась врожденная патология, таким образом проведение клинического обследования и молекулярно-генетического исследования на выборке пациентов в возрастной группе до 18 лет,

было достаточно полным по отношению к генеральной совокупности. В контрольную группу вошли лица старше 18 лет, возраст обследуемых не относился к критериям включения. Разница в возрасте между пациентами с ВГ и здоровыми лицами не может негативно влиять на результаты молекулярно-генетического исследования, так как данные изменения являются врожденными.

Достижение целей и задач исследования производилось при помощи общенаучных методов. Пациентам проведено специфическое обследование, способствующее диагностике клинических симптомов. Эксперимент представлял собой изучение молекулярно-генетических основ врожденного гипотиреоза, с последующим соотнесением результатов генетического исследования с фенотипом пациентов. Проведенный анализ результатов позволил сделать соответствующие выводы и сформулировать практические рекомендации.

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

Общая частота встречаемости моногенных форм среди пациентов с врожденным гипотиреозом составляет 38 % (95 %ДИ = 32 %–44 %).

Результаты молекулярно-генетического исследования демонстрируют превалирование дефектов генов дисгормоногенеза в структуре наследственных форм врожденного гипотиреоза. Врожденный гипотиреоз, обусловленный мутациями генов *TPO* и *DUOX2*, является наиболее распространенной моногенной формой врожденного гипотиреоза.

В группе пациентов с моногенными мутациями в генах дисгормоногенеза отсутствует корреляция генотип-фенотип.

Врожденный гипотиреоз вызван дигенными дефектами в 9 % (95 %ДИ = 4 %–16 %) среди выявленных нуклеотидных изменений. Наиболее часто выявлено сочетание мутаций в генах, ответственных за биосинтез тиреоидных гормонов.

Для определения формы ВГ показано проведение молекулярно-

генетического исследования методом высокопроизводительного параллельного секвенирования ввиду его высокой эффективности.

### **Степень достоверности**

В данном исследовании достоверность выводов и рекомендаций подтверждается анализом научных работ по изучению этиологии ВГ; применением диагностических методов согласно установленным стандартам; интерпретацией полученных результатов в соответствие с международными рекомендациями; применением статистического анализа при обработке результатов.

### **Апробация полученных результатов**

Апробация диссертационной работы состоялась 13 февраля 2018 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава России. Основные положения диссертации обсуждены на семинаре «Инновации Thermo Fisher Scientific для научных открытий» (Москва, 2015), 54-ой ежегодной встрече европейского общества детских эндокринологов (ESPE, Барселона, 2015), VII Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва, 2016), III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2017).

### **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, в том числе 4 статьи в отечественных журналах, включенных 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 121 страницы машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы результатов собственных наблюдений, главы обсуждение результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 17 рисунками. Список использованной литературы включает 226 источников: 3 отечественных и 223 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Этиология врожденного гипотиреоза: историческая справка

Первые масштабные исследования по изучению этиологии врожденного гипотиреоза и распространённости различных форм заболевания были основаны на методах визуализации [3, 4]. В работе Н. Devos с соавт. ультразвуковое исследование щитовидной железы и скинтиграфия с  $^{99m}\text{Tc}$ -Пертехнетатом проведены 230 пациентам с ВГ [3]. В результате эктопия выявлена в 61,3 % случаев ( $n = 141$ ), аплазия в 15,6 % ( $n = 36$ ), гемиагенезия в 0,4 % ( $n = 1$ ) и зоб у 4,3 % пациентов ( $n = 10$ ) [3]. В исследовании L. Bubuteishvili с соавт. ультразвуковая диагностика и скинтиграфия с I-123 проведены 66 пациентам с ВГ, авторами получены следующие результаты: эктопия 63,6 % ( $n = 42$ ), аплазия 15,2 % ( $n = 10$ ), нормальный объем ЩЖ 21,2 % ( $n = 14$ ) [4].

Полученные данными демонстрировали превалирование различных подтипов дисгенезии ЩЖ в структуре заболевания, что позволило предположить, что основной причиной развития ВГ являются мутации в генах-кандидатах, ответственных за эмбриогенез щитовидной железы. Последующие исследования были направлены на подтверждение данной гипотезы. Однако, с учетом трудоемкости секвенирования по Сэнгеру, молекулярно-генетические исследования включали анализ отдельных генов-кандидатов в фенотипически соответствующих группах пациентов [5–11]. Результаты наиболее крупномасштабных исследований приведены в Таблице 1.

**Таблица 1 – Результаты молекулярно-генетических исследований методом секвенирования по Сэнгеру по изучению распространенности моногенных форм врожденного гипотиреоза**

Автор, год	Количество пациентов	Фенотип	Генотип
Macchia P.E с соавт., 1998 [5]	145	Различные формы дисгенезии ЩЖ	<i>PAX8</i> – 2,07 % (n = 3)
Narumi S, с соавт., 2009 [6]	102	Эктопия (n = 37) Аплазия (n = 6) Гипоплазия (n = 8) Зоб (n = 11) Нормальный объем (n = 29) Исследование не проводилось (n = 11)	<i>TSHR</i> – 5,88 % (n = 6)
Narumi S, с соавт., 2010 [7]	102	Эктопия (n = 37) Аплазия (n = 6) Гипоплазия (n = 8) Зоб (n = 11) Нормальный объем (n = 29) Исследование не проводилось (n = 11)	<i>PAX8</i> – 1.96 % (n = 2), <i>NKX2-1</i> – 0 % (n = 0), <i>NKX2-5</i> – 0 % (n = 0), <i>FOXE1</i> – 0 % (n = 0)
Narumi S, с соавт., 2011 [8]	14	Зоб (n = 14)	<i>DUOX2</i> – 57.14 % (n = 8), <i>TG</i> – 14.29 % (n = 2), <i>TPO</i> – 14.29 % (n = 2),
Eva Al Taji, с соавт., 2007 [9]	170	Эктопия (n = 8) Аплазия (n = 26) Гипоплазия (n = 75) Гемиагенезия (n = 1)	<i>PAX8</i> – 0,59 % (n = 1), <i>NKX2-1</i> – 0 % (n = 0), <i>NKX2-5</i> – 0 % (n = 0), <i>FOXE1</i> – 0 % (n = 0)

		Нормальный объем (n = 39) Исследование не проводилось (n = 21)	
Jin H.Y, с соавт., 2014 [10]	43	Зоб и эктопия ЩЖ (n = 43)	<i>TSHR</i> – 4,98 % (n = 3), <i>DUOX2</i> – 41,86 % (n = 18), Сочетание мутаций в <i>TSHR</i> и <i>DUOX2</i> - 4,65 % (n = 2)
Muzza M., с соавт., 2013 [11]	30	Зоб и ЩЖ с нормальным объемом (n = 30)	<i>DUOX2</i> – 36.67 % (n = 11)

**Примечание** – молекулярно-генетические исследование проводились секвенированием по Сэнгеру, только в генах, указанных в графе «Генотип».

Таким образом выявлено, что ВГ, ассоциированный с зобом, является результатом дефектов в генах гормоногенеза [8, 10, 11]. В структуре гипотиреоза, обусловленного дисгенезией ЩЖ, напротив, молекулярная основа была установлена менее чем у 6 % обследуемых [5–7, 9], это позволило предположить, что большинство случаев являются спорадическими. Однако, при проведении анализа родословных пациентов с ВГ и дисгенезий ЩЖ, была выявлена высокая частота как семейных случаев гипотиреоза, так и морфологических аномалий щитовидной железы у эутиреоидных родственников первой линии родства (7,9–21,0 %), по сравнению с контрольной выборкой (0,9 %) [12], что не позволяло исключать моногенную природу заболевания. Тем более, что проведенные исследования были ограничены по количеству проанализированных генов.

Внедрение метода высокопроизводительного параллельного секвенирования, позволило увеличить объем и скорость проведения исследования. И в 2013 году были опубликованы первые данные с более высоким процентом выявления мутаций (21,3 %) [13].

## 1.2. Эмбриогенез щитовидной железы

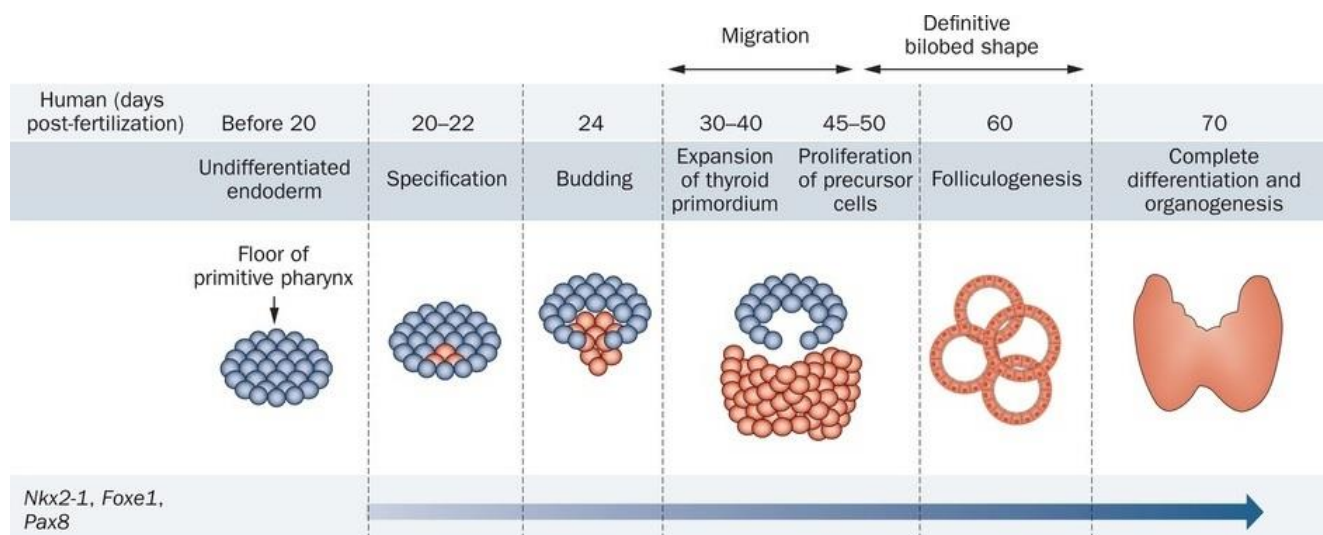
Щитовидная железа человека представляет собой непарный орган, состоящий из двух долей, соединенных между собой перешейком. В норме ЩЖ расположена на передней поверхности шеи, фиксирована к передней и боковой поверхностям трахеи и гортани соединительной тканью.

Клетки ЩЖ имеют двойственное происхождение. Медиальный зачаток железы формируется из энтодермы передней кишки между I и II парами глоточных карманов, и впоследствии дает начало фолликулярным клеткам, два латеральных зачатка имеют нейроэктодермальное происхождение, образуются из четвертой пары глоточных карманов и нервного гребня и являются источником парафолликулярных клеток [14].

Первым этапом формирования ЩЖ является инвагинация клеток энтодермы, с последующим паттернированием и спецификацией клеточных клонов [15]. Данный процесс контролируется клеточно-автономными факторами, такими как регуляторы транскрипции, и индуктивными сигналами от окружающих тканей [15, 16]. На 22 день эмбрионального развития прогениторные фолликулярные клетки ЩЖ человека приобретают органоспецифическую молекулярную сигнатуру с коэкспрессией факторов транскрипции *PAX8* и *NKX2-1*, на 33 день гестации дополнительно начинает экспрессироваться *FOXE1* [17]. В дальнейшем происходит пролиферация клеток-предшественников и их вращение в подлежащую мезенхиму вдоль глоточной кишки каудально по отношению к первой паре жаберных карманов [18]. Впоследствии зачаток щитовидной железы приобретает форму вытянутой полости (эпителиального тяжа), соединяясь с глоткой узким каналом (щитовидно-язычным протоком) [19]. Далее зачаток ЩЖ начинает мигрировать в поперечном направлении в область конечной локализации и тянет щитовидно-язычный проток, в это время происходит слияние с латеральными зачатками на уровне 4-ых пар жаберных карманов [19]. Процесс транслокации зачатка щитовидной железы контролируется работой

транскрипционного фактора *FOXE1*, что показано на мышинных моделях [20]. После завершения данного процесса происходит раздвоение и расширение зачатка железы, начинается формирование правой и левой доли, соединенные перешейком, к 8-й неделе гестации щитовидно-язычный проток атрофируется [19]. Происходит быстрый рост органа за счет разрастания эпителия и мезенхимы [19].

Структурная дифференцировка органа является завершающим этапом развития, и сочетает в себе структурные и функциональные изменения. Процесс запускается на 7 неделе эмбриогенеза и занимает в среднем около четырех недель [16]. Структурные изменения включают в себя поляризацию и адгезию фолликулярных клеток с образованием фолликулов, представляющих собой функциональную единицу щитовидной железы. На функциональном уровне, поляризованные тироциты приобретают способность синтезировать гормоны щитовидной железы [15]. Гистологически можно выделить несколько этапов дифференцировки ЩЖ: преколлоид, начальный коллоид и стадия фолликулярного роста [21]. Преколлоидная стадия развития наблюдается на 7-9 неделях гестации, в этот период ЩЖ представлена нитями компактных неполяризованных предшественников тироцитов. Начальная коллоидная стадия характеризуется появлением мелких фолликулов, образованных поляризующимися тироцитами на 10-11 неделях. И, наконец, с 12 недели гестации начинается прогрессирующий фолликулярный рост [21]. Щитовидная железа плода приобретает способность накапливать йодид и синтезировать тиреоидные гормоны на этапе начальной коллоидной стадии [15] (Рисунок 1).



**Рисунок 1 – Схематическое изображение процессов эмбриогенеза щитовидной железы и экспрессии факторов транскрипции у человека** (Fernández, L. P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease / L. P. Fernández, et al. // Nature Reviews Endocrinology. – 2015. – № 11. – P. 29–42. – С изменениями)

### 1.3. Дисгенезия щитовидной железы

Дисгенезия щитовидной железы – гетерогенная группа пороков развития органа, по данным мировой литературы опосредует 80-85 % случаев ВГ [3].

В структуре патологии выделяют аплазию ЩЖ (20-30 %), обусловленную нарушением процессов детерминации или ускорением апоптоза предшественников фолликулярных клеток ЩЖ, эктопию (50-60 %), вызванную преждевременным прекращением миграционного процесса, а также гипоплазию органа (5 %) [22–24]. Фенотипически для полной аплазии органа характерен тяжелый врожденный гипотиреоз. Помимо полной аплазии железы у ряда пациентов наблюдается гемагенезия ЩЖ, то есть отсутствие одной из долей, в большинстве случаев данное состояние не сопряжено с развитием гипотиреоза [22–24]. Дополнительно выделяют «кажущуюся аплазию», данный термин применяется в случаях отсутствия функциональной активности ткани ЩЖ по

результатам сцинтиграфии, и обнаружении гипоплазированного органа при ультразвуковом исследовании, а также выявления определяемых уровней тироксина и тиреоглобулина в крови [25, 26]. В зависимости от степени дифференцировки клеток ЩЖ и их функциональной состоятельности, среди пациентов с гипоплазией органа выделяют группу с гипотиреозом и эутиреозом [22–24]. Эктопия ЩЖ является наиболее распространённой формой заболевания. Эктопированные ткани железы в большинстве случаев локализуется по срединной линии, между слепым отверстием языка и нормальным предтрахеальным положением, кроме того описаны случаи эктопии органа в средостение, двенадцатиперстную кишку, желчный пузырь, желудок, поджелудочную железу и другие органы [27]. Примерно в 10 % случаев выявляется двойная эктопия органа [1]. Эктопированная щитовидная железа имеет округлую форму, с различной функциональной активностью ткани [22–24].

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза дисгенезии щитовидной железы, позволило выделить изолированные формы заболевания и ВГ в составе наследственных синдромов [28–48]. Так мутации в генах *PAX8* и *TSHR* приводят к изолированным нарушениям процессов эмбриогенеза ЩЖ [29–39, 47–48], мутации в *NKX2-1* и *FOXE1*, к синдрому «мозг-легкие-щитовидная железа» и синдрому Бамфорт-Лазарус соответственно [29–32, 40–43]. Обособленное положение занимает ген *NKX2-5*, экспрессия данного гена помимо щитовидной железы обнаружена еще и в сердце [44, 49]. Согласно этим данным, мутации в *NKX2-5* должны приводить к синдромальной форме заболевания, однако, на сегодняшний день нет достоверных данных ни о роли данного гена в самих процессах эмбриогенеза ЩЖ, ни о случаях мутаций, с доказанной патогенностью, приводящих к развитию дисгенезии ЩЖ [44, 45].

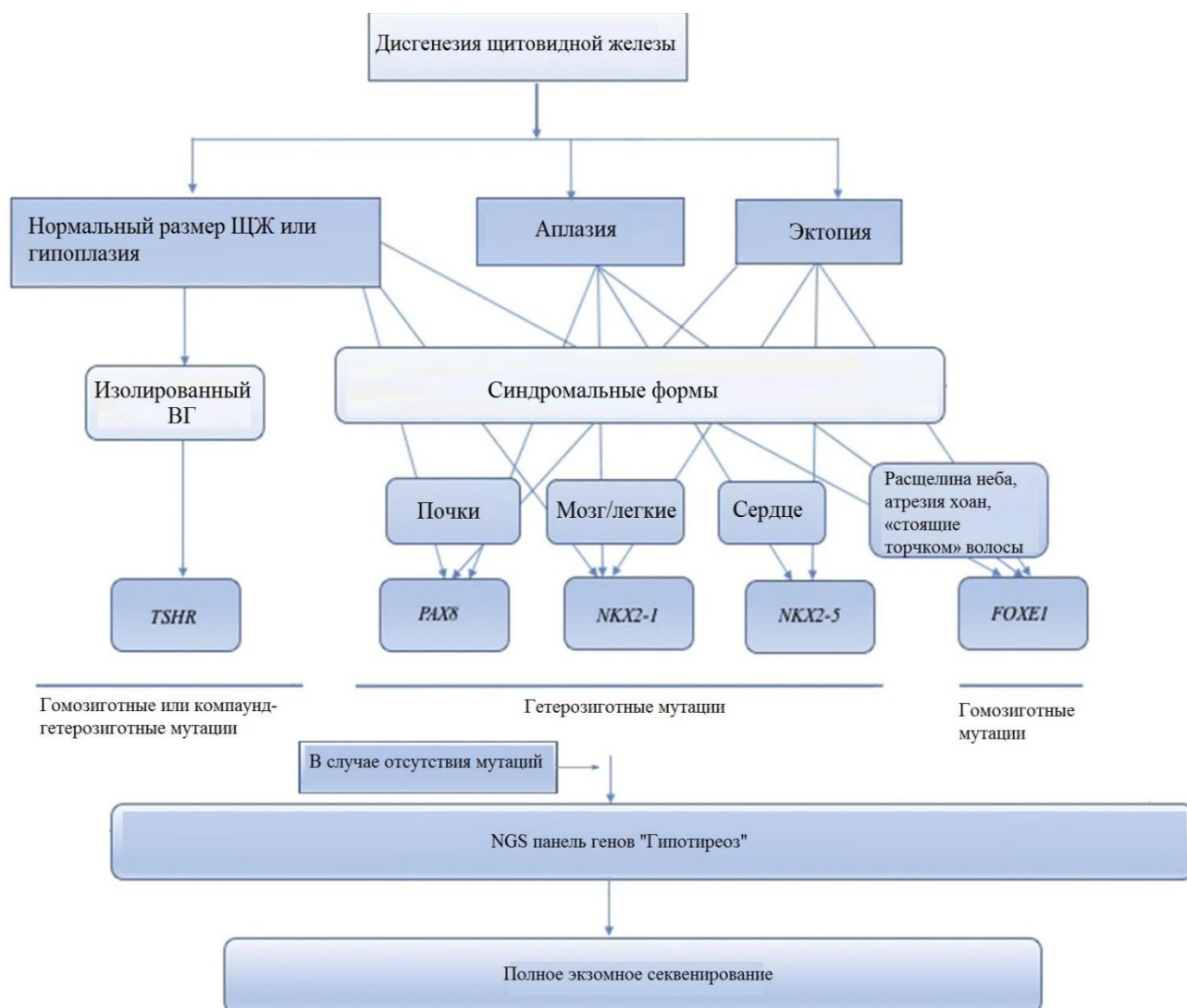
Следующим этапом, после изучения молекулярных причин гипотиреоза с дисгенезией ЩЖ, было определение частоты встречаемости моногенных форм в структуре данной патологии. С этой целью проведены молекулярно-генетические исследования всех генов-кандидатов (*NKX2-1*, *FOXE1*, *PAX8*, *TSHR*, *NKX2-5*) на



больших когортах пациентов. По результатам данных исследований выявлен низкий процент встречаемости моногенных форм заболевания 0,59–5,88 % [5, 7–9]. Помимо молекулярно-генетических исследований были проведены анализы родословных пациентов с дисгенезией ЩЖ и врожденным гипотиреозом, при этом семейные случаи заболевания были выявлены в 2 % случаев [50], другие врожденные аномалии ЩЖ, такие как срединные кисты шеи и добавочная пирамидальная доля, у родственников первой линии родства встречались значительно чаще (7,9–21,0 % случаев), по сравнению с контролем (0,9 % случаев) [12]. Эти данные указывали на наличие неизученных генетических механизмов наследования данного заболевания. Учитывая клиническую гетерогенность форм дисгенезии ЩЖ в рамках одной семьи, и высокий процент (92 %) дискордантности между монозиготными близнецами [52], было предположено, что причина в «неменделевском» механизме наследования заболевания [52]. И первой такой моделью стал «Second-hit», то есть наличие у таких пациентов сразу двух мутаций: герминальной (First-hit) и соматической (Second-hit) [52]. Другим возможным механизмом развития дисгенезии ЩЖ являются дигенные или полигенные мутации, причем не только в генах-кандидатах для данной патологии, но и в генах, участвующих в биосинтезе тиреоидных гормонов, что было выявлено у ряда пациентов [53, 54]. Другие исследования были направлены на изучение эпигенетических механизмов наследования, в результате при проведении бисульфидного секвенирования (BS-seq) группа ученых во главе с Abu-Khudir обнаружили тканеспецифическое дифференциальное метилирование региона (DMR) промотора гена *FOXE1* в щитовидной железе в отличие от лейкоцитов [55]. Более того, метилирование 2 последовательных CpG динуклеотидов в DMR приводило к уменьшению транскрипции *FOXE1* [55].

На сегодняшний день остается открытым вопрос патофизиологии дисгенезии щитовидной железы и требуется проведение дальнейших исследований. Наиболее рациональный алгоритм обследования пациентов с данной патологией, по рекомендациям ведущих специалистов, включает

детальное изучение фенотипических проявлений заболевания, с дальнейшим проведением молекулярно-генетических исследований согласно клиническим проявлениям (Рисунок 2) [54].



**Рисунок 2 – Алгоритм проведения молекулярно-генетического обследования пациентов с различными формами дисгенезии ЩЖ, на основе клинических проявлений.** (Stoupa, A. Update of Thyroid Developmental Genes/ A. Stoupa, et al. // Endocrinology and Metabolism Clinics. – 2016. – № 45 (2). – P. 243–254. – С изменениями)

#### Ген *PAX8*:

Ген *PAX8* (paired box gene) расположен на длинном плече хромосомы 2

(2q12–q14) и содержит 12 экзонов [32, 34]. Кодированный геном белок PAX8 является транскрипционным фактором, принадлежащий к семейству PAX, отличительной чертой которого является наличие консервативного ДНК-связывающего домена Paired box [32, 33]. PAX8 состоит из ДНК-связывающего домена, расположенного в N-концевой области, домена активации транскрипции, локализованного на C-конце, консервативного октапептида и центрального гомеодомена [33]. Максимальный уровень экспрессии *PAX8* выявлен в щитовидной железе [39], незначительные уровни в продолговатом мозге и почках [32]. В тканях ЩЖ PAX8 играет основную роль в процессе инициации дифференцировки клеток и поддержании дифференцированного состояния, что имеет большое значение для пролиферации клеток железы [35]. В щитовидных железах нокаутных мышей (*PAX8*  $-/-$ ) полностью отсутствовали фолликулярные клетки, а ткань была представлена только С-клетками, что свидетельствует о ключевом значении PAX8 в формировании именно фолликулярных клеток [39]. Кроме того, PAX8 связывается с промоторами генов *TPO*, *TG* и *SLC5A5* и, таким образом, контролирует их экспрессию [36–38]. В настоящий момент остается неизученной роль PAX8 в развитии и формировании почек и головного мозга. Как было сказано ранее, экспрессия мРНК *PAX8* обнаружена в тканях данных органов у мышей, тем не менее, у нокаутных особей не выявлено нарушений функционирования или развития этих органов [39].

Клиническая характеристика мутации гена *PAX8* впервые представлена в 1998 году [5]. К настоящему моменту описано более 20 инактивирующих мутаций в данном гене, большинство из них локализованы в Paired box домене [56]. Механизм наследования заболевания аутосомно-доминантный [57]. Фенотипические проявления мутаций в *PAX8* включают развитие гипотиреоза и гипоплазии щитовидной железы. Возраст манифестации недостаточности тиреоидных гормонов достаточно вариабелен, однако в большинстве случаев гипотиреоз диагностируется в неонатальном периоде [57]. В большинстве случаев при визуализации ЩЖ выявлена гипоплазия органа, описаны также случаи

полной аплазии или, наоборот, нормальных размеров железы [58]. Кроме того, зафиксировано два случая эктопии ЩЖ, ассоциированные с мутациями в гене *PAX8* [57]. Фенотипическая вариабельность данного заболевания, объясняется гаплонедостаточностью и доминантно-негативным эффектом мутаций [5].

### **Ген *NKX2-1*:**

Ген *NKX2-1* (*TTF-1*) (OMIM #600635), картирован на длинном плече хромосомы 14 (14q13) и содержит 3 экзона. Белок NKX2-1 является гомеодомен-содержащим фактором транскрипции [1]. Экспрессия *NKX2-1* в процессе эмбриогенеза начинается на 32-й день гестации в переднем мозге (базальных ганглиях и гипоталамусе), зачатке щитовидной железы, кроме того экспрессия мРНК *NKX2-1* обнаружена в легких с 11 недели гестации.

В тироцитах NKX2-1 регулирует экспрессию генов тиреоглобулина (*TG*), тиреопероксидазы (*TPO*), рецептора ТТГ (*TSHR*) и пендрина (*SLC26A4*) [59]. Процесс активации транскрипции *TG* и *TPO* происходит в синергии генов *NKX2-1* и *PAX8*. [60, 61]. В процессе дифференцировки клеток щитовидной железы NKX2-1 необходим для торможения процессов апоптоза, но вероятно не участвует в формировании самих клеток [19]. Данная гипотеза была предположена ввиду отсутствия у нокаутных мышей (*NKX2-1* *-/-*) и фолликулярных, и С-клеток ЩЖ.

В легких NKX2-1 является одним из ключевых регуляторов процесса морфогенеза [63] и участвует в активации транскрипции белков сурфактанта А, В, С (SP-A, SP-B и SP-C), а также в процессе дифференцировки пневмоцитов типа II. [64].

В головном мозге NKX2-1 занимает центральное положение в процессе спецификации и миграции интернейронов в медиальный ганглинарный бугорок и конечный мозг (лат. telencephalon). Тем не менее, к настоящему времени роль NKX2-1 в центральной нервной системе до конца не изучена [59].

В соответствии с характером экспрессии *NKX2-1*, наличие мутаций в данном гене обуславливает развитие синдрома «Мозг-легкие-щитовидная железа». Тип наследования заболевания аутосомно-доминантный, однако, по данным

литературы, более 50 % мутаций происходит *de novo* [64]. Первое описание пациента с мутацией в гене *NKX2-1* опубликовано в 1998 году Devriendt и соавт. [65]. Классическими проявлениями синдрома являются доброкачественная наследственная хорея, гипотиреоз и респираторный-дистресс синдром. Однако сочетание всех 3 признаков встречается примерно в 50 % случаев, а степень тяжести проявления каждого отдельного составляющего синдрома варьиабельна [63].

Отличительным признаком заболевания являются неврологические нарушения (частота встречаемости около 90 %), к которым относится доброкачественная наследственная хорея, тремор, дизартрия, мышечная гипотония и атаксия [28–31]. Возраст манифестация нарушений варьирует от периода новорожденности до подросткового возраста, с нарастанием клинических проявлений до второго десятилетия жизни [28]. Вторым по частоте встречаемости симптомом является нарушение функций легких [59]. В неонатальном периоде возможно развитие респираторного дистресс-синдрома, а в более старшем возрасте - рецидивирующий интерстициальных легочных инфекций, что ведет к формированию фиброза легких у пожилых пациентов [28]. Степень недостаточности гормонов щитовидной железы варьирует от манифестного гипотиреоза до субклинического (повышение уровня ТТГ, при нормальном значении уровня Т4 свободного) [28, 59]. Манифестация гипотиреоза, также, как и других проявлений данного заболевания, может наблюдаться от младенческого возраста до подросткового. Морфологические нарушения процесса эмбриогенеза щитовидной железы проявляются гипоплазией или агенезией. Описаны также случаи нормального размера железы [28, 59].

К настоящему моменту известно более 70 мутаций в гене *NKX2-1* [28]. Было замечено, что тяжесть клинических проявлений зависит от типа мутаций. К примеру, миссенс-вариации характеризуются более мягким течением, отсутствием одного или нескольких составляющих синдрома, а для обширных делеций характерно развитие респираторного дистресс-синдрома, врожденного

гипотиреоза и более тяжелых моторных нарушений [28, 59].

### Ген *FOXE1*:

В 1997 году был картирован ген *FOXE1* (OMIM #602617) на хромосоме 9 (9q22), состоящий из 1 экзона [66].

Фактор транскрипции FOXE1 (forkhead box E1) является членом семейства forkhead/winged-helix, для которых характерно наличие вилкообразного домена. FOXE1, по своей структуре, является фосфопротеином, состоит из N-концевой области, высоко консервативного ДНК-связывающего forkhead домена, альфа спирального полиаланинового участка и С-концевой области [41]. Изначально он был идентифицирован как ядерный белок специфический для тканей щитовидной железы, способный связываться с промоторами генов *TG* и *TPO* [67, 68], и регулировать уровень экспрессии данных генов в постнатальном периоде [69, 70]. Дальнейшие исследования выявили, что *FOXE1* контролирует процессы дорсо-каудальной миграции тироцитов [20]. Позднее экспрессия *FOXE1* во время эмбриогенеза была выявлена в тимусе, хоанах, ротовой полости, эпителии глотки, трахеи и пищевода [17], в постнатальном периоде - в эпидермисе, экзокринных клетках семенных канальцев яичек и волосяных фолликулах [41, 71].

В 1989 году Vamforth с соавт. описали двух sibсов со специфическим фенотипом: врожденный гипотиреоз, аплазия ЩЖ, расщелина неба, двусторонняя атрезия хоан, раздвоенный надгортанник и «стоящие торчком» волосы [40]. После изучения экспрессии гена *FOXE1*, Clifton-Bligh с соавт. провели молекулярно-генетическое исследование у данных пациентов и выявили наличие гомозиготной миссенс-мутации, а симптомокомплекс получил название синдром Бамфорт-Лазарус [41].

К настоящему моменту в гене *FOXE1* зарегистрировано всего 6 миссенс-мутаций, все расположенные в ДНК-связывающем домене [41–43, 72, 73]. Механизм наследования заболевания аутосомно-рецессивный [41–43, 72, 73]. Ведущими клиническими проявлениями синдрома являются гипотиреоз на фоне уменьшения размеров ЩЖ и расщелина неба, выявленные у всех пациентов с

данной патологией [41–43, 72, 73], что позволяет их отнести к «большим» признакам заболевания. Мутации в *FOXE1* не были выявлены у пациентов с изолированной дисгенезией ЩЖ [2].

#### **Ген *NKX2-5*:**

*NKX2-5* (OMIM #600635) расположен на длинном плече хромосомы 5 (5q34-Q35) и состоит из двух экзонов [74].

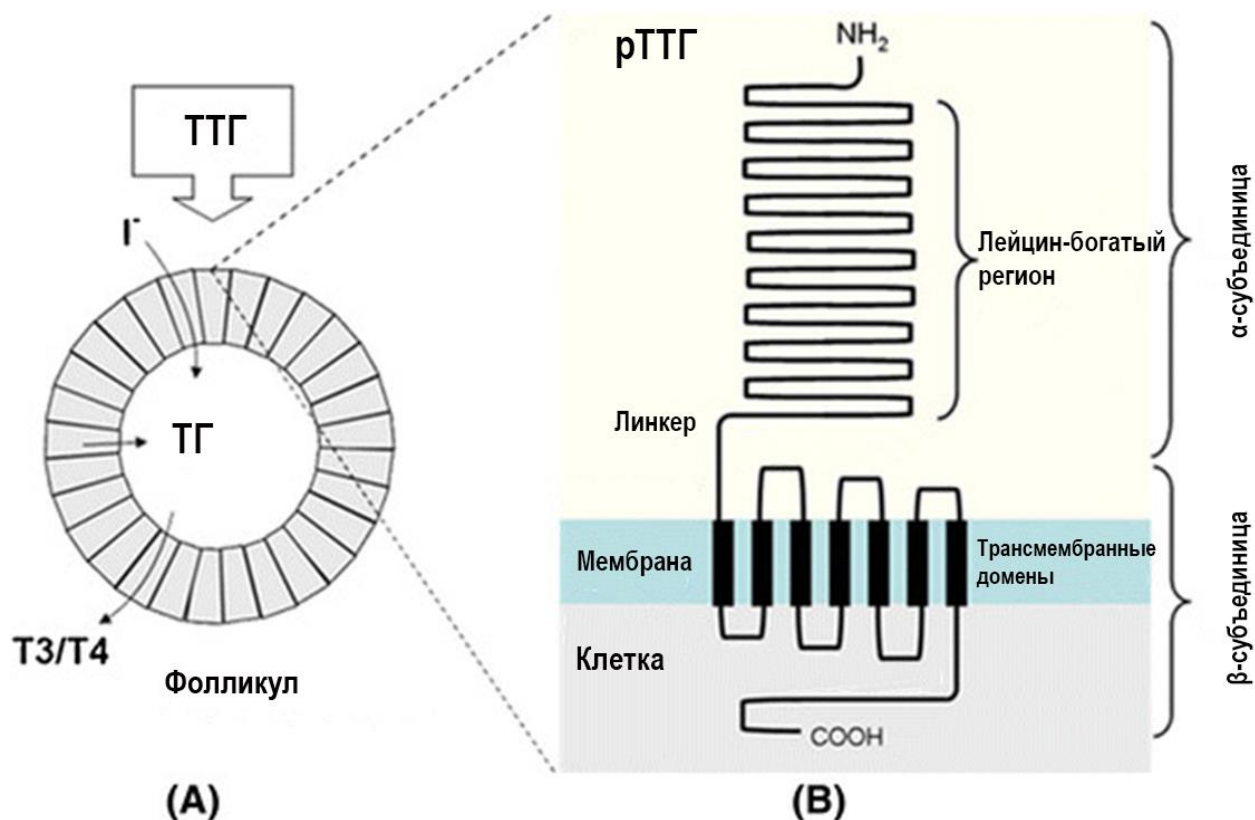
Белок *NKX2-5* относится к семейству факторов транскрипции *NK2*, содержащих консервативный гомеодомен [75]. *NKX2-5* состоит из N- и C-концевых регуляторных доменов, и гомеодомена, расположенного в 138-197 аминокислотных положениях [76]. Роль гомеодомена заключается в ядерной транслокации, взаимодействии с другими транскрипционными факторами и связывании с ДНК [77–80]. Первоначально экспрессия мРНК *NKX2-5* была выявлена в тканях сердца [49]. Функциональная активность *NKX2-5* в сердце широко изучена, в частности на моделях нокаутных мышей (*NKX2-5* <sup>-/-</sup>), и выражается в обеспечении нормального развития и созревания в процессе эмбриогенеза [81], а также в поддержании работы проводящей системы в постнатальном периоде [82]. К роли данного белка в процессах развития и функционирования щитовидной железы к настоящему моменту остается большое количество вопросов. Известно лишь о наличии экспрессии *NKX2-5* в зачатке щитовидной железы во время эмбриогенеза [44], в связи, с чем мутации в данном гене и были предложены как новый механизм формирования дисгенезии щитовидной железы [45]. После выдвижения данной теории M. Dentice с соав. провели скрининг группы пациентов с различными вариантами дисгенезии ЩЖ и врожденным гипотиреозом на наличие мутаций в гене *NKX2-5*, в результате чего у четырех обследуемых были идентифицированы 3 различные миссенс-мутации в гетерозиготном состоянии [45]. По данным методов визуализации у троих пациентов выявлена эктопия, у одного аплазия ЩЖ, незначительные нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы обнаружены только у одного пациента [45]. Функциональные исследования в ходе данной работы были проведены для

всех мутаций, при этом отмечалось снижение активации промоторов генов *TG*, *TPO* и *DUOX2* [45]. Несмотря на полученные результаты, патогенность изменений вызывает сомнения по ряду причин. Во-первых, данные мутации были выявлены у здоровых родителей, во-вторых, одна из мутаций идентифицирована у одного обследуемого из группы контроля [45]. Авторы исследования объясняют это различной степенью пенетрантности и вариабельной экспрессией гена на уровне тканей ЩЖ и сердца [45]. Однако на сегодняшний день в мировой литературе не представлено весомых доказательств выдвинутых гипотез.

### **Ген *TSHR*:**

Ген *TSHR* (OMIM #603372) расположен на длинном плече хромосомы 14 (14q31), содержит 10 экзонов [82]. Кодируемый геном рецептор ТТГ (рТТГ) сопряжен с G-белком и активирует классические эффекторы – цАМФ и фосфолипазу С [83]. Рецептор ТТГ представлен  $\alpha$ -субъединицей, расположенной с N-концевой стороны и включающий 397 аминокислот,  $\beta$ -субъединицей, локализованной со стороны С-конца и состоящей из 346 аминокислот. В своей структуре рТТГ содержит семь трансмембранных доменов, взаимодействующие с G-белками, три интрацеллюлярные петли, три экстрацеллюлярные петли и крупный лиганд-связывающий внеклеточный домен (Рисунок 3) [84]. В составе последнего содержатся лейцин-богатые регионы, участвующие в связывании цистеин-богатых доменов и лиганда, что способствует образованию третичной структуры внеклеточного домена и поддержании правильной структуры двух субъединиц рТТГ, кроме того между лейцин-богатыми регионами и трансмембранными доменами находится структурный линкер, участвующий в структурной конформации [46]. Внеклеточная часть рецептора ТТГ кодируется экзонами 1-9 и частично 10, в то время как трансмембранный домен и внутриклеточная часть – оставшейся частью экзона 10 [83]. На поверхности тироцитов рТТГ находится в виде димеров или олигомеров, образование данных структур необходимо для правильной ориентации молекул на клеточной мембране и повышения лиганд-связывающей способности [47].





**Рисунок 3 – Структура и локализация pТТГ.** Слева – схематическое изображение фолликула ЩЖ. Справа – схематическое строение белка pТТГ (Iosco, C. TSHR (thyroid stimulating hormone receptor) / C. Iosco, K. J. Rhoden // Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. – 2009. – № 14 (9). – P. 846–852. – С изменениями)

К настоящему моменту в гене *TSHR* описано более 60 инактивирующих мутаций, приводящих к развитию синдрома резистентности к ТТГ [46]. Мутации распределены по всей длине гена, за исключением интрацеллюлярной С-концевой области [46]. Тао с соав. определено 5 классов мутаций, в зависимости от места их локализации и функциональных нарушений: 1 – дефект биосинтеза рецептора, 2 – дефект транспорта к мембране клетки, 3 – дефект связывания лиганда, 4 – дефект активации рецептора, 5 – неизвестные дефекты [48]. Введение последнего класса подчеркивает необходимость дальнейших исследований структуры и функциональной активности рецептора.

Инактивирующие мутации *TSHR* приводят к широкому фенотипическому спектру, от тяжелого врожденного гипотиреоза до изолированного повышения уровня ТТГ. Чувствительность тканей щитовидной железы к стимулирующему действию ТТГ может полностью отсутствовать, что приводит к нарушению роста органа [47]. Степень резистентности к ТТГ зависит от типа мутации и количества мутировавших аллелей [47]. Тяжелый врожденный гипотиреоз с гипоплазией ЩЖ как правило встречается при биаллельных мутациях, в то время как моноаллельные изменения приводят к мягким формам заболевания [46]. Однако фенотипическая изменчивость является характерной чертой мутаций гена *TSHR*, в частности описаны случаи гипоплазии железы при гетерозиготных изменениях [46].

#### **1.4. Биосинтез тиреоидных гормонов**

Гормоны щитовидной железы играют ключевую роль в процессах метаболизма, развития нервной системы, формирования нормального роста и созревания костной ткани.

Продукция щитовидной железой тиреоидных гормонов опосредована работой гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы по принципу отрицательной обратной связи. Основным звеном механизма является изменение чувствительности клеток аденогипофиза к стимулирующему действию тиреотропин-рилизинг-гормона (ТРГ) в зависимости от уровня циркулирующих в крови тиреоидных гормонов.

Тиреотропин-рилизинг-гормон (ТРГ) синтезируется в нейронах медиальных отделов паравентрикулярных ядер гипоталамуса. ТРГ стимулирует синтез тиреотропного гормона (ТТГ) тиреотрофами гипофиза, посредством активации мембранного рецептора, связанного с G-белком [85, 86]. Действие ТТГ на щитовидную железу осуществляется через G-белок-связанный рецептор, расположенный на мембране тиреоидных клеток, путем усиления выработки

цАМФ [88]. Связывание ТТГ с рецептором запускает реакции биосинтеза тиреоидных гормонов в фолликулярных клетках щитовидной железы.

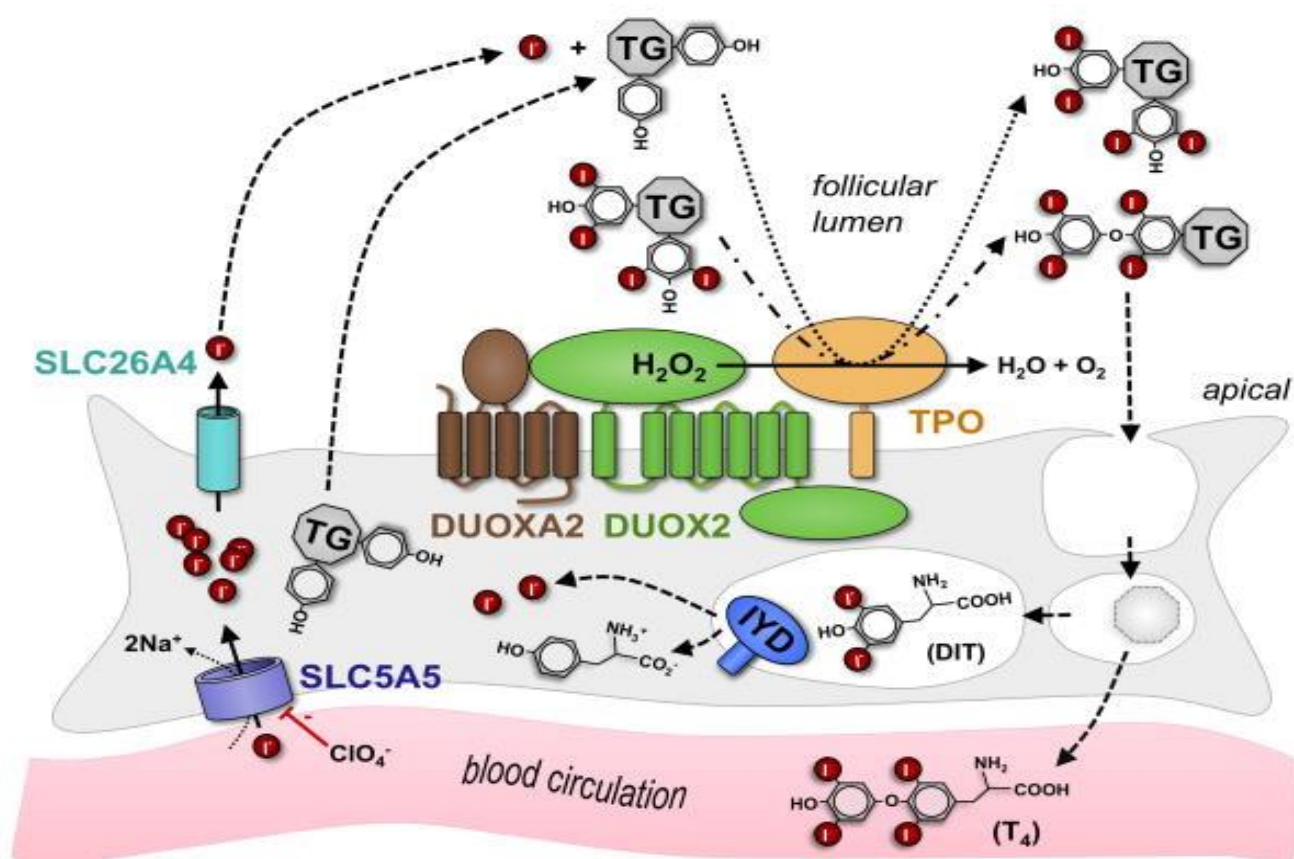
Первым шагом в процессе синтеза является перенос неорганического йода через базальную мембрану тироцитов (Рисунок 4). Хотя концентрация йодида в плазме имеет довольно низкие значения (50–300 нмоль), уникальная транспортная система позволяет максимально эффективно поглощать йодид [88]. Процесс транспортировки йодида происходит против градиента концентрации посредством работы натрий-йодного симпортера (NIS), осуществляющего перенос одного иона йода совместно с двумя ионами натрия, используя мембранный потенциал клетки, который генерируется работой  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В ходе переноса происходит повышение концентрации йодида в фолликулах в 30-60 раз по сравнению с плазмой [89]. Далее через апикальную мембрану за счет работы белка пендрин йодид попадает внутрь фолликула [90]. Матрицей для синтеза тиреоидных гормонов служит тиреоглобулин, синтезируемый тироцитами. Под действием тиреопероксидазы происходит оксидация йодида, данный процесс заключается в образовании молекулярного йода ( $\text{I}_2$ ), при соединении йодида с перекисью водорода, йодирование тирозиновых остатков тиреоглобулина, в результате чего образуется монойодтирозин (МИТ) и дийодтирозин (ДИТ) [91]. Тиреоглобулин содержит 140 остатков тирозина, однако, только четыре из них (в положениях 5, 2553, 2568, 2747) подвергаются связыванию с йодом [92, 93].

Перекись водорода генерируется при переносе через апикальную мембрану электронов с НАДФ на кислород кальций-зависимыми оксиредуктазами DUOX1 и DUOX2 [94, 95]. В процессе активации белков DUOX1 и DUOX2 происходит их гликозилирование, во время присоединения к соответствующим переносчикам (DUOXA1 и DUOXA2) [96].

После образования МИТ и ДИТ происходит их конденсация: при соединении двух молекул ДИТ образуется тироксин, а при слиянии МИТ и ДИТ образуется трийодтиронин. Процесс конденсации происходит через конверсию боковой цепи аланина до дегидроаланина [97]. При повышении уровня ТТГ в

крови, происходит резорбция коллоида, протеолиз тиреоглобулина, в результате чего высвобождается МИТ, ДИТ, тироксин, трийодтиронин. Молекулы МИТ и ДИТ подвергаются обратному дейодированию, под контролем белка IYD, с целью поддержания запасов йода [98].

Тироксин и трийодтиронин связываются со специфическими рецепторами клеток-мишеней и реализуют свои эффекты. При этом происходит частичное дейодирование Т4 в более активный Т3.



**Рисунок 4 – Схематическое изображение фолликулярной клетки ЩЖ, иллюстрирующее ключевые процессы биосинтеза тиреоидных гормонов (Grasberger, H. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis / H. Grasberger, S. Refetoff // Current Opinion in Pediatrics. – 2011. – № 23 (4). – P. 421–428)**

### 1.5. Дисгормоногенез

Термин «дисгормоногенез» применяется для обозначения форм гипотиреоза, обусловленных недостаточностью одного из ферментов, участвующих в процессе биосинтеза тиреоидных гормонов. Данная группа заболеваний гетерогенна по своей молекулярной основе, однако схожа по фенотипическим проявлениям. Наиболее частым симптомом является формирование зоба, внутриутробно, либо после рождения, что обусловлено зобогенным эффектом ТТГ [2]. К синдромальным формам ВГ в этой группе относится только синдром Пендреда, характеризующийся врожденным гипотиреозом и нейросенсорной тугоухостью [99]. В большинстве случаев ВГ, обусловленный мутациями в генах дисгормоногенеза, наследуется аутосомно-рецессивно, исключением является ген *DUOX2* и *IYD*, при мутациях в которых возможен и аутосомно-доминантный тип наследования [2, 100, 104].

В мире разработаны функциональные исследования для проведения первичной дифференциальной диагностики различных форм врожденного гипотиреоза, обусловленного дисгормоногенезом, к которым относятся сцинтиграфия ЩЖ и проба с перхлоратом калия [100–123]. Принцип сцинтиграфии основан на способности ткани ЩЖ захватывать и накапливать йод, в случае нарушений в транспортной системе наблюдается снижение или полное отсутствие накопления радиоактивного йода. Проба с перхлоратом калия проводится с целью оценки уровня органификации йода. В норме поглощенный щитовидной железой йод быстро органифицируется и уже не может быть из нее вытеснен. В случае нарушения процессов органификации захваченный радиоактивный йод остается в щитовидной железе в неорганической форме и легко может быть вытеснен конкурентными веществами, в данном случае перхлоратом калия. В процессе исследования рассчитывается уровень поглощения радиоактивно йода до и после введения перхлората калия. В нормально функционирующих тканях ЩЖ уровень поглощения снижается менее чем на

10 % от исходного, у лиц с полным дефектом органификации йода (TIOD - total iodine organification defect) отмечается понижение уровня более чем на 90 %, при частичном дефекте (PIOD - partial iodine organification defect) уменьшается на 10-90 % (Таблица 2) [102-104].

**Таблица 2 – Корреляция результатов диагностических тестов и генетических/белковых дефектов**

Ген/белок	Сцинтиграфия ЩЖ	Проба с перхлоратом калия	Дополнительные тесты
<i>SLC5A5/NIS</i>	Отсутствие/низкое поглощение радиоактивного йода		
<i>SLC26A4/пендрин</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Снижение поглощения радиоактивного йода >90 % (PIOD)	МРТ височных костей
<i>TPO/ТПО</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Снижение поглощения радиоактивного йода на 10-90 % (TIOD)	
<i>DUOX2/ DUOX2</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Снижение поглощения радиоактивного йода на 10-90 % (TIOD)	
<i>DUOXA2/ DUOXA2</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Снижение поглощения радиоактивного йода на 10-90 % (TIOD)	
<i>TG/ТГ</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Отрицательный тест с перхлоратом калия	Определение уровня ТГ в сыворотке
<i>IYD/IYD</i>	Нормальное поглощение радиоактивного йода	Отрицательный тест с перхлоратом калия	Определение уровня МИТ и ДИТ в крови и моче

**Примечания**

1 TIOD – полный дефект органификации йода (total iodine organification

defect)

2. PIOD – частичный дефект органификации йода (partial iodine organification defect).

Следует отметить, что методы функциональной диагностики являются первым шагом к установлению этиологической причины развития гипотиреоза и не исключают необходимость в молекулярно-генетическом исследовании. Результаты данных тестов зависят от степени ферментативной дисфункции и тяжести мутаций [2]. Наличие у пациента «мягких» мутаций приводит к нехарактерным результатам исследований, и может усложнить поиск истинной причины гипотиреоза.

#### **Ген *SLC5A5*:**

Человеческий ген *SLC5A5* (OMIM # 601843) впервые просеквенирован в 1997 году P.A. Smanik, картирован на коротком плече хромосомы 19 (19p13.2-p12) [124], кодирует 643 аминокислотных остатка белка NIS [125].

Натрий-йодный симпортер (NIS) – трансмембранный белок, основная роль которого заключается в транспортировке йода через базальную мембрану.

В название белка NIS заложена аббревиатура от Sodium Iodide Symporter. NIS относится к суперсемейству натрий белковых симпортеров (sodium/solute symporters (SSS)) [126]. Белок расположен на базо-латеральной мембране фолликулярных клеток тироцитов, имеет три участка N-сцепленного гликозилирования (у крыс в положениях 225, 485 и 497), 13 трансмембранных доменов, экстрацеллюлярно расположенный N-конец и интрацеллюлярный C-конец [127–129]. Функциональная активность выражается в совместном переносе 2 катионов натрия и одного аниона йода через мембрану тироцитов, с использованием энергии градиента концентрации ионов натрия, которая создается за счет работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [89]. Кроме того, NIS опосредует активный транспорт йода в клетках слюнных желез, эпителиальных клетках желудка, энтероцитах кишечника, эпителиальных клетках легких, плаценте и тканях

молочной железы в период лактации [130–137]. Однако роль белка в этих тканях остается до конца неизученной.

Регуляция белка NIS осуществляется на транскрипционном, а также посттрансляционном уровнях [138]. В физиологических условиях уровень экспрессии белка ингибируется повышенным уровнем йодида и активируется под действием ТТГ [139–141].

Врожденный гипотиреоз вследствие нарушения поглощения йода (OMIM #274400) – заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленное мутациями гена *SLC5A5*. Фенотип заболевания, описанный еще в 1958 году D. Federman с соав., включает формирование зоба и снижение накопления радиоактивного йода по данным сцинтиграфии [142]. К настоящему моменту в гене *SLC5A5* зарегистрировано более 14 мутаций [143]. Степень тяжести гипотиреоза варьирует от тяжелого врожденного гипотиреоза до легких форм, проявляющихся в старшем возрасте. Остаточная функциональная активность белка коррелирует с локализацией мутации и опосредует тяжесть клинических проявлений [144].

#### **Ген *SLC26A4*:**

Ген *SLC26A4* картирован на длинном плече хромосомы 7 в позиции 22-31.1 (7q22-31.1) и содержит 21 экзон [145]. Экспрессия гена выявлена в щитовидной железе, внутреннем ухе и почках [145, 147]. В 1999 году был открыт кодируемый белок, названный пендрин [147].

Белок пендрин состоит из 780 аминокислот и содержит 12 трансмембранных доменов и расположенные внутриклеточно N- и C-концы [146]. В щитовидной железе за счет работы белка осуществляется регуляция транспорта йодида через апикальную мембрану в просвет фолликула [146, 148, 149]. Во внутреннем ухе пендрин расположен в эндолимфатическом протоке и мешочке, где он функционирует как хлорид-бикарбонатный обменник [147, 149]. Кроме того, функциональная активность белка выявлена в кортикальном собирательном протоке почек, в интеркалированных клетках типов В и ни-А-ни-В, где он



поддерживает баланс электролитов, путем обеспечения секреции бикарбоната, а так же участвует в поддержании артериального давления, регулируя абсорбцию хлора почками [150–152].

Фенотип заболевания был описан задолго до идентификации молекулярных и патофизиологических основ заболевания. В 1896 году врач Vaughan Pendred описал семейный случай тугоухости в сочетании с увеличением щитовидной железы, в дальнейшем данный симптомокомплекс получил название синдрома Пендред [99].

К настоящему времени в гене *SLC26A4* описано более 160 мутаций [153]. Мутации с равной частотой встречаются по всей протяженности гена, большинство описанных мутаций являются миссенс [154]. Для некоторых этнических групп описаны наиболее часто встречающиеся мутации. Так мутация H723R встречается в 53 % случаев заболевания в японской популяции [155, 156] и в 40 % в корейской [157]. По данным Campbell и соав. у европейцев относительно часто (22–30 %) встречаются мутации L236P, T416P и IVS8 + 1G→A [158].

Спектр фенотипических проявлений варьирует от наличия классического симптомокомплекса синдрома Пендред (врожденный гипотиреоз, зоб и нейросенсорная тугоухость) до несиндромальной потери слуха [156]. Патогенез развития первичного гипотиреоза и зоба связан с нарушением транспорта йодида из тироцитов в коллоид, прекращением процесса органификации йода. Во внутреннем ухе изменяется баланс ионов, происходит повышение осмотического давления, приводящее к развитию мальформации, в виде недоразвития улитки и расширения вестибулярного акведука и, как следствие, нейросенсорной тугоухости [156].

### **Ген *TPO*:**

Ферментативная активность ТПО была описана несколько десятилетий назад (DeGroot, L.J. и соавт. 1977 г.), и уже в то время предполагалось, что основной причиной развития наследственных дефектов синтеза тиреоидных гормонов является нарушение функции тиреопероксидазы [159].

Ген *TPO* (OMIM #606765) был клонирован в 1987 году, полнометражный транскрипт мРНК составил 3048 пар оснований [160]. *TPO* содержит 17 экзонов, картирован на коротком плече хромосомы 2 (2p25.3) [161]. Установлено, что транскрипция *TPO* происходит под контролем транскрипционных факторов *NKX2-1 (TTF1)*, *FOXE1 (TTF2)* и *PAX8* [37]. Во время определения границ экзонов и интронов выявлено, что существует альтернативный транскрипт *TPO*, в котором отсутствует экзон 10 (кодирует аминокислоты 533–589) [160]. Таким образом, выделяют две изоформы белка тиреопероксидазы: ТПО-1 и ТПО-2. Однако последующие исследования демонстрируют, что вторая изоформа ТПО не способна связывать гем, что является основой ферментативной активности ТПО [162, 163].

Белок ТПО-1 состоит из 933 аминокислот и представляет собой димер, мономеры которого соединены межмолекулярными дисульфидными связями. Каждый мономер содержит гемсвязывающий домен, три внеклеточных домена, трансмембранную спираль и короткий цитоплазматический «хвост» [164]. ТПО катализирует перекисное окисление йодида, йодирование тирозина с последующим соединением остатков йодтирозина и образованием активных йодтиронинов (тироксина и трийодтиронина) [91].

Инактивирующие мутации в гене *TPO* приводят к развитию врожденного гипотиреоза в сочетании с увеличением размеров ЩЖ. Первое описание пациента с врожденным гипотиреозом, обусловленным мутацией гена *TPO*, было опубликовано в 1992 г Abramowicz с соавт. [165]. На сегодняшний день описано более 60 мутаций в гене *TPO*, большинство из которых локализованы в экзонах 7, 8 и 9, кодирующих гемсвязывающий домен белка [166]. Предполагалось, что мутации в *TPO* всегда приводят к полному дефекту органификации йода, тем не менее, описаны случаи частичного дефекта, обусловленные менее тяжелыми мутациями [167, 168].

На сегодняшний день в ряде стран изучена распространенность гипотиреоза, обусловленного мутациями в гене *TPO*: Нидерланды 1:66000 [169],

Япония 1:177000 [8], Словения 1:20000 [170].

В большинстве случаев ВГ, обусловленный мутациями в *TPO*, наследуется аутосомно-рецессивно, однако появляется все больше сообщений о случаях «неменделевского» механизма наследования [171–173], такие как изодисомия или делеция участка одной из родительских хромосом [172, 173], а также моноаллельная экспрессия мутантного аллеля в тканях щитовидной железы [171].

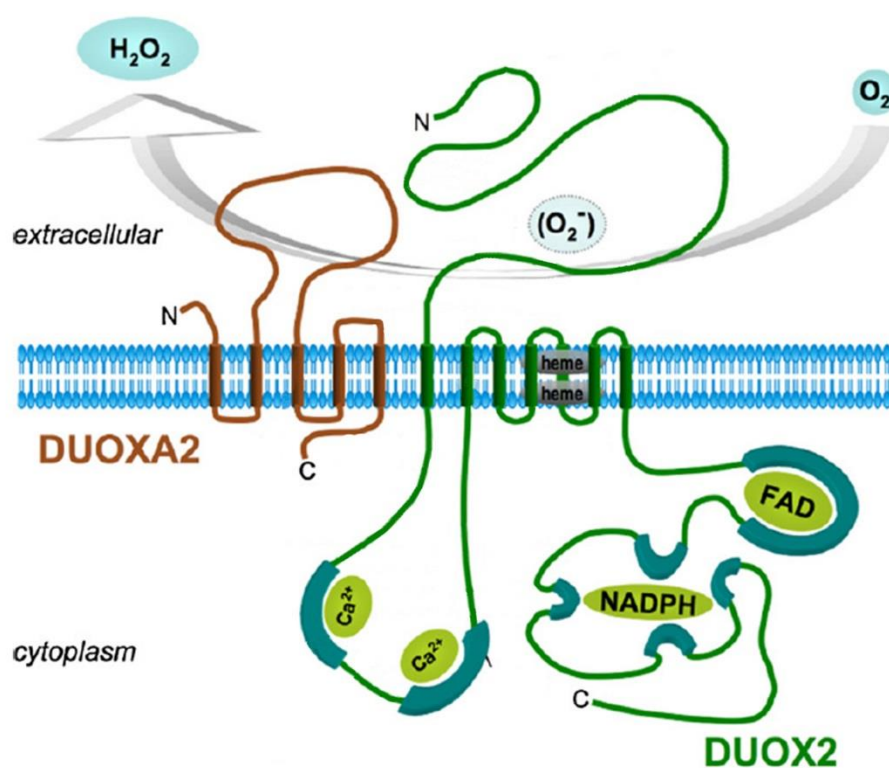
### **Гены *DUOX2* и *DUOX1*:**

Гены *DUOX2* (OMIM #606759) и *DUOX1* (OMIM #606758) картированы на длинном плече хромосомы 15 (15q15.3-21) на расстоянии в 16 кб. Гены имеют противоположные транскрипционные ориентации [174]. Ген *DOUX1* содержит 35 экзонов, первый и второй являются некодирующими, ген *DOUX2* состоит из 34 экзонов, некодирующим является только первый экзон [94, 95]. Несмотря на то, что нуклеотидная последовательность *DUOX2* и *DUOX1* идентична на 83 %, промоторы генов различны. Промотор *DUOX1* имеет три GC-богатые последовательности в сайте связывания SP1, в то время как промотор *DUOX2* не содержит ни TATA-бокс (бокс Хогнесса), ни SP1-связывающие сайты [110].

Белок *DUOX2* состоит из 1548 аминокислот, *DUOX1* – из 1551. Оба белка содержат семь трансмембранных спиралей, внеклеточный пероксидазоподобный домен, расположенные внутриклеточно два домена EF-руки (EF-hand motifs) и домен типа NOX2 [94, 95]. Пероксидазоподобный домен имеет 43 % сродства к ТПО. Однако существуют сообщения и за, и против наличия пероксидазной активности белков *DUOX*, соответственно этот вопрос остается открытым [175, 176]. Домены EF-руки расположены на первой трансмембранной спирали и участвуют в связывании ионов кальция, что увеличивает количество производимой перекиси водорода [95]. С-концевая область состоит из шести трансмембранных спиралей, на которых расположено четыре инвариантных остатка гистидина, образующие координационные связи с двумя простетическими группами гема, а так же NOX2 домен с участками связывания для ФАД (Флавинадениндинуклеотид) и НАДФ (Никотинамидадениндинуклеотидфосфат)

[94, 95]. Такое расположение простетических групп обеспечивает транспортную цепочку для переноса электролитов с НАДФ через апикальную мембрану [94, 95].

Транспортировка белков к мембране и генерация перекиси водорода осуществляется только после полного гликозилирования белков. Процесс гликозилирования заключается в соединении DUOX1 и DUOX2 с соответствующими переносчиками DUOXA1 и DUOXA2, которые содержат сайты гликозилирования (Рисунок 5) [96].



**Рисунок 5 – Схематическое изображение структуры и локализации белка DUOX2 с переносчиком DUOXA2** (Grasberger, H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism / H. Grasberger // Molecular and Cellular Endocrinolog. – 2010. – № 322 (1-2). – P. 99-106. – С изменениями)

Экспрессия в щитовидной железе мРНК DUOX2 в 1,5-5 раз выше, чем DUOX1 [174]. Кроме того, DUOX1 обнаружен в простате, плаценте, сердце, почках и головном мозге, а DUOX2 расположен в слюнных железах, желудке,

двенадцатиперстной, толстой и прямой кишке. В эпителиальных клетках дыхательных путей, поджелудочной железе и семенниках выявлены оба белка [177–179].

Первое описание пациентов с мутациями в гене *DUOX2* опубликовано в 2002 году Mogeno с соав. [180]. К настоящему моменту известно более 20 различных мутаций в *DUOX2* [107, 112, 180–184]. На сегодняшний день в мировой литературе не зарегистрировано случаев гипотиреоза, обусловленного мутациями в гене *DUOX1*. Предполагается, что это связано с достаточной компенсаторной способностью *DUOX2* [185].

Гипотиреоз, обусловленный мутациями *DUOX2*, может наследовать как аутосомно-рецессивно, так и доминантно [185]. В свою очередь и моноаллельные, и биаллельные мутации приводят к гипотиреозу различной степени выраженности, кроме того у ряда пациентов выявлено увеличение щитовидной железы. Однако считается, что гетерозиготные мутации более часто ассоциированы с легкими формами заболевания [185]. Нарушения органификации йода также могут быть частичными или полными [185]. Интересно, что у ряда обследуемых врожденный гипотиреоз имел транзиторный характер, причем и в случаях с моноаллельными и биаллельными мутациями [180, 185]. Предполагается, что существующий альтернативный путь генерации перекиси водорода, с помощью *DUOX1*, может компенсировать недостаточность *DUOX2*. Однако это теория остается не доказанной, ввиду наличия случаев перманентного ВГ [80, 186].

#### **Гены *DUOX2* и *DUOX1*:**

Гены *DUOX2* (OMIM #612772) и *DUOX1* (OMIM #612771) расположены на длинном плече хромосомы 15, в пространстве между генами *DUOX2* и *DUOX1*. Ген *DOUXA2* содержит 6 экзонов, ген *DOUXA1* состоит из 10 экзонов [96]. Основным местом экспрессии мРНК *DUOX2* является щитовидная железа, в меньшей степени – слюнные железы. *DUOX1* также преимущественно экспрессируется в щитовидной железе, кроме того небольшой уровень экспрессии

выявлен в пищеводе и клетках респираторной системы [96, 107].

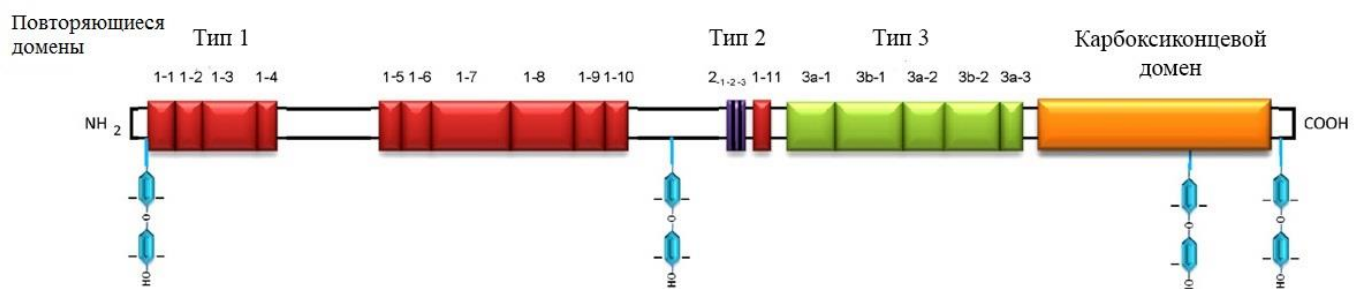
Белок DUOXA2 состоит из 320 аминокислот, содержит 5 трансмембранных доменов, с расширением внеклеточной области между вторым и третьим доменом, за счет наличия сайтов N-гликозилирования. Существует четыре изоформы DUOXA1:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ .  $\alpha$  и  $\gamma$  изоформы DUOXA1 содержат по три сайта N-гликозилирования, тогда как в изоформах  $\beta$  и  $\delta$  находится только один, что недостаточно для активации оксидоредуктаз [108]. На экспериментальных моделях выявлено, что наиболее эффективно перекись водорода генерируется в парах DUOX1-DUOXA1- $\alpha$  и DUOX2-DUOXA2, значительно более низкие уровни продукции выявлены в парах DUOX1-DUOXA2 и DUOX2-DUOXA1- $\alpha$  и  $\gamma$  [108].

Первый случай мутации в гене *DUOXA2* был зарегистрирован в 2008 году, при скрининговом обследовании пациентов с частичным дефектом органификации йода [109]. У пациента выявлена гомозиготная мутация Y246X, клинически отмечалось увеличение щитовидной железы на фоне умеренного выраженного гипотиреоза [109]. Проведенные в последующем функциональные исследования доказали полную потерю активности DUOXA2 при биаллельных мутациях, при этом моноаллельные изменения не приводили к нарушениям функции, что указывает на отсутствие эффекта гаплонедостаточности при мутациях в гене *DOUXA2*, в отличие от *DUOX2* [110]. В целом мутации в *DUOXA2* являются редкой причиной развития врожденного гипотиреоза, к настоящему моменту идентифицировано всего 6 мутаций [109, 111–115]. Интересным представляется тот факт, что для генов *DUOX2* и *DUOXA2* характерен дигенный механизм развития гипотиреоза, при этом мутации в генах выявляются в гетерозиготном состоянии [111]. Все же остается неясным патофизиологический механизм развития заболевания в данном случае, возможно наличие гетерозиготных мутаций приводит к перекрестному снижению ферментативной активности, либо же достаточно одной гетерозиготной мутации в *DUOX2* для развития гипотиреоза.

### Ген *TG*:

В 1986 году впервые просеквенирован полнометражный транскрипт *TG* [187]. Ген *TG* (OMIM #188450) состоит из 48 экзонов, расположен на хромосоме 8 (8q24.2-8q24.3) [187]. ТТГ стимулирует экспрессию гена за счет модуляции уровня цАМФ (циклического аденозинмонофосфата) [188]. Транскрипцию гена контролируют NKX2-1, FOXE1 и PAX8, связываясь с его промотором [188].

Белок тиреоглобулин (ТГ) представляет собой крупный гомодимерный гликопротеид, синтезирующийся тироцитами (Рисунок 6). После анализа последовательности мономеров белка выявлено, что он состоит из четырех областей: тип 1 (11 повторяющихся доменов), тип 2 (3 повторяющихся домена), тип 3 (5 повторяющихся доменов) и карбоксиконцевой домен [189]. Регионы 1-3 типов являются цистеин-богатыми, что позволяет им образовывать дисульфидные связи [190]. Функциональная активность доменов 1-3 остается до конца неизученной. Существуют данные, что домен 1 типа участвует в эндоцитозе тиреоглобулина, домен 2 типа опосредует клеточную адгезию, а в домене 3 типа образуются основные дисульфидные связи, необходимые для правильного формирования третичной структуры белка [191]. Карбоксиконцевой домен белка необходим для нормального созревания и внутриклеточного транспорта ТГ [192]. Кроме того, карбоксиконцевой домен может функционировать как внутримолекулярный шаперон для ТГ доменов 1-3 типов [193].



**Рисунок 6 – Структура белка тиреоглобулина** (Targovnik, H. M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations / H. M. Targovnik, S. A. Esperante, C. M. Rivolta // Molecular and Cellular Endocrinology. –

2010. – № 322. – Р. 44–55. – С изменениями).

Процесс активации тиреоглобулина представляет собой образование внутрицепных дисульфидных связей, гликозилирование, силилирование, сульфатирование, фосфорилирование и йодирование, и наконец гомодимеризацией, после чего ТГ поступает в просвет фолликула [192]. После поступления ТГ в фолликул происходит присоединение йода к тирозиновым остаткам. В своем составе тиреоглобулин содержит 140 остатков тирозина, однако в настоящий момент идентифицировано только четыре акцепторных остатка тирозина Tyr5, Tyr2554, Tyr2568 и Tyr2747 и три донорных: Tyr130, Tyr847, Tyr1448 [92, 35].

Для пациентов с мутациями в гене *TG*, характерно развитие тяжелого врожденного гипотиреоза с зобом. По данным сцинтиграфии ЩЖ отмечается нормальное поглощение радиоактивного йода, проба с перхлоратом калия отрицательная. Первое описание пациента с данной патологией датируется 1991 г. [194], и к настоящему моменту известно уже более 50 мутаций [105]. Наиболее часто встречающимися мутациями в японской популяции являются p.C1058R и p.C1977S [106], в европеоидной - p.R277X, p.R1511X, p.A2215D и p.R2223H [105].

### **Ген *IYD*:**

В 2002 году клонирован ген *IYD* (*DEHAL1*) (OMIM #612025), состоящий из 6 экзонов и расположенный на коротком плече хромосомы 6 (6p24) [116]. Помимо щитовидной железы экспрессия, в значительно меньшей степени, выявлена в печени, почках и трахее. Повышение уровня экспрессии мРНК происходит за счет стимулирования выработки цАМФ тиреотропным гормоном, снижение – повышением уровня йодида [98, 117]. Существует несколько альтернативно спращенных изоформ *IYD*: А, В и С, при этом функциональной активностью обладает только А изоформа, кодирующая белок йодтирозин-дейодиназу (*IYD*) [118]. Белок *IYD* является членом суперсемейства нитро-ФМН редуктаз (НАДФ-оксидазы/флаavin-редуктазы), процесс катализа которого основан на кофакторном действии флавина [118, 119]. В своей структуре белок содержит N-концевой якорь



(N-terminal membrane anchor), промежуточный домен и каталитический С-концевой домен гомологичный флавопротеидам [121].

С целью обеспечения необходимого запаса йодида в щитовидной железе, под действием *IYD* происходит дейодирование молекул монойодтирозина (МИТ) и дийодтирозина (ДИТ), которые избыточно вырабатываются в процессе биосинтеза тиреоидных гормонов. Таким образом, *IYD* обеспечивает интратиреоидный механизм регуляции йодида [98]. В случае нарушения функции белка, происходит повышение пороговой концентрации МИТ и ДИТ в щитовидной железе, их выделение в кровоток и дальнейшая утилизация почками. Данная реакция приводит к истощению йодидного запаса в организме, подобно эндемическому дефициту йода [122].

Первое описание пациента с мутациями в гене *IYD* опубликовано в 2008 году [123]. К настоящему моменту описано всего четыре мутации в данном гене, три из них расположены в пределах второго экзона, кодирующего каталитический домен белка [123], четвертая мутация - в экзоне 4 [100]. Функциональные исследования доказали полную утрату активности белка при биаллельных мутациях [100, 123]. У всех пациентов выявлен тяжёлый гипотиреоз с зобом. Интересно, что в ряде случаев гипотиреоз манифестировал в возрасте от 8 месяцев до 8 лет [123]. Причины позднего развития заболевания до сих пор остаются невыясненными. У всех пациентов были выявлены повышенные уровни МИТ и ДИТ в крови и моче, что и позволило заподозрить данный диагноз [100, 123]. Остается до конца неопределенным и механизм наследования заболевания, биаллельные мутации однозначно приводят к формированию гипотиреоза и зоба, однако в двух семьях у родственников с моноаллельными мутациями выявлено увеличение щитовидной железы [101, 123], у одного из них так же выявлен гипотиреоз, с повышением уровня ТТГ более 100 мМЕ/л, в старшем возрасте [100].

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Характеристика исследуемых пациентов**

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (протокол №12 от 22.10.2014). Информированное согласие получено от всех обследованных пациентов, если возраст обследованных не достиг 15 лет, информированное согласие подписано законным представителем в соответствии с протоколом исследования.

Для первичного отбора в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России было направлено 328 пациентов с диагнозом «Врожденный гипотиреоз» в период с ноября 2014 года по сентябрь 2016 года.

Неонатальный скрининг был проведен всем пациентам по месту жительства в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 N185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания».

Критериями включения в исследование:

1. Пациенты обоих полов;
2. Возраст пациентов от 0 до 18 лет;
3. Повышение уровня ТТГ по данным неонатального скрининга и/или ретестирования более 90 мМЕ/л.

Критерием исключения было несогласие пациента и/или законного представителя на участие в исследовании.

Данным критериям соответствовало 244 пациента из 328, в том числе 6 пар сиблингов (2 пары сиблингов являлись монозиготными близнецами). Медиана возраста пациентов на момент включения в исследование составила 4,4 года [2,2; 9,7]. Распределение по полу было следующим: 150 девочек и 94 мальчика.

По данным ультразвукового исследования у 137 пациентов выявлены различные типы дисгенезии щитовидной железы: аплазия ( $n = 31$ ), эктопия ( $n = 10$ ), гипоплазия ( $n = 97$ ); у 30 обследуемых обнаружено увеличение ЩЖ

различной степени выраженности, 23 пациента имели нормальные размеры железы. В 54 случаях ультразвуковое исследование проведено не было.

Молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительного параллельного секвенирования проведено 244 пациентам.

## **2.2. Контрольная группа**

В контрольную группу включено 56 человек, из них 24 мужчины и 32 женщины.

Набор контрольной группы осуществлялся с мая 2016 года по июнь 2016 года.

Критерии включения в исследование:

1. Пациенты обоих полов;
2. Пациенты всех возрастов;
3. Уровни ТТГ и Т4 свободного в пределах референсных интервалов;
4. Отсутствие антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО) и тиреоглобулину (АТ к ТГ);
5. Отсутствие изменений по данным ультразвуковой диагностики щитовидной железы.

Критерием исключения было несогласие обследуемых лиц и/или их законных представителей на участие в исследовании.

Молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительного параллельного секвенирования проведено всем обследуемым из данной группы.

## **2.3. Дизайн исследования**

Работа включала в себя одномоментное исследование выборки пациентов с

врожденным гипотиреозом. Пациенты были набраны в соответствии с критериями включения и исключения в исследование. Набор пациентов с врожденным гипотиреозом осуществлялся в период с ноября 2014 года по сентябрь 2016 года. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Первоначально проведено клиническое обследование пациентов, регистрация симптомов заболевания. Далее пациентам проведено молекулярно-генетическое исследование, с последующим сопоставлением результатов генетического исследования и фенотипических характеристик пациентов. Кроме того, нами набрана контрольная группа. Набор лиц производился с мая 2016 года по сентябрь 2016 года, размер контрольной выборки также предварительно не рассчитывался. Всем обследуемым из контрольной группы проведено аналогичное молекулярно-генетическое исследование, с целью определения частоты встречаемости нуклеотидных изменений в генах-кандидатах у здоровых лиц. Проведен сравнительный анализ частоты встречаемости количества нуклеотидных изменений у пациентов с врожденным гипотиреозом и контрольной группой.

## **2.4 Клинические и лабораторные методы исследования**

План обследования пациентов включал:

1. Сбор анамнеза жизни, анамнеза заболевания и семейного анамнеза. Сбор семейного анамнеза осуществлялся со слов родителей.
2. Клинический осмотр по стандартной методике.

Ультразвуковое исследование щитовидной железы пациентов с ВГ и обследуемых из контрольной группы проводилось на аппаратах экспертного класса (Toshiba, Япония; Philips, США) по принятым методикам. Оценка размеров щитовидной железы проводилась относительно площади поверхности тела согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (Таблица 3) [195, 196].

**Таблица 3 – Нормативы объема щитовидной железы в зависимости от пола и площади поверхности тела (ВОЗ, 2004)**

ППТ, м <sup>2</sup>	Мальчики		Девочки	
	P50	P97	P50	P97
0,7	1,47 мл	2,62 мл	1,46 мл	2,56 мл
0,8	1,66 мл	2,95 мл	1,67 мл	2,91 мл
0,9	1,86 мл	3,32 мл	1,90 мл	3,32 мл
1,0	2,10 мл	3,73 мл	2,17 мл	3,79 мл
1,1	2,36 мл	4,20 мл	2,47 мл	4,32 мл
1,2	2,65 мл	4,73 мл	2,82 мл	4,92 мл
1,3	2,99 мл	5,32 мл	3,21 мл	5,61 мл
1,4	3,36 мл	5,98 мл	3,66 мл	6,40 мл
1,5	3,78 мл	6,73 мл	4,17 мл	7,29 мл
1,6	4,25 мл	7,57 мл	4,79 мл	8,32 мл

**Примечания**

1. P50 – 50й процентиль
2. P97 – 97й процентиль
3. ППТ – площадь поверхности тела.

Площадь поверхности тела вычислялась по формуле:

$$\text{ППТ} = \sqrt{\frac{\text{рост, см} \times \text{вес, кг}}{3600}}$$

Исследование гормонального профиля контрольной группы проводилось на базе лаборатории биохимического анализа ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (заведующий лабораторией - Ильин А.В.). Лабораторные исследования включали определение уровня ТТГ, Т4 свободного, АТ к ТПО и АТ к ТГ. Лабораторные исследования ТТГ, Т4 свободного, АТ к ТПО были выполнены на автоматическом иммунохемилюминисцентном анализаторе

ARCHITECT i2000sr (ABBOTT), АТ к ТГ на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas 6000 Module e601 методом усиленной электрохемилюминесценции.

## 2.5. Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетический анализ проводился в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (заведующий лабораторией - д.м.н. Тюльпаков А.Н.).

Забор крови проводился из локтевой вены вне зависимости от приема пищи в пробирки с консервантом ЭДТА в концентрации 1,2 – 2,0 мг на 1 мл крови. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием набора Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике, рекомендованной производителем.

## 2.6. Высокопроизводительное параллельное секвенирование

Для молекулярно-генетического анализа применялся метод высокопроизводительного параллельного секвенирования (next-generation sequencing, NGS). Использовалась разработанная в отделении наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава России панель праймеров для мультиплексной ПЦР и секвенирования с применением технологии Ion Ampliseq™ Custom DNA Panel (Life Technologies, США). Панель праймеров «Гипотиреоз» охватывает кодирующие области следующих генов: *TPO*, *PAX8*, *NKX2-5*, *IYD*, *SLC26A4*, *TG*, *GLIS3*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *DUOX2*, *DUOX1*, *DOXA2*, *TSHR*, *SLC5A5*, *TSHB*, *THRB*, *THR*, *UBR1*, *THRA*, *SLC16A2*. Секвенирование осуществлялось на полупроводниковом секвенаторе PGM™ (Personal Genome Machine) Ion Torrent (Life Technologies, США). С учетом технических особенностей проведения исследования, вышеперечисленная панель включала

последовательность ряда генов, проводящих к развитию вторичного и третичного гипотиреоза, а также к нечувствительности к тироидным гормонам (*GLIS3*, *DUOX1*, *TSHB*, *THRB*, *THR*, *UBR1*, *THRA*, *SLC16A2*), анализ которых не проводился.

Процесс высокопроизводительного секвенирования (Next-generation sequencing) включал следующие этапы:

#### 1. Приготовление ДНК - библиотек:

- амплификация исследуемых участков генома, присоединение к ним адаптеров со штрих-кодами и очистка библиотек;
- амплификация библиотек на микрочастицах и обогащение микрочастиц, содержащих ДНК-матрицы.

#### 2. Расшифровка последовательности ДНК (секвенирование).

Биоинформатическая обработка результатов секвенирования осуществлялась с помощью программного модуля Torrent Suite 4.2.1 (Ion Torrent, Life Technologies, США) и пакета программ Annovar (версия 2015-2016 гг.) (<http://annovar.openbioinformatics.org>) [197]. В данной программе использовались специализированные методы прогнозирования патогенного воздействия выявленных нуклеотидных изменений на ген или генный продукт *in silico* такие как: PolyPhen2-HDIV и PolyPhen2-HVAR (<http://genetics.bwh.harvard.edu>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT+PROVEAN ([http://provean.jcvi.org/genome\\_submit\\_2.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php)) и другие. В качестве референсных последовательностей кДНК генов-кандидатов использовались ссылки Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами NM\_000547 (*TPO*), NM\_014080 (*DUOX2*), NM\_003235 (*TG*), NM\_000453 (*SLC5A5*), NM\_000441 (*SLC26A4*), NM\_203395 (*IYD*), NM\_000369 (*TSHR*), NM\_001079668 (*NKX2-1*), NM\_004387 (*NKX2-5*), NM\_003466 (*PAX8*). Обозначение нуклеотидных вариантов проведено в соответствии с рекомендациями den Dunnen и Antonarakis [198]. Популяционная частота выявленных нуклеотидных вариантов оценивалась с использованием выборки проекта Exome Aggregation Consortium (ExAC)

(<http://exac.broadinstitute.org>). Дополнительно для оценки патогенности и клинической значимости нуклеотидных вариантов использовались базы данных Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/index.php>), OMIM (<http://www.omim.org/>) и данные литературы. Оценка патогенности нуклеотидных изменений проведена согласно международным рекомендациям ACMG [199], при этом учитывались следующие признаки:

1. Наличие описания аналогичной нуклеотидной замены как патогенной;
2. Проведенные ранее функциональные исследования (*in vitro* или *in vivo*) доказали наличие патогенного эффекта на ген или генный продукт, вследствие возникновения данного нуклеотидного изменения;
3. Нуклеотидный вариант встречается с частотой менее 0,01 % в контрольной выборке (ExAC), либо отсутствует в базе данных;
4. Нуклеотидный вариант приводит к синтезу белка с измененной длиной (инсерции, делеции, мутации сайта сплайсинга, нонсенс-мутации);
5. Нуклеотидный вариант оценен как патогенный по трем и более методикам, включенным в программу Annovar.

Нами дополнительно проведен анализ BAM-файлов с помощью программы ExomeDepth [200], для выявления косвенных признаков обширных делеций и инсерций (снижение глубины прочтения по сравнению с другими образцами). Данный анализ проведен ввиду некоторых ограничений метода высокопроизводительного параллельного секвенирования (метод не выявляет делеции и инсерции длиной более 10 п.о.).

После анализа полученных данных проводилось подтверждение мутаций секвенированием по Сэнгеру. Фрагменты геномной ДНК, включающие кодирующие последовательности генов, дефекты в которых выявлены методом высокопроизводительного параллельного секвенирования, амплифицированы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Далее проведен электрофорез на 1 % агарозном геле, после чего продукты ПЦР выделялись и очищались с использованием набора Wizard PCR Preps DNA Purification System, и



секвенировались на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer Model 3130 (Applied Biosystems, США).

## **2.7. Мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)**

Одному пациенту, с подозрением на обширную делецию в гене *PAX8* по результатам анализа покрытия NGS, и 23 пациентам с одной гетерозиготной мутацией в генах *TPO* или *TSHR*, проведена мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). Использовался набор зондов SALSA MLPA probemix P319 Thyroid (Lot A2-1014) (MRC-Holland, Нидерланды), включающих последовательность генов *TPO*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *TSHR* и стандартный набор реагентов SALSA MLPA EK1-FAM (MRC-Holland, Нидерланды). На анализаторе ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) проведен электрофорез с использованием капилляра длиной 50 см и полимера POP-7 согласно рекомендациям производителя (протокол проведения MLPA доступен на сайте производителя <https://mlpa.com>). В качестве маркера использован размерный стандарт GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems, США). Обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды).

## **2.8. Статистический анализ**

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием прикладной программы MedCalc (Version 17.8).

Для количественных признаков рассчитывались: средние (M), медианы (Me), перцентили [25; 75], указывались число объектов исследования. Для качественных данных выборки указывались абсолютные и относительные частоты. Относительная частоты признака указывалась в процентах в виде целых

чисел, округление проведено по правилам арифметического округления. Точность оценки относительной частоты признака представлена в виде 95 % доверительного интервала (нижняя и верхняя границы), для расчета применен метод Вальда с коррекцией по Агрести – Коуллу, расчет производился с использованием онлайн калькулятора (доступен по ссылке <https://www.graphpad.com/quickcalcs/confInterval2/>). При сравнении двух независимых групп по количественному признаку для оценки статистической значимости межгрупповых различий использован U-тест Манна-Уитни ( $U$ ). Для сравнения групп по качественному признаку использован расчет 95 % доверительного интервала для отношения шансов и тест  $\chi^2$  Пирсона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

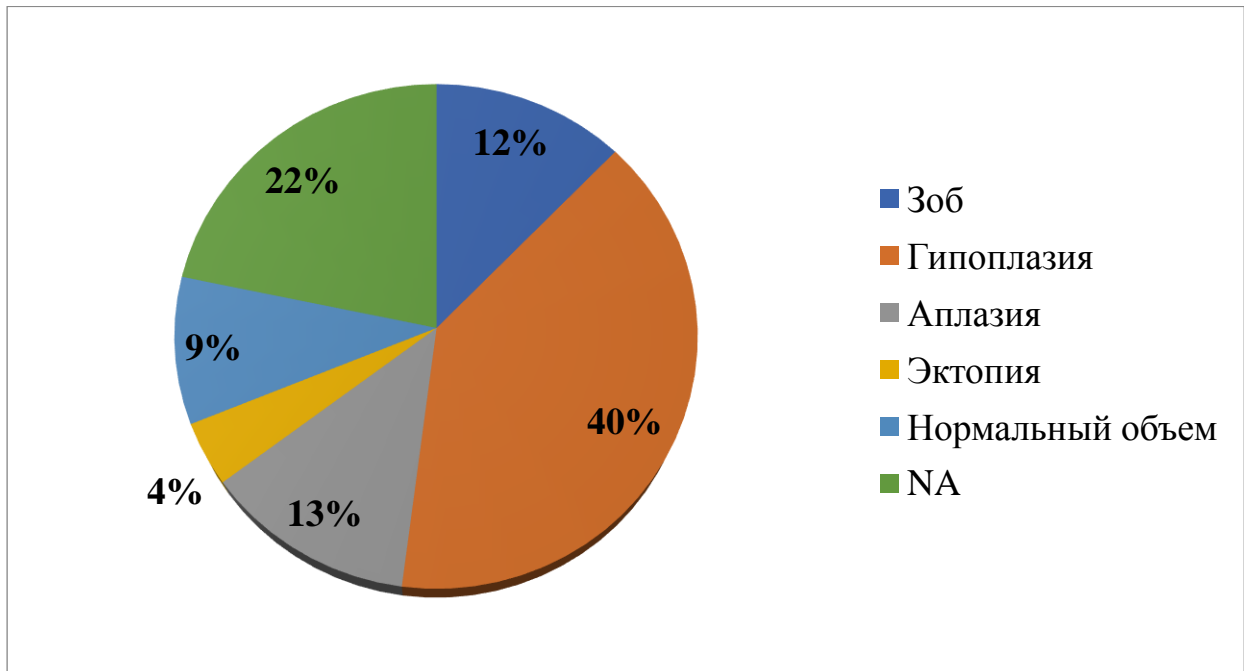
### **3.1. Клиническая характеристика группы пациентов с врожденным гипотиреозом**

По результатам проведенного обследования в нашу группу включено 244 из 328 пациентов с диагнозом «Врожденный гипотиреоз». Всем пациентам диагноз был установлен на основании неонатального скрининга или ретестирования.

Медиана возраста пациентов на момент проведения исследования составила 4,4 года [2,2; 9,7], самому младшему пациенту было 2 недели, старшему - 17 лет 11 месяцев. Распределение по полу: 150 девочек (61 % (95 %ДИ = 55 %–67 %)) и 94 мальчиков (39 % (95 %ДИ = 33 %–45 %)). Данные о семейном анамнезе были доступны у 235 пациентов (96 % (95 %ДИ = 93 %–98 %)). В 6 случаях врожденный гипотиреоз диагностирован у двух сибсов, из них 2 пары являлись монозиготными близнецами. Родители пробандов гипотиреозом не страдали.

### **3.2. Результаты ультразвукового исследования щитовидной железы**

В ходе проведения ультразвукового исследования щитовидной железы получены следующие результаты: зоб без узловых образований выявлен в 11 % (95 %ДИ = 8 %–16 %) случаев ( $n = 27$ ), многоузловой зоб в 1 % (95 %ДИ = 0,3 %–4 %) ( $n = 3$ ), щитовидная железа нормального объема в 9 % (95 %ДИ = 6 %–14 %) ( $n = 23$ ), гипоплазия в 40 % (95 %ДИ = 34 %–46 %) ( $n = 97$ ), эктопия органа в 4 % (95 %ДИ = 2 %–7 %) ( $n = 10$ ), полная аплазия в 13 % (95 %ДИ = 9 %–18 %) ( $n = 31$ ), в 22 % (95 %ДИ = 17 %–29 %) ( $n = 53$ ) случаев исследование не было проведено (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Результаты ультразвукового исследования ЩЖ, n = 244.

### 3.3. Результаты молекулярно-генетического исследования

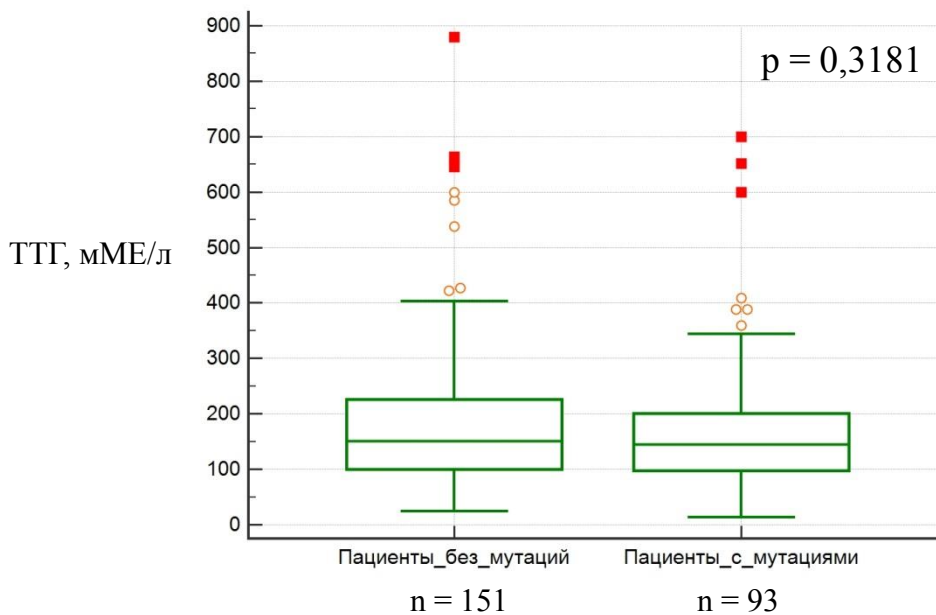
Молекулярно-генетическое исследование 12 генов-кандидатов проведено 244 пациентам. В результате у 93 пациентов было выявлено 64 варианта различных нуклеотидных изменений (38 % (95 %ДИ = 32 %–44 %), 93/244) (Таблица 4). Гомозиготные мутации выявлены в 12 % (95 %ДИ = 7 %–20 %) случаев (11/93), компаунд-гетерозиготные мутации в 13 % (95 %ДИ = 7 %–21 %) (12/93), гетерозиготные мутации в 67 % (95 %ДИ = 57 %–75 %) (62/93), в 8 % (95 %ДИ = 4 %–16 %) случаев мутации выявлены сразу в двух генах (8/93). На мутации в генах, приводящих к дисгормоногенезу, приходилось 84 % (95 %ДИ = 75 %–90 %) (78/93): *TPO*, n = 30; *DUOX2*, n = 24; *TG*, n = 8; *SLC5A5*, n = 3; *SLC26A4*, n = 6; *IYD*, n = 1; *DOUXA2*; n = 0, у 6 пациентов выявлены мутации в двух генах, в 14 % (95 %ДИ = 8 %–22 %) (13/93) мутаций выявлены в генах, отвечающих за эмбриональное развитие щитовидной железы: *TSHR*, n = 6; *NKX2-1*, n = 2; *NKX2-5*, n = 1; *PAX8*, n = 3; *FOXE1*, n = 0. У 2 пациентов (2 % (95 %ДИ = 0,1 %–8 %), 2/93) выявлены мутации в двух группах генов.

**Таблица 4 – Характеристика моногенных нуклеотидных изменений, выявленных у пациентов (n = 85)**

Ген	Общее количество пациентов	Количество пациентов с гомозиготными вариантами, n	Количество пациентов с гетерозиготными вариантами, n	Количество пациентов с компаунд-гетерозиготными вариантами, n	Уникальные нуклеотидные варианты, n	Патогенные нуклеотидные варианты, n	Возможно патогенные нуклеотидные варианты, n	Нуклеотидные варианты с неопределенной патогенностью, n
<i>TPO</i>	30 (35 %)		21	9	20	5	4	11
<i>DUOX2</i>	24 (28 %)	7	16	1	10	3		7
<i>TG</i>	8 (9 %)		8		7	2		5
<i>SLC5A5</i>	3 (4 %)	2		1	3	2	1	
<i>SLC26A4</i>	6 (7 %)		6		5		1	4
<i>DOXA2</i>	0				0			
<i>IYD</i>	1 (1 %)		1		1	1		
<i>TSHR</i>	6 (7 %)	2	3	1	5	1	1	3
<i>NKX2-1</i>	3 (4 %)		2		2	1		1
<i>NKX2-5</i>	1 (1 %)		1		1			1
<i>PAX8</i>	3 (4 %)		3		3	1		2
<i>FOXE1</i>	0				0			

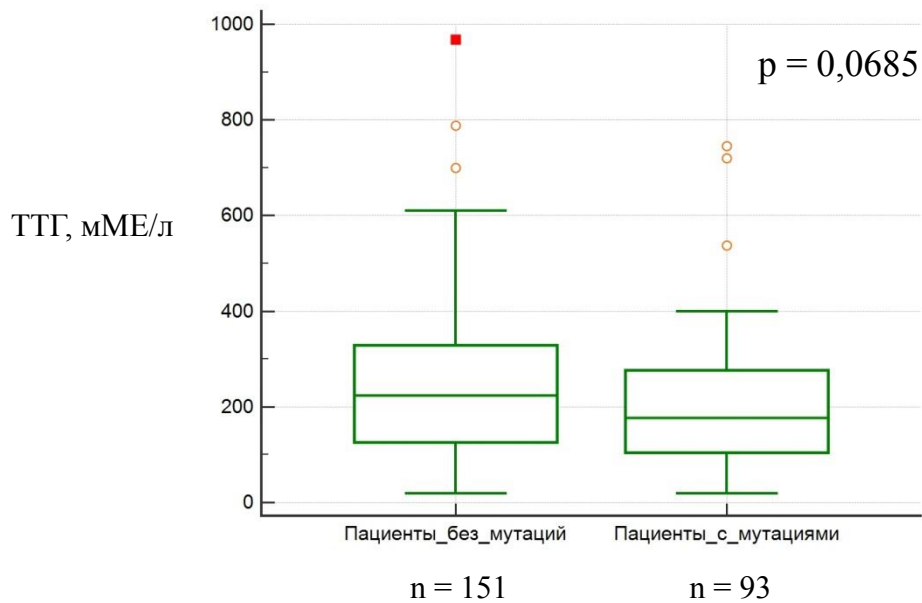
**Примечание** – характеристика дигенных вариантов приведена в таблице 16.

Медиана уровня ТТГ по данным неонатального скрининга в группе пациентов с наследственными формами ВГ составила 171,44 мМЕ/л [98,0; 200,0], в группе пациентов без выявленных мутаций – 184,2 мМЕ/л [100,0; 225,0], статистически значимой разницы в уровне ТТГ в этих группах не получено,  $p = 0,3181$  (U-тест Манна-Уитни) (Рисунок 8).



**Рисунок 8 – Различие уровня ТТГ по данным неонатального скрининга в группах пациентов с мутациями и без мутаций. U-тест Манна-Уитни,  $p = 0,3181$ . По оси ординат: уровень ТТГ, мМЕ/л. По оси абсцисс: медиана уровня ТТГ с интерквартильным размахом у пациентов без мутаций,  $n = 151$ . Медиана уровня ТТГ с интерквартильным размахом у пациентов с мутациями,  $n = 93$ .**

Медиана уровня ТТГ по результатам ретестирования в группе пациентов с мутациями составила 176,4 мМЕ/л [105,5; 276,5], в группе пациентов без мутаций – 224,3 мМЕ/л [125,62; 328,25], статистически значимой разницы по данному параметру также не получено,  $p = 0,0685$  (U-тест Манна-Уитни) (Рисунок 9).



**Рисунок 9 – Различие уровня ТТГ по данным ретестирования в группах пациентов с мутациями и без мутаций.** U-тест Манна-Уитни,  $p = 0,0685$ . По оси ординат: уровень ТТГ, мМЕ/л. По оси абсцисс: медиана уровня ТТГ с интерквартильным размахом у пациентов без мутаций,  $n = 151$ . Медиана уровня ТТГ с интерквартильным размахом у пациентов с мутациями,  $n = 93$ .

### 3.4. Моногенные изменения и клиническая характеристика пациентов

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *TPO*, и клиническая характеристика пациентов:**

В нашем исследовании среди моногенных мутаций, в гене *TPO* нуклеотидные изменения идентифицированы в 35 % случаев (95 %ДИ = 26 %-46 %, 30/85) (Таблица 5). Выявлено 20 вариантов различных нуклеотидных изменений, 5 из них относятся к патогенным вариантам, 4 к возможно патогенным, и 11 к вариантам с неопределенной патогенностью. Моногенные дефекты гена *TPO* включали инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания ( $n = 4$ ), нонсенс-мутации ( $n = 1$ ), миссенс-мутации ( $n = 13$ ), мутации в интроне, приводящие к нарушению сплайсинга ( $n = 2$ ). У 9 обследуемых выявлены компаунд-гетерозиготные мутации, гетерозиготные мутации выявлены у 21

пациента. При проведении MLPA у пациентов с одной гетерозиготной мутацией дополнительных обширных делеций или инсерций выявлено не было.



**Таблица 5 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *TPO* и клиническая характеристика пациентов (n = 30)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон/ интрон	Патогенность	Зиготность	*ExAC	#HGMD	Щитовидная железа	Ассоцииро- ванные пороки
<b>N1</b>	c.1181_1182insCG GC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	Описана [169]	Гипоплазия	Нет
<b>N2</b>	c.1181_1182insCG GC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	Описана [169]	Зоб	Нет
<b>N3</b>	c.1181_1182insCG GC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	Описана [169]	Многоузлов ой зоб	Нет
<b>N4</b>	c.1181_1182insCG GC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	Описана [169]	—	Нет
<b>N5</b>	c.1181_1182insCG GC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	Описана [169]	Зоб	Нет
<b>N6</b>	c.1851delC	p.S617RfsX23	<b>экзон 11</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	—	Зоб	Нет
<b>N7</b>	c.2618+1G>T		<b>интрон 15</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	—	Гипоплазия	Нет
<b>N8</b>	c.A1898T	p.D633V	<b>экзон 11</b>	Неопределенная патогенность	Het	—	—	Зоб	Нет
<b>N9</b>	c.C1449A	p.N483K	<b>экзон 9</b>	Неопределенная патогенность	Het	—	—	Аплазия	Нет

<b>N10</b>	c.C265T	p.R89X	<b>экзон 4</b>	<b>Патогенная</b>	Нет	—	Описана [201]	Гипоплазия	Нет
<b>N11</b>	c.C443T	p.A148V	<b>экзон 5</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.000049	—	Аплазия	Нет
<b>N12</b>	c.G1581T	p.W527C	<b>экзон 9</b>	<b>Возможно патогенная</b>	Нет	—	Описана [169]	Зоб	Нет
<b>N13</b>	c.G1751A	p.R584Q	<b>экзон 10</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.000082	—	Гипоплазия	Нет
<b>N14</b>	c.G1994A	p.R665Q	<b>экзон 11</b>	<b>Возможно патогенная</b>	Нет	0.000025	Описана [205]	Зоб	Нет
<b>N15</b>	c.G2017A	p.E673K	<b>экзон 12</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.00011	—	Гипоплазия	Нет
<b>N16</b>	c.G2017A	p.E673K	<b>экзон 12</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.00011	—	Гипоплазия	Нет
<b>N17</b>	c.G2017A	p.E673K	<b>экзон 12</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.00011	—	—	Нет
<b>N18</b>	c.G2017A	p.E673K	<b>экзон 12</b>	Неопределенная патогенность	Нет	0.00011	—	—	Нет
<b>N19</b>	c.T289C	p.S97P	<b>экзон 4</b>	Неопределенная патогенность	Нет	—	—	Зоб	Нет
<b>N20</b>	c.C208G	p.P70A	<b>экзон 4</b>	Неопределенная	Нет	0.00071	—	Нормальный	Нет

				патогенность				объем	
<b>N21</b>	c.T289C	p.S97P	<b>экзон 4</b>	Неопределенная патогенность	Het	—	—	Гипоплазия	Нет
<b>N22-1</b>	c.G1042A	p.G348R	<b>экзон 8</b>	Неопределенная патогенность	ComHet	—	—	Гипоплазия	Нет
	c.G1465A	p.A489T	<b>экзон 9</b>	Неопределенная патогенность		—	—		
<b>N22-2</b>	c.G1042A	p.G348R	<b>экзон 8</b>	Неопределенная патогенность	ComHet	—	—	Гипоплазия	Нет
	c.G1465A	p.A489T	<b>экзон 9</b>	Неопределенная патогенность		—	—		
<b>N23</b>	c.1851delC	p.S617RfsX23	<b>экзон 11</b>	<b>Патогенная</b>	ComHet	—	—	Нормальный объем	Нет
	c.2422delT	p.C808AfsX24	<b>экзон 14</b>	<b>Патогенная</b>		—	—		
<b>N24</b>	c.2422delT	p.C808AfsX24	<b>экзон 14</b>	<b>Патогенная</b>	ComHet	—	—	—	Нет
	c.C208G	p.P70A	<b>экзон 4</b>	Неопределенная патогенность		0.00071	—		
<b>N25</b>	c.C265T	p.R89X	<b>экзон 4</b>	<b>Патогенная</b>	ComHet	—	Описана [201]	Многоузловый зоб	Нейросенсорная тугоухость
	c.1181_1182insCGGC	p.A397PfsX76	<b>экзон 8</b>	<b>Патогенная</b>		—	Описана [169]		

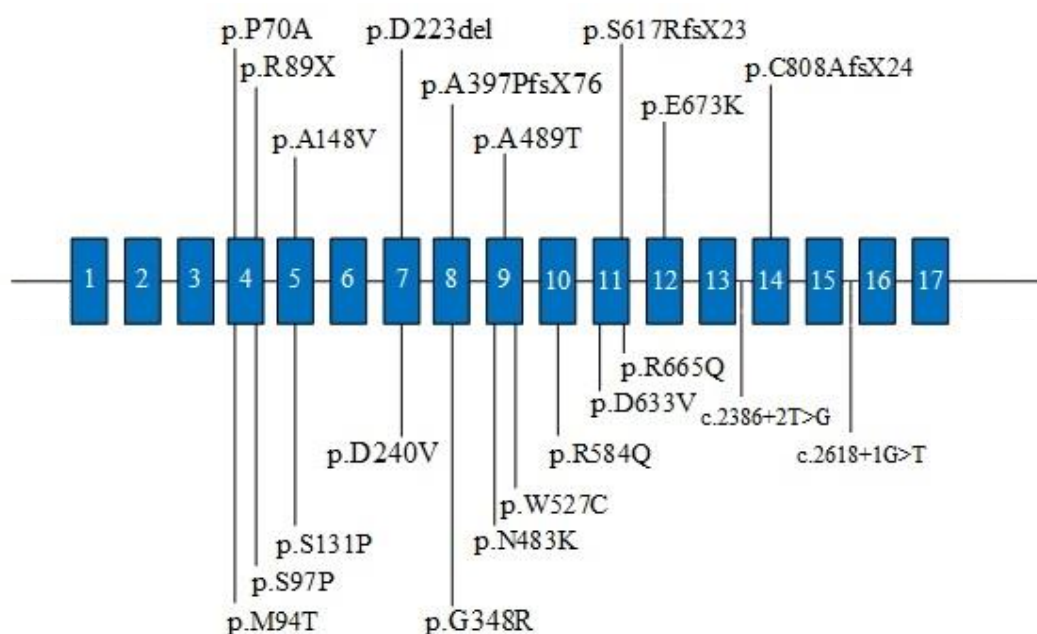
<b>N26</b>	c.T391C  c.2386+2T>G	p.S131P	экзон 5  интрон 13	Возможно патогенная  Возможно патогенная	ComHet	0.000058  —	Описана [202]  —	Многоузловый зоб	Нет
<b>N27-1</b>	c.667_669delGAT c.2422delT	p.D223del p.C808AfsX24	экзон 7 экзон 14	Патогенная Патогенная	ComHet	— —	— —	Зоб	Нет
<b>N27-2</b>	c.667_669delGAT c.2422delT	p.D223del p.C808AfsX24	экзон 7 экзон 14	Патогенная Патогенная	ComHet	— —	— —	Зоб	Нет
<b>N28</b>	c.T281C  c.A179T	p.M94T  p.D240V	экзон 4  экзон 7	Неопределенная патогенность  Неопределенная патогенность	ComHet	—  —	—  —	Зоб	Нет

### Примечания

1. Референсная последовательность *TPO* - NM\_000547;
2. #The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Нет – гетерозиготная мутация; ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация.

При анализе базы данных HGMD и мировой литературы, выявлено, что из идентифицированных изменений гена *TPO* 5 были описаны ранее [169, 168, 201, 202], остальные 15 вариантов считаются не описанными. Выявленные в ходе исследования изменения в гене *TPO* были локализованы с экзонов 4 по 14, наиболее часто в экзонах 4 ( $n = 7$ ) и 8 ( $n = 8$ ). Распределение выявленных изменений представлено на Рисунке 10.



**Рисунок 10 – Схематическое обозначение нуклеотидных изменений в гене *TPO*, выявленных в ходе исследования. Референсная последовательность NCBI: NM\_000547**

Среди выявленных моногенных нуклеотидных изменений наиболее часто встречалась дупликация 4 пар оснований в экзоне 8 со сдвигом рамки считывания (c.1181\_1182insCGGC p.A397PfsX76) ( $n = 6$ , 20 %). В результате данного изменения происходит образование преждевременного стоп-кодона и потеря части гемсвязывающего домена. Нуклеотидное изменение встречалось как составе компаунд-гетерозиготных мутаций, так и отдельно в гетерозиготном состоянии.

К нуклеотидным изменения, приводящим к укорочению длины белка, относились делеции со сдвигом рамки считывания с.2422delT p.C808AfsX24 (n = 4, из них 1 пара сибсов), с.1851delC p.S617RfsX23 (n = 2) с.667\_669delGAT p.D223del (n = 2, 1 пара сибсов) и нонсенс-мутация с.C265T p.R89X (n = 2). Все изменения расценены как патогенные.

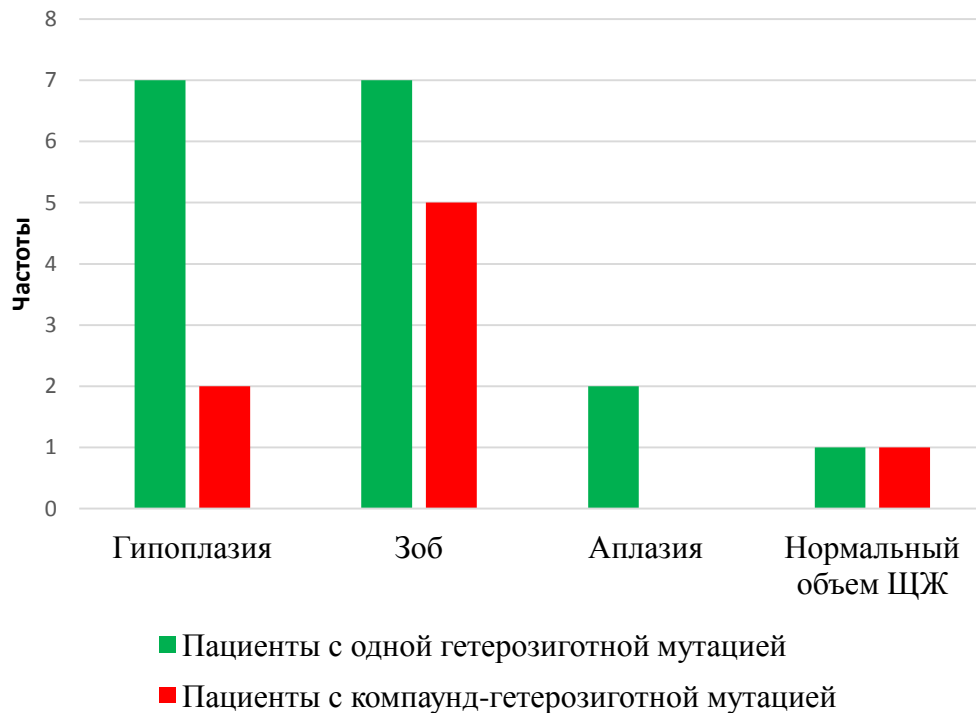
Моногенные миссенс-мутации выявлены у 21 обследуемого: с.C208G p.P70A (n = 2), с.G1042A p.G348R (n = 2, 1 пара сибсов), с.G1465A p.A489T (n = 2, 1 пара сибсов), с.G2017A p.E673K (n = 4), с.T289C p.S97P (n = 2), с.A179T p.D240V (n = 1), с.A1898T p.D633V (n = 1), с.C1449A p.N483K (n = 1), с.C443T p.A148V (n = 1), с.G1581T p.W527C (n = 1), с.G1751A p.R584Q (n = 1), с.G1994A p.R665Q (n = 1), с.T281C p.M94T (n = 1), с.T391C p.S131P (n = 1). Все миссенс-мутации, за исключением с.G1581T p.W527C, с.G1994A p.R665Q и с.T391C p.S131P, расценены как нуклеотидные изменения с неопределенной патогенностью. Мутации с.G1581T p.W527C, с.G1994A p.R665Q и с.T391C p.S131P отнесены к возможно патогенным, так как данные изменения описаны ранее у пациентов с гипотиреозом [168, 202].

К мутациях в интроне относились с.2618+1G>T (n = 1) и с.2386+2T>G (n = 1), расцененные как патогенная и возможно патогенная соответственно.

У пациентов с моногенными мутациями в гене *TPO* по данным ультразвуковой диагностики зоб без узловых образований выявлен в 33 % (95 %ДИ = 19 %–51 %) (n = 10), многоузловой зоб в 10 % (95 %ДИ = 3 %–26 %) (n = 3), нормальный объем ЩЖ в 7 % (95 %ДИ = 1 %–22 %) (n = 2), аплазия железы в 7 % (95 %ДИ = 0,1 %–22 %) (n = 2) и гипоплазия в 30 % (95 %ДИ = 14 %–54 %) (n = 9). 4 пациентам ультразвуковое исследование не проводилось.

Случаи аплазии щитовидной железы выявлены только у пациентов с одной гетерозиготной миссенс-мутацией в гене *TPO*. Большинство случаев гипоплазии ЩЖ (n = 7) выявлено у пробандов с одной гетерозиготной мутацией. Увеличение ЩЖ в группе пациентов с одной мутацией выявлено в 7 случаях, с компаунд-

гетерозиготными мутациями в 5. Нормальный объем железы диагностирован с равной частотой в двух группах (Рисунок 11).



**Рисунок 11 – Соотношение между количеством мутировавших аллелей в гене *TPO* и размером ЩЖ по данным ультразвуковой диагностики (n = 30, 4 пациентам исследование не проведено)**

В нашей группе многоузловой зоб выявлен только у пациентов с моноаллельными мутациями в гене *TPO*. Заместительная терапия левотироксином пациенту N3 начата в возрасте 3 месяцев, N26 в 5 месяцев и N25 в 2 дня, которую они, в последующем, получали в возрастающих дозах под контролем уровня ТТГ. Впервые узловые образования ЩЖ выявлено в возрасте 10 (N3), 8 (N25) и 12 лет (N26).

Особый интерес представляет пациент N25 (данный клинический случай опубликован нами ранее [204]), у которого увеличение ЩЖ выявлено внутриутробно при проведении планового ультразвукового исследования на 30-й неделе гестации, на 31-й неделе уровень ТТГ в пуповинной крови составил более

200 мЕд/л. При рождении у ребенка отмечалась деформация шеи за счет увеличения объема щитовидной железы (гигантский зоб) (Рисунок 12, 13). Общий объем ЩЖ в 1 месяц составлял 40 мл. На фоне проводимой терапии сначала отмечалось уменьшение размеров ЩЖ, однако с 8-летнего возраста объем ЩЖ начал прогрессивно нарастать, появились узловые образования в обеих долях. В 16 лет объем ЩЖ составлял 122 мл, с множественными образованиями округлой формы, пониженной и нормальной эхогенности, максимальным размером до 2,8х1,7х2,7 см (в нижней трети левой доли). Кроме того, при обследовании у сурдолога в возрасте 4,5 лет, у пациента выявлена двусторонняя нейросенсорная тугоухость 2-3 степени. Учитывая сочетание у пациента врожденного гипотиреоза, многоузлового зоба и нейросенсорной тугоухости, был установлен диагноз «Синдром Пендреда», заподозрено наличие инактивирующих мутаций в гене *SLC26A4*. Однако при проведении молекулярно-генетического исследования на панели генов «Гипотиреоз», выявлена составная гетерозиготная мутация в гене ТПО: с.265C>Т р.R89X и с.1181\_1182insCGGC р.A397PfsX76. Нонсенс-мутация с.265C>Т, расположенная в экзоне 4, приводит к образованию стоп-кодона в положении 89 и выраженному укорочению белка ТПО с полной потерей гемсвязывающего домена. Вторая мутация с.1181\_1182insCGGC расположена в экзоне 8. Результатом такой мутации также является образование преждевременного стоп-кодона с потерей части гемсвязывающего домена. Таким образом, можно предполагать, что сочетание данных мутаций у пробанда приводит к полной потере функциональной активности тиреопероксидазы, чем объясняется столь тяжелое течение заболевания.





**Рисунок 12 – Фотография пациента N25, возраст 2 недели**



**Рисунок 13 – Фотография пациента N25, возраст 4 месяца**

Ранее в мировой литературе уже были представлены случаи сочетания мутаций гена *TPO* и нейросенсорной тугоухости [205]. Выявлено, что формирование тугоухости при мутациях гена *TPO* вторично и связано с дефицитом тиреоидных гормонов в эмбриональном и неонатальном периодах, следствием чего является замедление формирования структур внутреннего уха [206]. В 2013 году в исследовании Johnson с соавт. проведена оценка влияния мутаций в гене *TPO* на развитие внутреннего уха. Для исследования были выведены две линии мутантных мышей (*Tpo tee* и *Tpo tee-2J*). С целью оценки слуха мышей применялся метод определения коротколатентных слуховых вызванных потенциалов. Пороги слуха у гомозиготных мутантных мышей (*tee/tee* и *tee-2J/tee-2J*) были резко повышены (60-70 дБ). Гистологические исследования позволили установить, что нарушение слуха у мутантных мышей связаны с изменением размеров и формы текториальной мембраны и отставанием в развитии архитектоники внутреннего уха [206].

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *DUOX2*, и клиническая характеристика пациентов:**

Моногенные мутации в гене *DUOX2* обнаружены в 28 % случаев (95 %ДИ = 20 %–39 %, 24/85). Нами выявлено 2 нонсенс-мутации, 7 миссенс-мутаций и 1 делеция со сдвигом рамки считывания (Таблица 6). Мутации были локализованы с 9 по 34 экзоны.

Наиболее часто встречающаяся мутация c.2895\_2898del p.S965fsX30 выявлена у 16 пациентов в гомозиготном, гетерозиготном и составном гетерозиготном состояниях. В большинстве случаев нонсенс и миссенс-мутации выявлены в гетерозиготном состоянии (n = 8). Мутация c.A4637G p.E1546G расценена как возможно патогенная, остальные миссенс-мутации в данном гене классифицированы как изменения с неопределенной патогенностью; варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (делеции и нонсенс-мутации) - к патогенным изменениям. К ранее описанным изменениям относились мутации c.A4637G p.E1546G, c.2895\_2898del p.S965fsX30, c.C1126T p.R376W, c.C2056T p.Q686X, для которых проведены функциональные исследования, доказывающие их патологическую значимость [11, 110, 180].

Наличие у наших пациентов как моноаллельных, так и биаллельных мутаций в гене *DUOX2* согласуется с данными мировой литературы [11, 110, 180]. Кроме того, не выявлена корреляция между количеством мутировавших аллелей и тяжестью гипотиреоза [11, 110, 180], что так же было продемонстрировано в нашей когорте пациентов, ввиду наличия у всех пациентов тяжелого врожденного гипотиреоза.

**Таблица 6 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *DUOX2*, и клиническая характеристика пациентов (n = 24)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон/ интрон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD	Щитовидная железа
<b>N29</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
<b>N30</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	Зоб
<b>N31</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
<b>N32</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Аплазия
<b>N33</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	—
<b>N34</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
<b>N35</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Нормальный объем
<b>N36</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
<b>N37</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана	Зоб

							[180]	
<b>N38</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	Нормальный объем
<b>N39</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	Нормальный объем
<b>N40</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
<b>N41</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	—
<b>N42</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Нормальный объем
<b>N43</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.0029	Описана [180]	Нормальный объем
<b>N44</b>	c.A4637G	p.E1546G	экзон 34	Вероятно патогенная	Het	0.00084	Описана [11]	—
<b>N45</b>	c.C1126T	p.R376W	экзон 10	Неопределенная патогенность	Het	0.00012	Описана [110]	Аплазия
<b>N46</b>	c.C1294T	p.R432C	экзон 12	Неопределенная патогенность	Het	—	—	—
<b>N47</b>	c.C3250T	p.R1084X	<b>экзон 25</b>	<b>Патогенная</b>	Het	0.000099	—	Гипоплазия
<b>N48</b>	c.C3970T	p.P1324S	экзон 30	Неопределенная	Het	—	—	Гипоплазия

				патогенность				
<b>N49</b>	c.G1040A	p.R347K	экзон 9	Неопределенная патогенность	Het	0.000034	—	—
<b>N50</b>	c.A4637G	p.E1546G	экзон 34	Вероятно патогенная	Het	0.00084	Описана [11]	Гипоплазия
<b>N51</b>	c.T1366C	p.W456R	экзон 12	Неопределенная патогенность	Het	—	—	—
<b>N52</b>	c.2895_2898del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	ComHet	—	Описана [180]	—
	c.C2056T	p.Q686X	<b>экзон 17</b>	<b>Патогенная</b>		—	Описана [180]	

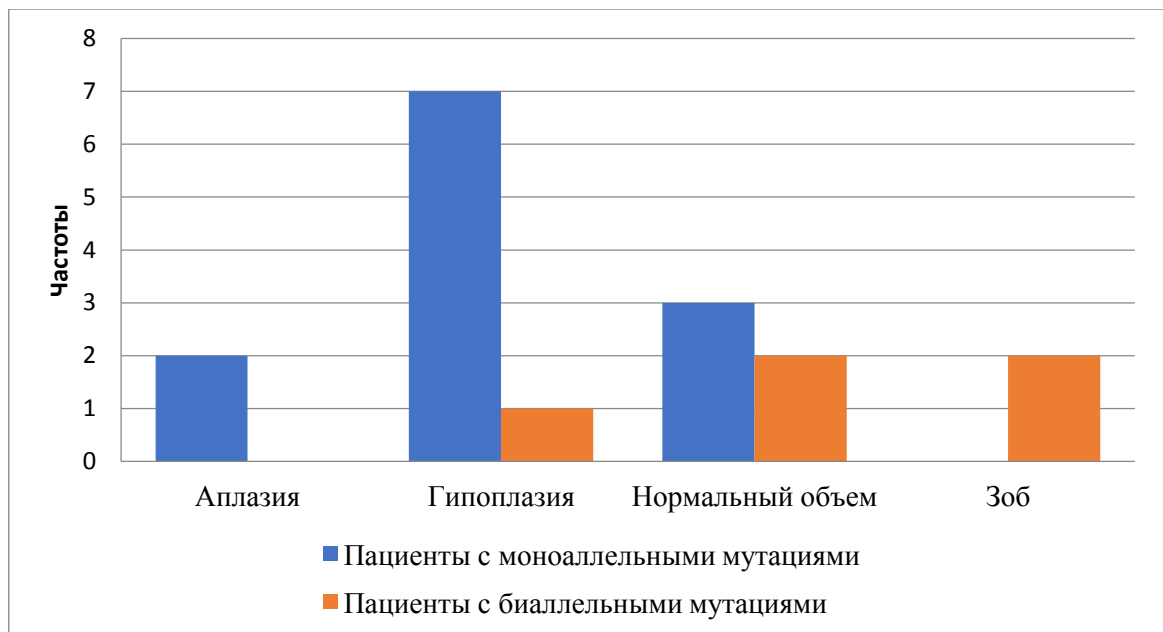
### Примечания

1. Референсная последовательность *DUOX2* - NM\_014080
2. #The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация; Hom – гомозиготная мутация; ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация.

Для пациентов с моноаллельными мутациями по данным ультразвукового исследования характерны различные формы дисгенезии ЩЖ, выявленные в 9 случаях: аплазия у 2, гипоплазия - 7. Нормальный объем ЩЖ обнаружен у 3 пациентов. Увеличение ЩЖ у пробандов с моноаллельными мутациями не диагностировано. В группе пациентов с биаллельными мутациями с равной частотой выявлен зоб ( $n = 2$ ) и нормальный объем железы ( $n = 2$ ), в то время как гипоплазия органа зафиксирована лишь в 1 случае. 4 пациентам из первой группы и 3 из второй ультразвуковое исследование не проведено (Рисунок 14).

Ассоциированных пороков развития у пациентов с мутациями в гене *DUOX2* не выявлено.



**Рисунок 14 – Соотношение между количеством мутировавших аллелей в гене *DUOX2* и размером ЩЖ по данным ультразвуковой диагностики ( $n = 24$ , 7 пациентам исследование не проведено)**

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *TG*, и клиническая характеристика пациентов:**

Моногенные мутации в гене *TG* выявлены у 8 пациентов (9 % (95 %ДИ = 5 %–18 %)). Все нуклеотидные изменения идентифицированы в

гетерозиготном состоянии. Мутация с.G2977A р.А993Т выявлена сразу у двух пациентов. Спектр моногенных изменений в гене *TG* включал в себя миссенс-мутации ( $n = 5$ ), нонсенс-мутацию ( $n = 1$ ), а также мутацию в интроне, приводящую к нарушению сплайсинга ( $n = 1$ ) (таблица 7). По результатам проверки базы данных HGMD [56], выявленные в ходе нашего исследования изменения ранее описаны не были.

Идентифицированные нами нонсенс и миссенс-мутации локализованы с 4 по 11 экзон, что в белковой структуре соответствует первому типу повторяющихся доменов. Мутация с.G2776T р.Е926Х расценена как патогенная, приводит к образованию преждевременного стоп кодона в положении 926, следствием чего является полная потеря центральных и терминальных доменов, акцепторных остатков тирозина в положениях 2554, 2568 и 2747, а также донорного остатка в 1448 позиции [187, 188]. Миссенс-мутации расценены как изменения с неопределенной патогенностью.

**Таблица 7 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *TG* ( $n = 8$ )**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон/ интрон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
<b>N53</b>	с.5401+2Т>С		<b>интрон 27</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	—
<b>N54</b>	с.C2338A	р.Q780K	экзон 10	Неопределенная патогенность	Het	—	—
<b>N55</b>	с.G1900A	р.G634R	экзон 9	Неопределенная патогенность	Het	0.00049	—
<b>N56</b>	с.G2776T	р.Е926Х	<b>экзон 11</b>	<b>Патогенная</b>	Het	—	—
<b>N57</b>	с.G2977A	р.А993Т	<b>экзон 11</b>	Неопределенная патогенность	Het	0.00033	—
<b>N58</b>	с.G2977A	р.А993Т	<b>экзон 11</b>	Неопределенная патогенность	Het	0.00033	—
<b>N59</b>	с.T2200A	р.S734Т	экзон 10	Неопределенная	Het	0.000017	—

				патогенность			
<b>N60</b>	c.G455A	p.R152H	экзон 4	Неопределенная патогенность	Het	0.00068	—

### Примечания

1. Референсная последовательность *TG* - NM\_003235;
2. <sup>#</sup>The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. <sup>\*</sup>ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация.

По данным ультразвукового исследования ЩЖ зоб выявлен у пациентов с более тяжелыми вариантами нуклеотидных изменений, приводящими к укорочению белка (нонсенс-мутация и мутация в интроне). Для моногенных миссенс вариантов характерны гипоплазия ( $n = 3$ ), аплазия ( $n = 1$ ) и нормальный объем железы ( $n = 1$ ). У 1 пациента с миссенс-мутацией гена *TG* исследование размеров ЩЖ не проведено. Данные пациентов представлены в Таблице 8.

**Таблица 8 – Клиническая характеристика пациентов с моногенными мутациями в гене *TG* ( $n = 8$ )**

Пациент	ДНК	Белок	Щитовидная железа
<b>N53</b>	c.5401+2T>C		Зоб
<b>N54</b>	c.C2338A	p.Q780K	Гипоплазия
<b>N55</b>	c.G1900A	p.G634R	Аплазия
<b>N56</b>	c.G2776T	p.E926X	Зоб
<b>N57</b>	c.G2977A	p.A993T	Нормальный объем
<b>N58</b>	c.G2977A	p.A993T	Гипоплазия
<b>N59</b>	c.T2200A	p.S734T	Гипоплазия
<b>N60</b>	c.G455A	p.R152H	—



**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *SLC5A5*, и клиническая характеристика пациентов:**

В гене *SLC5A5* выявлено 3 мутации (4 % (95 %ДИ = 1 %–10 %, 3/85)) (Таблица 9): нонсенс-мутация (у 2 пациентов), делеция со сдвигом рамки считывания и миссенс-мутация. Мутация с.G1183A p.G395R отнесена в группу возможно патогенных изменений, все остальные мутации - патогенные. На основании данных функциональных исследований выявлено, что в гомозиготном состоянии мутация с.G1183A p.G395R приводит к нарушению конформации белка NIS и прекращению транспорта йодида через мембрану тироцитов [143]. У описанных ранее пациентов с гомозиготной мутацией p.G395R выявлен тяжелый врожденный гипотиреоз, на фоне отсутствия увеличения ЩЖ [143]. У нашего пациента, напротив, диагностирован зоб, что возможно связано с наличием мутации с.469delA p.N157fs, которая приводит к потере трансмембранных доменов с 5 по 13, нарушению гликозилирования и, как следствие, полной потери функциональной активности белка [143].

Пациенты N61-1 и N61-2 являются сибсами от близкородственного брака. По данным ультразвуковой диагностики у них выявлено уменьшение размеров ЩЖ относительно ППТ. Идентифицированная гомозиготная нонсенс-мутация с.C1906T p.R636X ранее не описана, расположена в экзоне 15, приводит к укорочению внутриклеточного С-конца. Функциональная значимость данного изменения остается неясной, ввиду отсутствия описания подобных мутаций ранее.

**Таблица 9 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *SLC5A5*, и клиническая характеристика пациентов (n = 3)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
N61-1	с.C1906T	p.R636X	экзон 15	Патогенная	Hom	—	—

<b>N61-2</b>	c.C1906T	p.R636X	<b>экзон 15</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	—	—
<b>N62</b>	c.469delA c.G1183A	p.N157fs p.G395R	<b>экзон 3 экзон 10</b>	<b>Патогенная Возможно патогенная</b>	ComHet	— 0.000066	— Описана [143]

### Примечания

1. Референсная последовательность *SLC5A5* - NM\_000453;
2. <sup>#</sup>The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. <sup>\*</sup>ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация; Hom – гомозиготная мутация.

### Описание моногенных изменений, выявленных в гене *SLC26A4*, и клиническая характеристика пациентов:

На моногенные мутации в гене *SLC26A4* приходилось 7 % случаев (95 % ДИ = 3 %–15 %). Все выявленные изменения в гене *SLC26A4* (Таблица 10) были в гетерозиготном состоянии и являлись миссенс-мутациями. Из 5 обнаруженных нами мутаций одна относится к возможно патогенным, остальные – к группе с неопределенной патогенностью. Мутация c.A1246C p.T416P была описана в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии как у пациентов с классическим симптомокомплексом синдрома Пендреда, так и с изолированным гипотиреозом [207]. В результате данной мутации происходит замена консервативного остатка треонина на пролин в позиции 416, находящейся во внеклеточной петле между трансмембранными доменами 9 и 10 [207], что вероятно должно приводить к снижению функциональной активности белка.

Мутации c.G441A p.M147I и c.G2219T p.G740V описаны в гетерозиготном состоянии у пациентов с несидромальной потерей слуха [208, 209], данные о наличии этих изменения у пациентов с гипотиреозом отсутствуют. При этом у пациентов из нашей группы нарушений слуха не выявлено. В связи, с чем

значимость выявленных изменений остается неопределенной.

**Таблица 10 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *SLC26A4* (n = 6)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
<b>N63</b>	c.A1246C	p.T416P	экзон 10	Возможно патогенная	Het	0.00021	Описана [207]
<b>N64</b>	c.A736C	p.N246H	экзон 6	Неопределенная патогенность	Het	0.0000082	—
<b>N65</b>	c.G1483A	p.D495N	экзон 13	Неопределенная патогенность	Het	—	—
<b>N66</b>	c.G441A	p.M147I	экзон 5	Неопределенная патогенность	Het	0.00051	Описана [208]
<b>N67</b>	c.G441A	p.M147I	экзон 5	Неопределенная патогенность	Het	0.00051	Описана [208]
<b>N68</b>	c.G2219T	p.G740V	экзон 19	Неопределенная патогенность	Het	0.00027	Описана [209]

**Примечания**

1. Референсная последовательность *SLC26A4* - NM\_000441;
2. #The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация.

Только у 1 пациента (N64) с мутацией в гене *SLC26A4* помимо ВГ отмечалась нейросенсорная тугоухость. Идентифицированная у пациента моноаллельная замена p.N246H аннотирована как изменение с неопределенной патогенностью.

Клиническая характеристика пациентов с мутациями в гене *SLC26A4* представлена в Таблице 11.

**Таблица 11 – Клиническая характеристика пациентов с моногенными мутациями в гене *SLC26A4* (n = 6)**

Пациент	ДНК	Белок	Щитовидная железа	Ассоциированные пороки
<b>N63</b>	c.A1246C	p.T416P	—	Нет
<b>N64</b>	c.A736C	p.N246H	—	Нейросенсорная тугоухость
<b>N65</b>	c.G1483A	p.D495N	Гипоплазия	Нет
<b>N66</b>	c.G441A	p.M147I	—	Нет
<b>N67</b>	c.G441A	p.M147I	Зоб	Нет
<b>N68</b>	c.G2219T	p.G740V	—	Нет

**Описание моногенных изменения, выявленного в гене *IYD*, и клиническая характеристика пациента:**

В гене *IYD* выявлена одна патогенная гетерозиготная нонсенс-мутация c.C448T p.R150X в экзоне 3 у пациента N69, что составило 1 % (95 %ДИ = <0,01 %–7 %, 1/85) от общего числа выявленных моногенных мутаций. Данное нуклеотидное изменение приводит к выраженному укорочению белка и практически полной потере каталитического С-концевого домена [121]. Ранее в мировой литературе были описаны случаи моноаллельных мутаций гена *IYD*, опосредующих развитие заболевания [100, 101].

По результатам ультразвуковой диагностики выявлена эктопия ЩЖ, что не характерно для данного заболевания. Однако, ввиду сложности визуализации эктопированных тканей в подъязычной области, нельзя исключать возможность ложной диагностики. В данном случае необходимо дополнительное проведение скинтиграфии органа с I-123, от которой пациент отказался.

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *TSHR*, и клиническая характеристика пациентов:**

На моногенные мутации в гене *TSHR* по результатам проведенного исследования приходилось 7 % случаев (95 %ДИ = 3 %–15 %) (n = 6). Компаунд-гетерозиготная мутация в гене *TSHR* выявлена у одного пациента (N73), у двух

сибсов от близкородственного брака (N70-1 и N70-2) выявлена гомозиготная мутация, трое пациентов (N71, N72-1, N72-2) имели по одной гетерозиготной мутации (Таблица 12). Для гипотиреоза, обусловленного мутациями в гене *TSHR*, описан аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный тип наследования [2]. Однако считается, что биаллельные мутации гена *TSHR* ведут к более тяжелой форме врожденного гипотиреоза, в то время как моноаллельные изменения приводят к субклиническому гипотиреозу или изолированной гипертиротропинемии [210]. В связи, с чем пациентам из последней группы (N71, N72-1, N72-2) проведено дополнительное генетическое исследование методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб, однако патологических изменений выявлено не было.

Среди выявленных нами нуклеотидных изменений, ранее описанной, оказалась только миссенс-мутация с.C484G p.P162A, замена пролина на аланин в положении 162 [211]. По результатам функционального исследования выявлено, что для стимуляции мутантного рецептора требуется значительное повышение уровня ТТГ (в 20 раз), по сравнению с нормой [211].

**Таблица 12 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *TSHR* (n = 6)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
N70-1	c.141delC	p.I47fs	экзон 1	Патогенная	Hom	—	—
N70-2	c.141delC	p.I47fs	экзон 1	Патогенная	Hom	—	—
N71	c.C484G	p.P162A	экзон 6	Возможно патогенная	Het	0.00017	Описана [211]
N72-1	c.G902A	p.C301Y	экзон 10	Неопределенная патогенность	Het	—	—
N72-2	c.G902A	p.C301Y	экзон 10	Неопределенная патогенность	Het	—	—
N73	c.C1532T	p.T511M	экзон	Неопределенная	ComHet	0.000033	—

	c.T1697G	p.V566G	<b>10</b> экзон <b>10</b>	патогенность Неопределенная патогенность		—	—
--	----------	---------	---------------------------------	--	--	---	---

### Примечания

1. Референсная последовательность *TSHR* - NM\_000369;
2. <sup>#</sup>The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. <sup>\*</sup>ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация; ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация; Hom – гомозиготная мутация.

Клинически у пациентов с моногенными мутациями в *TSHR* выявлено уменьшенные и нормальные размеры ЩЖ, что согласуется с патогенезом заболевания (Таблица 13). У двух sibсов с гомозиготной мутацией p.I47fs обнаружена аплазия ЩЖ, что вероятно связано с полной утратой рецептором функциональной активности. Мутация p.C301Y представляет собой замену цистеина на тирозин, в области цистеин-богатых доменов, что должно приводить к нарушению связывания с лиганом и, возможно, к дезорганизации третичной структуры белка. Однако данная мутация идентифицирована в гетерозиготном состоянии, что может обуславливать наличие остаточной активности рецептора, и нормальные размеры ЩЖ у пациентов. Мутации p.T511M и p.V566G, выявленные у пациента N73, расположены в 3 и 4 трансмембранных доменах соответственно, ранее не описаны. Наличие данных изменений должно приводить к нарушению выработки цАМФ и передачи лиганда. Тем не менее, обнаружение щитовидной железы нормальных размеров у пациента, указывает на неполную блокировку pТТГ.

**Таблица 13 – Клиническая характеристика пациентов с моногенными мутациями в гене *TSHR* (n = 6)**

Пациент	ДНК	Белок	Щитовидная железа
N70-1	c.141delC	p.I47fs	Аплазия
N70-2	c.141delC	p.I47fs	Аплазия
N71	c.C484G	p.P162A	Гипоплазия
N72-1	c.G902A	p.C301Y	Нормальный объем
N72-2	c.G902A	p.C301Y	Нормальный объем
N73	c.C1532T c.T1697G	p.T511M p.V566G	Нормальный объем

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *NKX2-1*, и клиническая характеристика пациентов:**

Различные моногенные нуклеотидные изменения в гене *NKX2-1* выявлены у 3 пациентов (4 % (95 %ДИ = 1 %–10 %)). В нашем исследовании выявлено 2 делеции со сдвигом рамки считывания, которые были классифицированы как патогенные, и 1 миссенс-мутация, с неопределенной патогенностью (Таблица 14), все мутации идентифицированы в экзоне 3. Ранее данные изменения описаны не были. Все нуклеотидные изменения выявлены в гетерозиготном состоянии, что согласуется с аутосомно-доминантным типом наследования, характерным для данного заболевания [64].

**Таблица 14 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *NKX2-1* (n = 3)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
N74	c.628_772del		экзон 3	Патогенная	Het	—	—
N75	c.A1180G	p.T394A	экзон 3	Неопределенная патогенность	Het	—	—
N76	c.943_949del		экзон 3	Патогенная	Het	—	—

	TGCAGCCT						
--	----------	--	--	--	--	--	--

### Примечания

1. Референсная последовательность *NKX2-1* - NM\_001079668.
2. <sup>#</sup>The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. <sup>\*</sup>ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация.

Мутации в гене *NKX2-1*, приводят к развитию синдрома мозг-легкие-щитовидная железа, классическими проявлениями которого являются доброкачественная наследственная хорея, гипотиреоз и респираторный-дистресс синдром [64]. Однако сочетание всех компонентов заболевания встречается только в 50 % случаев [64], что так же было продемонстрировано у пациентов из нашей группы.

Пациенту N74 диагноз «Врожденный гипотиреоз» установлен на основании повышения уровня ТТГ по данным неонатального скрининга до 196 мМЕ/л, по ретестированию до 233 мМЕ/л. По данным ультразвуковой диагностики щитовидная железа расположена в типичном месте, гипоплазирована. Признаков респираторного дистресс-синдрома не отмечалось. С первых месяцев жизни у пациента выявлена мышечная гипотония, задержка моторного развития (ходит с поддержкой с 2 лет), при нормальном психическом развитии. В возрасте 15 месяцев появились гиперкинезы ног. В ходе молекулярно-генетического исследования выявлена гетерозиготная мутация в гене *NKX2-1*: c.628\_772del (делеция 144 нуклеотидов в экзоне 3). Удаление значительного числа нуклеотидов, позволяет предположить, что данное изменение является патологическим и приводит к потере функции белка [212].

Уровень ТТГ по результатам неонатального скрининга у пациента N75 был повышен до 180 мМЕ/л, отмечалась полная аплазия щитовидной железы по результатам ультразвукового исследования. Нарушений со стороны дыхательной и



нервно-мышечной системы не выявлены. По данным молекулярно-генетического исследования выявлена миссенс-мутация с.А1180G р.Т394А, аннотированная как изменение с неопределенной патогенностью. По данным мировой литературы установлено, что для миссенс-вариаций характерно более легкое течение заболевания, что согласуется с нашими результатами.

У пациента N76 выявлен наиболее тяжелый вариант заболевания. По результатам неонатального скрининга уровень ТТГ соответствовал 350 мМЕ/л. При рождении отмечалась нарастающая дыхательная недостаточность, потребовавшая перевода ребенка на искусственную вентиляцию легких (снят в возрасте 1 месяца), диагностирована внутриутробная правосторонняя очагово-сливная пневмония. С 1х суток жизни отмечается судорожный синдром.

При осмотре пробанда (N76) в возрасте 7 месяцев, состояние средней степени тяжести, за счет хронической дыхательной недостаточности. Выявлена деформация ногтевых пластин по типу «часовых стекол» на руках и ногах, грудная клетка цилиндрической формы, одышка с участием вспомогательной мускулатуры (втяжение межреберий), с нарастанием на фоне незначительной двигательной активности, перкуторный звук над легкими с коробочным оттенком, цианоз носогубного треугольника. Отмечается мышечная гипотония, на этом фоне задержка моторного развития: голову держит не уверенно, не переворачивается. Гиперкинезы не выявлены. Пальпаторно щитовидная железа не определяется, по результатам ультразвукового исследования ЩЖ расположена типично, нормального объема. По данным компьютерной томографии органов грудной клетки диагностированы признаки диффузного пневмосклероза, парасептальной эмфиземы. У пациента найдена мутация с.943\_949delTGCAGCCT в гене *NKX2-1*, делеция 7 нуклеотидов в экзоне 3.

Более тяжелое течение заболевания у пациентов N74 и N76 обусловлено наличием обширных делеций гена *NKX2-1*, что согласуются с литературными данными [28, 59].

У родителей пациентов из данной группы аналогичные изменения в гене

*NKX2-1* идентифицированы не были, соответственно во всех случаях мутации были *de novo*.

**Описание моногенных изменения, выявленного в гене *NKX2-5*, и клиническая характеристика пациента:**

В данном исследовании выявлена 1 гетерозиготная миссенс-мутация в гене *NKX2-5* у пациента N77 (1 % (95 %ДИ = <0,01 %–7 %)). Нуклеотидное изменение с.G676A р.D226N, локализованное в экзоне 2, отнесено к вариантам с неопределенной патогенностью.

По данным ультразвукового исследования щитовидной железы выявлена гипоплазия органа. Пороков развития сердца у пациента выявлено не было. Вероятно, уменьшение размеров ЩЖ характерно для пациентов с мутациями в гене *NKX2-5*, в соответствии с функциональной активностью белка *NKX2-5* [45]. Кроме того, у пациентов с мутациями в данном гене должны быть выявлены пороки развития сердца [80, 81]. Однако нарушения в закладке сердца не были обнаружены ни у нашего пациента, ни у пациентов из исследования M. Dentice с соав. [45], что ставит под сомнение патогенность данных изменений.

**Описание моногенных изменений, выявленных в гене *PAX8*, и клиническая характеристика пациентов:**

В трех случаях обнаружены моногенные мутации в гене *PAX8* (4 % (95 %ДИ = 1 %–10 %)) (Таблица 15). 2 мутации были миссенс, с неопределенной патогенностью, 1 – патогенная делеция гена *PAX8*. Мутация с.G440A р.C147Y локализована в 5 экзоне, между доменом Paired box и консервативным октапептидом [213]. Ранее мутации в этой части *PAX8* идентифицированы не были, в связи, с чем влияние данного изменения на функцию белка не определена [157, 213]. Миссенс-мутация с.A701G р.E234G расположена в центральном гомеодомене, должна приводить к снижению транскрипционной активности [213].

**Таблица 15 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в гене *PAX8* (n = 3)**

Пациент	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
N78	c.A701G	p.E234G	экзон 7	Неопределенная патогенность	Het	—	—
N79	c.G440A	p.C147Y	экзон 5	Неопределенная патогенность	Het	—	—
N80	chr2:113973574_ 114036498del			<b>Патогенная</b>	Het	—	—

**Примечания**

1. Референсная последовательность *PAX8* - NM\_003466;
2. The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация.

Интерес представляет пациент N80, у которого была заподозрена обширная делеция гена при анализе результатов NGS, что было доказано методом MLPA (Рисунок 15). При проведении ультразвукового исследования у пациента выявлена гипоплазия щитовидной железы.

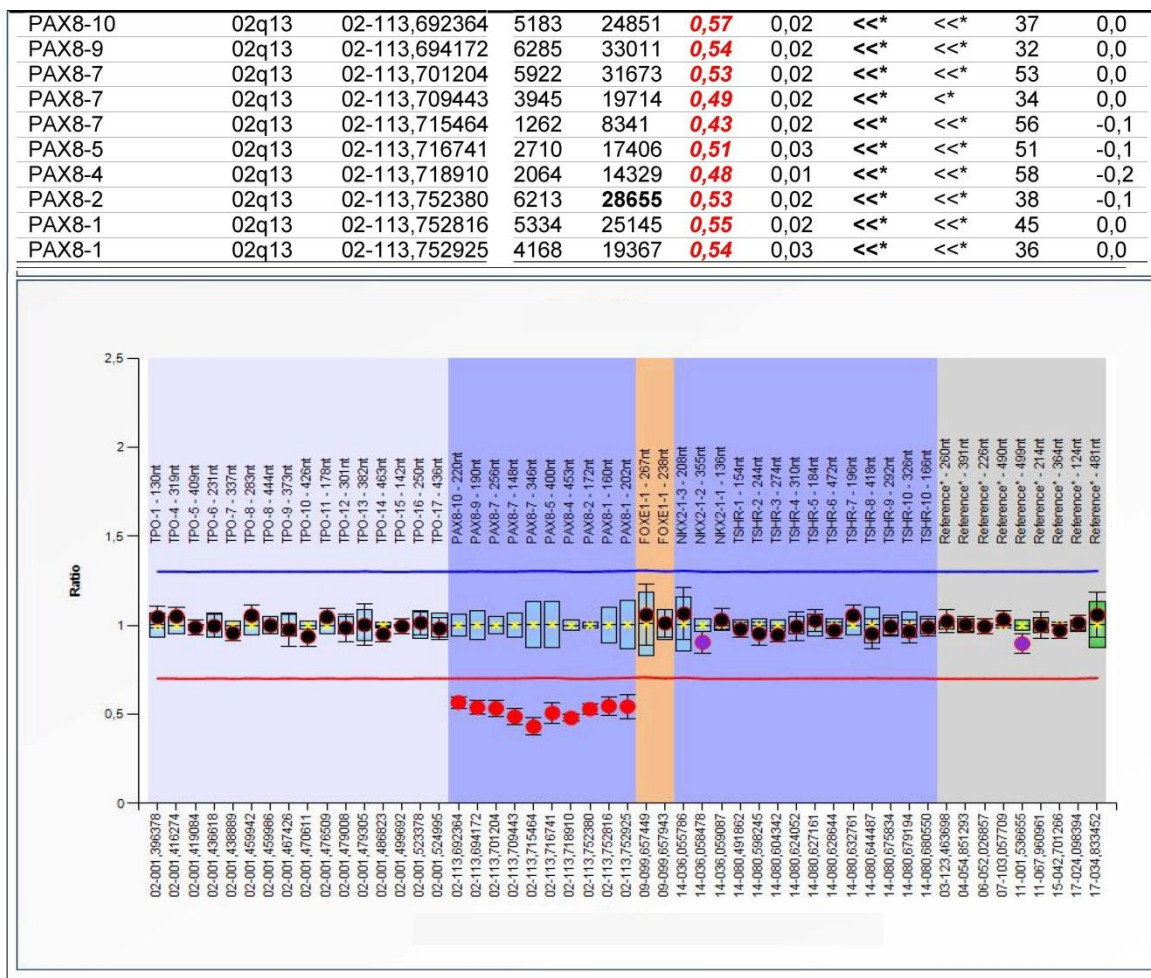


Рисунок 15 – Результаты MLPA у пациента N80

У пациентов N78 и N79 ультразвуковая картина также соответствовала гипоплазии ЩЖ, которая является характерным пороком для мутаций в гене *PAX8* [58]. Ассоциированных пороков развития у пробандов выявлено не было.

### 3.5. Дигенные изменения и клиническая характеристика пациентов

У 8 обследуемых пациентов (9 % (95 %ДИ = 4 %–16 %), 8/93) выявлены мутации сразу в двух генах (Таблица 16). Наиболее часто выявлено сочетание мутаций в генах, ответственных за биосинтез тиреоидных гормонов, у 6 пробандов: *TG* и *TPO* в 3 случаях, *TG* и *IYD* в 1 случае, *TPO* и *DUOX2* в 1 случае, *SLC26A4* и *DUOX2* в 1 случае. У пациента (N87) идентифицировано сочетание

гомозиготной мутации в гене *DUOX2* и гетерозиготной мутации в гене *SLC26A4*, в остальных случаях обе мутации были в гетерозиготном состоянии. В 2 случаях отмечались комбинации мутаций как в генах, приводящих к дисгормоногенезу, так и дисгенезу: *TG* и *PAX8* в 1 случае, и *DUOX2* и *TSHR* в 1 случае, все мутации в гетерозиготном состоянии.

Таблица 16 – Спектр дигенных нуклеотидных изменений и клиническая характеристика пациентов (n = 8)

Пациент	Ген	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD	Щитовидная железа
N81	<i>PAX8</i>	c.C74T	p.P25L	экзон 3	Неопределенная патогенность	Het	—	—	Гипоплазия
N81	<i>TG</i>	c.C961T	p.R321X	экзон 8	Патогенная	Het	—	—	
N82	<i>TG</i>	c.C6553T	p.R2185W	экзон 37	Неопределенная патогенность	Het	—	—	Гипоплазия
N82	<i>TPO</i>	c.C208G	p.P70A	экзон 4	Неопределенная патогенность	Het	0.00072	—	
N83	<i>IYD</i>	c.C818T	p.T273M	экзон 5	Неопределенная патогенность	Het	0.00013	—	Гипоплазия
N83	<i>TG</i>	c.G2977A	p.A993T	экзон 11	Неопределенная патогенность	Het	0.00033	—	
N84	<i>DUOX2</i>	c.2895_2898 del	p.S965fsX30	экзон 22	Патогенная	Het	0.0029	Описана [180]	Гипоплазия
N84	<i>TSHR</i>	c.G733A	p.G245S	экзон 9	Неопределенная патогенность	Het	0.00014	Описана [214]	
N85	<i>TG</i>	c.G455A	p.R152H	экзон 4	Неопределенная патогенность	Het	0.00068	—	Зоб
N85	<i>TPO</i>	c.C290G	p.S97X	экзон 4	Патогенная	Het	—	—	

<b>N86</b>	<b><i>DUOX2</i></b>	c.A4603G	p.R1535G	экзон 34	Неопределенная патогенность	Het	0.00027	—	Зоб
<b>N86</b>	<b><i>TPO</i></b>	c.C962T	p.T321I	экзон 8	Неопределенная патогенность	Het	—	—	
<b>N87</b>	<b><i>DUOX2</i></b>	c.2895_2898 del	p.S965fsX30	<b>экзон 22</b>	<b>Патогенная</b>	Hom	0.0029	Описана [180]	Зоб
<b>N87</b>	<b><i>SLC26A4</i></b>	c.G441A	p.M147I	экзон 5	Неопределенная патогенность	Het	0.00051	Описана [208]	
<b>N88</b>	<b><i>TG</i></b>	c.C4481T	p.P1494L	экзон 21	Неопределенная патогенность	Het	0.00054	—	Зоб
<b>N88</b>	<b><i>TPO</i></b>	c.G1450A	p.V484M	экзон 9	Неопределенная патогенность	Het	—	—	

### Примечания

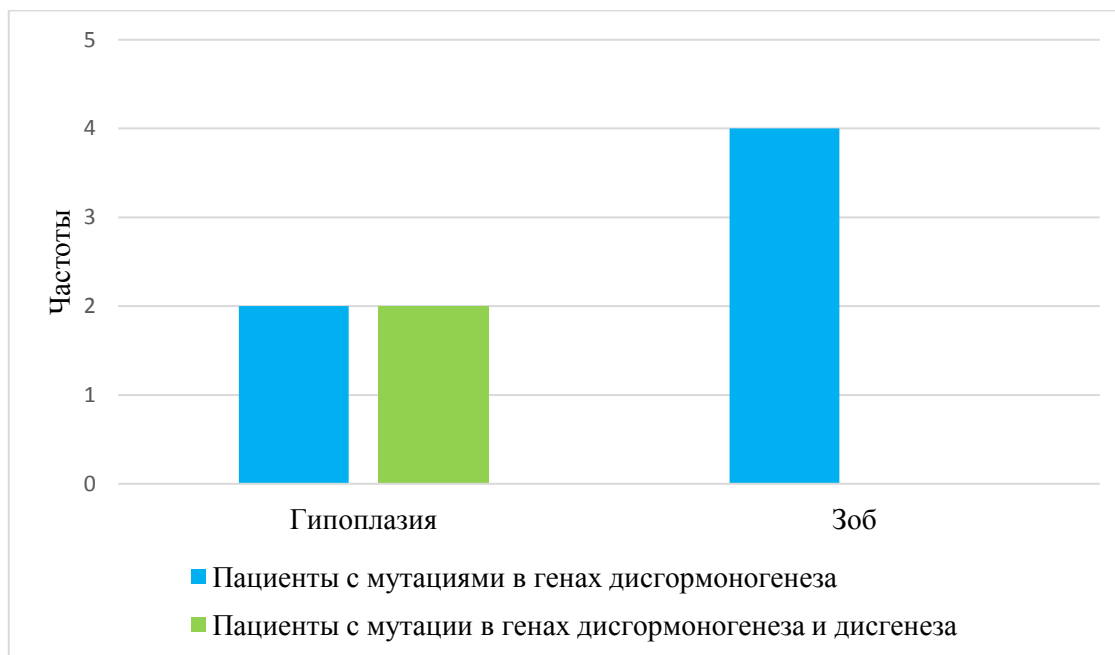
1. Референсная последовательность *TPO* - NM\_000547; *DUOX2* - NM\_014080; *TG* - NM\_003235; *SLC26A4* - NM\_000441; *IYD* - NM\_203395; *TSHR* - NM\_000369; *PAX8* - NM\_003466;
2. The Human Gene Mutation Database (HGMD®) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация; Hom – гомозиготная мутация.

К патогенным изменениям была отнесена нонсенс-мутация с.C961T p.R321X в гене *TG*, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона в положении 321 и потере трех акцепторных остатков тирозина и двух донорных, и соответственно к нарушению способности генерировать тиреоидные гормоны. Кроме того, патогенной является мутация с.2895\_2898del p.S965fsX30 в гене *DUOX2*, делеция 4 нуклеотидов с 2895 по 2989 положения, вследствие чего происходит сдвиг рамки считывания. Данное изменения было описано ранее, выявлено снижение способности мутантного белка генерировать перекись водорода [180]. Мутация с.2895\_2898del p.S965fsX30 в гене *DUOX2* является наиболее часто встречаемым изменением у пациентов из нашей группы 19 % (95 %ДИ = 13 %–29 %) (18/93). Нонсенс-мутация с.C290G p.S97X в гене *TPO* аннотирована как патогенная, ввиду образования преждевременного стоп-кодона в положении 97, который приведет к потере всего гемсвязывающего домена, и как следствие функциональной активности белка. Все остальные мутации, выявленные у пациентов из данной группы, были миссенс и отнесены к изменениям с неопределенной патогенностью.

Частота встречаемости увеличения и уменьшения размеров ЩЖ в группе пациентов с дигенными мутация была равной (50 % (95 %ДИ = 22 %-78 %)). Интересно, что зоб выявлен только у обследуемых с 2 мутациями в генах дисгормонотропного действия, в то время как у пациентов с мутациями в генах двух групп отмечалось уменьшение объема железы (Рисунок 16). Однако нами не проводилось статистическая оценка данных показателей ввиду небольшой численности этой группы пациентов.





**Рисунок 16 – Соотношение между группами генов, в которых обнаружены мутации, и размером щитовидной железы (n = 8)**

### **3.6. Статистическое сравнение пациентов с врожденным гипотиреозом и контрольной группой**

В контрольную группу входило 56 обследуемых, из них 24 мужчин и 32 женщины. При проведении молекулярно-генетического исследования, выявлены 4 варианта нуклеотидных изменений с неопределенной патогенностью, все относятся к миссенс-мутациям (7 % (95 %ДИ = 2 %–17 %), 4/56). Все выявленные изменения были в гетерозиготном состоянии. Нуклеотидные изменения выявлены в генах *DUOX2*, *IYD*, *SLC26A4* и *TG* (Таблица 17). У пациентов с врожденным гипотиреозом аналогичные изменения идентифицированы не были. В базе данных HGMD мутации, выявленные в контрольной группе, не зарегистрированы [56].

**Таблица 17 – Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в контрольной группе (n = 56)**

Обследуемый	Ген	ДНК	Белок	Экзон	Патогенность	Зиготность	ExAC	HGMD
<b>C1</b>	<i>DUOX2</i>	c.C4632G	p.H1544Q	экзон 34	Неопределенная патогенность	Het	—	—
<b>C2</b>	<i>IYD</i>	c.A281G	p.Y94C	экзон 2	Неопределенная патогенность	Het	0.000025	—
<b>C3</b>	<i>SLC26A4</i>	c.C1232G	p.A411G	экзон 10	Неопределенная патогенность	Het	—	—
<b>C4</b>	<i>TG</i>	c.A6853G	p.N2285D	экзон 39	Неопределенная патогенность	Het	—	—

**Примечания**

1. Референсная последовательность *DUOX2* - NM\_014080; *TG* - NM\_003235; *SLC26A4* - NM\_000441; *IYD* - NM\_203395;
2. The Human Gene Mutation Database (HGMD® (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [56];
3. \*ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [203].

**Условные обозначения** – Het – гетерозиготная мутация.

В сравнении с контрольной группой частота выявления мутаций у пациентов с врожденным гипотиреозом была достоверно выше (Таблица 18).

**Таблица 18 – Расчет отношения шансов с 95 % доверительным интервалом и анализ сопряженности с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона**

Факторный признак	Результативный признак		Сумма
	Врожденный гипотиреоз	Контроль	
Мутации выявлены, n	93	4	97
Мутации не выявлены, n	151	52	203
Всего, n	244	56	300

**Расчет отношения шансов с 95 % доверительным интервалом**

Отношение шансов = 8.007 (95 %ДИ = 2,8–22,9)

Z statistic = 3.886

Уровень значимости:  $p = 0,0001$

**Анализ сопряженности с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона**

Число степеней свободы равно 1.

Значение критерия  $\chi^2$  Пирсона составляет 19.969.

Критическое значение  $\chi^2$  при уровне значимости  $p < 0.01$  составляет 6.635.

Связь между факторным и результативным признаками статистически значима при уровне значимости  $p < 0.01$ .

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании была создана панель праймеров, охватывающая кодирующие области всех известных генов-кандидатов ВГ, для проведения молекулярно-генетического исследования методом высокопроизводительного параллельного секвенирования. Основной задачей исследования являлась оценка частоты моногенных форм в общей структуре врожденного гипотиреоза. Исходя из этого, критерием включения выбран уровень ТТГ более 90 мМЕ/л по данным скрининга, указывающий, согласно Федеральным клиническим рекомендациям, на высокую вероятность наличия у ребенка ВГ, тяжелое течение заболевания, и требующий незамедлительного назначения заместительной терапии левотироксином, что минимизировало вероятность включения в исследование пациентов с ложноположительными результатами [215].

Результаты исследования демонстрируют генетическую гетерогенность ВГ и высокую частоту случаев с доказанной генетической природой заболевания (38 % (95 %ДИ = 32 %–44 %), 93/244). Последние зарубежные исследования так же показали, что частота встречаемости моногенных форм ВГ значительно выше, чем предполагалось ранее, и составляет от 35 % до 59 % [90, 216–219]. Однако ряд исследований был ограничен по некоторым параметрам, в частности, по количеству исследуемых генов. В исследовании Kyoung-Jin Park и соавт. молекулярно-генетический анализ выполнен для генов *TPO*, *TSHR*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *PAX8* и *SLC5A5* в группе из 170 пациентов [217]. В свою очередь Adeline K. Nicholas с соавт. проводили обследование 49 пациентов с нормально расположенными ЩЖ, с секвенированием генов *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *IYD* и *TSHR* [90].

Нами выявлено, что основной причиной развития тяжелого ВГ являются мутации в генах, приводящих к дисгормоногенезу 84 % (95 %ДИ = 75 %–90 %) (78/93), и лишь 14 % (95 %ДИ = 8 %–22 %) (12/93) случаев обусловлены мутациями в генах дисгенеза, что кардинально отличается от этиологии,

основанной на результатах ультразвуковой диагностики и сцинтиграфии [3, 4].

Среди моногенных форм наиболее часто выявлены различные нуклеотидные изменения в генах *TPO* (35 % (95 %ДИ = 26 %–46 %, 30/85) и *DUOX2* (28 % (95 %ДИ = 20 %–39 %, 24/85). Подобные данные были получены и в ранее проведенных зарубежных исследованиях [90, 216–218]. Так в работе Adeline K. Nicholas с соавт. мутации в *TG* идентифицированы в 24,49 % случаев (12/49), в *TPO* 8 % (4/49), в *DUOX2* 4 % (2/49) [90]. В исследовании Kyoung-Jin Park с соавт. наибольшее количество мутаций приходилось на ген *DUOX2* (35 % случаев) [217]. В работе Christoffer Löf с соавт. выявлена высокая распространенность мутаций в генах *TPO* - 15 % (4/26), *TG* – 12 % (3/26) и *DUOX2* – 8 % (2/26) [216]. В исследовании Xin Fan с соавт. различные изменения выявлены гене *DUOX2* в 32 % (21/66), в *TG* в 14 % (9/66) [218]. В наиболее обширном исследовании Tiziana de Filippis с соавт., в которое включено 177 пациентов с ВГ, мутации в *DUOX2* идентифицированы в 18 % случаев (18/177), в *TG* в 17 % (30/177) [219]. В нашем исследовании мутации в *TG* обнаружены в 9 % случаев (95 %ДИ = 5 %–18 %), что было сопоставимо с количеством мутаций в генах *TSHR* (7 %) и *SLC26A4* (7 %). Таким образом, полученные аналогичные результаты в несвязанных между собой исследованиях доказывают, что мутации в генах дисгормоногенеза, в частности в *TPO* и *DUOX2*, являются основной причиной развития врожденного гипотиреоза.

В нашей когорте пациентов наиболее распространённым нуклеотидным изменением была делеция 4 оснований в гене *DUOX2* (с.2895\_2898del). Данная мутация была выявлена у 18 обследуемых, причем как в моногенном варианте, так и в дигенном, что составило 19 % (95 %ДИ = 13 %–29 %). Анализ зарубежных источников литературы позволил установить высокую частоту встречаемости изменения с.2895\_2898del, в частности, по данным выборки проекта ExAC распространенность мутации с.2895\_2898del составляет 0.29 % в общей популяции [203].

Моногенные нуклеотидные изменения в генах *SLC5A5*, *SLC26A4*, *IYD* выявлены в значительном меньшем количестве случаев, по сравнению с *TPO* и

*DUOX2*: 4 % (95 %ДИ = 1 %–10 %), 7 % (95 %ДИ = 3 %–15 %) и 1 % (95 %ДИ = <0,01 %–7 %) соответственно, что также согласуется с данными мировой литературы [90, 123, 143, 153, 154, 217–219].

Наши данные подтвердили результаты первых исследований по изучению молекулярной основы ВГ, мутации в генах дисгенеза являются редкой патологией [5–7, 9, 10]. В данном исследовании выявлен низкий процент мутаций в генах ответственных за эмбриональное развитие ЩЖ (14 % (95 %ДИ = 8 %–22 %)), не смотря на высокую распространенность случаев дисгенезии органа. Применение метода высокопроизводительно параллельного секвенирования позволило увеличить количество исследуемых генов и установить этиологический диагноз у ряда пациентов с гипоплазией, аплазией и эктопией ЩЖ без мутаций в генах дисгенеза.

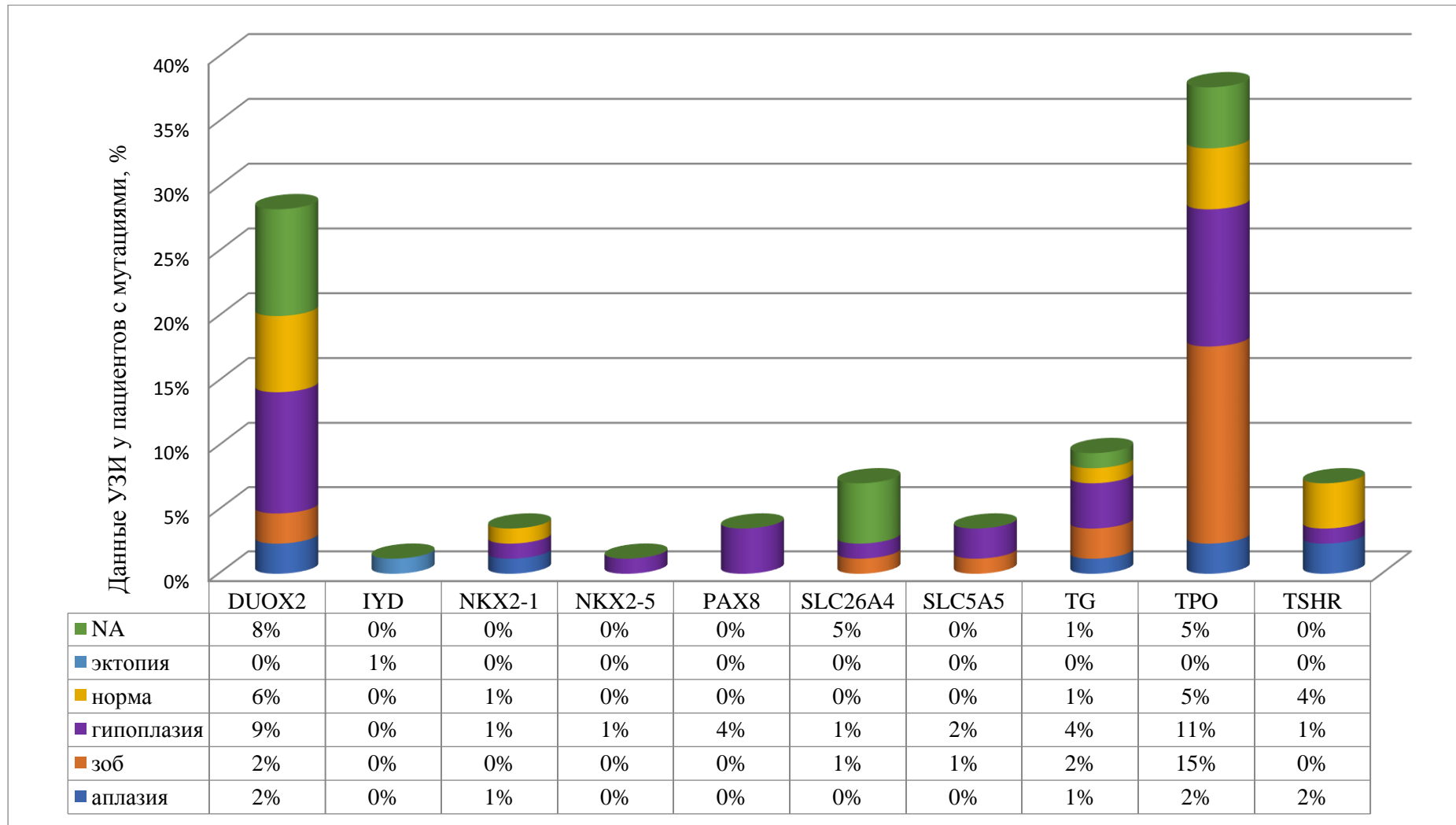
Идентификация у наших пациентов ранее не описанных нуклеотидных изменений требует проведения функциональных исследования *in vivo* или *in vitro*, с целью уточнения влияния данных мутаций на функциональную активность белка. Несмотря на то, что исследования в нашей работе проведены не были, обнаруженные мутации имеют высокую вероятность патогенность на ген или генный продукт по результатам прогнозирования *in silico*. Кроме того, низкий процент встречаемости выявленных изменений как в общей популяции [203], так и в контрольной выборке так же указывает на их патологическую значимость.

Нам не удалось установить генетический диагноз в 62 % случаев, что указывает на возможность наличия еще не изученных механизмов развития заболевания и требует дальнейших исследований.

В большинстве случаев ВГ, обусловленный мутациями в генах гормоногенеза, наследуется аутосомно-рецессивно, исключением является только *DUOX2* и *IYD*, тем не менее, наибольшее количество мутаций в данных генах выявлено в гетерозиготном состоянии. Между тем, появляется все больше сообщений о случаях ВГ, обусловленного «неменделевскими» механизмами наследования [171–173], такими как изодисомия или делеция участка одной из

родительских хромосом [172, 173], а также моноаллельной экспрессией мутантного аллеля в тканях щитовидной железы [171]. Несмотря на то, что эти особенности экспрессии были описаны только для гена *TPO* [171–173], не исключено, что данный феномен объясняет экспрессию рецессивного аллеля и в других генах данной группы. Кроме того, случаи моноаллельных мутаций описаны и в зарубежных исследованиях [90, 216–219]. Стоит также отметить, что метод высокопроизводительного секвенирования имеет ряд ограничений: метод не выявляет делеции и инсерции длиной более 10 п.о., а также мутации в зоне интрона на большом удалении от экзона. Данные недостатки методики также могли сказаться на полученных результатах, тем менее нами были проведены дополнительные исследования с целью минимизации искажения результатов.

Еще одна проблема, с которой мы столкнулись в ходе оценки результатов исследования – несоответствие фенотипа и генотипа. Сопоставление результатов ультразвукового исследования и генотипа пациентов с моногенными мутациями представлены на Рисунке 17.



**Рисунок 17 – Соотношение между размером щитовидной железы и моногенными изменениями (n = 85)**



Отсутствие зоба у части больных с дефектами в генах дисгормоногенеза, может быть обусловлено рядом факторов. Во-первых, формирование данного феномена может быть вызвано тяжелым постнатальным дефицитом йода, приводящим к атрофии тканей. Данная гипотеза была предложена Kühnen с соавт. после выявления гомозиготных миссенс-мутацией в гене *SLC26A4* у пациентов с гипоплазированной щитовидной железой [53]. Кроме того, в регионах с выраженным йодным дефицитом описаны случаи аплазии ЩЖ, гистологически характеризующиеся фиброзом тканей органа [220, 221]. Механизм формирования постнатальной атрофии органа к настоящему моменту остается не ясен, возможно, повышение уровня ТТГ опосредует усиление внутриклеточного окислительного стресса, посредством повышения уровня  $O_2$  и  $H_2O_2$ , что в результате приводит к атрофическим изменениям в щитовидной железе [222, 223]. Другим объяснением может быть упомянутый выше феномен моноаллельной аутомной экспрессии генов (AME). Правомочность данной теории обсуждается в работе Magne с соав. [224]. Авторами в ходе исследования в образцах из тканей щитовидной железы AME была выявлена в среднем в 22 генах (16-32), однако истинное число может быть значительно выше, учитывая некоторые технические ограничения данного исследования. Интересен и тот факт, что для тканей эктопированных ЩЖ подтверждено AME генов *ZNF331* и *FCGBP*, ответственных за деление и миграцию клеток. Кроме того, было показано нарушение пропорций клеток с нормальной биаллельной экспрессией по сравнению с клетками AME, что также может привести к различным вариациям дисгенезии щитовидной железы [224]. Наконец, еще одной причиной отсутствия увеличения ЩЖ может быть супрессивное действие левотироксина. Следует отметить, что ультразвуковое исследование щитовидной железы у пациентов из нашей когорты впервые было проведено в возрасте старше одного года жизни, что могло исказить истинную картину врожденной аномалии.

В особую группу вошли пациенты с дигенным механизмом развития ВГ. Данный феномен описан ранее [90, 216–219, 225], высказано предположение, что

наличие гетерозиготных мутаций в нескольких генах может приводить к перекрестному снижению ферментативной активности, соответственно, и к развитию гипотиреоза [226]. Однако на сегодняшний день в мировой практике накоплено небольшое количество материала по данной проблеме, что требует дальнейших исследований. В нашей работе дигенные мутации были выявлены у 8 пациентов.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Полученные нами данные указывают на генетическую гетерогенность ВГ и позволяют лучше понять его молекулярную основу. Молекулярно-генетический анализ именно методом высокопроизводительного параллельного секвенирования является обязательным исследованием для уточнения генеза заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. Высокопроизводительное параллельное секвенирование является высокоэффективным методом верификации молекулярно-генетической причины развития врожденного гипотиреоза, по результатам которого частота встречаемости моногенных форм среди пациентов с данным заболеванием составила 38 %.

2. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о преобладании дефектов генов дисгормоногенеза (84 %, 78/93) как причины развития врожденного гипотиреоза в структуре наследственных форм заболевания. Среди выявленных моногенных нуклеотидных изменений наибольшее количество мутаций идентифицировано в генах *TPO* (35 %) и *DUOX2* (28 %), том числе в группе пациентов с гипоплазией ЩЖ.

В данном исследовании выявлен низкий процент мутаций в генах ответственных за эмбриональное развитие ЩЖ (14 %, 13/93), несмотря на высокую распространённость случаев дисгенезии органа по данным ультразвукового исследования.

3. Среди обследованных пациентов врожденный гипотиреоз был ассоциирован с дигенными дефектами в 9 % (8/93). Наиболее часто выявлено сочетание мутаций в генах, ответственных за биосинтез тиреоидных гормонов ( $n = 6$ ).

4. Выявленная в ходе исследования высокая частота моноаллельных вариантов в генах, для которых описан рецессивный тип наследования (*TPO*, *TG* и *SLC26A4*), позволяет предположить роль дополнительных, ненаследуемых, факторов в развитии гипотиреоза (моноаллельная аутосомная экспрессия, изодисомия, постзиготные мутации и др.)

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для генетической верификации наследственных форм врожденного гипотиреоза целесообразно использовать высокопроизводительное параллельное секвенирование с одновременным исследованием нескольких генов-кандидатов.

2. Учитывая неоднозначность интерпретации дефектов с моноаллельной экспрессией, а также случаев с дигенными дефектами, проведение перинатальной диагностики может быть рекомендовано только в случаях подтверждения биаллельных мутаций, либо при доказанном доминантном наследовании заболевания (*PAX8*, *NKX2-1*).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ТТГ – тиреотропный гормон  
 МИТ - монойодтирозин  
 ДИТ - дийодтирозин  
 Т4 - тироксин  
 Т3 - трийодтиронин  
 ТРГ - Тиреотропин-релизинг-гормон  
 рТТГ – рецептор к тиреотропному гормону  
 ТПО - тиреопероксидаза  
 ТГ/ *TG* – тиреоглобулин/ ген тиреоглобулина  
 АТ к ТПО - антитела к тиреопероксидазе  
 АТ к ТГ – антитела к тиреоглобулину  
 ВГ – врожденный гипотиреоз  
 ЩЖ – щитовидная железа  
 ППТ – площадь поверхности тела  
*TSHR*- ген рецептора к тиреотропному гормону  
*PAX8* - *paired box* ген  
*NKX2-5*- ген *NK2* гомеобокс 5  
*FOXE1* – фактор транскрипции щитовидной железы 2, ген *Forkhead Box E1*  
*NKX2-1 (TTF-1)* - ген *NK2* гомеобокс 1  
*TPO* – ген тиреопероксидазы  
*IYD/LYD* – ген/белок йодтирозин-дейодиназа  
*SLC26A4* – ген анионного транспортера  
*SLC5A5*- ген семейства транспортеров растворов  
*DUOX2* – ген двойной оксидазы 2  
*DOXA2* – ген активатор созревания двойной оксидазы 2  
*DUOX1* - ген двойной оксидазы 1  
*DOXA1* – ген активатор созревания двойной оксидазы 1  
 DMR - дифференциальное метилирование региона  
 NGS - next-generation sequencing, высокопроизводительное параллельное секвенирование  
 мРНК - Матричная рибонуклеиновая кислота  
 цАМФ - Циклический аденозинмонофосфат  
 НАДФ -  
 TIOD - total iodine organification defect, полный дефект органификации йода  
 PIOD - partial iodine organification defect, частичный дефект органификации йода  
 NIS - Natrium Iodide Symporter, Натрий-йодный симпортер  
 ФАД - Флавинадениндинуклеотид  
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения  
 ExAC - Exome Aggregation Consortium  
 HGMD - Human Gene Mutation Database  
 OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man  
 ПЦР - полимеразная цепная реакция  
 MLPA - Multiplex ligation-dependent probe amplification, Мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб  
 Het – гетерозиготная мутация  
 ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация  
 Hom – гомозиготная мутация  
 АМЕ - моноаллельная аутосомная экспрессия генов

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toublanc, J. E. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world / J. E. Toublanc // *Horm Res.* – 1992. – № 38. – P. 230–235.
2. Szinnai, G. Clinical Genetics of Congenital Hypothyroidism / G. Szinnai. – Basel : Karger, Paediatric Thyroidolog, Endocr Dev, 2014. – № 26. – 60-78 p.
3. Devos, H. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations / H. Devos, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – № 84. – P. 2502–2506.
4. Bubuteishvili, L. Thyroid abnormalities by ultrasonography in neonates with congenital hypothyroidism / L. Bubuteishvili, et al. // *J Pediatr.* – 2003. – № 143 (6). – P. 759–764.
5. Macchia, P. E. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis / P.E. Macchia, et al. // *Nat. Genet* – 1998. – № 19. – P. 83–86.
6. Narumi, S. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study / S. Narumi, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – № 94. – P. 1317–1323.
7. Narumi, S. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients / S. Narumi, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – № 95. – P. 1981–1985.
8. Narumi, S. Molecular basis of thyroid dysmorphogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients / S. Narumi, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – № 96 (11). – P. 1838-1842.
9. Al Taji, E. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism / E. Al Taji, et al. // *European Journal of Endocrinology.* – 2007. – № 156. – P. 521–529.
10. Jin, H. Y. High Frequency of DUOX2 Mutations in Transient or Permanent Congenital Hypothyroidism with Eutopic Thyroid Glands / H. Y. Jin, et al. // *Horm Res Paediatr.* – 2014. – № 82 (4). – P. 252-60.
11. Muzza, M. The Clinical and Molecular Characterization of Patients With Dysmorphogenic Congenital Hypothyroidism Reveals Specific Diagnostic Clues for DUOX2 Defects / M. Muzza, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – № 99 (3). – P.

- 544-553.
12. Léger, J. Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidis / J. Léger, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – № 87. – P. 575–580.
  13. Narumi, S. Unveiling the genetic landscape of congenital hypothyroidism / S. Narumi, T. Hasegawa // Program of the 9th Joint Meeting of Pediatric Endocrinology, Italy. *Hormone Research in Pediatrics.* – 2013. – № 80 (suppl 1) : 6. – Abstract S4-24.
  14. Weller, G. Development of the thyroid, parathyroid and the thymus glands in man / G. Weller // *Contrib Embryol.* – 1933. – № 24. – P. 93–140.
  15. Szinnai, G. Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans / G. Szinnai // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – № 28 (2). – P. 133-150.
  16. Fagman, H. Morphogenesis of the thyroid gland / H. Fagman, M. Nilsson // *Mol Cell Endocrinol.* – 2010. – № 323. – P. 35-54. doi:
  17. Trueba, S. S. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations / S. S. Trueba, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – № 90. – P. 455–462.
  18. Kaufman, M. H. The anatomic basis of mouse development / M. H. Kaufman, J. Bard. – San Diego : Academic Press, 1999. – 165–166 p.
  19. De Felice, M. Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms / M. De Felice, R. Di Lauro // *Endocrine Reviews.* – 2004. – № 25 (5). – P. 722-746.
  20. De Felice, M. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate / M. De Felice, et al. // *Nat Genet* – 1998. – № 19. – P. 399–401.
  21. Shepard, T. H. Histochemical studies of the human fetal thyroid during the first half of fetal life / T. H. Shepard, H. Andersen, H. J. Andersen. // *Anat Rec.* – 1964. – № 149. – P. 363–380.
  22. Polak, M. Thyroid disorders / M. Polak, G. Szinnai. – Philadelphia : Academic Press, Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics, 2013. – 1–24 p.
  23. Van Vliet, G. Hypothyroidism in infants and children: congenital hypothyroidism / G. Van Vliet, J. Deladoëy. – Philadelphia : Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 10th ed., 2012. – 790–802 p.
  24. Rastogi, M. N. Congenital hypothyroidism / M. N. Rastogi, S. H. LaFrancchi // *Orphanet J*



- Rare Dis. – 2010. – № 5. – P. 17.
25. Deladoëy, J. Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Québec / J. Deladoëy, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – 96. – P. 2422–2429.
  26. Gagné, N. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? / N. Gagné, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – № 83. – P. 1771–1775.
  27. Triggiani, V. Ectopic Thyroid Gland: Description of a Case and Review of the Literature / V. Triggiani, et al. // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* – 2013. – № 13 (3). – P. 275–281.
  28. Patel, N.J. NKX2-1-Related Disorders / N.J. Patel, J. Jankovic; edited by R. A. Pagon, et al. – Seattle (WA) : GeneReviews, 2014. – 1993–2015 p.
  29. Schady, W. Hereditary progressive chorea without dementia / W. Schady, R. J. Meara // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1988. – № 51. – P. 295–297.
  30. Schrag, A. Benign hereditary chorea-entity or syndrome? / A. Schrag, et al. // *Mov. Disord.* – 2000. – № 15. – P. 280–288.
  31. Shimohata, T. Novel locus for benign hereditary chorea with adult onset maps to chromosome 8q21.3 q23.3 / T. Shimohata, et al. // *Brain.* – 2007. – № 130. – P. 2302–2309.
  32. Plachov, D. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland / D. Plachov, et al. // *Development.* – 1990. – № 110. – P. 643–651.
  33. Poleev, A. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilm's tumors / A. Poleev, et al. // *Development.* – 1992. – № 116. – P. 611–623.
  34. Stapleton, P. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9 / P. Stapleton, et al. // *Nat. Genet* – 1993. – № 3. – P. 292–298.
  35. di Magliano, M. P. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation / M. P. di Magliano, R. Di Lauro, M. Zannini // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – № 97. – P. 13144–13149.
  36. Mascia, A. Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells / A. Mascia, et al. // *J. Endocrinol.* – 2002. – № 172. – P. 163–176.

37. Esposito, C. PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene / C. Esposito, et al. // *Biochem. J.* – 1998. – № 331. – P. 37–40.
38. Ohno, M. The paireddomain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription / M. Ohno, et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – № 19. – P. 2051–2060.
39. Mansouri, A. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function / A. Mansouri, K. Chowdhury, P. Gruss // *Nat. Genet* – 1998. – № 19. – P. 87–90.
40. Bamforth, J. S. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate / J. S. Bamforth, et al. // *J Med Genet* – 1989. – № 26. – P. 49–51.
41. Clifton-Bligh, R. J. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia / R. J. Clifton-Bligh, et al. // *Nat Genet* – 1998. – № 19 (4). – P. 399-401.
42. Castanet, M. Maternal isodisomy for chromosome 9 causing homozygosity for a novel FOXE1 mutation in syndromic congenital hypothyroidism / M. Castanet, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – № 95. – P. 4031–4036.
43. Castanet, M. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate / M. Castanet, et al. // *Hum Mol Genet* – 2002. – № 11. – P. 2051–2059.
44. Lints, T. J. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic escendants / T. J. Lints, et al. // *Development.* – 1993. – № 119. – P. 419–431.
45. Dentice, M. Missense mutation in the transcription factor NKX2–5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis / M. Dentice, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2006. – № 91. – P. 1428–1433.
46. Cassio, A. Current Loss-of-Function Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene: When to Investigate, Clinical Effects, and Treatment / A. Cassio, et al. // *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology.* – 2013. – № 5 (Suppl 1). P. 29-39.
47. Persani, L. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance / L. Persani, et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2010. – № 322. – P. 72–82.
48. Tao, Y. X. Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure-function insights and therapeutic implications / Y. X. Tao // *Pharmacology Ther.* – 2006. – № 111. – P. 949–973.

49. Komuro, I. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart / I. Komuro, S. Izumo // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – № 90. – P. 8145–8149.
50. Castanet, M. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors / M. Castanet, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2001. – № 86. – P. 2009–2014.
51. Perry, R. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology / R. Perry, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – № 87. – P. 4072–4077.
52. Deladoey, J. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis / J. Deladoey, G. Vassart, G. van Vliet // *Endocr Dev.* – 2007. – № 10. – P. 29–42.
53. Kühnen, P. Identification of PENDRIN (SLC26A4) Mutations in Patients With Congenital Hypothyroidism and “Apparent” Thyroid Dysgenesis / P. Kühnen, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – № 99 (1). – P. 169–176.
54. Stoupa, A. Update of Thyroid Developmental Genes / A. Stoupa, et al. // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2016. – № 45 (2). – P. 243–254.
55. Abu-Khudir, R. Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in nontumoral thyroid glands / R. Abu-Khudir, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – № 99. – P. 1120–1129.
56. Stenson, P. D. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies / P. D. Stenson, et al. // *Hum Genet* – 2017. – № 136. – P. 665–677.
57. Nettore, I. C. The molecular causes of thyroid dysgenesis: a systematic review / I. C. Nettore, et al. // *J Endocrinol Invest.* – 2013. – № 36. – P. 654–664.
58. Montanelli, L. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations / L. Montanelli, M. Tonacchera // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2010. – № 322. – P. 64–71.
59. Thorwarth, A. Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum / A. Thorwarth, et al. // *J. Med. Genet* – 2014. – № 51. – P. 375–387.
60. Di Palma, T. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription / T. Di Palma, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 278. – P. 3395–3402.

61. Miccadei, S. The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay/ S.Miccadei, et al. // *Mol. Endocrinol.* – 2002. – № 16. – P. 837-846.
62. Hamvas, A. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1 / A. Hamvas, et al. // *Chest.* – 2013. – № 144. – P. 794-804.
63. Carre, A. Five new TTF1/ NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case / A. Carre, et al. // *Hum. Mol. Genet* – 2009. – № 18. – P. 2266-2276.
64. Gras, D. Benign hereditary chorea: phenotype, prognosis, therapeutic outcome and long term follow-up in a large series with new mutations in the TITF1/NKX2-1 gene / D. Gras, et al. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2012. – № 83. – P. 956-962.
65. Devriendt, K. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure/ K. Devriendt, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – № 338. –P. 1317-1318.
66. Chadwick, B. P. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22 / B. P. Chadwick, F. Obermayr, A. M. Frischauf // *Genomics.* – 1997. – № 41. – P. 390–396.
67. Civitareale, D. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter / D. Civitareale, et al. // *EMBO J.* – 1989. – № 8. – P. 2537–2542.
68. Santisteban, P. Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter / P. Santisteban, et al. // *Mol Endocrinol.* – 1992. – № 6. – P. 1310–1317.
69. Zannini, M. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of the differentiation / M. Zannini, et al. // *EMBO J.* – 1997. – № 16. – P. 3185–3197.
70. Perrone, L. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor / L. Perrone, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2000. – № 275. – P. 203–208.
71. Sequeira, M. Production and application of polyclonal antibody to human thyroid transcription factor 2 reveals thyroid transcription factor 2 protein expression in adult thyroid and hair follicles and prepubertal testis / M. Sequeira, et al. // *Thyroid.* – 2003. – №

13. – P. 927–932.
72. Kang, I. N. Characterization of mutations in the FOXE1 gene in a cohort of unrelated Malaysian patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis / I. N. Kang, et al. // *Biochem Genet* – 2010. – № 48. – P. 141–151.
73. Carré, A. A Novel FOXE1 Mutation (R73S) in Bamforth–Lazarus Syndrome Causing Increased Thyroidal Gene Expression / A. Carré, et al. // *Thyroid*. – 2014. – № 24 (4). – P. 649–654.
74. Turbay, D. Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the human cardiac-specific homeobox gene hCsx / D. Turbay, et al. // *Molecular Medicine*. – 1996. – № 2 (1). – P. 86–96.
75. Gehring, W. J. Homeodomain proteins / W. J. Gehring, M. Affolter, T. Burglin // *Annu Rev Biochem*. – 1994. – № 63. – P. 487–526.
76. Pradhan, L. Crystal Structure of the Human NKX2.5 Homeodomain in Complex with DNA Target / L. Pradhan, et al. // *Biochemistry*. – 2012. – № 51 (32). – P. 6312–6319.
77. Kasahara, H. Identification of the in vivo casein kinase II phosphorylation site within the homeodomain of the cardiac tissue-specifying homeobox gene product Csx/Nkx2.5 / H. Kasahara, S. Izumo // *Mol Cell Biol*. – 1999. – № 19. – P. 526–536.
78. Durocher, D. The cardiac transcription factors Nkx2–5 and GATA-4 are mutual cofactors / D. Durocher, et al. // *EMBO J*. – 1997. – № 16. – P. 5687–5696.
79. Lee, Y. The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression / Y. Lee, et al. // *Mol Cell Biol*. – 1998. – № 18. – P. 3120–3129.
80. Akazawa, H. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2–5: Its role in cardiac development and diseases / H. Akazawa, I. Komuro // *Pharmacol Ther*. – 2005. – № 107. – P. 252–268.
81. Takeda, M. Slow progressive conduction and contraction defects in loss of Nkx2–5 mice after cardiomyocyte terminal differentiation / M. Takeda, et al. // *Lab Invest*. – 2009. – № 89. – P. 983–993.
82. Parmentier, M. Molecular cloning of the thyrotropin receptor / M. Parmentier, et al. // *Science*. – 1989. – № 246. – P. 1620–1622.
83. Vassart, G. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth / G. Vassart, J. E. Dumont // *Endocr Rev*. – 1992. – № 13. – P. 596–611.
84. Smits, G. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucinerich repeats responsible for ligand specificity / G. Smits, et al. // *EMBO J*. – 2003. – № 22. – P. 2692–2703.

85. Lechan, R. M. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome / R. M. Lechan, C. Fekete // *J Endocrinol Invest.* – 2004. – № 27 (6). – P. 105-119.
86. Fekete, C. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase / C. Fekete, R. M. Lechan // *Frontiers in neuroendocrinology.* – 2007. – № 28 (2-3). – P. 97-114.
87. Weinstein, L. S. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome / L. S. Weinstein, et al. // *New Engl J Med.* – 1991. – № 325. – P. 1688-1695.
88. Carrasco, N. Iodide transport in the thyroid gland / N. Carrasco // *Biochim Biophys Acta.* – 1993. – № 1154 (1). – P. 65-82.
89. Dohán, O. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance / O. Dohán, et al. // *Endocr.Rev.* – 2003. – № 2. – P. 48-77.
90. Nicholas, A. K. Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ / A. K. Nicholas, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2016 – № 101 (12). – P. 4521–4531.
91. Taurog, A. Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis / A. Taurog // *Recent Prog. Horm. Res.* – 1970. – № 26. – P. 189–247.
92. Lamas, L. Consensus sequences for early iodination and hormonogenesis in human thyroglobulin / L. Lamas, et al. // *J Biol Chem.* – 1989. – № 264. – P. 13541–13545.
93. Dunn, A. D. Tyrosine 130 is an important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin / A. D. Dunn, et al. // *J Biol Chem.* – 1998. – № 273. – P. 25223–25229.
94. Dupuy, C. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs / C. Dupuy, et al. // *J Biol Chem.* – 1999. – № 274. – P. 37265–37269.
95. De Deken, X. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family / X. De Deken, et al. // *Biol Chem.* – 2000. – № 275. – P. 23227–23233.
96. Grasberger, H. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent / H. Grasberger, S. Refetoff // *J Biol Chem.* – 2006. – № 281. – P. 18269–18272.
97. Pitt-Rivers, R. The oxidation of diiodotyrosine derivatives / R. Pitt-Rivers // *Biochemical Journal.* – 1948. – № 43 (2). – P. 223–231.

98. Gnidehou, S. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site / S. Gnidehou, et al. // *FASEB J.* – 2004. – № 18 (13). – P. 1574–1576.
99. Pendred, V. Deaf mutism and goiter / V. Pendred // *Lancet* – 1896. – № II. – P. 532.
100. Afink, G. Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism / G. Afink, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – № 3 (12). – P. 4894–4901.
101. Ismail-Beigi, F. A variant of iodotyrosine-dehalogenase deficiency / F. Ismail-Beigi, M. Rahimifar // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1977. – № 44 (3). – P. 499– 506.
102. Knobel, M. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system / M. Knobel, G. Medeiros-Neto // *Thyroid.* – 2003. – №13. – P. 771–801.
103. Cavarzere, P. Clinical description of infants with congenital hypothyroidism and iodide organification defects / P. Cavarzere, et al. // *Horm Res.* – 2008. – № 70. – P. 240–248.
104. Clerc, J. Imaging the thyroid in children / J. Clerc // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2014. – № 28. – P. 203–220.
105. Targovnik, H. M. Thyroglobulin Gene Mutations in Congenital Hypothyroidism / H. M. Targovnik, C. E. Citterio, C. M. Rivolta // *Horm Res Paediatr.* – 2011. – № 75 (5) – P. 311–321.
106. Hishinuma, A. Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan / A. Hishinuma, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2006. – № 91. – P. 3100–3104.
107. Luxen, S. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer / S. Luxen, S. A. Belinsky, U. G. Knaus // *Cancer Res.* – 2008. – № 68. – P. 1037–1045.
108. Morand, S. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation / S. Morand, et al. // *FASEB J.* – 2009. – № 23. – P. 1205–1218.
109. Zamproni, I. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism / I. Zamproni, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – № 93. – P. 605–610.
110. Vigone, M. C. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings / M. C. Vigone, et al. // *Hum Mutat.* – 2005. – № 26. – P. 395.

111. Zheng, X. A Novel c.554+5C>T Mutation in the DUOXA2 Gene Combined with p.R885Q Mutation in the DUOX2 Gene Causing Congenital Hypothyroidism / X. Zheng, et al. // *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. – 2016. – № 8 (2). – P. 224-227.
112. Maruo, Y. Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program / Y. Maruo, et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2008. – № 93. – P. 4261–4267.
113. Hular, I. A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion / I. Hular, et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2011. – № 96. – P. 841–845.
114. Yi, R. H. A novel dualoxidase maturation factor 2 gene mutation for congenital hypothyroidism / R. H. Yi, et al. // *Int J Mol Med*. – 2013. – № 31. – P. 467–470.
115. O'Neill, S. Genetic disorders coupled to ROS deficiency / S. O'Neill, et al. // *Redox Biol*. – 2015. – № 6. – P. 135–156.
116. Moreno, J. C. Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression / J. C. Moreno // *Horm Res*. – 2003. – № 60 (3). – P. 96–102.
117. Solis-S, J. C. Inhibition of intrathyroidal dehalogenation by iodide / J. C. Solis-S, et al. // *J Endocrinol*. – 2011. – № 208. – P. 89-96.
118. Gnidehou, S. Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B / S. Gnidehou, et al. // *Thyroid*. – 2006. – № 16 (8). – P. 715–724.
119. Friedman, J. E. Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily / J. E. Friedman, et al. // *J Biol Chem*. – 2006. – № 281 (5). – P. 2812-2819.
120. Goswami, A. Characterization of a flavoprotein iodotyrosine deiodinase from bovine thyroid. Flavin nucleotide binding and oxidation-reduction properties / A. Goswami, I. N. Rosenberg // *J Biol Chem*. – 1979. – № 254 (24). – P. 12326-12330.
121. Roldán, M. D. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. / M. D. Roldán, et al. // *FEMS Microbiol Rev*. – 2008. – № 32 (3). – P. 474-500.
122. Iglesias, A. Towards the pre-clinical diagnosis of hypothyroidism caused by iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) defects / A. Iglesias, et al. // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. – 2014. – № 28 (2). – P. 151-159.



123. Moreno, J. C. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism / J. C. Moreno, et al. // *N Engl J Med.* – 2008. – № 358 (17). – P. 1811–1818.
124. Smanik, P. A. Cloning of the human sodium iodide symporter / P. A. Smanik, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – № 226. – P. 339–345.
125. Selmi-Ruby, S. The porcine sodium/iodide symporter gene exhibits an uncommon expression pattern related to the use of alternative splice sites not present in the human or murine species / S. Selmi-Ruby, et al. // *Endocrinology.* – 2003. – № 144. – P. 1074–1085.
126. Jung, H. The sodium/substrate symporter family: structural and functional features / H. Jung // *FEBS Lett.* – 2002. – № 529. – P. 73–77.
127. Paire, A. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity / A. Paire, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – № 272. – P. 18245–18249.
128. Levy, O. N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model / O. Levy, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 273. – P. 22657–22663.
129. Levy, O. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody / O. Levy, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – № 94 (11). – P. 5568–5573.
130. La Perle, K. M. Modulation of sodium/iodide symporter expression in the salivary gland / K. M. La Perle, et al. // *Thyroid.* – 2013. – № 23 (8). – P. 1029–1036.
131. Tazebay, U. H. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer / U. H. Tazebay, et al. // *Nat. Med.* – 2000. – № 6. – P. 871–878.
132. Cho, J. Y. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter expression in mammary glands / J. Y. Cho, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – № 85. – P. 2936–2943.
133. Fragoso, M. A. Transcellular thiocyanate transport by human airway epithelia / M. A. Fragoso, et al. // *J. Physiol.* – 2004. – № 561. – P. 183–194.
134. Nicola, J. P. The Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter mediates active iodide uptake in the intestine / J. P. Nicola, et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2009. – № 296. – P. 654–662.
135. Kotani, T. Characterization of gastric Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter of the rat / T. Kotani, et al. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1998. – № 89. – P. 271–278.
136. Bidart, J. M. Expression of Na<sup>+</sup>/I<sup>–</sup> symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells / J. M. Bidart, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – № 85. – P. 4367–4372.

137. Russo, D. Expression and localization of the sodium/iodide symporter (NIS) in testicular cells / D. Russo, et al. // *Endocrine*. – 2011. – № 40. – P. 35–40.
138. Russo, D. Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets / D. Russo, et al. // *J Mol Endocrinol*. – 2011. – № 46 (3). – P. 73-81.
139. Kogai, T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells / T. Kogai, et al. // *Endocrinology*. – 1997. – № 138. – P. 2227–2232.
140. Riedel, C. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter (NIS) by thyrotropin / C. Riedel, O. Levy, N. Carrasco // *J. Biol. Chem.* – 2001. – № 276. – P. 21458–21463.
141. Eng, P. H. Escape from the acute Wolff–Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein / P. H. Eng, et al. // *Endocrinology*. – 1999. – № 140. – P. 3404–3410.
142. Federman, D. Some observations on cretinism and its treatment / D. Federman, J. Robbins, J. E. Rall // *N Engl J Med*. – 1958. – № 259. – P. 610–616.
143. Spitzweg, C. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations / C. Spitzweg, J. C. Morris // *Mol Cell Endocrinol*. – 2010. – № 322. – P. 56–63.
144. Darrouzet, E. The sodium/iodide symporter: State of the art of its molecular characterization / E. Darrouzet, et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – № 1838. – P. 244–253.
145. Everett, L. A. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS) / L. A. Everett, et al. // *Nat. Genet* – 1997. – № 17. – P. 411–422.
146. Royaux, I. E. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells / I. E. Royaux, et al. // *Endocrinology*. – 2000. – № 141. – P. 839–845.
147. Everett, L. A. A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases / L. A. Everett, E. D. Green // *Hum. Mol. Genet* – 1999. – № 8. – P. 1883–1891.
148. Yoshida, A. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin / A. Yoshida, et al. // *Endocrinology*. – 2004. – № 145. – P. 4301–4308.
149. Royaux, I. E. Localization and functional studies of pendrin in the mouse inner ear provide insight about the etiology of deafness in Pendred syndrome / I. E. Royaux, et al. // *J. Assoc. Res. Otolaryngol*. – 2003. – № 4. – P. 394–404.

150. Soleimani, M. Pendrin: an apical  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger in the kidney cortex / M. Soleimani, et al. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2001. – № 280. – P. 356–364.
151. Royaux, I. E. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion / I. E. Royaux, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – № 98. – P. 4221–4226.
152. Verlander, J. W. Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension / J. W. Verlander, et al. // *Hypertension.* – 2003. – № 42. – P. 356–362.
153. Solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4 [Электронный ресурс]. – Retinal and hearing impairment genetic mutation database. – 2011. – Режим доступа: [https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher\\_montpellier/variants.php?action=view\\_unique](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/variants.php?action=view_unique).
154. Kopp, P. Pendred syndrome: clinical characteristics and molecular basis / P. Kopp // *Curr. Opin. Endocrinol. Diab.* – 1999. – № 6. – P. 261–269.
155. Park, H. J. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness / H. J. Park, et al. // *J. Med. Genet* – 2003. – № 40. – P. 242–248.
156. Tsukamoto, K. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese / K. Tsukamoto, et al. // *Eur. J. Hum. Genet* – 2003. – № 11. – P. 916–922.
157. Park, H. J. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans / H. J. Park, et al. // *Clin. Genet* – 2005. – № 67. – P. 160–165.
158. Campbell, C. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations / C. Campbell, et al. // *Hum. Mutat.* – 2001. – № 17. – P. 403–411.
159. DeGroot, L. J. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects / L. J. DeGroot, H. Niepomniszcze // *Metabolism.* – 1977. – № 26 (6). – P. 665–718.
160. Kimura, S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs / S. Kimura, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1987. – № 84 (16). – P. 5555–5559.
161. de Vijlder, J. J. Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2pter—p12 / J. J. de Vijlder, et al. // *Cytogenet Cell Genet* – 1988. – № 47 (3). – P. 170–172.

162. Niccoli, P. Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking / P. Niccoli, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – № 272 (47). – P. 29487–29492.
163. Bikker, H. Congenital hypothyroidism caused by a premature termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene / H. Bikker, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1996. – № 81 (6). – P. 2076–2079.
164. Banga, J. P. Prediction of domain organisation and secondary structure of thyroid peroxidase, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis / J. P. Banga, et al. // *FEBS Letters* – 1990. – № 266 (1-2). – P. 133–141.
165. Abramowicz, M. J. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter / M. J. Abramowicz, et al. // *J. Clin. Invest.* – 1992. – № 9 (4). – P. 1200–1204.
166. Ris-Stalpers, C. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations / C. Ris-Stalpers, H. Bikker // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2010. – № 322 (1-2). – P. 38–43.
167. Kotani, T. Partial iodide organification defect caused by a novel mutation of the thyroid peroxidase gene in three siblings / T. Kotani, et al. // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2003. – № 59. – P. 198–206.
168. Nascimento, A. C. Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect / A. C. Nascimento, et al. // *Thyroid.* – 2003. – № 13 (12). – P. 1145–1151.
169. Bakker, B. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update) / B. Bakker, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2000. – № 85. – P. 3708–37128.
170. Avbelj, M. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis / M. Avbelj, et al. // *Eur J Endocrinol.* – 2007. – № 156. – P. 511–519.
171. Fugazzola, L. et al. Monoallelic Expression of Mutant Thyroid Peroxidase Allele Causing Total Iodide Organification Defect / L. Fugazzola, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – № 88 (7). – P. 3264–3271.
172. Bakker, B. Maternal isodisomy for chromosome 2p causing severe congenital hypothyroidism / B. Bakker, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2001. – № 86. – P. 1164–1168.
173. Kotani, T. Iodide organification defects resulting from cosegregation of mutated and null

- thyroid peroxidase alleles / T. Kotani, et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2001. – № 182. – P. 61–68.
174. Pachucki, J. Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions / J. Pachucki, et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2004. – № 214. – P. 53–62.
  175. Edens, W. A. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox / W. A. Edens, et al. // *J Cell Biol.* – 2001. – № 154. – P. 879–891.
  176. Meitzler, J. L. *Caenorhabditis elegans* and human dual oxidase 1 (DUOX1) “peroxidase” domains: insights into heme binding and catalytic activity / J. L. Meitzler, P. R. Ortiz de Montellano // *J Biol Chem.* – 2009. – № 284. – P. 18634–18643.
  177. El Hassani, R. A. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract / R. A. El Hassani, et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2005. – № 288. – P. 933–942.
  178. Geiszt, M. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense / M. Geiszt, et al. // *FASEB J.* – 2003. – № 7. – P. 1502–1504.
  179. Caillou, B. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues / B. Caillou, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2001. – № 86. – P. 3351–3358.
  180. Moreno, J. C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism / J. C. Moreno, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – № 347. – P. 95–102.
  181. Varela, V. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19–2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect / V. Varela, et al. // *Clin Chem.* – 2006. – № 52. – P. 82–191.
  182. Pfarr, N. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene / N. Pfarr, et al. // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2006. – № 65. – P. 810–815.
  183. Di Candia, S. Congenital hypothyroidism and partial iodide organification defects: two mutations in DUOX2 gene / S. Di Candia, et al. // *Horm Res.* – 2006. – № 65 (4). – P. 38.
  184. Ohye, H. A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter / H. Ohye, et al. // *Thyroid.* – 2008. – № 18. – P. 561–566.
  185. Grasberger, H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism / H. Grasberger // *Molecular and Cellular Endocrinology* – 2010. – № 322. – P. 99–106.

186. Rigutto, S. Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation / S. Rigutto, et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – № 284. – P. 6725–6734.
187. Baas, F. The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb / F. Baas, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1986. – № 14. – P. 5171–5186.
188. Targovnik, H. M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations / H. M. Targovnik, S. A. Esperante, C. M. Rivolta // *Mol Cell Endocrinol.* – 2010. – № 322. – P. 44–55.
189. Malthiéry, Y. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA / Y. Malthiéry, S. Lissitzky // *Eur J Biochem.* – 1987. – № 165. – P. 491–508.
190. Veneziani, B. The disulfide bond pattern between fragments obtained by the limited proteolysis of bovine thyroglobulin / B. Veneziani, F. Giallauria, F. Gentile // *Biochimie.* – 1999. – № 81. – P. 517-525.
191. Belkadi, A. Phylogenetic analysis of the human thyroglobulin regions / A. Belkadi, et al. // *Thyroid Research.* – 2012. – № 5. – P. 3.
192. Lee, J. The cholinesterase-like domain, essential in thyroglobulin trafficking for thyroid hormone synthesis, is required for protein dimerization / J. Lee, et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – № 284. – P. 12752–12761.
193. Lee, J. The cholinesterase-like domain of thyroglobulin functions as an intramolecular chaperone / J. Lee, B. Di Jeso, P. Arvan // *J Clin Invest.* – 2008. – № 118. – P. 2950–2958.
194. Ieiri, T. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism / T. Ieiri, et al. // *J Clin Invest.* – 1991. – № 88. – P. 1901–1905.
195. World Health Organization & International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders. Recommended normative values for thyroid volume in children aged 6-15 years // *Bulletin of the World Health Organization.* – 1997. – № 75 (2). – P. 95-97.
196. Zimmermann, M. B. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report / M. B. Zimmermann, et al. // *Am J Clin Nutr.* – 2004. – № 79. – P. 231–237.
197. Wang, K. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data / K. Wang, M. Li, H. Hakonarson // *Nucleic Acids Research.* – 2010. – № 38. – P. 164.

198. den Dunnen, J. T. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update / J. T. den Dunnen, et al. // *Hum Mutat.* – 2016. – № 37. – P. 564–569.
199. Richards, S. et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, et al. // *Genetics in medicine.* – 2015. – № 17 (5). – P. 405-424.
200. Plagnol, V. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling / V. Plagnol, et al. // *Bioinformatics.* – 2012. – № 28 (21). – P. 2747–2754.
201. Yapakçı, E. Intrauterine Treatment of an Infant with Fetal Goitre / E. Yapakçı, S. Tulgar Kınık, J. Pohlenz // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* – 2011. – № 23 (7). – P. 651-660.
202. Rodrigues, C. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism / C. Rodrigues, et al. // *Eur J Endocrinol.* – 2005. – № 152. – P. 193-198.
203. Lek, M. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans / M. Lek, et al. // *Nature.* – 2016. – № 536. – P. 285-291.
204. Макрецкая, Н. А. Случай врожденного гипотиреоза в сочетании с нейросенсорной тугоухостью (синдром Пендреда), обусловленный дефектом гена TPO / Н. А. Макрецкая и др. // *Проблемы эндокринологии.* – 2017. – Т. 63. – № 2. – С. 110–113.
205. Pfarr, N. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes / N. Pfarr, et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2006. – № 91 (7). – P. 2678–2681.
206. Johnson, K. R. Hearing impairment in hypothyroid dwarf mice caused by mutations of the thyroid peroxidase gene / K. R. Johnson, et al. // *J Assoc Res Otolaryngol.* – 2014. – № 15 (1). – P. 45–55.
207. Van Hauwe, P. Two Frequent Missense Mutations in Pendred Syndrome / P. Van Hauwe, et al. // *Hum Mol Genet* – 1998. – № 7 (7). – P. 1099-1104.
208. Laurence, J. Screening of SLC26A4, FOXI1 and KCNJ10 genes in unilateral hearing impairment with ipsilateral enlarged vestibular aqueduct / J. Laurence, et al. // *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* – 2010. – № 74 (9). – P. 1049-1053.
209. Albert, S. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations / S. Albert, et al. // *European Journal*

- of Human Genetics. – 2006. – № 14 – P. 773–779.
210. Alberti, L. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism / L. Alberti, et al. // J Clin Endocrinol Metab. – 2002. – № 87 (6). – P. 2549-2555.
  211. Sunthornthepvarakul, T. Resistance to Thyrotropin Caused by Mutations in the Thyrotropin-Receptor Gene / T. Sunthornthepvarakul, et al. // N Engl J Med. – 1995. – № 332. – P. 155-160.
  212. Макрецкая, Н. А. Клинический случай врожденного гипотиреоза, обусловленного дефектом гена NKX2-1 / Н. А. Макрецкая и др. // Проблемы эндокринологии. - 2016. - Т. 62. - № 3. – С. 21-24.
  213. de Sanctis, L. Familial PAX8 Small Deletion (c.989\_992delACCC) Associated with Extreme Phenotype Variability / L. de Sanctis, et al. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2004. – № 89 (11). – P. 5669–5674.
  214. Yuan, Z. F. Thyrotropin Receptor and Thyroid Transcription Factor-1 Genes Variant in Chinese Children with Congenital Hypothyroidism / Z. F. Yuan, et al. // Endocrine Journal. – 2008. – № 55 (2). – P. 415-423.
  215. Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по ведению детей с эндокринными заболеваниями / под общ. ред. И. И. Дедова и В. А. Петерковой. М. : Практика, – 2014. – 442 с.
  216. Löf, C. Detection of Novel Gene Variants Associated with Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort / C. Löf, et al. // Thyroid. – 2016. – № 26 (9). – P. 1215-1224.
  217. Park, K.J. DUOX2 Mutations Are Frequently Associated With Congenital Hypothyroidism in the Korean Population / K.J. Park, et al. // Ann Lab Med. – 2016. – № 36 (2). – P. 145-153.
  218. Fan, X. Next-generation sequencing analysis of twelve known causative genes in congenital hypothyroidism / X. Fan, et al. // Clin Chim Acta. – 2017. – № 468. – P. 76-80.
  219. de Filippis, T. A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism / T. de Filippis, et al. // Hum Mol Genet – 2017. – № 26 (13). – 2507–2514.
  220. Boyages, S. C. Endemic cretinism: toward a unifying hypothesis / S. C. Boyages, J. P. Halpern // Thyroid. – 1993. – № 3. – P. 59–69.
  221. Shankar, S. M. Dysgenesis of thyroid is the common type of childhood hypothyroidism in environmentally iodine deficient areas of north India / S. M. Shankar, et al. // Acta Paediatr. – 1994. – № 83. – P. 1047–1051.



- 222. Resch, U. Antioxidant status in thyroid dysfunction / U. Resch, et al. // Clin Chem Lab Med. – 2002. – № 40 (11). – P. 1132–1134.
- 223. Senou, M. A coherent organization of differentiation proteins is required to maintain an appropriate thyroid function in the Pendred thyroid / M. Senou, et al. // J Clin Endocrinol Metab. – 2010. – № 95 (8). – P. 4021–4030.
- 224. Magne, F. Demonstration of Autosomal Monoallelic Expression in Thyroid Tissue Assessed by Whole-Exome and Bulk RNA Sequencing / F. Magne, et al. // Thyroid. – 2016. – № 26. – P. 852–859.
- 225. Sriphrapadang, C. The Coexistence of a Novel Inactivating Mutant Thyrotropin Receptor Allele with Two Thyroid Peroxidase Mutations: A Genotype-Phenotype Correlation / C. Sriphrapadang, et al. // J Clin Endocrinol Metab. – 2011. – № 96 (6). – P. 1001–1006.
- 226. Vockley, J. Metabolism as a complex genetic trait, a systems biology approach: implications for inborn errors of metabolism and clinical diseases / J. Vockley // J Inherit Metab Dis. – 2008. – № 31. – P. 619–629.