

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ЭНДОКРИНОЛОГИИ»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

на правах рукописи

Карева Мария Андреевна

Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей: эпидемиология,  
генетическая основа, персонализированный подход к диагностике и лечению,  
мониторинг соматического и репродуктивного здоровья.

**Специальность:** 14.01.02, эндокринология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант: академик РАН Петеркова В.А.

Москва, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Актуальность темы.....	5
Цель.....	7
Задачи .....	7
Научная новизна.....	9
Практическая значимость.....	11
Положения, выносимые на защиту .....	13
Апробация работы.....	14
Внедрение результатов исследования в практику .....	15
Публикации.....	16
Объем и структура диссертации.....	16
Личный вклад автора .....	16
Глава 1.    Врожденная дисфункция коры надпочечников.	
Обзор литературы .....	17
1.1.    Историческая справка .....	17
1.2.    Патогенез и клиническая картина дефицита 21-гидроксилазы.....	19
1.3.    Неонатальный скрининг .....	24
1.4.    Молекулярная генетика дефицита 21-гидроксилазы.....	30
1.4.1.    Корреляция генотип-фенотип.....	35
1.4.2.    Популяционная генетика и этнические особенности дефицита 21-гидроксилазы .....	39
1.4.3.    Молекулярно-генетический анализ гена <i>CYP21</i> .....	44

1.5.	Лечение дефицита 21-гидроксилазы у детей.....	46
1.6.	Особенности становления полового развития и фертильность у женщин с дефицитом 21-гидроксилазы.....	48
1.6.1.	Особенности полового созревания у девочек с ВДКН .....	49
1.6.2.	Феминизирующая пластика .....	52
1.6.3.	Проблема фертильности у пациенток с ВДКН .....	54
1.7.	Особенности полового развития у мальчиков с дефицитом 21— гидроксилазы .....	55
1.7.1.	Особенности перинатального периода у мальчиков с ВДКН .....	55
1.7.2.	«Опухоли» из эктопированной надпочечниковой ткани в яичко (Testicular adrenal rest tumors, TART) .....	56
Глава 2.	Материалы и методы исследования .....	62
2.1.	Формирование групп пациентов.....	62
2.2.	Методы исследования .....	65
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	70
3.1.	Эпидемиология классических форм дефицита 21-гидроксилазы .....	70
3.1.1.	Эпидемиологические результаты неонатального скрининга .....	70
3.1.2.	Эпидемиология аллельных вариантов <i>CYP21</i> в разных этнических группах .....	78
3.2.	Молекулярно-генетические исследования .....	82
3.2.1.	Результаты генетического исследования в группе пациентов с ВДКН и подозрением на данный диагноз.....	82
3.2.2.	Корреляция генотип-фенотип.....	99
3.2.3.	Роль генетического тестирования в неонатальном скрининге.....	103

3.3. Результаты длительного наблюдения за пациентами с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы.....	108
3.3.1. Рост пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы .....	108
3.3.2. Половое развитие девочек с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы .....	119
3.3.3. Половое развитие у мальчиков с врожденной дисфункцией коры надпочечников .....	141
3.4. Сопутствующая патология, влияющая на диагностику и лечение врожденной дисфункции коры надпочечников .....	156
3.4.1. Язвенное поражение желудочно-кишечного тракта .....	156
3.4.2. Дефицит гормона роста .....	157
3.4.3. Сочетание двух моногенных заболеваний .....	159
Глава 4. Обсуждение и заключение .....	164
Выводы.....	174
Практические рекомендации.....	176
Алгоритм диагностики ВДКН в неонатальном периоде с применением молекулярно-генетического анализа.....	178
Персонализированный алгоритм наблюдения за пациентами с классическими формами ВДКН в разные возрастные периоды .....	180
Список сокращений и условных обозначений .....	182
Список литературы.....	184

## ВВЕДЕНИЕ

### АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Врожденная дисфункция коры надпочечников представляет собой группу заболеваний, обусловленных нарушением стероидогенеза в результате дефицита одного из ферментов, участвующих в биосинтезе кортизола. Дефицит фермента 21-гидроксилазы составляет более 90% всех случаев ВДКН. Был клонирован ген данного фермента – *CYP21A2* и выявлены патогенные мутации, вызывающие заболевание, обнаружена корреляционная связь между конкретной мутацией и тяжестью клинической картины.

По степени тяжести выделяют две классические формы: сольтеряющую и простую вирильную, и одну, более легкую, неклассическую форму заболевания. При классических формах внутриутробная гиперандрогения приводит к вирилизации наружных гениталий у плодов женского пола. После рождения отмечается прогрессирование вирильного синдрома в виде ускорения физического развития, костного созревания и преждевременного адrenaрхе. При сольтеряющей форме, которая составляет до 75% всех случаев, имеется дефицит минералокортикоидов, проявляющийся синдромом потери соли. Неклассическая форма проявляется только в перипубертатном возрасте преждевременным адrenaрхе и симптомами гиперандрогении, такими, как гирсутизм, дермопатия и алопеция.

Существует специфический маркер - 17-гидроксипрогестерон (17ОНП), который используется в гормональной диагностике заболевания. ВДКН удовлетворяет условиям включения в программу неонатального скрининга, поскольку является распространенным, потенциально летальным заболеванием, которое может быть диагностировано единственным анализом - исследованием уровня 17ОНП в крови. Тотальный неонатальный скрининг позволил своевременно диагностировать тяжелые формы заболевания и исключил ошибки в определении половой принадлежности у девочек.

По результатам неонатального скрининга 1 млн. новорожденных в разных странах мира была определена частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы 1:14199 [199]. В России до введения процедуры скрининга выполнены единичные эпидемиологические исследования, в которых частота ВДКН составляет от 1:17000 до 1:22000 [11; 25]. После введения неонатального скрининга определена частота дефицита 21-гидроксилазы в отдельных регионах России, которая варьирует от 1:5000 до 1:12000 [25; 6; 10; 12]. В Российской популяции в целом частота ВДКН до настоящего момента не определена.

Для молекулярно-генетической диагностики были предложены разные методы исследования, но сложность организации и полиморфность данного гена не позволяют выбрать наиболее информативную методику генетической диагностики [78].

Разработан протокол терапии врожденной дисфункции коры надпочечников, основанный на применении глюкокортикоидов в дозах, позволяющих не только заместить дефицит кортизола, но и подавить избыточную секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ), вызывающую гиперандрогению. Несмотря на огромный клинический опыт и большое количество научных исследований, остаются проблемы, связанные со снижением физического развития детей с ВДКН и значимое снижение репродуктивной функции. По данным разных авторов количество родов у женщин с ВДКН по сравнению со здоровой популяцией составляет 0-10% для сольтеряющей формы и 30-50% при вирильной форме, снижение сперматогенеза выявляется у 60% мужчин с классическими формами ВДКН [20; 72; 117; 62; 134; 212]. Причины снижения репродуктивных возможностей могут быть связаны с нарушением развития половой системы у детей с ВДКН, что делает актуальным исследование особенностей становления пубертата при данной патологии.

Во всех публикациях отмечено снижение конечного роста у пациентов с классическими формами ВДКН [95; 179]. Оптимизация терапии детей с ВДКН остается очень важной проблемой для практической медицины.

## ЦЕЛЬ

Разработать персонализированный подход к диагностике, лечению и наблюдению за детьми с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников на основании эпидемиологических, молекулярно-генетических, клинических и гормонально-метаболических исследований.

## ЗАДАЧИ

1. Оценить распространенность самой частой формы врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицита 21-гидроксилазы) по данным тотального неонатального скрининга на территории всей Российской Федерации;
2. Проанализировать распространенность частых мутаций в гене *CYP21* в разных этнических группах на территории Российской Федерации;
3. Оценить роль методов молекулярно-генетических исследований в диагностике дефицита 21-гидроксилазы;
4. Определить прогностическое значение уровня 17ОНП в рамках неонатального скрининга для диагностики формы врожденной дисфункции коры надпочечников и выборасхемы лечения
5. Изучить физическое развитие и особенности течения врожденной дисфункции коры надпочечников в зависимости от возраста и формы заболевания;
6. Исследовать особенности полового развития и становление репродуктивной функции у детей с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы;
7. Оценить влияние внутриутробной гиперандрогении на рецепторную чувствительность тканей промежности у девочек на основании ИГХ после феминизирующей пластики;

8. Оценить частоту гиперплазии эктопической надпочечниковой ткани в яичках и проанализировать влияние ее на репродуктивный потенциал у мальчиков с классическими формами ВДКН;
9. Разработать алгоритм персонализированного ведения детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников в разные возрастные периоды.



## НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые в Российской Федерации определена частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы на основании результатов неонатального скрининга, которая составила 1 случай на 9638 живых новорожденных. Достоверность полученных результатов основана на размерах выборки (более 9,5 млн. новорожденных), высоком проценте охвата неонатальным скринингом (96,2%) и на длительности наблюдения (6 лет). Частота данной патологии в России выше, чем в среднем в мировой популяции 1:14198. Показана достоверная разница в частоте классических форм ВДКН в разных регионах Российской Федерации. Получены данные о неравномерном распределении патологических генотипов в отдельных исследуемых этнических группах, выявлены доминирующие мутации для данных групп, что может служить причиной различий в распространенности данной патологии на территории России.

Впервые в России апробирован метод мультиплексной лигазозависимой амплификации в диагностике дефицита 21-гидроксилазы и показана его эффективность для выявления крупных перестроек гена, делеций и дупликаций копий *CYP21A2*. Проведенные исследования доказывают необходимость применения нескольких методов молекулярных исследований в пренатальной диагностике дефицита 21-гидроксилазы.

Проведенный анализ корреляции генотип-фенотип на большой когорте детей с дефицитом 21-гидроксилазы показал высокую прогностическую ценность «тяжелых» генотипов, характерных для сольтеряющей формы заболевания, но выявлена низкая прогностическая ценность «средних» и «легких» генотипов у детей в Российской Федерации.

Впервые в России показана низкая прогностическая значимость уровня 17ОНП, полученного в ходе неонатального скрининга для прогнозирования формы заболевания и определения схемы терапии.

Результаты длительного наблюдения за большой группой пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы показали снижение конечного

роста пациентов вне зависимости от пола, возраста диагностики и формы заболевания. Выявлены критические периоды для роста детей и показана связь между скоростью роста и дозой глюкокортикоидных препаратов. Проведенный анализ влияния дополнительной терапии гормоном роста не доказал значимого эффекта на конечный рост пациентов с ВДКН.

Получены данные о снижении репродуктивного потенциала у мальчиков с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы, обусловленные ранними сроками вступления в пубертат и высокой частотой развития гиперплазии эктопированной надпочечниковой ткани в яичках.

Впервые проведено исследование распределения рецепторов к эстрогенам и андрогенам в тканях промежности у девочек с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы и показано отсутствие влияния внутриутробной гиперандрогении на рецепторную закладку.

Получены данные о снижении чувствительности к эстрогенам со стороны внутренних гениталий у девочек-подростков с классическими формами ВДКН вне зависимости от компенсации заболевания, что потенциально приводит к снижению репродуктивных возможностей.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

1. Проведен анализ неонатального скрининга в РФ и установлено что за период с 2010 по 2015 года процедуре скрининга было подвергнуто 9 млн 909 тыс 570 новорожденных, что составляет 96,2% всех новорожденных в РФ. На основании этих данных была установлена частота дефицита 21-гидроксилазы, которая составила 1 случай на 9638 живых новорожденных. Проанализирован уровень 17ОНП, полученный при скрининге, и показано, что только по уровню 17ОНП невозможно дифференцировать сольтеряющую, вирильную или неклассическую форму заболевания у конкретного новорожденного с положительным результатом скрининга.
2. Была проведена оценка эффективности метода аллель-специфической ПЦР для детекции частых мутаций в гене *CYP21*, которая составила 85% для классических форм, и установлено место данного метода в алгоритме диагностики разных форм дефицита 21-гидроксилазы.
3. Впервые в РФ нами внедрен метод мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA), и показано, что данный метод является важным методом для семейного консультирования и пренатальной диагностики, так как позволяет определить количество копий как активного гена *CYP21A2*, так и количество копий псевдогена *CYP21A1* (*CYP21P*), а также определить наличие сложных химерных генов, что не позволяют другие методы.
4. Проанализированы и установлены факторы, которые могут влиять на снижение фертильности у женщин с ВДКН, в том числе значение контроля эффективности терапии глюкокортикоидами для становления репродуктивной функции, что позволяет разрабатывать подходы к лечению с целью улучшения прогноза фертильности у женщин с ВДКН.
5. Определены факторы, влияющие на становление репродуктивной функции и на фертильность у мужчин с ВДКН. Установлена высокая частота TART у мальчиков с ВДКН (18,75%), которые были выявлены методом УЗИ и не

определялись при осмотре, в связи с чем мы рекомендуем включить УЗИ тестикул в алгоритм наблюдения за пациентами мужского пола с ВДКН.

6. Изучена эффективность лечения гормоном роста пациентов с ВДКН, и установлено, что данное лечение не оказывает значимого влияния на конечный рост пациентов с ВДКН, который снижен по сравнению с общей популяцией. Таким образом, показано, что применение гормона роста у пациентов с ВДКН нецелесообразно.

## ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. По данным неонатального скрининга с 2010 по 2016гг определена частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы, которая составила 1 случай на 9638 живых новорожденных. Выявлена разница в распространенности заболевания в регионах Российской Федерации с максимальной частотой в Уральском Федеральном округе 1:6749 и минимальной – в Северо-Западном Федеральном округе 1:14876.
2. Молекулярно-генетическую диагностику врожденной дисфункции коры надпочечников целесообразно проводить поэтапно с использованием нескольких методик. Наличие частых мутаций в гене *CYP21A2* позволяет использовать менее дорогостоящий метод аллель-специфической ПЦР на первом этапе. Выявленная в нашем исследовании разница в распределении частых мутаций в отдельных этнических группах определяет последовательность проведения исследований. Чувствительность метода аллель-специфической ПЦР составляет 85%. Для поиска редких мутаций в гене *CYP21A2* используется секвенирование. С целью генетического консультирования семей и планирования пренатальной диагностики в ряде случаев дополнительно используется метод MLPA, позволяющий определять количество копий гена *CYP21A2* и гена *CYP21A1P*.
3. Имеется достоверная корреляция между уровнем 17ОНП, полученным в результате неонатального скрининга, и формой заболевания, но существующий перекрест в индивидуальных показателях 17ОНП у пациентов с сольтеряющим, вирильным и неклассическим генотипами не позволяет прогнозировать форму заболевания по результатам гормонального показателя в процедуре неонатального скрининга.
4. Результаты длительного катамнестического наблюдения за пациентами с классическими формами ВДКН продемонстрировали снижение конечного роста при всех формах заболевания, более выраженное у пациентов мужского пола. Скорость роста отрицательно коррелирует с дозой

глюкокортикоидных препаратов, что особенно выражено в раннем детстве и в пубертатный период. Применение гормона роста увеличивает скорость роста на этапе лечения, при этом два года терапии прибавляют к конечному росту в среднем 3см.

5. Период полового развития у мальчиков с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников начинается раньше, чем у здоровых детей. При этом объем тестикул и уровень ингибина В, как маркера репродуктивного потенциала у мальчиков с ВДКН, находятся в пределах нормы, но снижены по сравнению со здоровыми сверстниками. Основное негативное влияние на уровень ингибина В оказывают опухоли яичек из эктопированной надпочечниковой ткани, которые выявлены у 18,75% пациентов.
6. Возраст менархе у девочек с ВДКН не отличается от популяционного. Эстрогенизация наружных гениталий зависит от компенсации гиперандрогении на данный момент и может быть определена с помощью цитологического исследования вагинального мазка. Степень эстрогенизации внутренних гениталий, оцененная по размерам матки, снижена при классических формах ВДКН даже при компенсации гиперандрогении в период полового развития. Внутриутробная гиперандрогения не влияет на рецепторную чувствительность тканей промежности у девочек с ВДКН.

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты и основные положения диссертационной работы за период 2001 – 2018 годы были доложены на более, чем тридцати различных конгрессах и конференциях, в том числе за последние три года на:

- II Всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» с участием стран СНГ, Москва, 25-28 мая 2014

- XI Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Персонализированная эндокринологическая помощь в педиатрии», Санкт-Петербург, 30-31 мая 2015 года
- 54 Европейском обществе детских эндокринологов ESPE, Барселона, Испания, 1-4 октября 2015
- VII Всероссийском конгрессе эндокринологов 2-5 марта 2016 (Москва)
- Ученом совете ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗРФ, 19 июня 2017 года
- на Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «ОРФАННЫЕ БОЛЕЗНИ», 1-3 июня 2017 года, Москва
- на III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии», 1-4 марта 2017 года, Москва

## ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ

Результаты проведенного исследования по диагностике и ведению детей с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников внедрены в практику Института детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Материалы исследования, а также алгоритмы диагностики и наблюдения за пациентами с ВДКН в разные возрастные периоды включены в обучающие курсы для студентов, ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Материалы данного исследования использованы для составления национальных клинических рекомендаций по диагностике и лечению детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников, которые были утверждены эндокринологической ассоциацией и опубликованы на сайте Минздрава Российской Федерации.

## ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 37 работ, в отечественной литературе 31, в иностранных журналах – 6 (шесть), в журналах, рецензируемых ВАК РФ - 12 (двенадцать), издано пособие для врачей «Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей», «Хроническая надпочечниковая недостаточность», главы в руководстве для врачей «Детская эндокринология», национальном руководстве «Эндокринология», «Справочник по детской эндокринологии».

## ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, четырех основных глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение и заключение), выводов и практических рекомендаций. Общий объем работы составляет 212 страниц. Работа иллюстрирована 44 рисунками и 31 таблицей.

## ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор лично провел анализ состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных, сформулировал цель и задачи диссертационного исследования, разработал дизайн научно-исследовательского проекта. Автор самостоятельно проводил обследование пациентов, осуществлял длительно наблюдение, поддерживал регулярный контакт с больными и их родственниками, участвовал в лабораторных исследованиях, проводил анализ полученных результатов. Диссертантом выполнена статистическая обработка полученных данных, которые изложены в данной рукописи. Автор предложил алгоритмы диагностики ВДКН в неонатальном периоде с применением молекулярно-генетического анализа. Результаты работы были опубликованы автором в статьях и доложены на многих российских и международных конференциях.



## ГЛАВА 1. ВРОЖДЕННАЯ ДИСФУНКЦИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Врожденная дисфункция коры надпочечников – это целая группа врожденных моногенных аутосомно-рецессивных заболеваний. Первое описание пациента с данным синдромом относится к середине 19 века. В 1865г итальянский анатом Luigi De Creschio привел описание пациента мужского пола, который умер при явлениях “адинамии и рвоты”, на вскрытии были обнаружены внутренние женские половые органы [88]. Уже в конце 19 века выявлена взаимосвязь женского псевдогермафродитизма с гиперплазией надпочечников. В начале 20 века появились сообщения о связи преждевременного полового развития у мальчиков с гиперплазией или объемными образованиями надпочечников. Сочетание в одной семье девочек с гермафродитизмом и мальчиков с преждевременным половым развитием позволило ряду авторов предположить единую врожденную причину данных состояний [98; 87]. В 1912 году Gallais ввел термин адреногенитальный синдром.

В отечественной литературе впервые Верещинский О.В. в 1924г обобщил 12 случаев надпочечно-полового синдрома [5]. В работах 20-30-х годов одного из основателей советской педиатрии Молчанова В.И. и выдающегося патолога Давыдовского И.В. имеются попытки объяснить причину адреногенитального синдрома [17]. В 1946г один из основателей эндокринологии в России директор Всесоюзного института экспериментальной эндокринологии (в последующем ЭНЦ) Шерешевский Н.А. выделил мышечный тип супрарено-генитального синдрома, который в современной классификации соответствует вирильной форме дефицита 21-гидроксилазы [26].

Единственным способом лечения как девочек с явлениями вирилизма, так и мальчиков с преждевременным половым развитием при адреногенитальном

синдроме был хирургический. Удаление одного надпочечника давало частичный и временный эффект, в то время как двусторонняя адреналэктомия была невозможна из-за отсутствия в то время заместительной терапии [26].

Развитие биохимии и фармакологии положило начало новому этапу в изучении адреногенитального синдрома. Синтез и клиническое применение кортикостероидных препаратов, за которое Hench P.S. и Kendall E.C. в 1949г получили Нобелевскую премию, позволило эндокринологам не только установить этиологию и патогенез адреногенитального синдрома, но и проводить патогенетическую терапию данного заболевания. Bartter F.C. и Wilkins L. первыми связали адреногенитальный синдром с дефицитом ферментов, обеспечивающих синтез кортизола [38; 267]. Начиная с 50-х г сформулировано современное определение врожденной дисфункции коры надпочечников.

В СССР на базе Института экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР (в последующем ЭНЦ) в 1961г была организована детская эндокринологическая клиника под руководством проф. М.А. Жуковского. В детской клинике активно проводилась клиническая и научная работа по адреногенитальному синдрому [4; 8; 19; 22]. В 1969г состоялся III Всесоюзный съезд детских врачей на котором были доложены актуальные вопросы детской эндокринологии [3;14]. По результатам этого съезда детская эндокринология была выделена в отдельную специальность. И уже в июне 1970 г. в г. Иваново проведена I-ая Всесоюзная конференция педиатров-эндокринологов, на которой обсуждались наиболее актуальные проблемы диагностики и лечения эндокринных заболеваний у детей, несколько докладов были посвящены врожденной дисфункции коры надпочечников [1].

В 1977г впервые стал доступен простой и надежный метод скрининга 21-гидроксилазной недостаточности, основанный на исследовании 17ОНП радиоиммунным методом. Первый пилотный проект неонатального скрининга осуществлен на Аляске в популяции эскимосов, отличающейся высокой частотой данной патологии. По результатам данного проекта частота 21-гидроксилазной

недостаточности среди эскимосов Аляски составила 1:280 новорожденных, что по сегодняшний день остается самой высокой частотой данной патологии в мире [197]. Внедрение неонатального скрининга позволило устанавливать диагноз и начинать лечение пациента до начала развития сольтеряющего криза, что значительно снизило летальность при данном заболевании. В России процедура скрининга внедрена с 2006г. Внедрением проекта занимался ФГУ Эндокринологический научный центр, как головное эндокринологическое учреждение Минздравсоцразвития РФ (директор академик Дедов И.И.).

В 80-ые гг. началась новая эра в изучении адреногенитального синдрома, связанная с успехами молекулярной генетики. Были клонированы гены, кодирующие ферменты стероидогенеза и разработана методика молекулярной диагностики для всех форм ВДКН.

В последнее десятилетие основные усилия врачей направлены на оптимизацию терапии адреногенитального синдрома. Длительное катамнестическое наблюдение выявило осложнения и недостатки стандартных схем терапии.

## 1.2. ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Врожденная дисфункция коры надпочечников – группа заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникающих вследствие дефектов одного из ферментов или транспортных белков, участвующих в биосинтезе кортизола. На сегодняшний день описано 7 форм врожденной дисфункции коры надпочечников. Более 90% всех случаев приходится на дефицит фермента 21-гидроксилазы. Данный фермент участвует в биосинтезе кортизола, обеспечивая превращение 17-гидроксипрогестерона (17ОНП) в 11-дезоксикортизол, и в биосинтезе альдостерона, обеспечивая превращение прогестерона в 11-дезоксикортикостерон (Рисунок 1).

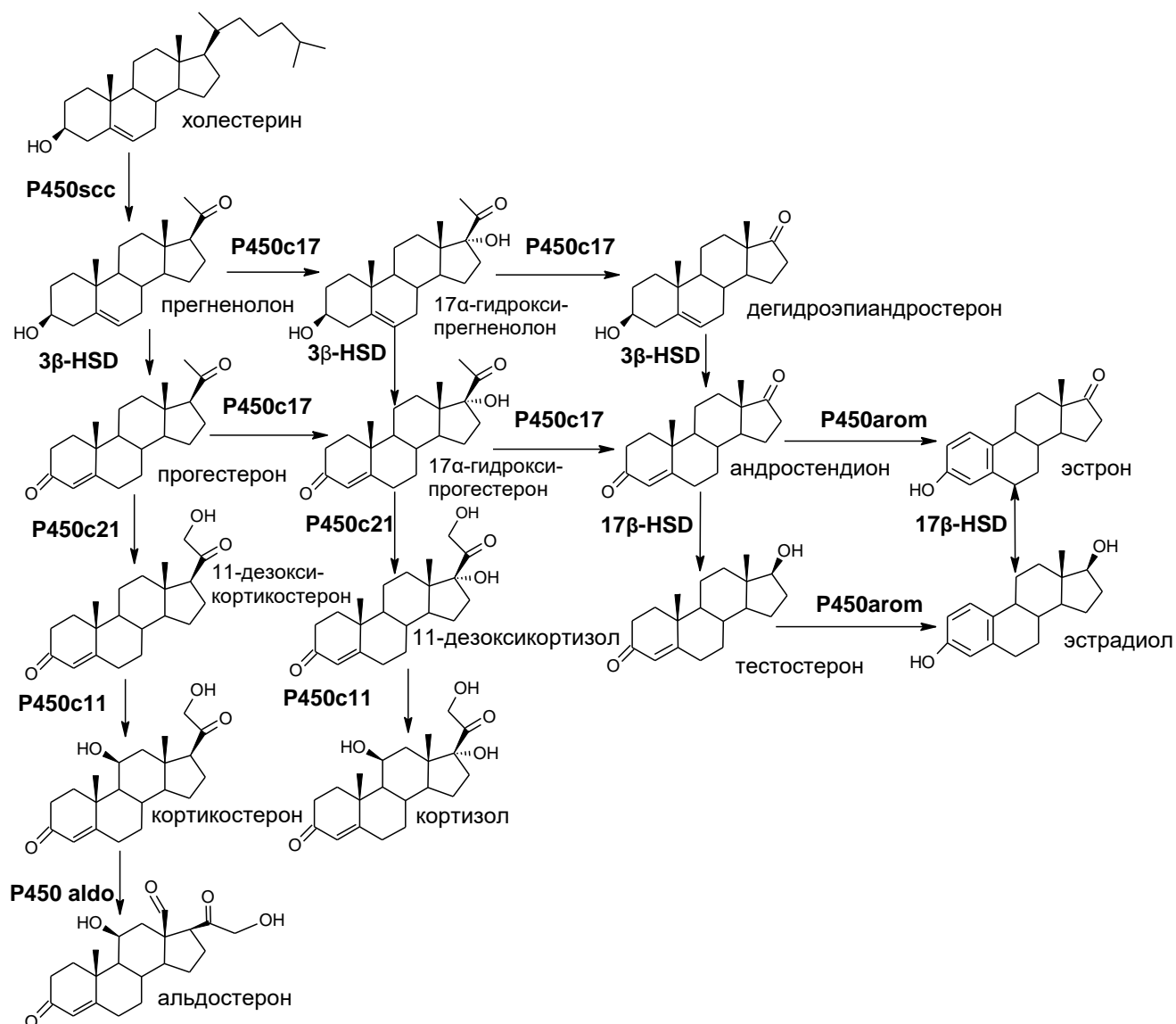


Рисунок 1 - Схема стероидогенеза

В результате дефицита кортизола по классическому механизму отрицательной обратной связи происходит повышение уровня кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ), который в свою очередь стимулирует синтез адренкортикотропного гормона (АКТГ), и осуществляется стимуляция коры надпочечников. Под стимулирующим действием АКТГ происходит гиперплазия коры надпочечников и повышается синтез стероидов, в продукции которых не участвует фермент 21-гидроксилаза, т.е. происходит избыточный синтез надпочечниковых андрогенов и их предшественников. В большей степени происходит накопление 17ОНП, как непосредственного субстрата для 21-

гидроксилазы, который в свою очередь метаболизируется в андростендион и далее - в тестостерон.

Функционирование надпочечников начинается у плода после 7 недели гестации, что является критическим периодом для формирования наружных гениталий. Под действием надпочечниковых андрогенов происходит маскулинизация наружных гениталий у плодов женского пола. Степень вирилизации наружных гениталий у плодов женского пола может варьировать от небольшой гипертрофии клитора до формирования пениальной уретры. Классификация степени вирилизации наружных половых органов у девочек при врожденной дисфункции коры надпочечников основана на системе Прадера, где первая степень - это гипертрофия клитора без скротолабиального сращения, а максимальная пятая степень – это формирование пенисообразного клитора с полным сращением мошоночного шва, когда уrogenитальный синус открывается на головке клитора (Рисунок 2).

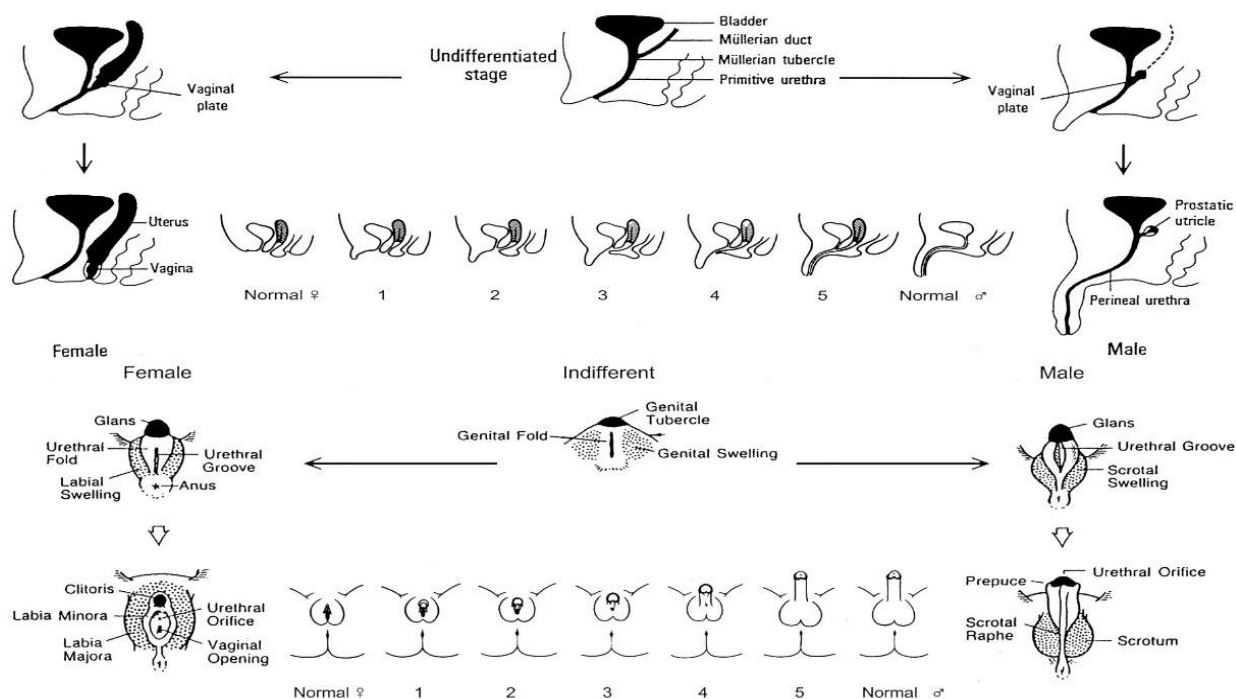


Рисунок 2 - Степени вирилизации наружных гениталий по Прадеру

При этом внутренние гениталии у девочек формируются правильно по женскому типу, поскольку отсутствует антимюллеров гормон.

У плодов мужского пола внутриутробные надпочечниковые андрогены существенно не влияют на формирование наружных и внутренних гениталий, а биосинтез тестикулярных андрогенов при дефиците 21-гидроксилазы не нарушен.

После рождения продолжается избыточная секреция надпочечниковых андрогенов, которая приводит к прогрессии вирильного синдрома, что проявляется не только увеличением клитора у девочек и полового члена у мальчиков, но и ускорением роста, чрезмерной прогрессией костного возраста и появлением полового оволосения.

Клиническая картина заболевания проявляется не только избытком надпочечниковых андрогенов, но и дефицитом глюко- и минералокортикоидов. К специфическим симптомам дефицита кортизола относится прогрессивно нарастающая гиперпигментация кожных покровов, которую можно заметить уже в неонатальный период, и гипогликемический синдром. Поскольку кортизол является основным контринсулярным гормоном, то при возникновении повышенной потребности в глюкозе или при дефиците ее поступления в организм у пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников не происходит компенсаторного нарастания кортизола и развивается гипогликемия. Для адекватной секреции минералокортикоидов требуется значительно меньшая активность 21-гидроксилазы, чем для производства кортизола. У 75% пациентов остаточная активность поврежденного фермента 21-гидроксилазы менее 1%, что приводит к дефициту минералокортикоидов, который проявляется синдромом потери соли. У детей с недостатком альдостерона начиная с 3-4 недели жизни появляются рвоты, жидкий стул, полиурия, что приводит к потере веса, обезвоживанию организма и сопровождается электролитными нарушениями в виде гиперкалиемии и гипонатриемии. Без медикаментозной коррекции данное состояние приводит к гибели ребенка от нарушений сердечного ритма вследствие гиперкалиемии и от гиповолемического шока.

В зависимости от выраженности клинических проявлений заболевания выделяют классическую и неклассическую формы. При неклассическом варианте

дефицита 21-гидроксилазы степень остаточной активности 21-гидроксилазы выше 10%, что не приводит к выраженному дефициту кортизола и альдостерона и не дает клинической картины надпочечниковой недостаточности. Также внутриутробный избыток андрогенов не бывает настолько выраженным и не вызывает внутриутробной вирилизации наружных генталий у девочек. Клиническая картина при неклассической форме дефицита 21-гидроксилазы проявляется в детском возрасте признаками преждевременного адренархе, умеренным ускорением роста и костного возраста. В пубертатном и взрослом возрасте клинические проявления значимы только у женщин, проявляются такими симптомами гиперандрогении, как гирсутизм, андрогенная дерматопатия, алопеция, и нарушением менструального цикла.

В свою очередь классическая форма дефицита 21-гидроксилазы тоже подразделяется на сольтеряющую и простую вирильную в зависимости от наличия минералокортикоидной недостаточности. Сохранение остаточной ферментативной активности 21-гидроксилазы более 1% обеспечивает достаточную секрецию альдостерона и не приводит к клиническим проявлениям синдрома потери соли. Среди всех пациентов с классическими вариантами дефицита 21-гидроксилазы у 25% имеется простая вирильная форма, у 75% - более тяжелая сольтеряющая форма заболевания (Таблица 1).

Таблица 1 - Клиническая классификация дефицита 21-гидроксилазы

Клинические признаки	Классическая форма		Неклассическая форма
	Сольтеряющая (СТ)	Простая вирильная (ПВ)	
Пренатальная вирилизация	У девочек	У девочек	Отсутствует
Постнатальная вирилизация	Выражена у всех пациентов	Выражена у всех пациентов	Варьирует от легкой до незначительной

Клинические признаки	Классическая форма		Неклассическая форма
	Сольтеряющая (СТ)	Простая вирильная (ПВ)	
Синдром потери соли	присутствует	отсутствует	Отсутствует
Дефицит кортизола	присутствует	присутствует	Очень редко
Степень остаточной активности фермента 21-гидроксилазы	<1%	1-2%	10-60%

### 1.3. НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ

Врожденная дисфункция коры надпочечников удовлетворяет условиям включения в программу тотального неонатального скрининга, поскольку является распространенным, потенциально летальным заболеванием, которое может быть диагностировано единственным анализом, исследованием уровня 17ОНП в крови. Своевременная диагностика и лечение могут предотвратить летальность и серьезные осложнения заболевания. С 1977 года, после развития методики определения 17ОНП в капиллярной крови из пятки новорожденного на фильтровальной бумаге, стало возможным проведение неонатального скрининга на ВДКН [197; 196]. Первая экспериментальная программа неонатального скрининга была предпринята в штате Аляска, поскольку среди коренных жителей этого региона отмечена чрезвычайно высокая частота данной патологии. Первый опыт подтвердил возможность и эффективность неонатального скрининга ВДКН [194; 195]. В течение последующих 8 лет неонатальный скрининг проводился в 8 странах (США, Франция, Италия, Новая Зеландия, Япония и Шотландия), среди



приблизительно 1 миллиона новорожденных было выявлено 77 случаев дефицита 21-гидроксилазы. Это позволило оценить распространенность классических форм 21-гидроксилазной недостаточности как 1: 14199 новорожденных [199]. К настоящему времени программы неонатального скрининга на ВДКН функционируют как минимум в 17 странах и еще в 13 странах имеются экспериментальные и местные скрининговые программы [250]. В 2006г в рамках реализации Национального проекта «Здоровье» осуществлено внедрение программы неонатального скрининга ВДКН в России.

Согласно процедуре неонатального скрининга образцы крови для определения уровня 17ОНП берутся у новорожденных из пятки на фильтровальную бумагу на 4 сутки жизни у доношенных новорожденных и на 7-14 сутки – у недоношенных новорожденных [198]. Большинство функционирующих программ используют для определения 17ОНП относительно дешевый иммунологический метод, однако во всех странах строго определены конкретные коммерческие наборы, разрешенные для использования в скрининге [197; 196].

Положительная прогностическая ценность скрининга, которая рассчитывается как отношение выявленных пациентов с ВДКН к общему числу лиц с превышением порогового уровня 17ОНП по результатам теста, оказалась относительно низкой - около 1%. На сегодняшний день обозначился ряд факторов, снижающих положительную прогностическую ценность скрининга [262].

Во-первых, необходимо помнить, что в первые дни жизни уровень 17ОНП обычно высокий у всех новорожденных и быстро снижается у здоровых детей, но продолжает нарастать у пациентов с ВДКН. В последнее время отчетливо прослеживается тенденция сокращения сроков пребывания в роддомах. Следовательно, если забор крови осуществляется в первые 3 суток жизни, то количество ложноположительных случаев будет увеличиваться. Забор крови в условиях поликлиники требует дополнительной организации данной процедуры.

Во-вторых, недоношенные дети и дети с тяжелой соматической патологией имеют значительно более высокие показатели 17ОНП. Благодаря использованию жидкостной хроматографии показано, что повышение 17ОНП обусловлено не только перекрестной реакцией с другими стероидами, а повышен уровень самого 17ОНП. Причем, чем меньше гестационный возраст недоношенных новорожденных, тем выше уровень 17ОНП. Это объясняется снижением функциональной активности нескольких ферментов стероидогенеза с самым низким уровнем активности в 29 недель беременности [183]. Для решения этой проблемы большинство скрининговых программ имеют разные пороговые уровни 17ОНП в зависимости от массы тела новорожденных [31; 113; 189]. Однако нет строгой корреляции между количеством рангов и положительной прогностической ценностью первого теста скрининга. Специфичность теста первой линии можно увеличить, если проводить ранжирование пороговых показателей 17ОНП не по весу новорожденных, а по гестационному возрасту [188; 229; 251]. Так в Нидерландах, применение пороговых значений 17ОНП в зависимости от гестационного возраста новорожденных увеличило положительную прогностическую ценность с 4,5% до 16% [252]. Гестационный возраст является менее объективным критерием, чем вес новорожденного, поэтому ряд стран используют сочетание веса и гестационного возраста для ранжирования диагностических порогов 17ОНП.

В-третьих, большое количество ложноположительных результатов связано с использованием иммунологических методов для определения 17ОНП, при которых имеется относительно слабая специфичность антител и перекрестная реакция их с различными стероидами, имеющимися у новорожденных в повышенном количестве [273].

Существует несколько подходов, позволяющих повысить положительную прогностическую ценность скрининга. Можно увеличить пороговые значения 17ОНП, что позволит снизить количество ложноположительных результатов, но одновременно с этим снижается и чувствительность метода [229]. Такое решение

частично зависит от целей, которые преследует неонатальный скрининг. Использование высокого порогового значения 17ОНП позволит эффективно выявлять пациентов с тяжелой сольтеряющей формой ВДКН, которые имеют самые высокие уровни 17ОНП, но в таком случае будет пропущено около 30% случаев вирильной формы заболевания [237; 254]. Высокий порог используется в программах скрининга в Швейцарии и Швеции, что повысило положительную прогностическую ценность в этих странах до 50% и 24% соответственно, но при этом чувствительность составляет 97% и 92% по сравнению со 100% в странах с более низкими пороговыми значениями [150; 229]. Поскольку главной целью неонатального скрининга является предотвращение летальности от недиагностированных сольтеряющих кризов, то более поздняя диагностика мягких форм может быть приемлемой, если при этом имеется экономическая выгода.

Другим подходом к повышению специфичности неонатального скрининга является проведение ретестирования у новорожденных через 7-10 дней [262; 229]. Именно такой вариант скрининга проводится в большинстве регионов России. Поскольку большее количество ложноположительных результатов имеется среди недоношенных новорожденных или детей с осложненными родами и соматической патологией, то со временем уровень 17ОНП у таких детей снижается, а у пациентов с ВДКН, напротив, нарастает. Однако после проведения ретестирования остается небольшое число детей (от 1 до 8%), у которых отмечается недостаточное снижение 17ОНП и за которыми необходимо дальнейшее наблюдение.

Применение на втором этапе скрининга более чувствительных методов могло бы существенно повысить специфичность процедуры скрининга. Использование и биохимических, и молекулярно-генетических методов в качестве второго теста обсуждается среди специалистов. И те, и другие методы имеют свои преимущества и недостатки. Специфичность гормональной диагностики может быть увеличена путем предварительной экстракции органическими растворителями, при которой отделяются стероиды, способные к перекрестным реакциям. Такой подход используется в некоторых штатах США [28]. Более эффективным методом

разделения стероидов является тандемная масс-спектрометрия (ТМС). Среди образцов с повышенным уровнем 17ОНП, определенным иммунологическим анализом, около 40% показали нормальный результат при использовании ТМС [148; 210; 133]. Определение соотношения стероидов еще больше повышает эффективность ТМС. Так в штате Миннесота определение отношения суммы 17ОНП и андростендиона к кортизолу при ТМС-анализе в качестве второго теста увеличило положительную прогностическую ценность с 0,64% до 7,3% [171].

Стероидное соединение 21-дезоксикортизол, образующееся из 17ОНП под воздействием 11 $\beta$ -гидроксилазы, у здоровых как доношенных, так и недоношенных детей не секретируется в большом количестве, но определяется повышенным у детей с дефицитом 21-гидроксилазы. При измерении отношения суммы 17ОНП и 21-дезоксикортизола к кортизолу методом ТМС в немецком исследовании выявлена 100% положительная прогностическая ценность. Из общего количества 242500 образцов на первом этапе скрининга положительными оказались 1609, диагноз дефицита 21-гидроксилазы был подтвержден у 16 пациентов (положительная прогностическая ценность – 1%). При ретроспективном исследовании методом ТМС среди этих 1609 образцов были выявлены все 16 пациентов и не оказалось ни одного ложноположительного результата [133].

Молекулярно-генетические исследования гена *CYP21* могут быть использованы как тест второго уровня в программе неонатального скрининга [101; 143; 185]. Образцы ДНК могут быть выделены из тех же самых высушенных пятен крови, используемых для гормонального анализа. Особенности строения гена *CYP21A2*, а именно наличие в непосредственной близости псевдогена *CYP21A1*, приводят к тому, что около 90% мутантных аллелей являются следствием рекомбинации между этими генами и несут в себе одну или несколько частых мутаций. С одной стороны, наличие частых мутаций ускоряет и удешевляет генетическую диагностику. С другой стороны, сложные рекомбинации между генами приводят к тому, что на одном аллеле может быть несколько патогенных мутаций, и определить, находятся ли мутации в разных аллелях или в пределах

одного, невозможно без генотипирования родителей. Помимо этого, существует вероятность наличия у пациента новых неописанных мутаций.

Для дефицита 21-гидроксилазы установлено наличие корреляции «генотип-фенотип», описаны мутации более характерные для сольтеряющей формы (делеции, большие генные конверсии, Q318X, R356W, I2spl), для вирильной формы (I172N) и для неклассической формы заболевания (V281L, P30L, P453S). Таким образом, определение конкретных мутаций может помочь не только подтвердить или опровергнуть диагноз, но и дифференцировать форму заболевания и определиться с необходимостью терапии [185].

На сегодняшний день генотипирование является более дорогостоящим и занимающим больше времени исследованием, чем ТМС. Если в последующем, в больших исследованиях, будет подтверждена высокая положительная прогностическая ценность ТМС, то данный метод может стать методом выбора для второго этапа скрининга.

Помимо большого числа ложноположительных результатов существует небольшой процент ложноотрицательных случаев. Видимой причиной тому служит прием матерью на поздних сроках беременности высоких доз глюкокортикоидных препаратов с целью профилактики респираторного дистресс-синдрома у новорожденных при угрозе преждевременных родов. В нашей стране сложилась практика назначения относительно невысоких доз глюкокортикоидов (часто дексаметазона) беременным с явлениями гиперандрогении. Если такая терапия продолжается до конца беременности, то это тоже может послужить причиной сниженного уровня 17ОНП у новорожденных с ВДКН [107; 140]. Сведения о приеме беременной глюкокортикоидных препаратов должны содержаться на фильтровальном бланке, такие дети должны быть обследованы повторно.

Неонатальный скрининг выявляет небольшой процент случаев неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы [262]. Предполагается, что повышенный уровень 17ОНП в период новорожденности могут иметь пациенты,

несущие сочетанные гетерозиготные мутации, одна из которых характерна для неклассической формы, а другая для классической формы ВДКН, в то время как, большинство пациентов с неклассической формой имеют гомозиготную мутацию V281L [245; 235]. Поэтому так невелико число детей с неклассической формой ВДКН, выявляемых по данным неонатального скрининга. Спорным остается вопрос о необходимости терапии у таких пациентов, которые не имеют клинических проявлений заболевания. Традиционно считается, что назначение глюкокортикоидной терапии пациентам без клинических проявлений избытка андрогенов может не только ухудшить ростовой прогноз, но и спровоцировать кризы надпочечниковой недостаточности вследствие длительного подавления гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Требуются дальнейшие исследования для решения данного вопроса.

#### 1.4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Ген *CYP21A2*, ответственный за синтез фермента 21-гидроксилаза, локализован на коротком плече 6-ой хромосомы в локусе HLA III класса [260]. В данном регионе имеются четыре тандемно расположенных гена: гена серин/треонин киназы RP, гена четвертого компонента комплемента C4, гена 21-гидроксилазы *CYP21A2* и гена тенасцина TNX, которые образуют модуль RCCX. Чаще всего имеется бимодульная организация данного региона за счет дублирования модуля RCCX, где гены расположены в следующей последовательности ориентируясь от центромеры - RP1-C4A-*CYP21A1P*-TNXA-RP2-C4B-*CYP21A2*-TNXB. При этом в первом модуле имеется три псевдогена, т.е. с этих генов не синтезируется активных белков. Это гены *CYP21A1P*, TNXA и RP2 [274; 119; 46] (Рисунок 3). Ген *CYP21A2* и псевдоген *CYP21A1P* идентичны на 98% в экзонной части и на 96% в интронной части и расположены на расстоянии 3,1 тыс. п.н [261]. Псевдоген содержит ряд мутаций, которые приводят к полной потере ферментативной активности синтезирующегося белка. В европейской популяции 69% хромосом представлены бимодульной структурой, мономодульная

организация встречается в 17% хромосом, а тримодульная – в 14% [119]. Также был описан гаплотип, несущий одну копию псевдогена *CYP21A1P* и две копии активного гена *CYP21A2*.

Тандемный повтор расположенных рядом гомологичных областей приводит к возможности неравновесного сщепления в процессе мейоза, за счет чего образуются различные генетические рекомбинации. Таким образом, в активный ген попадают участки из псевдогена, содержащие в себе патогенные мутации, или образуются химерные гены, состоящие из части псевдогена, несущего патогенные мутации и части активного гена.

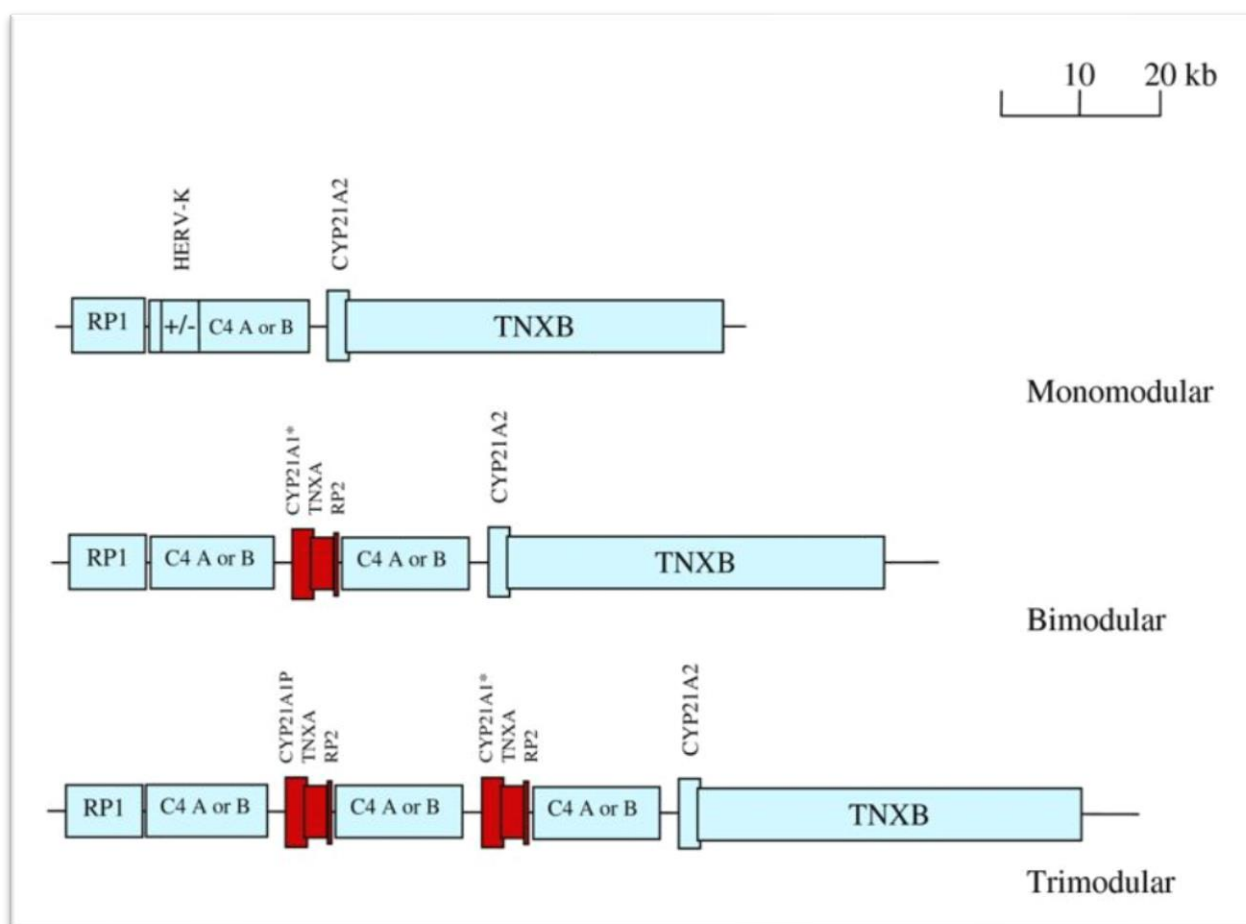


Рисунок 3 - Модульная организация генов [234])

До 95% патогенных гаплотипов у пациентов с дефицитом 21-гидроксилазы происходят за счет описанных межгенных рекомбинаций, около 5% патогенных вариантов представляют собой переданные от родителей спонтанные мутации и до 1% - это мутации *de novo*.

До 75% межгенных рекомбинаций представлены микроконверсиями, которые переносят из псевдогена в активный ген **точечные мутации**. На сегодняшний день описано 12 частых мутаций, произошедших из псевдогена (Таблица 2).

Таблица 2 - Частые мутации в гене *CYP21A2*, перенесенные из псевдогена путем микроконверсий

Место-положение в гене <i>CYP21</i>	Изменения в геноме	Изменения в кДНК	Изменения в белке	Предсказанный фенотип	Ссылка
Exon 1	g.5207C>T	c.89C>T	p.P30L	НК/ПВ	[245]
Intron 2	g.5774A/C>G;	c.290-13A/C>G	Аберрантный сплайсинг	СТ/ПВ	[126]
Exon 3	g.5826_5833 delGAGACTAC	c.329_336 delGAGACTAC	p.G110Vfs?	СТ	[264]
Exon 4	g.6119T>A	c.515T>A	p.I172N	ПВ	[32]
Exon 6 Cluster E6	g.6500T>A g.6503T>A g.6509T>A	c.707T>A c.710T>A c.716T>A	p.I236N p.V237E p. M239K	СТ	[126]
Exon 7	g.6803 G>T	c.841G>T	p.V281L	НК	[126]
Exon 7	g.6882_6883insT	c.920_921insT	p.L307Ffs?	СТ	[126]
Exon 8	g.7114C>T	c.952C>T	p.Q318X	СТ	[111]
Exon 8	g.7228 C>T	c.1066C>T	p.R356W	СТ/ПВ	[67]
Exon 10	g.7699 C>T	c.1357C>T	p.P453S	НК	[192]

Оставшиеся 25% межгенных рекомбинаций приходятся на крупные генные перестройки. Вариант **полной делеции гена *CYP21A2*** происходит с перестройкой модуля *RCCX* с образованием химерных генов *C4A-CYP21A1P-TNXA/TNXB*. Недостаточность *TNXB* приводит к развитию синдрома Элерса-Данло в сочетании



с сольтеряющей формой дефицита 21-гидроксилазы. На сегодняшний день описано 9 вариантов образования химерных генов *TNXA/TNXB* [153; 78].

Другим вариантом межгенных рекомбинаций является делеция около 30 тыс п.н. с образованием **химерного гена** *CYP21A1P/CYP21A2* (Рисунок 4). Таким образом, 5'конец представлен неактивным псевдогеном, а 3' – геном *CYP21A2*.

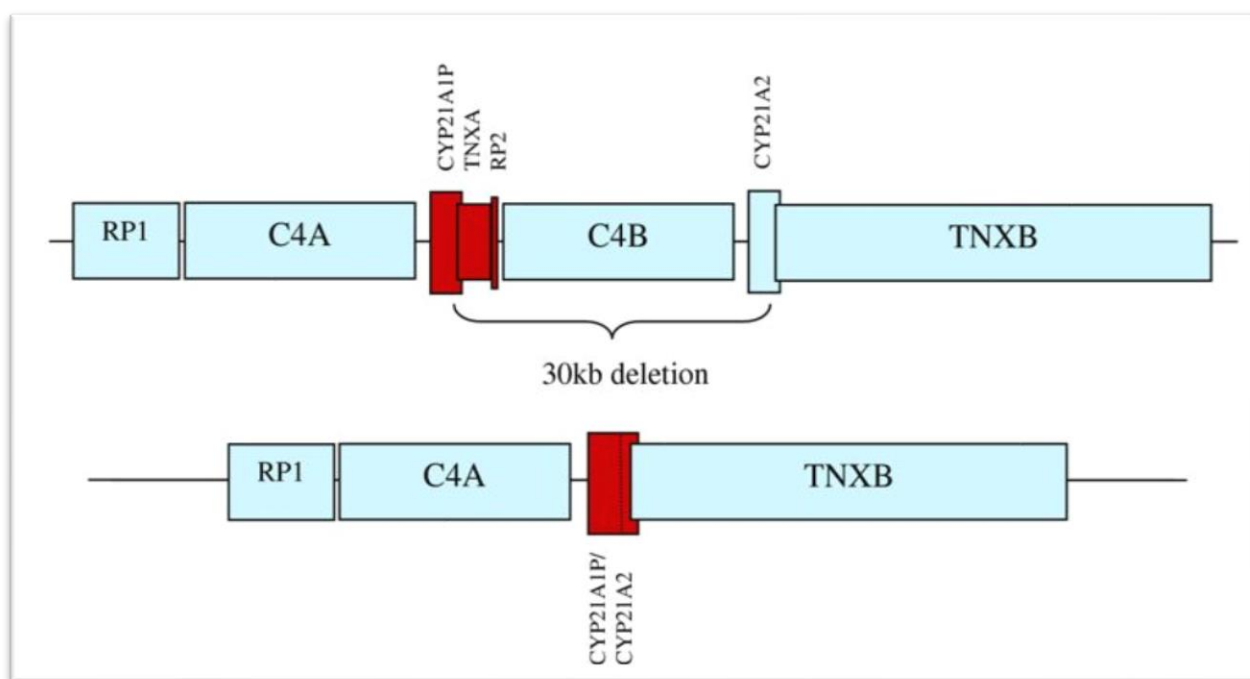


Рисунок 4 - Механизм образования химерного гена *CYP21A1P/CYP21A2* за счет 30-kb делеции [234]

В зависимости от точки соединения выделяют 9 типов химерных генов, из которых 7 вариантов являются классическими, а 2 варианта относятся к аттенуированным (Рисунок 5). При классических вариантах точка соединения лежит ниже 2 интрона, следовательно 5' конец несет мутацию *IVS2-13A/C(G)* характерную для псевдогена, что приводит к аберантному сплайсингу и развитию тяжелой формы дефицита 21-гидроксилазы [121; 66; 153; 78]. При формировании аттенуированных вариантов точка слияния лежит выше второго интрона и переносится из псевдогена только мутация в первом экзоне *P30L* и ослабленная промоторная область гена *CYP21A1P*, что приводит к неклассической форме дефицита 21-гидроксилазы [147].

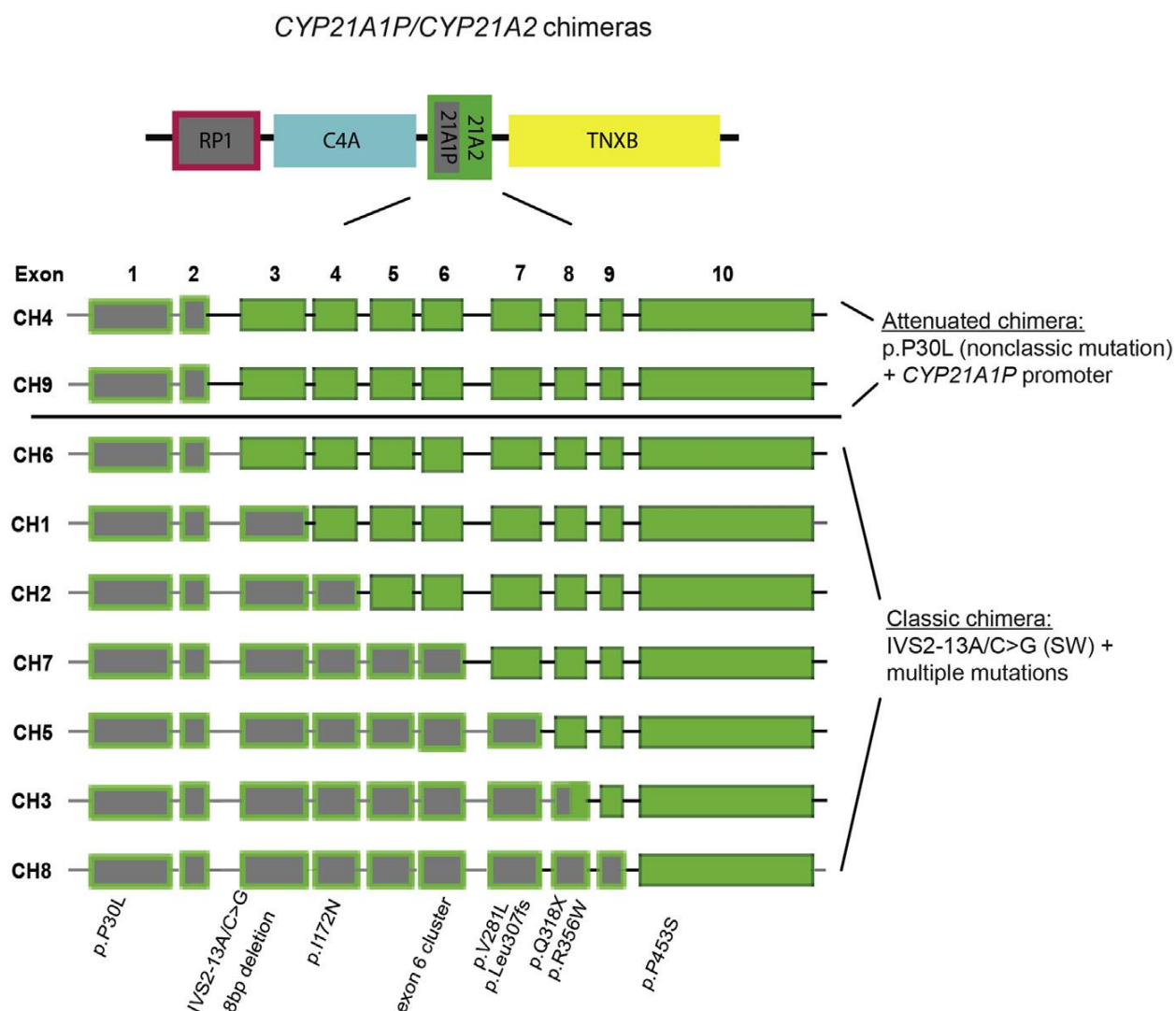


Рисунок 5 - Варианты образования химерного гена в зависимости от точки слияния [121]

И последний редкий вариант межгенных рекомбинаций, приводящий к дупликации активного гена *CYP21A2*, описан в разных популяциях [145; 130; 100; 233; 257; 142]. В большинстве случаев первый активный ген не содержит патогенных мутаций или несет мутацию во втором интроне, тогда как вторая копия активного гена содержит мутацию Q318X. Данный вариант нужно всегда иметь в виду, когда отсутствует корреляция выявленного генотипа с клинической картиной, и когда планируется пренатальная диагностика. Определение количества копий гена *CYP21A2* многие авторы считают необходимым внести в протокол генетической диагностики [78].

На сегодняшний день описано более 200 редких мутаций в гене *CYP21A2*, полный обзор которых с указанием на предполагаемый фенотип представлен в статье Concolino P, Costella A «Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of *CYP21A2* Gene [78].

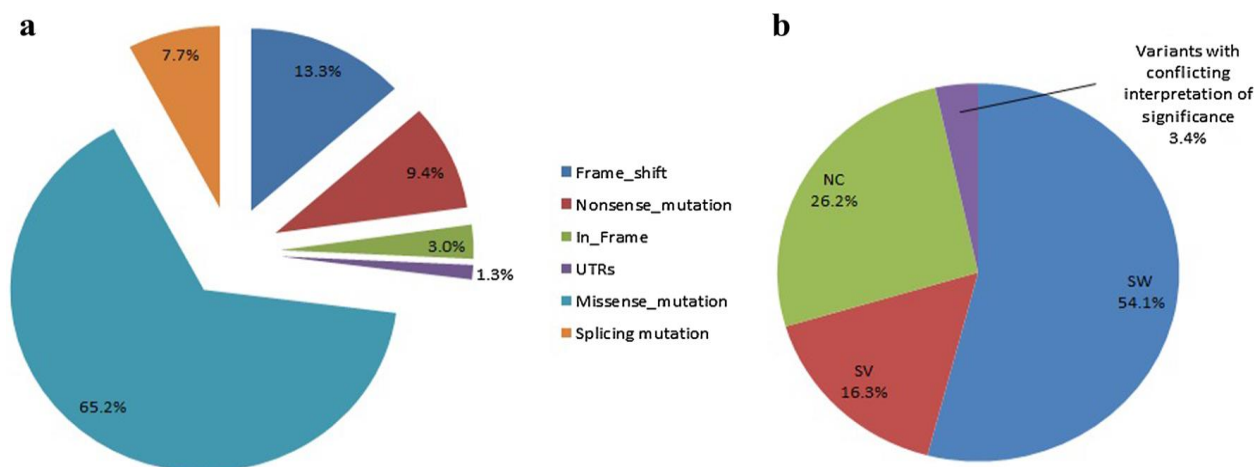


Рисунок 6 - Распределение мутаций в гене *CYP21A2*, описанных на сегодняшний день, по виду (a) и по фенотипу (b). [78]

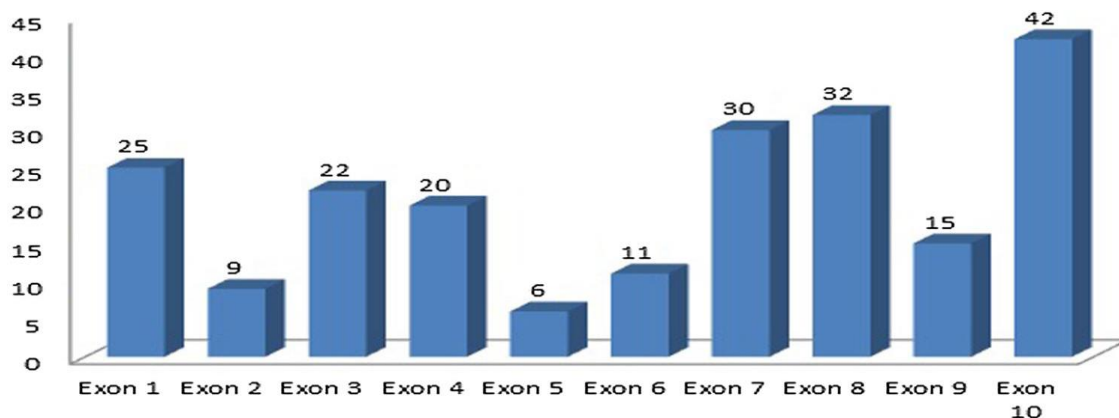


Рисунок 7 - Местоположение в экзонах мутаций в гене *CYP21A2*, описанных на сегодняшний день. [78]

#### 1.4.1. КОРРЕЛЯЦИЯ ГЕНОТИП-ФЕНОТИП

Для врожденной дисфункции коры надпочечников описана высокая корреляция между мутацией в гене и клиническими проявлениями заболевания, которая наблюдается у 90% пациентов [130; 100; 233; 145]. Это объяснимо с точки

зрения патогенеза заболевания. Конкретная мутация ведет к изменению конфигурации белка – фермента 21-гидроксилазы. Повреждение структуры белка определяет возможность его ферментативной активности, и, следовательно, уровень биосинтеза надпочечниковых стероидов. Так полная делеция гена *CYP21A2* приводит к нулевой активности фермента и соответствует самой тяжелой сольтеряющей форме заболевания. При сочетанных гетерозиготных мутациях клиническая картина определяется более легкой мутацией, при которой процент сохраненной ферментативной активности выше.

Частые мутации изначально были разделены на группы в зависимости от клинической формы, которую наблюдали у пациентов при данной мутации. Были выделены группы мутаций, характерных для сольтеряющей, для вирильной и для неклассической форм ВДКН. В дальнейшем для предсказания тяжести мутации в гене *CYP21* были созданы биологические системы, которые определяют остаточную активность фермента, синтезированного с мутантного гена в процентах от «дикого» типа отдельно для прогестерона и для 17ОНП *in vitro*. После проведения исследования ферментативной активности *in vitro* для частых патогенных вариантов была создана система деления мутаций на группы в зависимости от степени потери ферментативной активности. Выделяют 4 группы мутаций по тяжести: группа 0, когда ферментативная активность отсутствует полностью, группа А – ферментативная активность сохранена до 1%, группа В – от 1 до 2% и группа С – от 10 до 78% [244; 182]. Известно, что мутации группы 0 и группы А чаще приводят к сольтеряющей форме, группы В – к вирильной и группы С – к неклассической. По данным литературы наибольшая корреляция с клинической картиной выявлена для самых тяжелых мутаций (группа 0) и самых легких мутаций (группа С), тогда как для промежуточных групп А и В могут наблюдаться разные клинические формы ВДКН [227; 258; 182; 151]. В большом исследовании, где проведен анализ корреляции патогенных мутаций с клинической формой заболевания у 155 пациентов при выявлении мутаций из группы 0 в 100% случаев отмечалась сольтеряющая форма заболевания, при мутации *Introne 2 splice*

(группа А) сольтеряющая форма встречалась у 90% пациентов, при мутации I172N (группа В) вирильная форма была выявлена у 74% пациентов, а в группе С неклассическая форма была у 64% пациентов, но после исключения из группы мутации Р30L, позитивная предсказательная ценность неклассической формы для мутаций группы С составила 90% [145].

Нужно подчеркнуть, что предсказательная система *in vitro* в целом хорошо коррелирует с клинической картиной, но имеются расхождения, например для мутации Р30L, для которой остаточная активность составляет 60% для 17ОНП и 30% для прогестерона, что должно соответствовать легкой неклассической форме. При анализе клинической картины у ряда пациентов гомо- или гемизиготных по данной мутации, отмечается более тяжелая вирильная форма заболевания. Данные расхождения могут объясняться нестабильностью фермента вследствие замены гидрофобного пролина на лейцин в N-концевой части белка, что снижает способность прикрепления фермента к эндоплазматическому ретикулуму [145; 182].

Американские авторы на основе бычьего гомолога *CYP21* создали модель человеческого фермента 21-гидроксилазы, с помощью которой можно предсказать снижение ферментативной активности любой мутации (Рисунок 8) [120]. Расчеты, полученные при использовании данной модели, были схожи с результатами, полученными в биологических системах *in vitro*, и с клиническими наблюдениями. На основании полученных расчетов показано, что мутации, затрагивающие области прикрепления к мембране, участки соединения с гемом или с субстратом, а также приводящие к потере стабильности белка, вызывают полную потерю ферментативной функции и приводят к сольтеряющей форме заболевания. Мутации, изменяющие трансмембранную область или консервативные гидрофобные участки, приводят к снижению ферментативной активности на 98% и соответствуют вирильной форме заболевания. Мутации, приводящие к неклассическому варианту ВДКН, затрагивают области взаимодействия с

оксидоредуктазой, формирование ионных и водородных связей, а также неконсервативные гидрофобные кластеры [120].

Многие авторы указывают на несоответствие между генетическим вариантом и клинической формой заболевания у ряда пациентов, в том числе описаны разные клинические формы у сибсов в одной семье. Такое несоответствие может быть связано с рядом факторов: отмечается высокий полиморфизм оксидоредуктазы, которая является коферментом для 21-гидроксилазы, выраженность вирильного синдрома может быть связана с полиморфизмом андрогенового рецептора, также возможно существование других ферментов, обладающих активностью 21-гидроксилазы и т.п. [137; 175; 147; 272; 170].

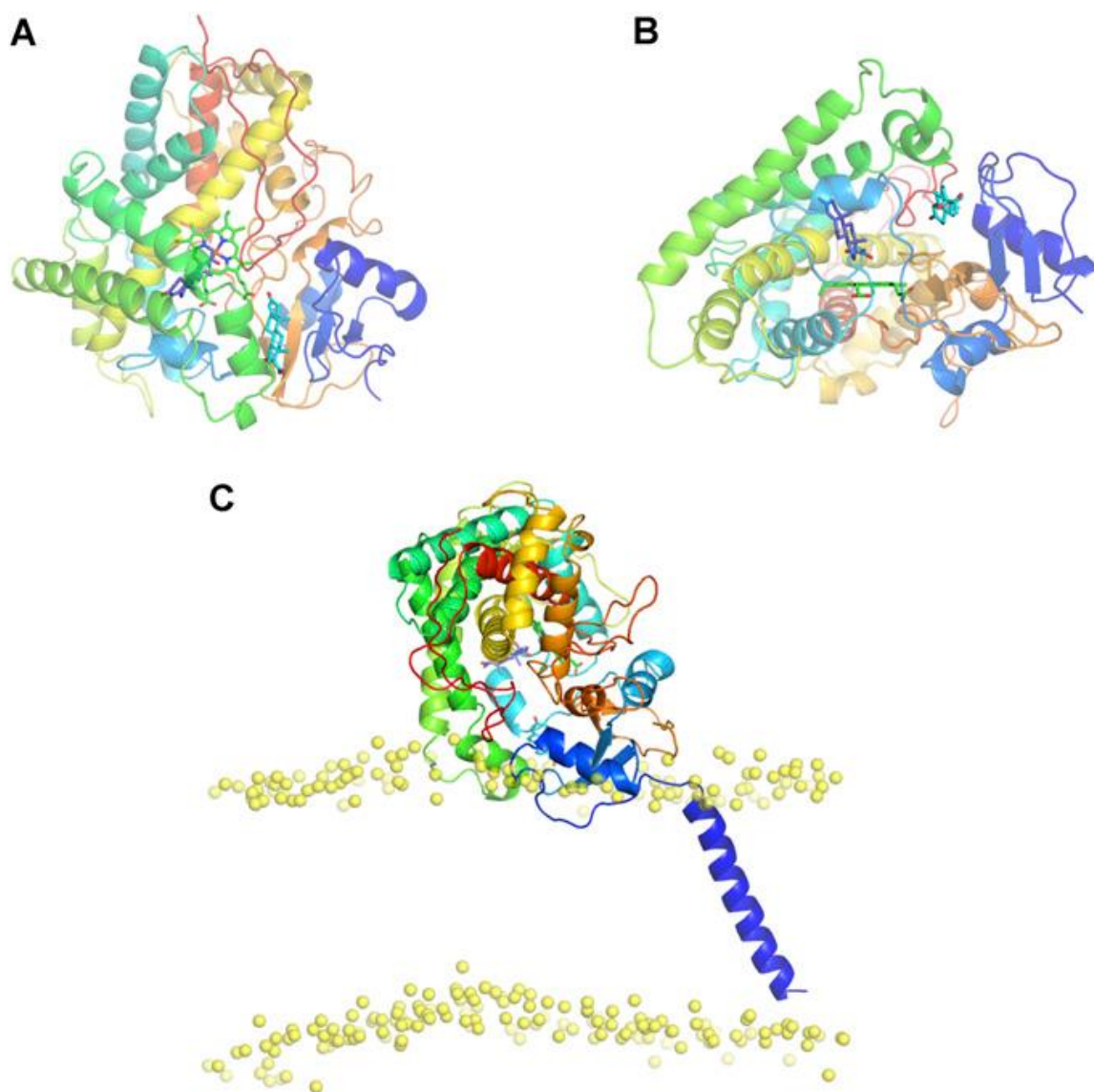


Рисунок 8 - Модель человеческого фермента 21-гидроксилазы [120]

#### 1.4.2. ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА И ЭТНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

После введения неонатального скрининга была определена частота классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в мировой популяции, которая составляет 1 случай на 13000 - 16000 живых новорожденных [199; 193]. Распространенность классической формы варьирует в разных популяциях, так в Европе и США от 1: 10 000 до 1: 23 000 [250], в Японии 1: 21 000 [169], в Новой Зеландии 1: 27 000 [124] и в Китае и Индии 1: 6000 [277; 138]. Неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы является одним из самых распространенных моногенных заболеваний с частотой в мировой популяции 1 : 1000, а в отдельных этнических группах частота еще выше - среди евреев ашкенази 3,7%; среди латиноамериканцев - 1,9%; в Югославии - 1,6%; в Италии - 0,3% [226].

Интересно, что в большинстве регионов частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы увеличилась после введения неонатального скрининга, т.к. процедура тотального неонатального скрининга как раз направлена на повышение выявления заболевания, особенно у мальчиков. Однако, в ряде стран, наоборот, показатель частоты заболевания снизился, что свидетельствует в пользу гипердиагностики данного заболевания. В таблице представлены сводные данные из разных регионов мира по частоте классических форм ВДКН по данным литературы.

Таблица 3 - Частота дефицита 21-гидроксилазы в разных регионах мира.

Регион	Анализируемый период и данные о неонатальном скрининге	Частота	Ссылка
Швейцария	1960-1974	1:15 472 жен>муж (жен 1:13 924)	[259]
	скрининг	1:10 749	[229]
Мюнхен	1963-1972	1:9 831	[167]
Франция	1963-1979	1: 23 044	[49]

Регион	Анализируемый период и данные о неонатальном скрининге	Частота	Ссылка
Япония	скрининг	1:11 438	[220]
	1989-2013 скрининг Токио	1:22 394	[243]
Италия	скрининг	1:8 586	[59]
Шотландия	До скрининга	1:20 907	[255]
	На скрининге	1:18 401	
Швеция	1969-1986	1:11 500	[238]
Венгрия	скрининг	1:18 000	[224]
	Без скрининга 1978-1998	1:14 300	[241]
Канада	1969-1989	1:14 500 жен:муж 2,2:1	[239].
Новая Зеландия	скрининг	1:23 344	[83]
США (Техас)	скрининг	1:16 008	[237]
США (Нью-Йорк)	2007-2014 скрининг	1:18 170	[201]
Израиль	1986-1991	1:30 000 евреи	[216]
		1:8 000 арабы	
Нидерланды	скрининг	1:11 764	[252]
Сингапур	1980-2001	1:22 965	[160]
Шанхай	скрининг	1:16 866	[115]
Индия (один штат Hyderabad)	скрининг	1:2 575	[90]
Аргентина	скрининг	1:8 937	[114]
Эстония	1978-2004	1:16 100	[156]
	Без скрининга		
Австралия	Скрининг	1:15 488	[110].
	Без скрининга	1:18 034	
Бразилия	Без скрининга	1:7 533	[221]
	скрининг	1:10 325	
	Скрининг с последующим наблюдением	1:19 927	[204]
	Длительный скрининг 2001-2010	1:14 967	[180]



Регион	Анализируемый период и данные о неонатальном скрининге	Частота	Ссылка
Хорватия	1995-2006 без скрининга	1:14 403	[93]
Великобритания	2007-2009 без скрининга	1:18 000	[139]
Франция	1996-2003	1:15 699	[80]
Куба	2005-2010 скрининг	1:15 931	[112].
Арабские эмираты	1995-2011	1:9 030	[27]
Китай	2013	1:6 084	[277]
Китай провинция Ningxia	2014-2016	1:14 550	[163]
Германия (Бавария)	1999-2011	1:12 457	[187]

В России имеются единичные эпидемиологические исследования до введения процедуры скрининга 1: 17240 в Москве, 1:20732 в Архангельской области, 1:21899 в Смоленской области [12; 11]. После введения тотального неонатального скрининга в 2006г появился целый ряд публикаций с оценкой частоты дефицита 21-гидроксилазы в отдельных регионах России - 1:7185 в Москве, 1:10005 в Западно-Сибирском регионе, 1:8069 в Краснодарском крае, 1:5934 в Архангельской области, 1: 8791 в Смоленской области, 1:5736 в Удмуртии: [25; 6; 10; 7; 21; 16].

Существует большое количество зарубежных исследований, в которых проводилась оценка распространенности мутаций, приводящих к дефициту 21-гидроксилазы, и выявлена разница в частоте определенных генотипов в разных этнических группах (Таблица 4). Данные различия могут объясняться «эффектом основателя».

Таблица 4 - Распределение частых мутаций в гене *CYP21* в разных популяциях.

Страна	Кол-во пациентов	Bel	I2spl	I172N	Q318X	R356W	V281I	P30L	Ссылка
Китай	52	2	31	23	14	-	9	3	[155]
Нидерланды	198	31,9	28,1	12,4	3,5	8,4	2,2	0,3	[233]
Аргентина	72	21	18	15	14	6	0	0	[85]
Турция	56	25,3	22	9,9	3,3	8,8	7,6	-	[39]
Центральн ая Европа	348	32,6	31,2	14,5	2,6	2,4	3,4	3,7	[92]
США	394	34	31	10	4	4	9	2	[227, 269]
Бразилия	74	23	25	19	11	8	4	0	[200]
Мексика	47	1	47,9	11,7	4,2	7,4	8,5	8,5	[68]
Индия	28	15,9	27,2	31,8	22,7	0	0	2,2	[166]
Япония	102	18	29	13	0	13	1	0	[125]
Великобри тания	384	45	30	7	0	10	0	0	[149]
Швеция	400	33	27	20	2	3	6	2	[258]
Финляндия	102	34	12	29	2	0	3	0	[154]
Италия	146	26	20	6	8	0	11	3	[61]
Германия	155	27,4	30,3	19,7	4,8	4,5	2,9	2,6	[37]
Франция	129	22,9	20,5	8,9	3,9	-	16,7	-	[72]
Испания	200	19,7	22,4	1,3	3,9	3,9	15,8	2,6	[75]

Интерес представляют результаты молекулярно-генетических исследований, проведенных в самой многочисленной выборке пациентов с ВДКН из США, где отмечается этническая гетерогенность популяции (Таблица 5) [270]. Авторы показали наличие доминирующих мутаций в разных этнических группах. Среди евреев ашкенази доминирующей мутацией является V281L, которая выявлена в 63% аллелей. Данная мутация не выявлена среди эскимосов юппи, коренного населения Америки, арабов, индусов, тайцев и в азиатской этнической группе, тогда как среди американцев англосаксонского, итальянского, французского происхождения и у хорватов встречается с частотой 4-15%, а у итальянцев и латиноамериканцев выявлена в 17-34% аллелей. Также данное исследование показало доминирующий характер мутации сплайсинга во втором интроне (In2spl) у эскимосов Юппи и среди иранского населения, при том, что данная мутация является одной из самых частых во всех этнических группах, кроме латиноамериканской популяции. Обращают на себя внимание и особенности частотного распределения мутации Q318X и делеции гена *CYP21A2*: мутация Q318X в высоком проценте выявлена среди арабского населения и у восточных индусов, делеция гена в значимо меньшем проценте аллелей определяется среди иранцев, арабов, индусов и тайцев (Таблица 5).

Таблица 5 - Частота (% от аллелей) мутаций в гене *CYP21A2* в этнических группах [270]

	Делеции	Конверсии	In2spl	I172N	Q318X	R356W	V281L
Англосаксы (n=93)	28	10	24	6	4	7	4
Евреи Ашкенази (n=155)	9	4	14	2	2	2	63
Хорваты*(n=50)	6	7	32	8	9	14	11
Французы (n=16)	16	3	41	9	3	6	6
Латиноамериканцы (n=81)	14	4	2	9	4	5	17

	Делеции	Конверсии	In2spl	I172N	Q318X	R356W	V281L
Иранцы* (n=40)	-	11	41	10	10	5	1
Итальянцы* (n=54)	3	1	23	14	5	6	34
Итало-американцы (n=50)	15	8	21	13	6	-	15
Эскимосы Юппи (n=7)	-	-	100	-	-	-	-
Коренные Американцы (n=5)	40	-	40	-	-	-	-
Арабы (n=8)	-	19	38	-	19	6	-
Азиаты (n=15)	20	10	23	13	-	7	-
Восточные индусы (n=19)	5	16	29	11	16	5	-
Тайцы* (n=71)	8	-	33	15	1	6	-
Афро-американцы (n=31)	18	6	23	10	6	5	5

\*проживают не на территории США

#### 1.4.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *CYP21*

Молекулярно-генетический анализ гена *CYP21A2* является сложной задачей по причине высокой изменчивости геномной области, в которой расположен данный ген. Наличие делеций и дупликаций генов, а также существование более одной мутации на каждом аллеле значительно затрудняет проведение исследований, возможны ошибки в интерпретации результатов молекулярно-генетического исследования, если не учитывается присутствие псевдогена *CYP21A1P*, крупные рекомбинации гена и псевдогена, делеции и дупликации в регионе 6q21.3.

Учитывая наличие частых мутаций в гене *CYP21A2* для ускорения и удешевления молекулярно-генетического исследования были разработаны

методики аллель-специфической ПЦР или рестрикционного анализа для определения 12 частых мутаций [263]. Однако, эти методы не позволяют выявить мутации примерно у 10% пациентов, в случае наличия спонтанных мутаций. Также данные методы не позволяют различить гомозиготные мутации от гемизиготных, что не существенно для подтверждения диагноза, но важно для генетического консультирования. Пациент с неклассической формой ВДКН в случае гомозиготного варианта мутации может передать своим детям только неклассический вариант заболевания, в том же случае, если пациент носитель гемизиготного варианта неклассической формы, он своим детям в 50% случаев передаст мутацию, характерную для неклассической формы, а в 50% случаев делецию (или крупную перестройку гена), обуславливающую сольтерную форму заболевания. Методы детекции частых мутаций не позволяют оценить количество копий активного гена и псевдогена, тогда как для проведения пренатальной диагностики крайне важно определить наличие дупликации гена *CYP21A2*, которая описана во многих популяциях [257; 142]. Для мутаций Q318X и In2splice описаны варианты гаплотипов, когда имеется дупликация активного гена, одна из копий которого несет патогенную мутацию, а другая не имеет патогенных изменений. В таком случае могут отмечаться ложноположительные результаты молекулярно-генетического анализа.

Для определения полной последовательности и количества модулей RCCX традиционно использовался метод Саузерн-блоттинга, который трудоемок, радиоактивен и требует большого количества ДНК. В настоящее время для определения количества копий гена, больших делеций и перестроек можно использовать количественную ПЦР в реальном времени или мультиплексную лигазозависимую амплификацию (MLPA), их эффективность подтверждена во многих исследованиях [152; 132; 77].

Большинство исследователей рекомендуют проводить генетическую диагностику при ВДКН с использованием нескольких молекулярно-генетических

методов, которые позволят определить количество копий гена и псевдогена и точковые мутации, как частые, так и спонтанные.

### 1.5. ЛЕЧЕНИЕ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ У ДЕТЕЙ

Лечение детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников преследует две цели: во-первых, необходимо заместить дефицит глюкокортикоидов и минералокортикоидов в случае сольтеряющей формы заболевания, и, во-вторых, необходимо подавить стимуляцию надпочечников, чтобы не было избыточной секреции промежуточных продуктов (17ОНП), которые метаболизируются в андрогены, вызывая симптомы вирилизации. Таким образом, в лечении детей с дефицитом 21-гидроксилазы используются дозы глюкокортикоидов выше, чем заместительные дозы при других вариантах первичной надпочечниковой недостаточности. Более высокие дозы приводят к подавлению чрезмерной секреции АКТГ, тем самым снижая выработку надпочечниковых андрогенов. Существует очень узкое «терапевтическое окно» в дозировании глюкокортикоидных препаратов: недостаточная доза глюкокортикоидов вызывает гиперандрогению, что приводит к прогрессии костного возраста и преждевременному половому развитию, следовательно, к дефициту конечного роста, в то время как избыточная доза глюкокортикоидов снижает скорость роста и вызывает ожирение и метаболические нарушения, свойственные гиперкортизолизму. Согласно международному консенсусу, принятому в 2002г на съезде педиатров-эндокринологов [135], препаратом выбора в лечении врожденной дисфункции коры надпочечников у детей является таблетированный гидрокортизон. Короткий период полужизни гидрокортизона оказывает минимальное супрессивное воздействие на процессы роста ребенка по сравнению с другими глюкокортикоидными препаратами.

В России с конца 50-х годов наиболее часто использовался преднизолон, который обладает более выраженным АКТГ-подавляющим действием, чем гидрокортизон. В диссертационных работах сотрудников ЭНЦ РАМН 1969-70 гг.

Бурой Т.И. и Кузнецовой Э.С., посвященных росту и развитию пациентов с ВДКН на фоне лечения, доказан положительный эффект преднизолона в отношении уменьшения симптомов гиперандрогении. Однако, показано, что, хотя ростовой прогноз пациентов на фоне лечения преднизолоном улучшается, конечный остается ниже целевого роста [2; 15].

Рост является одним из ключевых показателей адекватности терапии врожденной дисфункции коры надпочечников в детском возрасте. На сегодняшний день в литературе имеется большое количество поперечных исследований с оценкой конечного роста пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы. Практически все исследователи указывают на снижение конечного роста пациентов с ВДКН [54; 58; 103; 109; 122; 86; 123; 157; 162; 174; 218; 249; 275]. Опубликовано три метаанализа доступной литературы относительно конечного роста пациентов с ВДКН, в первом обзоре от 2001 проанализировано 18 исследований, опубликованных до 1998 г, и средний SDS конечного роста составил -1,37 для 561 пациента [95]. Следующий метаанализ, охватывающий публикации с 1966 по 2007гг включал уже 35 исследований и отклонение среднего роста от средней величины также составляло -1,38 SD, а при коррекции на целевой рост - 1,03 [179]. В ряде работ имеется корреляция между возрастом постановки диагноза и конечным ростом пациентов [54; 122; 218; 162]. Поскольку большинство пациентов, достигших конечного роста, были диагностированы до введения тотального неонатального скрининга, то минимальный рост описан у мальчиков с вирильной формой заболевания. Однако, в ряде исследований показано, что конечный рост пациентов снижен при всех формах вне зависимости от сроков начала терапии [58; 247; 249].

С целью поиска факторов, влияющих на рост пациентов с ВДКН, проводились ретроспективные продольные исследования, описывающие процессы роста на протяжении периода детства и представлен анализ зависимости скорости роста от формы заболевания, сроков начала терапии, вида терапии. В объединенном Европейском исследовании, куда были включены пациенты из

Австрии, Венгрии, Словакии, Чехии и Словении, был проанализирован рост 341 пациента и было выявлено снижение скорости роста у пациентов до 3-х лет, дальнейшее восстановление роста до начала полового развития. Пубертатный скачок роста был отмечен у пациентов раньше, чем у здоровых детей, и конечный рост оказался ниже целевых показателей [103]. Авторы не выявили корреляции между конечным ростом и возрастом начала терапии.

Анализируя влияние терапии на конечный рост пациентов с ВДКН рядом авторов выявлена зависимость достигнутого роста от применения минералокортикоидных препаратов, т.е. использование флудрокортизона положительно коррелировало с конечным ростом [44].

Лечение гормоном роста – потенциально возможная терапия, которая противодействует ростоподавляющим эффектам глюкокортикоидов, таким образом улучшая конечный рост пациентов. Karen Lin-Su и др. сообщили о значительном улучшении скорости роста и ростового прогноза у детей с дефицитом 21-гидроксилазы, после двухлетней терапии препаратами гормона роста [158]. В другом исследовании было отмечено увеличение конечного прогнозируемого роста у пациентов с ВДКН на фоне двух лет терапии препаратами гормона роста в сочетании с пролонгированными аналогами ГнРГ со  $159 \pm 11$  см до  $170 \pm 7.5$  см, что приближалось к целевым показателям. [208].

#### 1.6. ОСОБЕННОСТИ СТАНОВЛЕНИЯ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ И ФЕРТИЛЬНОСТЬ У ЖЕНЩИН С ДЕФИЦИТОМ 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Целью лечения девочек с ВДКН является не только компенсация первичной надпочечниковой недостаточности, но и сохранение фертильности, что на сегодняшний день по-прежнему представляет серьезную медицинскую проблему, обусловленную как внутриутробной гиперандрогенией и неправильным формированием наружных половых органов, так и постнатальной гиперандрогенией и особенностями полового развития [72; 131; 116; 62; 64; 134].



### 1.6.1. ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ У ДЕВОЧЕК С ВДКН

Важно отметить, что в большинстве опубликованных исследований не было обнаружено существенных различий в возрасте начала пубертата и возрасте менархе у девочек с дефицитом 21-гидроксилазы [242; 249]. По данным разных исследований средний возраст инициации полового развития у большинства девочек с классической формой дефицита 21-гидроксилазы составляет от 9,3 до 10,6 лет, что соответствует среднему возрасту начала пубертата в здоровой популяции [242; 249; 162]. Однако, есть исключения. Так, в работе Balsamo A. и др. было отмечено, что у пациенток с сольтеряющими вариантами заболевания и «тяжелыми» мутациями, то есть когда активность 21-гидроксилазы практически стремится к нулю (менее 1 %), вторая стадия пубертата по шкале Таннера (стадия Таннер2) и менархе наступали существенно позже, чем у пациенток с вирильной и неклассической формам ВДКН [36].

Отклонения в сроках начала полового созревания в большинстве случаев являются следствием плохой компенсации заболевания. Ускоренное половое развитие чаще наблюдается у девочек в тех случаях, когда терапия была начата позже уже при значительном опережении костного созревания, что провоцирует активацию гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Поздний пубертат и значительные задержки полового созревания часто связаны с гипозэстрогенией, ассоциированной с подавлением секреции гонадотропных гормонов надпочечниковыми андрогенами [141]. Менархе у девочек с ВДКН, которые получают адекватную терапию, наступает в среднем в  $12,7 \pm 1,8$  -  $12,5 \pm 1,5$  лет, что незначительно отличается от популяции здоровых подростков. Van der Kamp HJ и др. в своем исследовании констатируют более позднее наступление менархе, на 6 месяцев позже по сравнению с здоровыми подростками: при сольтеряющей форме -  $13,9 \pm 0,96$  лет, при простой вирильной форме -  $13,5 \pm 1,32$  [249].

Многие исследователи отмечают связь между плохой компенсацией заболевания и нарушениями полового развития. В публикации Hoimes-Walker DJ сравнивался возраст наступления менархе у девочек с компенсацией и

декомпенсацией заболевания в период полового созревания, и при декомпенсации возраст менархе был существенно больше (13 лет (10-18) у «компенсированных» девочек и 16 лет (10-21) у «некомпенсированных») [128].

Многими исследователями показано, что регулярность менструального цикла у девочек с ВДКН зависит в первую очередь от того, удастся ли стабильно подавлять избыточную секрецию андрогенов в надпочечниках [191]. Характер менструального цикла, его регулярность является дополнительным критерием компенсации заболевания [72]. Bindu Kulshreshtha и др. проанализировали течение пубертата у 13 девочек с ВДКН, у которых было поздно (после 8 лет) начато лечение, и заключили, что у шести из 13 девочек отмечалось позднее увеличение молочных желез (в 11-16 лет), и только у двух из 13 девочек наблюдалось спонтанное менархе или менструалоподобные реакции в 11-17 лет [146].

Результатом гиперандрогении является снижение уровня овариальных эстрогенов и низкая эстрогеновая насыщенность внутренних и наружных гениталий (гипоэстрогенизм). Проявлением гипоэстрогенизма может быть уменьшенные размеры матки, выявленные по УЗИ, которые описывают некоторые авторы в своих исследованиях [217; 134]. При исследовании на животных было показано, что под влиянием избытка андрогенов в пренатальный и постнатальный период происходит снижение веса матки у взрослых крыс [246]. Малые размеры матки могут быть дополнительным фактором, приводящим к бесплодию и невынашиваемости у женщин с ВДКН [134; 231; 106]. Кроме того, недоразвитие матки повышает риск осложнений: преэклампсии и задержку внутриутробного развития плода.

Стоит вспомнить, что в период полового созревания у здоровых девочек происходят физиологические изменения метаболизма кортизола: отмечается снижение активности печеночного фермента  $11\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы-1 ( $11\beta$ -ГСД-1) в ответ на пубертатное возрастание концентраций гормона роста (ГР) и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) в крови [64].  $11\beta$ -ГСД1 катализирует обратимую реакцию превращения неактивного кортизона в активный

кортизол. В результате снижения активности данного фермента происходит снижение уровня гидрокортизона, применяемого в качестве заместительной терапии. Повышение уровня гормона роста и, соответственно, ИФР-1 в период пубертата также увеличивают экскрецию кортизола с мочой [64]. Высокие концентрации ГР и ИФР-1 обуславливают «физиологический» пубертатный гиперинсулинизм и инсулинорезистентность, что является причиной повышения яичниковых андрогенов у подростков [172; 168; 47].

Таким образом, в результате физиологических процессов на фоне нарушенного стероидогенеза в надпочечниках у девочек-подростков с ВДКН в период полового созревания гораздо труднее поддерживать хорошую компенсацию и стабилизировать уровень андрогенов на нормальном и близком к нормальному уровне, что подчеркивает необходимость более частого контроля состояния и гормонального профиля девочек-подростков с ВДКН [63].

Однако, нельзя однозначно утверждать, что недостаточная эстрогенизация наружных и внутренних половых органов в период пубертата и связанные с этим нарушения фертильности в будущем объясняются лишь только плохой компенсацией заболевания. Ведь существует и такой фактор, как внутриутробная гиперандрогения.

Публикации, посвященные исследованиям эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в тканях наружных гениталий здоровых новорожденных девочек, а также у здоровых девочек допубертатного и пубертатного возрастов в литературе отсутствуют, что обусловлено сложностями с забором необходимых образцов ткани. Для определения экспрессии рецепторов чаще всего используется иммуногистохимическое исследование (ИГХ) или метод полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (Real-time PCR). Опубликовано всего несколько исследований, в которых определялись рецепторы стероидных гормонов в тканях наружных гениталий у животных и у женщин пре- и менопаузального возраста на фоне заместительной терапии эстрогенами или андрогенами и без терапии [127; 129; 65; 56; 203; 253]. Также достаточно мало

известно о влиянии заместительной терапии эстрогенами на экспрессию эстрогеновых рецепторов в слизистой влагалища. Большинство авторов указывает на увеличение экспрессии эстрогеновых рецепторов типа  $\alpha$  и  $\beta$  как при лечении комбинированными оральными контрацептивами, так и при местной терапии эстрогенами (интравагинальной) [56; 45; 104]. В других исследованиях было показано, что местная терапия эстрогенами меньше влияет на экспрессию эстрогеновых рецепторов по сравнению с комбинированными оральными контрацептивами [222]. Проводились исследования слизистой влагалища транссексуалов, которые длительно получали тестостерон в качестве подготовки к хирургической смене пола с женского на мужской. У транссексуалов было выявлено, что длительное воздействие андрогенов (тестостерона) приводит к истончению и снижению пролиферации эпителия влагалища, снижению экспрессии эстрогеновых рецепторов и увеличению экспрессии андрогеновых рецепторов в вагинальной слизистой [34; 35].

Цитологическое исследование влагалищных мазков и иммуногистохимическое определение рецепторов к эстрогенам и андрогенам у пациенток с врожденными дефектами стероидогенеза, которые приводят к внутриутробной и постоянной постнатальной гиперандрогении (в частности, у пациенток с ВДКН, дефицитом 21-гидроксилазы) в дальнейшем могут прояснить механизмы патогенеза бесплодия при ВДКН. В свою очередь, эти данные помогут пересмотреть и усовершенствовать подходы к лечению девочек с ВДКН в период полового созревания.

### 1.6.2. ФЕМИНИЗИРУЮЩАЯ ПЛАСТИКА

Одной из самых острых тем, обсуждаемых мировым медицинским сообществом и пациентами с патологией пола, является тема хирургической коррекции строения наружных половых органов, где мы сталкиваемся и с техническими, и с морально-этическими вопросами.

В случае девочек с ВДКН феминизирующая пластика проводится с целью социальной адаптации маленького ребенка в обществе, также с целью обеспечить нормальную менструальную функцию в подростковом возрасте и возможность в будущем вести половую жизнь с мужчинами.

Феминизирующая пластика наружных гениталий у девочек с ВДКН подразумевает несколько этапов: резекцию клитора с сохранением нервно-сосудистого пучка, головки и препуциальной кожи, или клиторопластика, рассечение уrogenитального синуса и формирование входа во влагалище, или интроитопластика. Необходимость всех или только одного из этих этапов определяется степенью вирилизации наружных гениталий (традиционно оценивается по шкале Прадера). Надо сказать, что рекомендуемый возраст для проведения феминизирующей пластики также до сих пор постоянно обсуждается и пересматривается хирургами и эндокринологами. Большинство специалистов считают, что самым подходящим периодом для выполнения феминизирующей пластики, ее первого этапа (клиторопластики), являются первые месяцы жизни. Некоторые хирурги настаивают на том, чтобы выполнялась одноэтапная операция - клиторо- и интроитопластика одновременно, и что такую операцию желательно выполнять на первом году жизни [48; 173; 214; 9]. Однако, такая хирургическая тактика чаще всего требует постоперационного бужирования влагалища в течение 6-12 месяцев, что создает дополнительные проблемы как психологического характера, так и отдаленных последствий в виде риска гематокольпоса в период полового созревания и менархе [79; 186; 276; 173]. Кроме того, в некоторых работах по отдаленным результатам описывается высокая частота развития стеноза дистальной части влагалища в период пубертата и позже, что создает необходимость проведения бужирования или повторной пластики влагалища у взрослой девушки [144; 134; 82; 48].

Обоснованием как ранней одноэтапной, так и двухэтапной пластики интроитуса является достаточная эстрогенизация тканей и, как следствие, повышение ее эластичности, что мы наблюдаем в короткий промежуток времени

минипубертата, а затем уже в период полового созревания. Более распространенной тактикой является проведение интроитопластики у девочек с высокой степенью вирилизации через 1-2 года после менархе [23; 24; 18; 94; 43; 30; 144]. Кроме физиологической эстрогенизации слизистой влагалища, важным фактором является возможность половой жизни в скором времени после проведения интроитопластики, чтобы избежать стеноза [159]. При одноэтапной тактике проведения феминизирующей пластики у детей до 1 года рекомендуется предоперационное местное использование эстроген-содержащих кремов [81; 207]. В последнее время ряд исследователей и пациентских сообществ рекомендует воздержаться от ранних корректирующих операций на гениталиях с целью предотвращения психологических гендерных расстройств, что затрудняет принятие решения о сроках и методах выполнения хирургического лечения у девочек с ВДКН [265]. В России у девочек с вирилизацией III-V степени по шкале Прадера в большинстве случаев отдается предпочтение двухэтапной тактике. 80% девочек, которым выполнен первый этап клиторопластики в раннем возрасте, нуждаются в проведении интроитопластики в пубертатном периоде [20].

### 1.6.3. ПРОБЛЕМА ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ВДКН

К сожалению, во многих исследованиях констатируется низкая фертильность у женщин с ВДКН [191; 131]. Особенно низкая частота беременностей и рождаемость отмечается у пациенток с сольтеряющей формой ВДКН, дефицитом 21-гидроксилазы – частота живорожденных детей у женщин с сольтеряющей формой составляет 0-10%, а у женщин с вирильной формой 30-50% [131; 231; 106; 20].

По результатам работы, проведенной в ФГБУ ЭНЦ в 2013 году, только 11,6% пациенток с вирильной формой родили детей, а 9,3% женщин планировали беременность. У женщин с сольтеряющей формой ни одного случая беременности не отмечалось [20].

Низкая фертильность объясняется множеством факторов как генетических, например Hagenfeldt К. показала в своей работе связь между генотипом и рождаемостью [117], так и психосоматических, в том числе и трудности с половой жизнью, которые связаны узким влагалищем, снижением чувствительности, снижением либидо [184].

## 1.7. ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ У МАЛЬЧИКОВ С ДЕФИЦИТОМ 21—ГИДРОКСИЛАЗЫ

### 1.7.1. Особенности перинатального периода у мальчиков с ВДКН

На первый взгляд репродуктивная система мужчин не должна пострадать от избытка андрогенов во внутриутробном периоде. У мальчиков избыток андрогенов внутриутробно не приводит к видимым нарушениям, мужская половая система формируется правильно. Тем не менее, в некоторых работах на животных было показано, что воздействие избытка тестостерона в пренатальном периоде может приводить к снижению герминативного эпителия, а также клеток Сертоли, и отрицательно влиять на фертильность в дальнейшем [215; 211; 209].

Кроме того, на крысах было продемонстрировано, что введение глюкокортикоидов (беклометазона) беременным крысам приводит к качественным и количественным изменениям спермы у самцов в потомстве [206]. Отсюда можно предположить, что не вполне обоснованное применение глюкокортикоидов для лечения гиперандрогенемии у беременных женщин может иметь отрицательное влияние на репродуктивную функцию мальчиков, рожденных от этих матерей. Однако, таких исследований на людях не проводилось.

Во время минипубертата, то есть с рождения до 6 месяцев, у мальчиков растет число герминативных клеток, а также клеток Сертоли и Лейдига, поэтому в этот «активный» период формирования мужской половой системы теоретически могут наблюдаться изменения, связанные с избытком андрогенов, однако публикаций, в которых бы описывались нарушения течения минипубертата именно у пациентов с ВДКН в настоящий момент нет [52; 40; 97; 53; 105].

Нарушения полового развития у мальчиков с ВДКН в основном связаны с гиперандрогенией. Недостаточный контроль избытка андрогенов на фоне лечения глюкокортикоидами может вызвать досрочную активацию гипофиза и преждевременное гонадотропин-зависимое половое развитие.

#### 1.7.2. «Опухоли» из эктопированной надпочечниковой ткани в яичко (TESTICULAR ADRENAL REST TUMORS, TART)

Самым важным фактором, приводящим к нарушению мужской репродуктивной функции у пациентов с ВДКН, на сегодняшний день считается наличие в яичках эктопированной надпочечниковой ткани, которая под воздействием стимулирующих факторов, таких как высокий АКТГ, гиперплазируется и образует объемные образования яичек – TART. Впервые двусторонние объемные образования яичек были описаны у 3,5 летнего мальчика с сольтеряющей формой заболевания ВДКН, не получавшего заместительной гормональной терапии [268]. Минимальный возраст обнаружение TART у мальчика с ВДКН - 1 год [219]. В основном TART обнаруживаются у пациентов с сольтеряющей и вирильной формой ВДКН, однако есть единичные описания и у пациентов с неклассической формой ВДКН [271].

Распространенность TART у взрослых мужчин с ВДКН варьирует от 0 до 94% и зависит от характеристики когорты обследованных пациентов и метода обнаружения образований, составляет в среднем 20-60%. [165; 136; 181; 89; 232]. В одном из самых больших исследований, в которое были включены 98 мужчин, 20 детей и подростков с ВДКН, TART были выявлены у 33% мальчиков и 44% взрослых мужчин [99]. Данные разных авторов о частоте TART среди детей и подростков с ВДКН представлены в таблице ниже.



Таблица 6 - Распространенность TART у детей и подростков

Исследование	Mouritsen, 2010 [176]	Pierre, 2012 [205]	Çakir, 2012 [60]	Aycan, 2013 [33]	Martinez-Aguayo, 2007 [165]	Claahsen-van der Grinten, 2007 [68]	Claahsen-van der Grinten, 2014 [69]
Возраст пациентов	2,6-40,3	2,2-40,2	0,8-18,3	2-18	2-10	2-18	0-19
Тип исследования	УЗИ	УЗИ	УЗИ	УЗИ	УЗИ	УЗИ	УЗИ высокого разрешения
Количество пациентов, чел	49	45	14	60	19	34	41
Частота TART, %	55	31,1	14,3	18,3	21	24	39

Очаги эктопии надпочечниковой ткани в яичко присутствуют и у здоровых мальчиков, о чем известно достаточно давно [84]. Еще в прошлом столетии было описано много клинических случаев TART у пациентов с ВДКН [178; 91; 240; 71; 177; 76; 164; 57]. В России первые описания пациентов с объемными образованиями в яичках были сделаны Кузнецовой Э.С., Касаткиной Э. П в 1960-х годах [14; 13]. Тем не менее проблема TART изучена недостаточно на сегодняшний день. Даже механизмы миграции клеток надпочечника в яички не совсем ясны до сих пор. Предполагается, что клетки надпочечника попадают в семенные канальца в ходе эмбрионального развития. Сами по себе TART не являются опухолью и представлены клетками, которые морфологически аналогичны клеткам коры надпочечника. Существует несколько объяснений механизма образования TART. Под воздействие высокого АКТИГ и ангиотензина-2 клетки эктопированной ткани надпочечника в яичко гиперплазируются, образуя гиперплазированную ткань - TART. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что у плохо компенсированных

пациентов с высоким АКТГ ТАРТ встречается чаще. Однако, с другой стороны, ТАРТ наблюдается и у мальчиков с длительными передозировками глюкокортикоидов и, напротив, низким АКТГ. Таким образом, однозначно считать образование ТАРТ следствием высокого АКТГ нельзя. Есть работы, в которых показано, что у мышей в тестикулах есть группы клеток, которые по своим функциональным характеристикам соответствуют как клеткам коры надпочечника, так и клеткам Лейдига, то есть в них выявлена экспрессия генов, присущих и надпочечникам, и клеткам Лейдига. Авторы делают вывод, что ТАРТ могут образовываться из эмбриональных клеток Лейдига [248; 223].

При макроскопическом исследовании ТАРТ на срезе представляют собой опухоли желто-коричневого цвета с узкими полосками фиброзной ткани. ТАРТ не имеют капсулы, но имеют четкую границу, отделяющую их от ткани яичка. ТАРТ состоят из больших полигональных клеток с эозинофильной цитоплазмой, разделенных плотными фиброзными тяжами [74]. В нескольких исследованиях показана способность ТАРТ вырабатывать надпочечниковые стероиды [42; 68]. Claahsen-van der Grinten и соавт. продемонстрировали, что клетки ТАРТ имеют функциональную общность и с клетками клубочковой, и с клетками сетчатой зоны коры надпочечника [68], в них обнаружена экспрессия рецепторов к АКТГ и ангиотензину-2, то есть они чувствительны к высокому уровню АКТГ и ренина, которые отмечаются у пациентов с ВДКН при плохой компенсации. Также в некоторых работах была выявлена экспрессия рецепторов к ЛГ, тогда как другие исследования не обнаружили данный вид рецепторов [75; 41].

В соответствии с классификацией, предложенной в 2009 году H.L. Claahsen-van der Grinten выделяют пять степеней развития ТАРТ в зависимости от размеров и степени повреждения окружающей паренхимы яичка (Рисунок 9) [70].•

- I. Определяются единичные клетки ТАРТ за пределами rete testis, клетки опухоли не визуализируются при ультразвуковом обследовании. У здоровых детей эти клетки исчезают внутриутробно или на первом году жизни.

II. TART выявлены при УЗИ как небольшие очаговые изменения паренхимы яичек

III. Размер опухоли приводит к сдавливанию rete testis. При гормональном обследовании может быть выявлено снижение уровня ингибина В и повышение уровня гонадотропинов. На этой стадии при обследовании может быть выявлена обструктивная олиго - и азооспермия вследствие обструкции интратестикулярных семявыносящих путей. На фоне супрессивной терапии глюкокортикоидами возможно уменьшение размеров.

IV. Рост TART приводит к обструкции семявыносящих путей, что вызывает фиброз и лимфоцитарную инфильтрацию. Некоторые опухоли объединяются, формируя дольчатые структуры, отграниченные от ткани яичка. Лечение супрессивными дозами глюкокортикоидов обычно неэффективны, так как ткань опухоли содержит значительное количество фиброзной ткани. На этой стадии развивается перитубулярный фиброз, вызывающий повреждение паренхимы яичек.

V. Хроническая обструкция семявыносящих путей и необратимое повреждение ткани яичек.

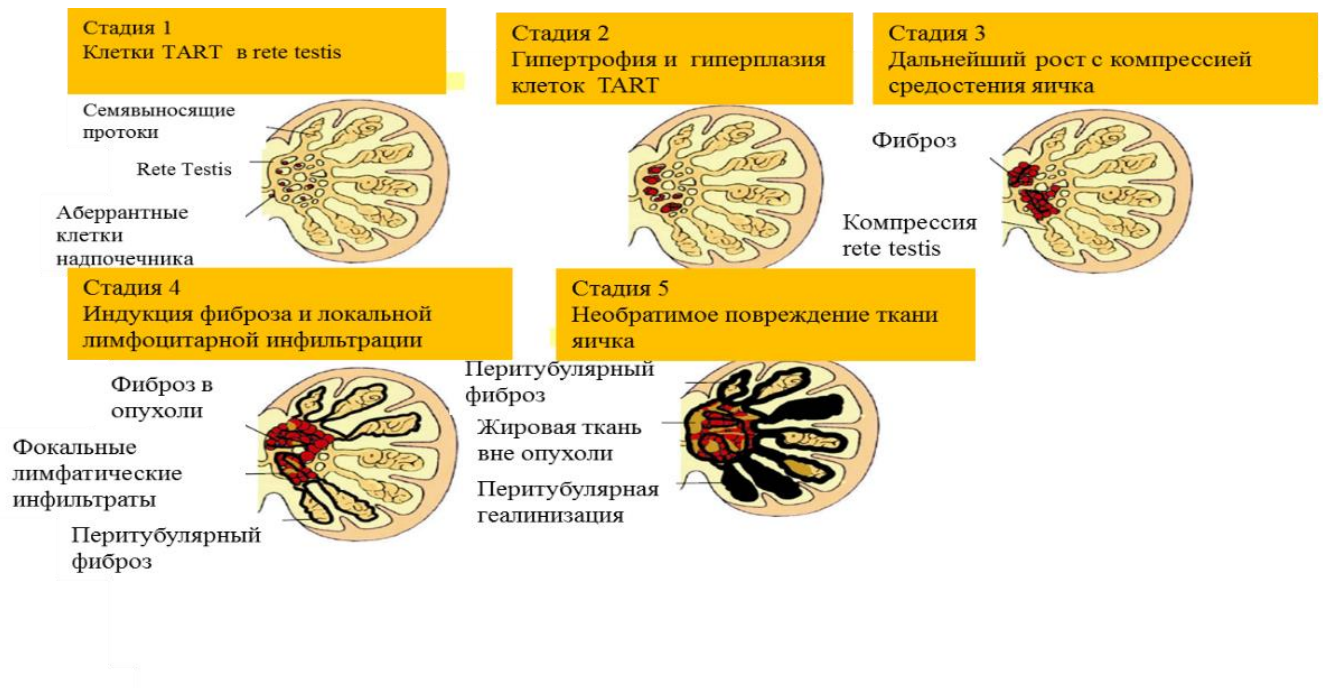


Рисунок 9 - Классификация TART (по Claahsen-van der Grinten [74])

TART редко удается обнаружить при осмотре и пальпации. Основными методами диагностики TART являются УЗИ и МРТ. Дифференциальную диагностику TART необходимо проводить с другими опухолями - лейдигомами, Сертоли-клеточными опухолями, семиномами и опухолями из клеток желточного мешка [29], для чего применяются иммуногистохимические исследования. Надо отметить, что стандартных иммуногистохимических маркеров этих опухолей до сих пор не существует. В ряде работ показан сравнимый уровень экспрессии ферментов стероидогенеза, рецепторов к ЛГ и АКТГ как в клетках TART, так в лейдигомах [223, 42]. Также продемонстрирована экспрессия ИФР-3 только в клетках Лейдига, а экспрессия DLK1 была обнаружена только в клетках TART [161].

Случаи малигнизации TART на сегодняшний день не описаны, в связи с чем хирургическое лечение TART в большинстве случаев не применяется. К сожалению, бывают случаи неоправданной двусторонней орхидэктомии у пациентов с TART. Даже при 4-5 стадии, когда может отмечаться выраженный болевой синдром, рекомендуется органосохраняющая операция [74]. Обычно пациентам с TART 1 – 3 стадии рекомендуется лечение дексаметазоном с целью

подавления АКТГ, что ведет к уменьшению размеров ТАРТ [230; 50; 108; 212; 71; 165]. Опубликовано одно описание лечения ТАРТ с помощью митотана 29-летнего юноши с сольтеряющей формой ВДКН и обструктивной азооспермией вследствие ТАРТ, когда через 2 года лечения отмечались значительное уменьшение размеров ТАРТ и восстановление фертильности (была достигнута беременность с помощью методов ЭКО) [55].

Страдают ли клетки Сертоли при ТАРТ пока окончательно не известно. В большинстве исследований не выявлено достоверно значимого снижения уровня ингибина В у взрослых пациентов с ТАРТ [69; 73]. С другой стороны, в работе Reisch показано статистически значимое снижение уровня ингибина В у 22 взрослых пациентов с ВДКН и ТАРТ [212]. Это может объясняться обструкцией семявыносящих канальцев и атрофией клеток Сертоли, в тоже время может быть связано и с токсическим паракринным действием предшественников кортизола, вырабатываемых клетками ТАРТ [165].

Таким образом, до сих пор нет единого подхода к наблюдению и лечению мальчиков и мужчин с ТАРТ при ВДКН.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. ФОРМИРОВАНИЕ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ

Исследование проходило по трем направлениям: эпидемиологическое, молекулярно-генетический анализ и оценка соматического и полового развития пациентов с ВДКН на основе результатов длительного наблюдения. Для каждой части исследования были сформированы разные когорты пациентов.

- Анализ эпидемиологических показателей заболевания проводился на основании результатов неонатального скрининга с 2010 по 2015 гг. во всех регионах Российской Федерации. За 6 лет в России зафиксировано 9 млн 909 тыс 570 новорожденных. Из них процедуру неонатального скрининга прошли 9 млн. 531 тыс 917 новорожденных и выявлено 989 пациентов с дефицитом 21-гидроксилазы.
- Молекулярно-генетическое обследование проводилось на основании коллекции образцов ДНК, собранных на базе Эндокринологического научного центра и присланных из разных регионов Российской Федерации. В данную группу вошли пациенты с установленным клиническим диагнозом дефицита 21-гидроксилазы и с подозрением на данный диагноз. Критериями постановки диагноза служили клинические и гормональные данные, согласно международному консенсусу по диагностике и лечению врожденной дисфункции коры надпочечников [135].

Критериями постановки дефицита 21-гидроксилазы являются:

#### Для девочек

- Неправильное строение наружных половых органов
- Кариотип 46XX
- Повышенный уровень 17ОНП более 30 нмоль/л

#### Для мальчиков

- Признаки ложного преждевременного полового развития (Степень полового развития  $>1$  при допубертатном размере тестикул).
- Опережение роста  $>2SD$
- Опережение костного возраста  $> 2$  лет от паспортного
- Уровень 17ОНП более 30 нмоль/л

#### Сольтеряющий синдром

- Клинические признаки синдрома потери соли
- Электролитные нарушения (гиперкалиемия+гипонатриемия)
- Повышенный уровень ренина (в зависимости от возраста).

Критериями постановки **неклассической формы** дефицита 21-гидроксилазы

- Преждевременное адренархе (до 9 лет)
- Опережение роста  $>2SD$
- Опережение костного возраста  $> 2$  лет от паспортного
- Уровень 17ОНП более 10 нмоль/л
- Результаты мультистероидного анализа (повышение 17ОНП и 21-дезоксикортизола) или пробы с АКТГ (стимулированный 17ОНП более 36 нмоль/л)

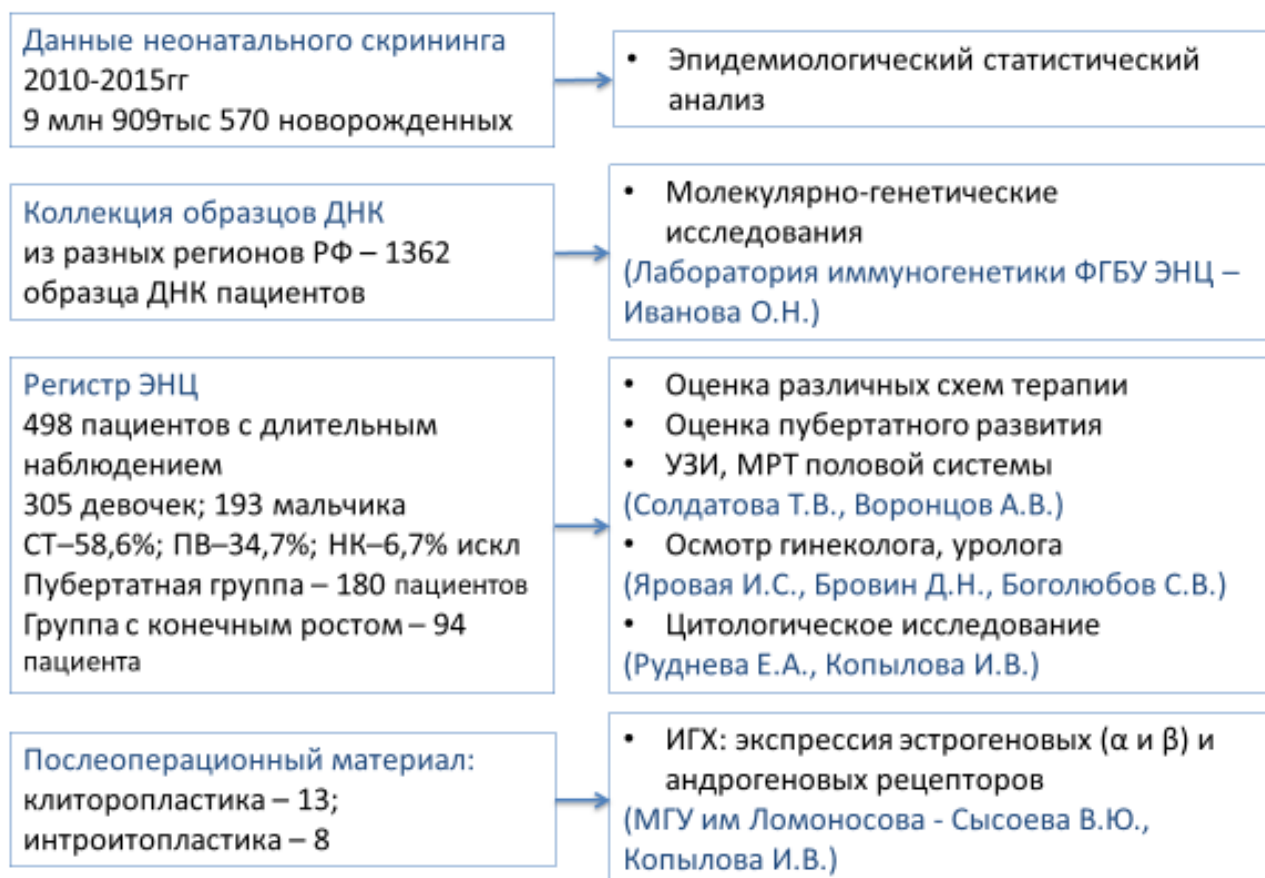
Всего в данную группу было включено 1362 пациента.

- Для оценки соматического и репродуктивного здоровья у пациентов с дефицитом 21-гидроксилазы была использована база данных Института детской эндокринологии, которая ведется с 2001 г., которая включает 498 пациентов с длительным наблюдением, из них 305 девочек и 93 мальчика. По формам дефицита 21-гидроксилазы пациенты распределены следующим образом: СТ–58,6%; ПВ–34,7%; НК–6,7%, пациенты с неклассической формой были исключены из исследования соматического и репродуктивного здоровья.
- Для оценки соматического статуса была выделена группа пациентов, которые достигли конечного роста – 94 человека. В данной группе было 63 девочки и 31

мальчик; 46 пациентов с сольтеряющей формой заболевания и 48 пациентов с простой вирильной формой.

- Проспективное исследование проводилось в группе из 50 пациентов, которые наблюдались в ФГБУ Эндокринологический научный центр с момента постановки диагноза до закрытия зон роста непрерывно, всего проанализировано 789 визитов.
- Для оценки полового развития была выделена группа пациентов пубертатного и постпубертатного возраста - 180 человек. В данной группе было 100 девочек и 80 мальчиков. В данной части исследования были составлены контрольные группы здоровых детей, сопоставимых по возрасту и стадии полового развития (18 мальчиков и 12 девочек), также для оценки влияния пубертатной гиперандрогении на размеры матки была составлена группа сравнения – 12 девочек с синдромом пубертатной гиперандрогении, у которых была исключена врожденная дисфункция коры надпочечников.

### Дизайн исследования





## 2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе динамического наблюдения ежегодное обследование проводилось по следующему протоколу:

- Клинический осмотр, оценка стадии полового развития по шкале Таннер, оценка объема яичек с использованием орхидометра Прадера и оценка степени вирилизации наружных гениталий у девочек по шкале Прадера.
- Антропометрия – измерение роста проводилось с помощью механического стадиометра (Harpender stadiometr, Holtain Ltd, UK) до 2015г и с помощью телескопического механического ростомера Sesa 222 (Германия) после 2015г. Измерение веса проводилось на напольных калиброванных весах. Антропометрические расчеты проводились с помощью программы Auxology 1,0 b17, где в качестве нормативных показателей используется популяционные данные Tanner J и Whitehouse H.
- Гинекологический осмотр, включающий оценку результатов проведенных пластических операций, проводился в отделении эндокринной гинекологии ФГБУ ЭНЦ (зав. отд. проф. д.м.н. Е.Н. Андреева, исполнитель: к.м.н. Яровая И.С.) и отделении гинекологии ИДГКБ №3 (исполнитель: зав. отделением - Глыбина Т.М).
- Гормональное обследование проводилось в лаборатории ФГБУ ЭНЦ (зав. лабораторией д.б.н. проф. Гончаров Н.С., зав. лабораторией Ильин А.В., зав. лабораторией к.м.н. Никанкина Л.В.). В гормональном анализе пациентов с ВДКН определялись уровни 17ОНП, тестостерона, эстрадиола, ЛГ, ФСГ, АКТГ, активности ренина плазмы/прямого ренина. Содержание общего тестостерона, эстрадиола, лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) исследовалось методом усиленной хемилюминесценции с помощью автоматического

иммунохимического анализатора Vitros 3600 (Ortho Clinical Diagnostix, «Johnson & Johnson», США). Концентрации 17ОНП в сыворотке крови и активность ренина плазмы исследовались методом радиоиммунного анализа с использованием коммерческих наборов Immunotech (Чехия). Прямой ренин определялся методом иммунохемилюминесцентного анализа с помощью наборов LIAISON Direct Renin (DiaSorin S.p.A, Италия). Определение уровня ингибина В (Inhibin B Gen II ELISA) и антимюллерова гормона (AMH Gen II ELISA) проводилось методом иммуноферментного анализа с помощью наборов компании Beckman Coulter (Beckman Coulter, Inc., США).

- Ультразвуковое исследование органов мошонки (отделение функциональной диагностики ФГБУ ЭНЦ, зав. отд., к.м.н. Солдатов Т.В.) проводилось на ультразвуковом сканере Toshiba Aplio XG-790 (Япония) с использованием линейного датчика с частотой 10-12 МГц. Объем тестикул рассчитывался, используя формулу объема эллипсоида ( $0,52 \times d1 \times d2 \times d3$ , где d1, d2, d3 - передне-задний, верхне-нижний размеры яичка и толщина). Исследование интратестикулярного кровотока проводилось методом цветной доплерографии. УЗИ органов малого таза проводилось у всех девочек трансабдоминально, объем матки был рассчитан по формуле  $A \times B \times C \times 0,5233$ , где А – длина матки вместе с шейкой, В – ширина, С – передне-задний размер (толщина) матки.
- Рентгенография кистей с лучезапястными суставами, костный возраст пациентов определялся в соответствии с общепринятой методикой W. Greulich, S. Pyle S (1959).
- Цитологическое исследование вагинального мазка. Забор материала для цитологического исследования производился в ходе гинекологического осмотра в ФГБУ ЭНЦ и ИДГКБ №3. Вагинальные мазки были получены с латеральных стенок средней трети влагалища.

Окрашивание стекол по методу Романовского в модификации Паппенгейма и последующее морфологическое исследование проводились в лаборатории патоморфологии ФГБУ ЭНЦ (зав. отделением – Абросимов А.Ю., консультант: Руднева Е.А., исполнитель ст. научный сотрудник отделения опухолей эндокринной системы Института детской эндокринологии к.м.н. Копылова И.В.). Морфологическая оценка препаратов заключалась в подсчете 200 клеток в нескольких полях зрения на микроскопе Zeiss Primo Star с помощью объективов 10× (для выбора поля зрения) и 100× (для подсчета и определения типа эпителиальных клеток). Затем производился подсчет процента каждого типа клеток эпителия влагалища - кариопикнотичных поверхностных (%КП), промежуточных (%ПР) и базально-парабазальных клеток (%ПБ). Для проведения статистического анализа был также использован общепринятый расчетный показатель - индекс созревания (ИС), являющийся маркером эстрогеновой насыщенности слизистой влагалища. Данный показатель был вычислен по формуле:  $ИС = (\% ПР \times 0.5) + \% КП$  [266].

- Иммуногистохимическое определение эстрогеновых (ЭР $\alpha$  и ЭР $\beta$ ) и андрогеновых (АР) рецепторов проведено на базе центра коллективного пользования, факультета фундаментальной медицины МГУ им. Ломоносова (консультант: к.б.н. Сысоева В.Ю., исполнитель ст. научный сотрудник отделения опухолей эндокринной системы Института детской эндокринологии к.м.н. Копылова И.В.). Операционный материал был фиксирован в 4% формалине в течение 24-72 ч и заключен в парафиновый блок. Исследование локализации ЭР $\alpha$ , ЭР $\beta$  и АР выполнено на парафиновых срезах толщиной 3 мкм по стандартной иммуногистохимической методике на иммуностейнере Autostainer Link 48 (Dako, США) с использованием коммерческих мышиных моноклональных антител против ЭР $\alpha$  (клон 6F11, в

разведении 1:80); ЭРβ (клон EMR02, разведение 1:50); AP (клон AR27, разведение 1:100) (Novocastra) с предварительной демаскировкой антигенов в соответствии с протоколом производителя. Время инкубации с первичными антителами составило 1 ч для эстрогеновых и 2 ч для андрогеновых рецепторов при комнатной температуре. Проявление реакции осуществлялось системой визуализации Peroxidase Detection System (Novocastra, Великобритания). В качестве негативного контроля была использована ткань миндалин, в качестве положительного – ткань эндометрия (для ЭР $\alpha$ ), кожи (для ЭР $\beta$ ), карциномы простаты (для AP), рекомендованные в описании к коммерческим антителам. Для серо-негативного контроля был использован мышинный IgG (FLEX Negative Control Mouse Cocktail; Dako). Морфометрический анализ проведен на микроскопе Zeiss Axioscop 40, оснащенном камерой AxioCam MRc5 Zeiss. Иммуногистохимическая реакция для каждого маркера идентифицировалась по ядерному окрашиванию клеток. Оценка процентного количества окрашенных клеток была проведена в 6-10 полях зрения при увеличении  $\times 40$  для каждого маркера в образце. В ткани малых половых губ помимо общего процента оценивалось количество иммунореактивных клеток отдельно в эпидермальном и дермальном слоях, в вагинальной слизи – в базально-парабазальном, промежуточном и поверхностном слоях эпидермиса и в дерме.

Молекулярно-генетические исследования проводились в лаборатории генетики и клинической иммунологии ФГБУ НМИЦ Эндокринологии Минздрава России (зав. лабораторией Прокофьев С.А., зав. лабораторией Иванова О.Н.):

- Выделение ДНК из образцов крови проводилось с использованием коммерческих наборов компании Promega (Promega Inc, США) согласно протоколу производителя.

- Метод аллель-специфической ПЦР использовали для детекции 12 точечных мутаций в гене *CYP21* по методике A.Wedell и H.Luthman [256] с модификациями. Селективно амплифицировали фрагменты гена *CYP21*, используя праймеры, комплементарные участку 8 п.н. в экзоне 3, полученные в результате амплификации специфические фрагменты ДНК использовали для генотипирования 12 точечных мутаций.
- Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе.
- Мультиплексная лигазозависимая амплификация проводилась с помощью коммерческих наборов SALSA MLPA Probemix P050 (MRC-Holland).

**Статистическая обработка** полученных данных проводилась с использованием приложения Microsoft Excel 2003 с помощью пакета прикладных программ Statistica («StatSoft Inc.», США, версия 8.0). Все данные в работе представлены для параметрических критериев - среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение; для непараметрических критериев – медиана с указанием 1 и 3 квартилей. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью непараметрических критериев статистического анализа. Для сравнения двух групп по количественным признакам рассчитывался критерий Стьюдента для параметрических выборок, для непараметрических - применялся тест Манна—Уитни. Для сравнения более двух независимых выборок проводился ранговый анализ вариаций по методу Краскела-Уоллеса с последующим сравнением групп с помощью теста Манна-Уитни. Для оценки значимости различий качественных признаков в группах использовался критерий  $\chi^2$  (хи-квадрат) по Пирсону с поправкой Йейтса. Для анализа связи двух признаков использовался анализ ранговой корреляции по Спирмену. Критический уровень значимости различий принимался равным 0,05.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ КЛАССИЧЕСКИХ ФОРМ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

#### 3.1.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА

С середины 2006 г. в России был введен неонатальный скрининг на врожденную дисфункцию коры надпочечников. С 2010 г. Процент охвата неонатальным скринингом превысил 90%. На основании полученных результатов процедуры тотального неонатального скрининга за 2010-2015 гг была оценена распространенность классических форм дефицита 21-гидроксилазы. Всего процедуре скрининга было подвергнуто 9 млн 909 тыс 570 новорожденных, что составляет 96,2% всех новорожденных в России за этот период. Было выявлено 989 пациентов с дефицитом 21-гидроксилазы, и рассчитана частота дефицита 21-гидроксилазы, которая составила 1 случай на 9638 живых новорожденных. В таблице представлены данные по неонатальному скринингу с 2010 по 2015гг в разных регионах Российской Федерации

Таблица 7 - Данные по неонатальному скринингу на врожденную дисфункцию коры надпочечников

Округ	Кол-во новорожденных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
<b>2010 год</b>				
Центральный ФО	415362	406603 (97,9%)	50	1:8132
Северо-Западный ФО	154671	141236 (91,3%)	9	1:15692
Южный ФО	320478	280237 (87,4%)	34	1:8242

Округ	Кол-во новорожден- ных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
Северо-Кавказский ФО	156291	150947	10	1:15094
Приволжский ФО	370039	361391 (97,7%)	55	1:6571
Уральский ФО	169788	155700 (91,7%)	25	1:6228
Сибирский ФО	269558	258987 (96,1%)	27	1:9592
Дальневосточный ФО	82069	74617	2	1:37308
<b>Всего 2010 в РФ</b>	<b>1781965</b>	<b>1678771</b> <b>(94,2%)</b>	<b>202</b>	<b>1:8310,7</b>
<b>2011 год</b>				
Центральный ФО	414959	389037 (93,75%)	44	1:8842
Северо-Западный ФО	154869	137185 (88,58%)	10	1:13719
Южный ФО	162088	159526 (98,42%)	15	1:10635
Северо-Кавказский ФО	163124	112018 (68,67%)	14	1:8001
Приволжский ФО	265319	353055 (96,64%)	33	1:10699
Уральский ФО	170874	166552 (97,47%)	22	1:7571
Сибирский ФО	268778	280461 (96,9%)	27	1:9647

Округ	Кол-во новорожден- ных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
Дальневосточный ФО	82249	82467 (100,3%)	9	1:9163
<b>Всего 2011г в РФ</b>	<b>1782260</b>	<b>1660301</b> <b>(93,16%)</b>	<b>174</b>	<b>1:9542</b>
<b>2012 год</b>				
Центральный ФО	444290	437811 (98,54%)	48	1:9121
Северо-Западный ФО	166258	171482 (103,14%)	8	1:21435
Южный ФО	172287	170118 (98,74%)	19	1:8506
Северо- Кавказский ФО	162505	136821 (84,19%)	15	1:9121
Приволжский ФО	393926	389321 (98,83%)	34	1:11451
Уральский ФО	183545	185059 (100,82%)	28	1:6609
Сибирский ФО	282997	281921 (99,62%)	34	1:8292
Дальневосточный ФО	86534	82762 (95,64%)	9	1:9196
<b>Всего 2012г в РФ</b>	<b>1892342</b>	<b>1855295</b> <b>(98,04%)</b>	<b>199</b>	<b>1:9323</b>
<b>2013 год</b>				
Центральный ФО	273846	269050 (98,25%)	17	1:15826



Округ	Кол-во новорожден- ных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
Северо-Западный ФО	107628	105117 (97,67%)	8	1:13140
Южный ФО	106955	102100 (95,46%)	10	1:10210
Северо- Кавказский ФО	92247	103140 (111,81%)	9	1:11460
Приволжский ФО	245932	218841 (88,98%)	33	1:6632
Уральский ФО	115513	111484 (96,51%)	13	1:8576
Сибирский ФО	175221	172328 (98,35%)	15	1:11489
Дальневосточный ФО	50293	45633 (90,73%)	1	1:45633
<b>Всего 2013г в РФ</b>	<b>1167645</b>	<b>1127693</b> <b>(96,58%)</b>	<b>106</b>	<b>1:10639</b>
<b>2014 год</b>				
Центральный ФО	444440	441724 (99,39%)	45	1:9816
Северо-Западный ФО	168400	166502 (98,87%)	13	1:12808
Южный ФО	178637	174513 (97,69%)	17	1:10265
Северо- Кавказский ФО	163814	145265 (88,68%)	10	1:14527
Приволжский ФО	396686	389076 (98,08%)	38	1:10239

Округ	Кол-во новорожден- ных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
Уральский ФО	184527	171455 (92,92%)	21	1:8165
Сибирский ФО	282046	280571 (99,48%)	29	1:9675
Дальневосточный ФО	87144	85733 (98,38%)	7	1:12248
<b>Всего 2014г в РФ</b>	<b>1905694</b>	<b>1854839 (97,33%)</b>	<b>180</b>	<b>1:10305</b>
<b>2015 год</b>				
Центральный ФО	294257	291440 (99,04%)	25	1:11658
Северо-Западный ФО	112862	111549 (98,84%)	8	1:12944
Южный ФО	115658	112244 (97,05%)	11	1:10204
Северо- Кавказский ФО	92910	89600 (96,44%)	8	1:11200
Приволжский ФО	249987	247054 (98,83%)	24	1:10294
Уральский ФО	121767	120936 (99,32%)	23	1:5258
Сибирский ФО	180348	176204 (97,7%)	17	1:10365
Дальневосточный ФО	55594	55121 (99,15%)	2	1:27560
<b>Всего 2015г в РФ</b>	<b>1243192</b>	<b>1216154 (97,83%)</b>	<b>118</b>	<b>1:10306</b>

Округ	Кол-во новорожден- ных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
<b>2010-2015 гг</b>				
Всего за 6 лет в России	9909570	9531917 (96,2%)	989	1:9638

Первые эпидемиологические данные о частоте дефицита 21-гидроксилазы относятся к концу 70-х годов XX века, до этого в литературе встречаются только описания небольших когорт пациентов. В Европейской популяции первые эпидемиологические данные показывают частоту врожденной дисфункции коры надпочечников от 1 случая на 9831 новорожденных в Германии (Мюнхен 1963-1972гг.) до 1 случая на 23044 новорожденных во Франции (1963-1979гг.). После введения неонатального скрининга с 1977г почти во всех странах отмечен рост частоты ВДКН, что обусловлено лучшей диагностикой заболевания за счет тотального скрининга. После проведения неонатального скрининга первому миллиону новорожденных во всем мире была рассчитана частота дефицита 21-гидроксилазы в мировой популяции, которая составила 1 случай на 14198 новорожденных. Наше исследование показывает, что частота классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в России оказалась выше среднемирового показателя и сравнима с Северной Европой (Швеция, Голландия) и Южной Америкой (Таблица 8).

Таблица 8 - Частота дефицита 21-гидроксилазы в разных странах.

страна	Годы исследования/ неонатальный скрининг	Частота дефицита 21- гидроксилазы	ссылка
Великобритания	2007-2009 без скрининга	1 : 18 000	[139]
Германия	1999-2011 скрининг	1 : 12 457	[187]

страна	Годы исследования/ неонатальный скрининг	Частота дефицита 21- гидроксилазы	ссылка
Франция	1996-2003 скрининг	1 : 15 699	[80]
Швеция	1969-1986 без скрининга	1 : 11 500	[238]
Швейцария	скрининг	1 : 10 749	[229]
Нидерланды	скрининг	1 : 11 764	[252]
Италия	скрининг	1 : 8 586	[59]
Япония	скрининг	1 : 11 438	[220]
Китай	2014-2016 скрининг	1 : 14 550	[163]
США (Техас)	скрининг	1 : 16 008	[237]
США (Нью-Йорк)	2007-2014 скрининг	1 : 18 170	[201]
Канада	1969-1989 без скрининга	1 : 14 500	[239]
Аргентина	скрининг	1 : 8 937	[114]
Бразилия	2001-2010 скрининг	1 : 10 325	[221]
Куба	2005-2010 скрининг	1 : 15 931	[112]
Австралия	скрининг	1 : 15 488	[110]
Новая Зеландия	скрининг	1 : 23 344	[83]

В разных регионах Российской Федерации отмечаются различия в частоте данной патологии (Рисунок 10). Самая высокая частота дефицита 21-гидроксилазы отмечена в Уральском Федеральном округе 1 случай на 6749 живых новорожденных, реже всего заболевание встречается в Северо-Западном регионе и

на Дальнем востоке (1:14876 и 1:14211 соответственно), в Центральном, Южном, Приволжском и Сибирском округах частота дефицита 21-гидроксилазы не отличается от средней по России.

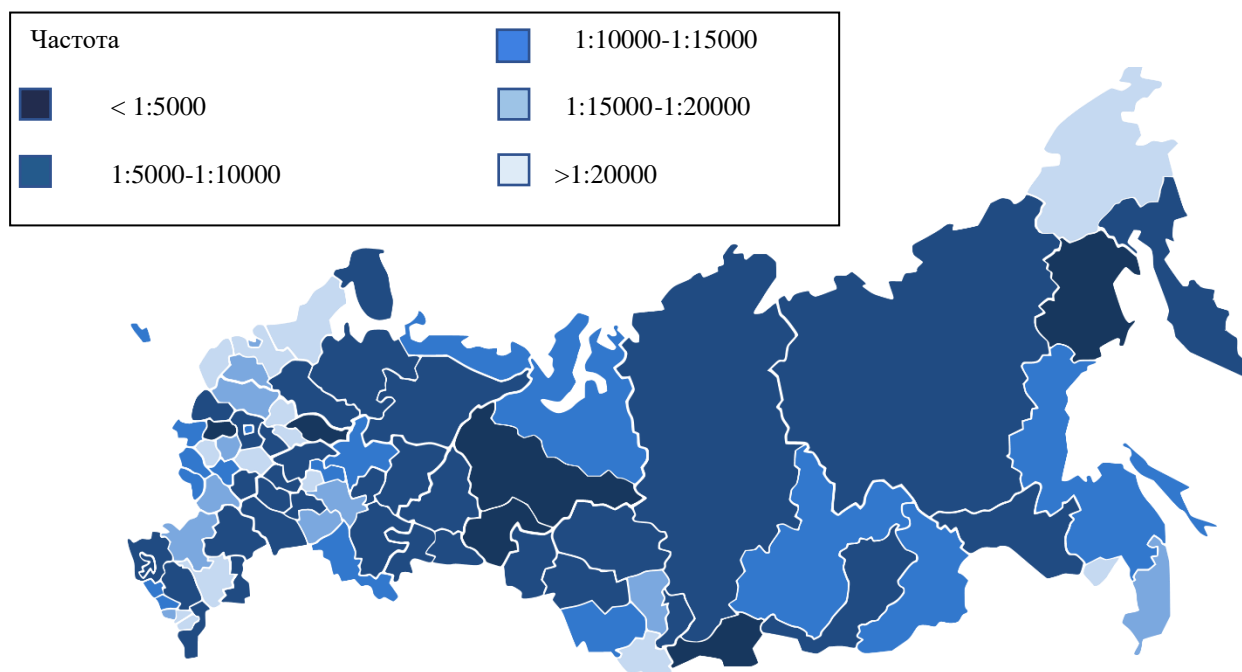


Рисунок 10 - Частота ВДКН по данным неонатального скрининга (2010-2015гг.) в разных регионах Российской Федерации

Поскольку во всех регионах России процедура скрининга стандартизирована, то разница в частоте данной аутосомно-рецессивной патологии вероятнее всего связана с распространенностью близкородственных браков в популяциях и с генетическими особенностями этнических популяций, проживающих в данных регионах. Аналогичные данные приводят исследователи в странах с разным этническим составом населения. Так в Израиле, где проживают две доминирующие этнически разнородные группы - евреи и арабы, частота классических форм среди арабского населения значительно выше (1:8000 против 1:30000), тогда как частота неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы среди евреев Ашкенази самая высокая в мире (1:27).

Введение неонатального скрининга во всех странах привело к повышению частоты дефицита 21-гидроксилазы. По нашим данным в Москве к 2004 году был создан регистр пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы и рассчитана частота данной патологии, которая составила 1 случай на 17240 живых новорожденных [11]. После внедрения неонатального скрининга в Москве за 9 лет с 2007 по 2015 гг. всего было выявлено 112 случаев классических форм дефицита 21-гидроксилазы среди вошедших в скрининг 1 млн 10 тыс 858 новорожденных. Таким образом, частота дефицита 21-гидроксилазы в Москве составляет 1 случай на 9025 новорожденных. Данный показатель сравним со средней частотой в России, что скорее всего говорит о разнородности Московской популяции. Увеличение частоты классических форм дефицита 21-гидроксилазы свидетельствует об эффективности неонатального скрининга, т.е. можно говорить о том, что до введения тотального неонатального скрининга часть пациентов умирали от сольтеряющих кризов без диагноза, а часть с вирильной формой - оставались без лечения.

### 3.1.2. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ *CYP21* В РАЗНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ

Учитывая разную частоту классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в разных регионах России, мы проанализировали распределение аллельных вариантов в отдельных регионах и этнических группах. Всего было обследовано 187 пациентов, проживающих в 4 регионах Российской Федерации с высокой частотой этнически однородных популяций: Татарстан, Башкирия, Удмуртия, Дагестан.

Таблица 9 - Распределение аллельных вариантов в разных этнических группах.

		Частота аллельного варианта, %					
Регион (кол-во пациентов)	Этническая группа (кол-во хромосом)	Del	I2spl	I172N	Q318X	R356 W	Другие вариан- ты <sup>1</sup>
Удмуртия (n=35)	Русские (40)	12 30%	15 37,5%	7 17,5%	2 5%	0	4 10%
	Удмурты (30)	2 6,6%	22 73,3%	1 3,3%	2 6,6%	0	3 10%
Башкирия (n=69)	Русские (58)	22 37,9%	21 36,2%	1 1,7%	9 15,5%	2 3,4%	3 5,2%
	Башкиры (32)	0	3 9,4%	10 32,25%	7 21,9%	15 46,9%	2 <sup>2</sup> 6,25%
	Татары (48)	8 16,6%	8 16,6%	8 16,6%	1 2%	18 37,5%	5 10,4%
Татарстан (n=44)	Русские (46)	10 21,7%	18 39,1%	8 17,4%	0	3 6,5%	7 15,2%
	Татары (42)	0	26 61,9%	1 2,4%	0	11 26,2%	0
Дагестан (n=39)	Аварцы (30 )	0	6 20%	2 6,6%	9 30%	12 40%	1 3,3%
	Даргинцы (30)	0	7 23%	7 23%	10 33%	6 20%	0
	Кумыки (18)	0	2 11%	8 44%	1 5,5%	4 22%	3 16,6%

В регионах частота заболевания разнилась от 1 случая на 5773 новорожденных в Удмуртии до 1:17996 – в Татарстане, в Башкирии частота

<sup>1</sup> к другим вариантам относятся мутации: L307insT, V281L, V237E, P30L, P453S, которые встречаются в единичных случаях во всех группах.

<sup>2</sup> у Башкир выявлено сочетание мутаций Q318X и R356W на одном аллеле в 5-и хромосомах.

классических форм дефицита 21-гидроксилазы составляет 1 случай на 9572 новорожденных, в Дагестане – 1:9278.

При сравнении частотного распределения аллельных вариантов среди этнических русских, проживающих в разных регионах России статистически значимых различий выявлено не было (методом расчета критерия  $\chi^2$  Пирсона для каждой мутации  $p > 0,05$ , кроме единственного случая - высокий удельный вес мутации Q318X для этнических русских, проживающих на территории Башкирии), сохранялось преобладание трех аллельных вариантов – del, I2spl, I172N. Для дальнейшего анализа стало возможным объединить всех этнических русских в одну группу вне зависимости от региона проживания. Аналогичная картина распределения мутаций выявлена в разных этнических группах Дагестана, распределение мутаций между аварцами и даргинцами существенно не различалось (для каждой мутации  $p > 0,05$ ), а группа кумыков оказалась малочисленной, что сделало невозможным статистическую обработку. Этот факт позволил объединить этнические группы, проживающие в Дагестане в одну. Также были объединены в одну группу татары, проживающие в Татарстане и в Башкирии. Распределение мутаций в полученных группах представлено в таблице с указанием статистически значимых различий.

Таблица 10 - Распределение частых мутаций гена *CYP21* в разных этнических группах

	Частота аллельного варианта, p - достоверность различий				
Этническая группа (количество хромосом)	del	I2spl	I172N	Q318X	R356W
Русские (144)	42 $p < 0,001$	72 $p < 0,001$	16 $p = 0,335$	11 $p = 0,795$	5 $p < 0,001$
Татары (90)	8 $P = 0,134$	34 $P = 0,747$	9 $p < 0,001$	1 $P = 0,002$	29 $p < 0,001$



	Частота аллельного варианта, p - достоверность различий				
Этническая группа (количество хромосом)	del	I2spl	I172N	Q318X	R356W
Башкиры (32)	0	3 p<0,001	10 P=0,002	7 p=0,081	15 p<0,001
Удмурты (30)	2 p=0,326	22 p<0,001	1 P=0,198	2 p=0,656	0
Народы Дагестана (60)	0	13 P=0,003	9 P=0,6565	19 p<0,001	18 P=0,02
P – рассчитывался с помощью критерия $\chi^2$ Пирсона с поправкой Йейтса					

Особенностью русской этнической группы по сравнению с исследуемыми популяциями является высокий удельный вес делеций гена *CYP21* и мутации во втором интроне, вызывающей нарушение сплайсинга при низком удельном весе мутации R356W. Обратное распределение мутаций имеется в башкирской этнической группе с полным отсутствием делеций, низкой частотой мутаций сплайсинга и высоким удельным весом R356W. Особенностью удмуртской группы является абсолютное превалирование мутации во втором интроне, которая составляет почти  $\frac{3}{4}$  всех выявленных мутаций. Особенностью этнических групп, проживающих в Дагестане, является высокая доля мутации Q318X, тогда как ни в одной другой группе эта мутация не является частой

Разница в частоте распределения частых мутаций в гене *CYP21* может быть связана с эффектом основателя или являться следствием дрейфа генов в маленьких популяциях. Выявление разной частоты мутаций позволяет модифицировать порядок проведения генетической диагностики для каждого региона.

### 3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.2.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ С ВДКН И ПОДОЗРЕНИЕМ НА ДАННЫЙ ДИАГНОЗ

Всего молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21* было проведено у 1362 пациентов. Группа состояла из пациентов, наблюдавшихся в ФГБУ ЭНЦ и пациентов, чью кровь присылали для генетического исследования из регионов Российской Федерации по программе «Альфа-Эндо». Данная группа включала 825 девочек и 537 мальчиков. С классическими формами заболевания было 1116 детей, среди них с сольтеряющей формой заболевания было 70,2% (783/1116), с простой вирильной – 29,8% (333/1116). Среди детей с классической формой заболевания распределение по полу было с небольшим преобладанием девочек, при сольтеряющей форме 1:1,26, а при простой вирильной форме 1:1,4. Среди детей с подозрением на неклассическую форму заболевания, которых было 213 человек, подавляющее большинство составляли девочки 1:6,66. Еще 33 ребенка были выявлены по данным неонатального скрининга, когда еще невозможно дифференцировать вирильную и сольтеряющую формы заболевания (Таблица 11).

Таблица 11 - Распределение по полу и форме заболевания в группе пациентов, которым проводилось молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21*.

Форма заболевания	Всего пациентов (% от всех форм)	Мальчики (% внутри данной формы)	Девочки (% внутри данной формы)
Сольтеряющая форма	783 (57,6%)	347 (44,3%)	436 (55,7%)
Вирильная форма	333 (24,4%)	137 (41,1%)	196 (58,9%)
Неклассическая форма	213 (15,6%)	32 (15%)	181 (85%)
Выявлены по скринингу	33 (2,4%)	21 (63,6%)	12 (36,4%)

### 3.2.1.1. МЕТОД АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР

Методом аллель-специфической ПЦР частые мутации в гене *CYP21* были выявлены в 2183 аллелях (80%). Среди пациентов с классическими формами заболевания мутации в двух аллелях были обнаружены у 947 пациентов из 1116 (85%). На 12 частых мутаций, которые позволяет выявить метод аллель-специфической ПЦР, во всех популяциях приходится до 80-85% всех случаев.

При подозрении на неклассическую форму заболевания мутации в обоих аллелях были выявлены у 85 пациентов (40%). При этом диагноз подтвержден у 68,8% мальчиков (22 из 32) и только у 34,8% девочек (63 из 181). При классических формах заболевания молекулярно-генетические исследования проводятся у детей с клинически установленным диагнозом с целью прогнозирования формы заболевания у новорожденных, выявленных по неонатальному скринингу, и для проведения генетического консультирования семьи с целью возможности пренатальной или предимплантационной диагностики у последующих детей. При неклассической форме заболевания молекулярно-генетические исследования проводятся с диагностической целью.

Гетерозиготные мутации (т.е. мутации только в одном аллеле) выявлены у 46 детей с классическими формами и у 18 детей с подозрением на неклассическую форму дефицита 21-гидроксилазы. Частых мутаций не выявлено у 123 детей с классическими формами ВДКН (11%) и у 110 детей с подозрением на неклассическую форму (51,6%). Среди детей, выявленных по данным неонатального скрининга до возможности дифференцировать форму заболевания, мутации в двух аллелях выявлены у 25 детей (75,7%), а у оставшихся 8 новорожденных мутаций выявлено не было.

Таким образом, можно говорить о том, что эффективность использования метода аллель-специфической ПЦР для классических форм дефицита 21-гидроксилазы в нашей популяции составляет 85%. Это означает, что совокупное распределение мутаций в Российской популяции не отличается от мировых

данных, на частые мутации, образовавшиеся путем конверсий из псевдогена, приходится около 80-85% всех мутаций в гене *CYP21A2*. В то же время, использование метода аллель-специфической ПЦР для диагностики неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы имеет меньшую эффективность (мутации выявлены в 40% случаев). Низкая процент выявляемости мутаций при неклассической форме в нашем исследовании связан с отсутствием четких гормональных критериев для постановки диагноза в детском возрасте. Существующие критерии имеют большую специфичность для постпубертатного возраста, но не позволяют четко дифференцировать идиопатическое преждевременное адренархе от неклассической формы ВДКН.

### 3.2.1.2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Анализ распределения мутаций в популяции проводился только в группе пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы из 1129 человек (1108 пациентов с классическими формами + 21 человек из группы неонатального скрининга).

Таблица 12 - Частота аллельного варианта в исследуемой группе

Аллельный вариант	Количество аллелей среди классических форм	Доля аллелей среди классических форм (%)
Делеция	516	22,9%
I2splice	605	26,8%
I172N	343	15,2%
Q318X	145	6,4%
R356W	153	6,8%
V281L	63	2,8%
P30L	59	2,6%

Аллельный вариант	Количество аллелей среди классических форм	Доля аллелей среди классических форм (%)
P453S	14	0,6%
V237E	11	0,5%
L307insT	8	0,4%
Более одной мутации на аллеле	46	2%
Частых мутаций не выявлено	295	13,1%

Распределение мутаций в группе пациентов с дефицитом 21-гидроксилазы в нашем исследовании совпадает с мировыми данными, полученными в разнородных популяциях. В нашем исследовании больше половины всех случаев (55,7%) приходится на три патологических аллельных варианта – это делеции и большие конверсии гена *CYP21*, точечная мутация во втором интроне, приводящая к нарушению сплайсинга и мисенс-мутация в 4 экзоне, приводящая к замене изолейцина на аспарагин в 172 положении. Аналогичные данные получены при анализе смешанных групп во всем мире. Самой частой мутацией в нашем исследовании является мутация сплайсинга во 2 интроне (I2splice), которая представлена в 26,8% аллелей. По данным литературы, мутация во втором интроне является второй по частоте в большинстве популяций, тогда как первое место занимают делеции и крупные перестройки гена *CYP21*. Несколько другое соотношение мутаций представлено в азиатских популяциях, где как раз мутация I2splice является самой частой, а доля делеций гена не велика (Таблица 13).

Таблица 13 - Распределение частых мутаций в различных популяциях по данным литературы

<b>Страна (кол-во пациентов)</b>	<b>Частота аллельного варианта, %</b>					<b>Ссылка</b>
	Del	I2splice	I172N	Q318X	R356W	
Центральная Европа (n=348)	32,6	31,2	14,5	2,6	2,4	[92]
Нидерланды (n=198)	31,9	28,1	12,4	3,5	8,4	[233]
Италия (n=146)	26	20	6	8	0	[61]
Великобритания (n=384)	45	30	7	0	10	[149]
Швеция (n=400)	33	27	20	2	3	[258]
Финляндия (n=102)	34	12	29	2	0	[154]
США (n=394)	34	31	10	4	4	[227; 269]
Бразилия (n=74)	23	25	19	11	8	[200]
Аргентина (n=72)	21	18	15	14	6	[85]
Китай (n=52)	2	31	23	14	0	[155]
Япония (n=102)	18	29	13	0	13	[125]
Индия (n=28)	15,9	27,2	31,8	22,7	0	[166]

В отличие от азиатских групп, где на долю делеций приходится от 2 до 18%, в нашей группе делеции были выявлены в 23% аллелей. Различия в распределении мутаций могут объясняться двумя причинами. Во-первых, доля делеций и крупных конверсий зависит от методов генетического анализа. Используемый в нашей работе метод аллель-специфической ПЦР не позволяет дифференцировать

гомозиготные точковые мутации от их гемизиготного состояния, что снижает удельный вес делеций в исследуемой группе. Нами ранее в дополнение к методу аллель-специфической ПЦР на 12 частых мутаций было проведено молекулярно-генетическое исследование, которое позволяет выявить делецию 30 тыс пар нуклеотидов с образованием химерного гена. При использовании метода детекции химерного гена в 37 из 75 случаев, определенных как гомозиготные точковые мутации, было выявлено гемизиготное состояние (т.е. точковая мутация на одном аллеле и делеция гена на другом), что увеличило удельный вес делеций в общей группе с 20,5% до 32,5% [11]. Во-вторых, можно предположить, что этническая разнородность российской популяции приводит к данному частотному распределению мутаций. В нашем исследовании генотипов в разных этнических группах показано, что в популяции татар, башкир, удмуртов и народов Дагестана удельный вес делеций гена небольшой (0-8%), схожий с азиатскими популяциями, что существенно снижает долю делеций в общей группе. И даже в условно «русской» группе число аллелей, несущих мутацию во втором интроне, превышало число делеций гена *CYP21*.

### 3.2.1.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРУГИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДЕФИЦИТОМ 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Метод аллель-специфической ПЦР при всех своих положительных моментах, а именно, скорости и низкой стоимости, имеет ограничения. Подтверждение диагноза с помощью данного метода возможно только для пациентов, имеющих частые мутации, на которые приходится до 85% всех нарушений. Для поиска редких мутаций необходимо проведение секвенирования всего гена. В нашем исследовании секвенирование было проведено пациентам, у которых при аллель-специфической ПЦР была выявлена только одна гетерозиготная мутация или мутаций выявлено не было, и кровь которых была доступна для дальнейшего исследования. Всего секвенирование гена *CYP21* было проведено у 27 пациентов. В 16 случаях диагноз подтвержден, были найдены 11 редких мутаций или сложных перестроек гена (Таблица 14). У 4 пациентов, у

которых методом аллель-специфической ПЦР была выявлена только гетерозиготная мутация, проведение секвенирования не дало результатов. Среди этих пациентов у трех девочек была исключена неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников и установлен диагноз синдрома пубертатной гиперандрогении и у одного мальчика, выявленного по неонатальному скринингу, патология надпочечников была исключена. У 7 пациентов мутаций ни одним методом выявлено не было. Среди них было трое пациентов, выявленных по неонатальному скринингу (один мальчик и две девочки с правильным строением наружных половых органов, т.е. с подозрением на неклассическую форму заболевания), всем пациентам патология надпочечников была исключена. Еще у трех девочек с подозрением на неклассическую форму заболевания диагноз был исключен. И у одного мальчика с вирильной формой была установлена гипертоническая форма ВДКН вследствие дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы.

Таблица 14 - Результаты секвенирования гена *CYP21*

Пациент №, пол, форма заболевания	Метод АС-ПЦР	Секвенирование	Предсказанная форма
№1 жен ПВ	Q318X +/-	Q318X+/- R483Q+/-	ПВ
№2 жен СТ	Не удалось определить носительство мутации R453S	G455_S460del +/+	?
№3 ПВ муж пол при 46XX, близкородственный брак	Частых мутаций не выявлено	R408C +/+	СТ
№4 жен НК	Q318X +/-	Q318X +/- INT2 -4G-A/3`+12 C-T +/-	?
№5 жен ПВ	Не удалось определить носительство мутаций R356W, Q318X, L307insT, V237E	Del 4-9 ex +/+	?
№6 муж ПВ	I172N +/-	I172N+/- R354C+/-	СТ



Пациент №, пол, форма заболевания	Метод АС-ПЦР	Секвенирование	Предсказанная форма
№7 жен СТ	Частых мутаций не выявлено	Del+/- C428W+/-	?
№8 муж ПВ	Частых мутаций не выявлено	R483W+/-	СТ
№9 жен НК	Частых мутаций не выявлено	Del+/- Ch A2/A1 с мутацией V281L	
№10 муж СТ	I2spl+/-	I2spl +/- R483W+/-	СТ
№11 жен НК	Частых мутаций не выявлено	H365N +/-	НК
№12 жен НК	Частых мутаций не выявлено	Ch A2/A1 с мутацией V281L +/- замена 10 п.н. в экзоне 6 +/-	?
№13 муж СТ	Частых мутаций не выявлено	L350P+/-	?
№14 жен СТ	Частых мутаций не выявлено	Del +/- с.393_394 InsA/T93fsX94 +/-	?
№15 муж СТ	I172N+/-	I172N+/-; R483W+/-	?
№16 жен СТ	Q318X+/-	Q318X +/- R483W+/-	?

Невозможность дифференцировать гомозиготные мутации от гемизиготных затрудняет проведение пренатальной диагностики. При генетическом консультировании важно отличать гомозиготное состояние от гемизиготного. Если патологическая мутация, выявленная у ребенка, находится в гомозиготном состоянии, то своим детям он передаст только данную мутацию с известным фенотипом, если же мутация находится в гемизиготном состоянии, то 50% детей получают точковую мутацию, а 50% его детей получают делецию гена, которая определяет сольтерную форму заболевания.

Другой проблемой, возникающей при исследовании частых мутаций в гене *CYP21* методом аллель-специфической ПЦР, является выявление более двух

мутаций. В таком случае для подтверждения диагноза важно знать распределение мутаций по хромосомам. Чаще всего в популяции имеется бимодульное устройство участка хромосомы, содержащее с теломерной стороны псевдоген *CYP21A1P*, а с центромерной – активный ген *CYP21A2*. Реже встречаются моно- и тримодульные гаплотипы, в которых имеется делеция или дупликация одного из модулей, содержащих или активный ген *CYP21A2*, или псевдоген *CYP21A1P*, или химерный вариант. Использование метода мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA) позволяет определить количество копий как активного гена *CYP21A2*, так и количество копий псевдогена *CYP21A1* (*CYP21P*), помимо этого, данный метод позволяет определить наличие сложных химерных генов. Всего описано 9 вариантов химерных генов.

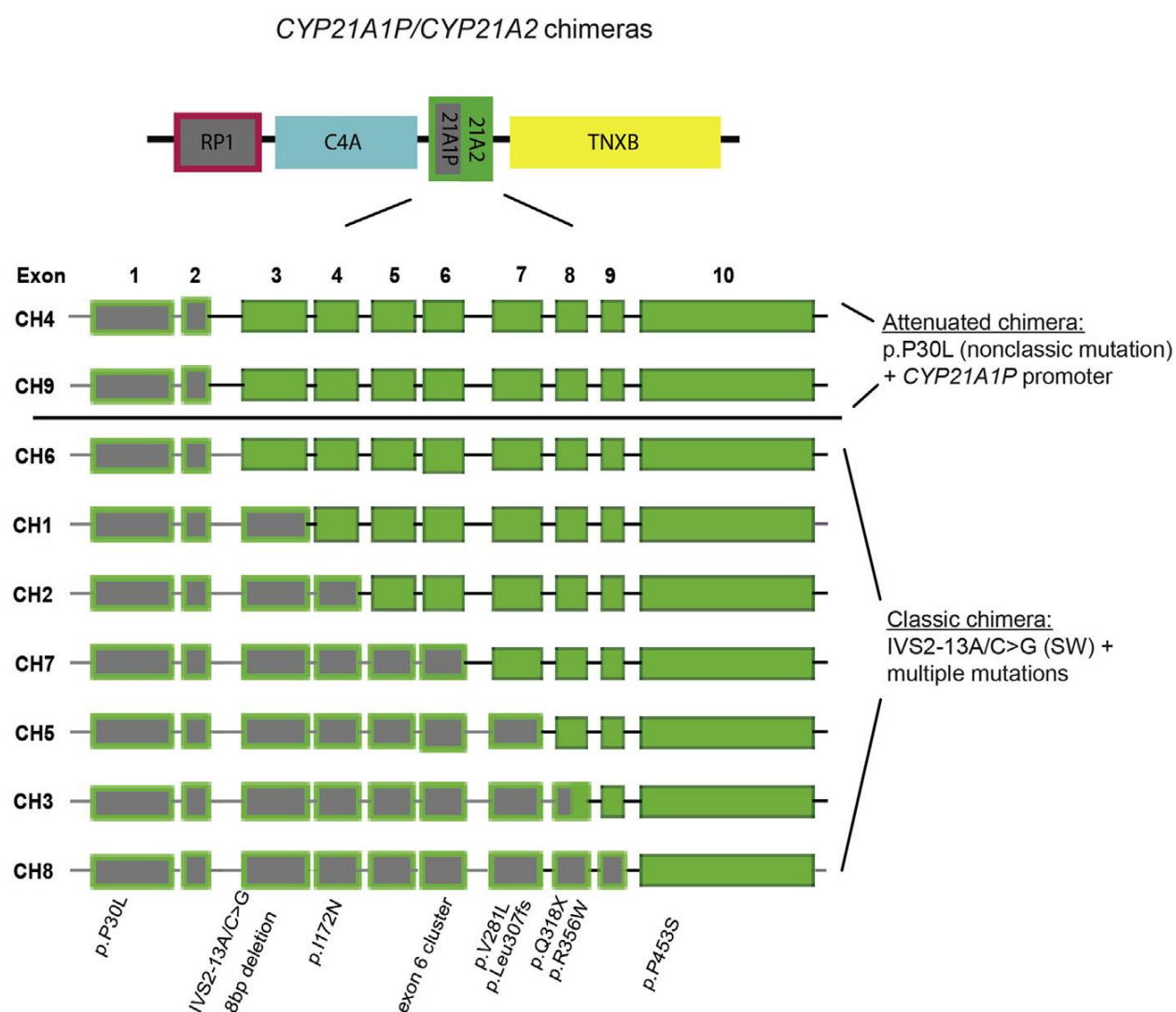


Рисунок 11 - Варианты образования химерного гена

Мы провели исследование методом MLPA у 37 пациентов и родителей из 17 семей. Среди 74 хромосом в 48 (64,9%) выявлены классические бимодульные гаплотипы. В 16 хромосомах (21,6%) выявлена мономодульная структура, содержащая ген *CYP21A2*, при этом у 8 человек (из 5 семей) на втором аллеле имелся химерный ген, а у оставшихся на втором аллеле имелся только псевдоген *CYP21A1P*. Тримодульная организация данного участка выявлена в 8 хромосомах (10,8%), а в двух хромосомах выявлено по четыре копии генов в каждой. У 2 пациентов на обоих аллелях выявлены химерные гены. Дупликации гена *CYP21A2* выявлены в 4 случаях, а дупликации псевдогена – в 7 случаях.

Всего в нашей группе было выявлено три типа химерных генов: самый частый вариант СН1 (Рисунок 11), промоторная область которого соответствует псевдогену, а точка соединения приходится в области 3-его интрона (*CYP21A1Ex3/CYP21A2Ex4*). Такой вариант химерного гена выявлен в 6 семьях. В качестве примера представлено распределение аллелей в семье №1. В данной семье у пробанда при проведении аллель-специфической ПЦР определена гомозиготная мутация I2spl, при этом у мамы данной мутации не выявлено, а у папы и здоровой сестры выявлено гетерозиготное носительство данной мутации. При проведении MLPA у мамы пациента определялась одна копия активного гена + две копии псевдогена + одна копия химерного гена с точкой слияния в области третьего интрона. У папы пациента определялось две копии активного гена и одна копия псевдогена, одна из копий активного гена содержала точковую мутацию I2spl. Пациенту от мамы был передан химерный ген, а от отца – активный ген с точковой мутацией. Здоровая сестра пациента получила от матери активную копию гена и от отца копию с точковой мутацией.

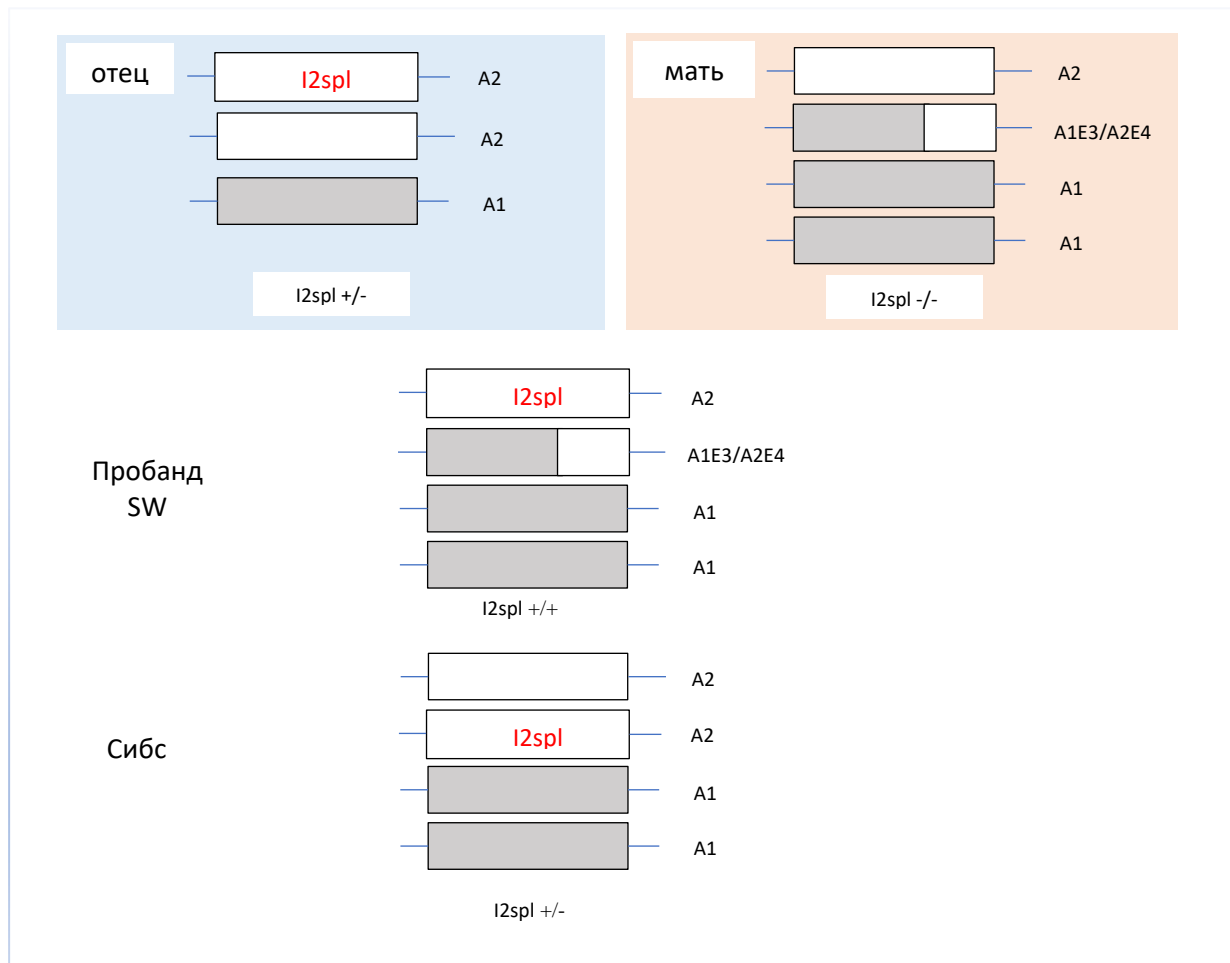


Рисунок 12 - Схема распределения аллелей в семье 1. (A1 – псевдоген CYP21A1P; A2 – активный ген CYP21A2, A1E3/A2E4 – химерный ген с промоторной областью и первыми тремя экзонами псевдогена и точкой соединения в третьем интроне; I2spl – мутация во втором интроне, приводящая к нарушению сплайсинга; +/+ - гомозиготная мутация; +/- - гетерозиготная мутация; SW – сольтерияющая форма ВДКН).

Второй вариант выявленного химерного гена – это так называемый аттенуированный химерный ген (CH4), который также начинается с псевдогена, но точка разрыва лежит выше, в области 2 интрона. При такой конфигурации в данный химерный ген из псевдогена попадает только одна мутация из 1 экзона P30L, которая соответствует неклассической или легкой вирильной форме заболевания. В нашей группе данный вариант химерного гена был выявлен в одной семье.

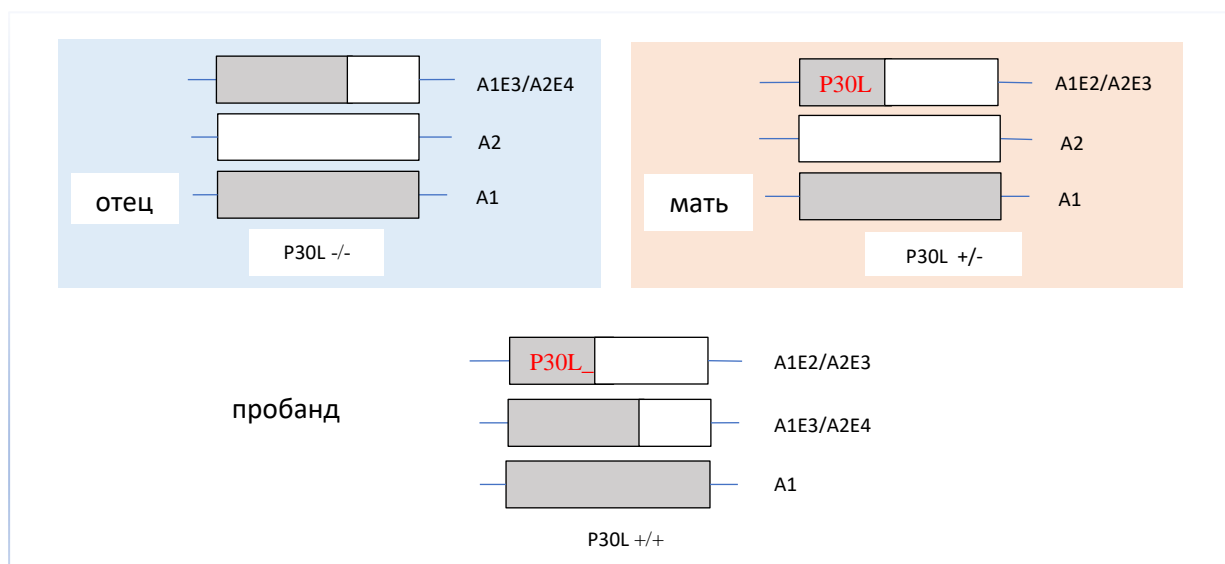


Рисунок 13 - Схема распределения аллелей в семье №2 с аттенуированным химерным геном. (A1 – псевдоген *CYP21A1P*; A2 – активный ген *CYP21A2*; A1E2/A2E3 – химерный ген с промоторной областью и первыми двумя экзонами псевдогена и точкой соединения во втором интроне до мутации I2spl; P30L – мутация в первом экзоне, соответствующая неклассической форме ВДКН; +/+ – гомозиготная мутация; +/- – гетерозиготная мутация)

Клинический случай: Пациентка С. Впервые обследована в ЭНЦ в возрасте 4-х мес с подозрением на врожденную дисфункцию коры надпочечников. Девочка родилась в срок с хорошими весо-ростовыми показателями и оценкой по шкале Апгар., наружные половые органы при рождении не вызывали подозрения. По результатам неонатального скрининга выявлено повышение уровня 17ОНП до 53,6 нмоль/л при норме до 30 нмоль/л. При этом в венозной крови уровень 17ОНП соответствовал нормальным значениям – 2,46 нг/мл (0,7-2,5). При повторном осмотре в возрасте 1 мес отмечалась небольшая гипертрофия клитора – степень вирилизации по Прадеру 1. У ребенка не отмечалось срыгиваний, была хорошая прибавка в весе. Был определен кариотип 46XX и проведено гормональное обследование: 17ОНП=26,54 нг/мл, тестостерон=4,16 нмоль/л. На основании клинической картины в виде вирилизации наружных гениталий у девочки с кариотипом 46XX в сочетании с повышением 17ОНП и тестостерона была диагностирована врожденная дисфункция коры надпочечников, дефицит 21-

гидроксилазы. Однако, учитывая минимальную степень вирилизации и отсутствие сольтеряющего синдрома, не была определена клиническая форма заболевания, что важно для решения вопроса о необходимости назначения глюкокортикоидной терапии. Было проведено молекулярно-генетическое исследование методом аллель-специфической ПЦР и выявлена гемизиготная мутация P30L, которая может соответствовать как неклассической, так и вирильной форме заболевания. Однако, при проведении MLPA стало понятным, что пациентка на двух хромосомах несет разные варианты химерного гена: от мамы ей был передан химерный ген с точкой слияния во втором интроне, который и содержит мутацию P30L (определяет неклассическую форму), а от папы передан другой вариант химерного гена с точкой слияния в третьем интроне, содержащий мутацию I2spl и делецию 8 п.н. в третьем экзоне (определяет сольтеряющую форму) (Рисунок 13). Следовательно, у нашей пациентки имеется мягкая вирильная форма заболевания, но своим детям в 50% случаев она передаст вариант химерного гена, вызывающего полную потерю ферментативной активности и соответствующего сольтеряющей форме заболевания.

Третий вариант химерного гена имеет в промоторной части активный ген *CYP21A2*, а точка слияния лежит в области третьего интрона. При таком варианте химерного гена во время проведения ПЦР с праймерами на участок экзона 3, который позволяет выделить активный ген, будет выделяться и химерный ген, который не содержит делеции 8 нуклеотидов, характерной для псевдогена. На втором этапе проведения аллель-специфической ПЦР будут определяться все частые мутации из 4-10 экзонов химерного гена, который соответствует псевдогену. В нашей группе у одной из пациенток с подозрением на неклассическую форму врожденной дисфункции коры надпочечников по результатам аллель-специфической ПЦР было выявлено 4 гетерозиготные мутации: I172N (4 экзон), V237E (6 экзон), V281L (7 экзон) и L307fs (7 экзон). При проведении MLPA у данной пациентки было выявлено 2 копии активного гена *CYP21A2*, одна копия псевдогена *CYP21A1P* и одна копия химерного гена

*CYP21A2Ex3/CYP21A1PEx4*. Именно с этой копии химерного гена и были определены все патогенные мутации в гетерозиготном варианте (Рисунок 14). По результатам генетического обследования у данной пациентки был исключен диагноз врожденной дисфункции коры надпочечников.

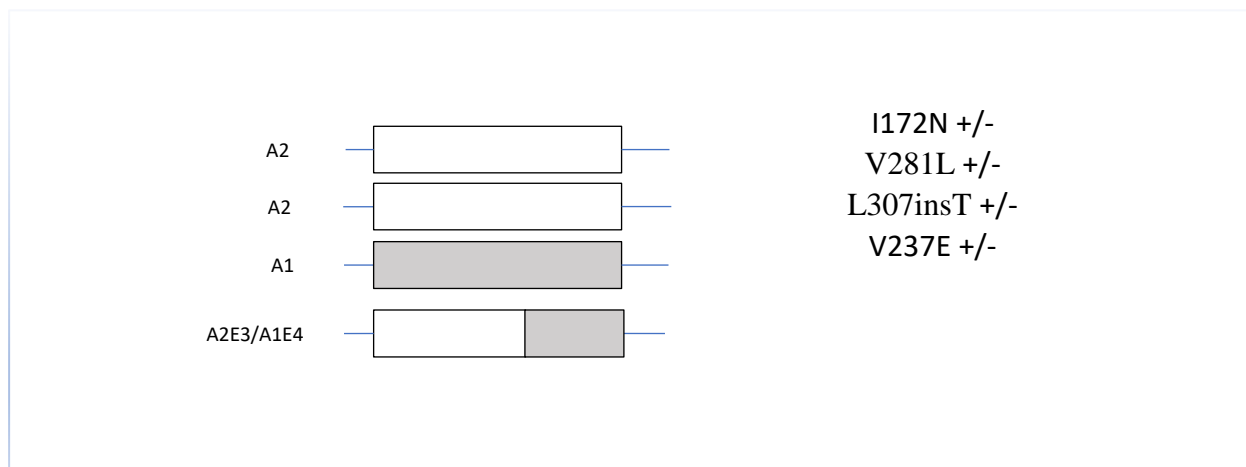


Рисунок 14 - Гаплотип пациентки с химерным геном *CYP21A2Ex3/CYP21A1PEx4*

При проведении аллель-специфической ПЦР в двух семьях было выявлено, что обе гетерозиготные мутации, выявленные у пробандов, были унаследованы от одного из здоровых родителей. Уточнить гаплотипы в таком случае позволяет применение MLPA. Так в семье №3 у ребенка с сольтеряющей формой дефицита 21-гидроксилазы при проведении аллель-специфической ПЦР выявлено две гетерозиготные мутации V237E и Q318X, обе соответствуют сольтеряющему фенотипу. При этом у мамы мутаций выявлено не было, а у папы выявлены те же две гетерозиготные мутации. Папа не имеет клинических проявлений врожденной дисфункции коры надпочечников. При проведении MLPA у папы пациента обнаружено 3 копии активного гена, одна из которых не содержит мутаций, а две другие с точковыми мутациями расположены на одной хромосоме. У мамы выявлено 2 копии псевдогена и только одна копия активного гена *CYP21A2*. Таким образом, от мамы ребенок получил аллель с делецией гена *CYP21A2*, а от папы аллель с двумя генами *CYP21A2*, каждый из которых содержит патологические точковые мутации.

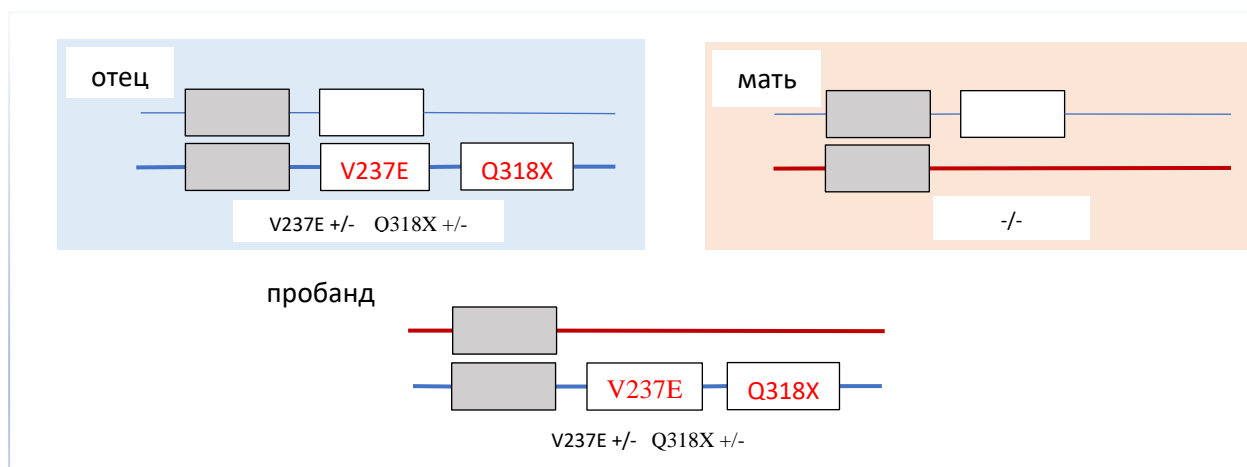


Рисунок 15 - Схема распределения аллелей в семье №3 (Q318X – нонсенс-мутация в восьмом экзоне, соответствующая сольтеряющей форме ВДКН; V237E – мисенс-мутация в 6 экзоне, соответствующая сольтеряющей форме ВДКН; +/- - гетерозиготная мутация)

Иногда в одной семье могут быть разные фенотипы у больных детей, что затрудняет пренатальную диагностику, поскольку невозможно предсказать фенотип плода. Представлен клинический пример такой ситуации, где причиной разных фенотипов были разные гаплотипы у больных членов семьи, выявленные при использовании MLPA.

Клинический случай: Пациенту В. диагноз врожденной дисфункции коры надпочечников был установлен на основании результатов неонатального скрининга (17ОНП 286нмоль/л). В период новорожденности отмечались электролитные нарушения (гиперкалиемия до 6,8 ммоль/л, гипонатриемия до 128 ммоль/л), что позволило установить сольтеряющую форму заболевания при отсутствии клинической картины синдрома потери соли. При проведении молекулярно-генетической диагностики методом аллель-специфической ПЦР у ребенка была выявлена гетерозиготная мутация I172N, которая описана при простой вирильной форме заболевания. Для поиска второй мутации было проведено секвенирование гена CYP21, при котором была выявлена мутация в 10 экзоне R483W, которая описана при сольтеряющей форме заболевания. В семье еще есть старшая девочка, у которой не отмечалось признаков заболевания. Во время третьей беременности на сроке 8 недель мама обратилась к врачам с целью



проведения пренатальной диагностики. При проведении аллель-специфической ПЦР у мамы было выявлено две гетерозиготные мутации *P172N* и *V281L*, соответствующие вирильной и неклассической форме заболевания, у папы пациента также было выявлено 2 гетерозиготные мутации *R483W* и *Q318X*, обе соответствуют сольтеряющей форме заболевания. При этом оба родителя считают себя здоровыми. Маме гормональное обследование не проводилось по причине отсутствия четких гормональных нормативов для беременных женщин, а у папы уровень *17ОНП* соответствовал норме. Для проведения пренатальной диагностики необходимо было уточнить распределение мутаций по аллелям в данной семье. Была проведена мультиплексная лигазозависимая амплификация, которая выявила следующие варианты гаплотипов: у мамы пациента имелось три копии псевдогена и две копии активного гена, каждая хромосома содержала по одной копии активного гена с точковыми мутациями (на одном аллеле *V281L*, на втором аллеле *P172N*). У папы пациента выявлено 3 копии псевдогена и 3 копии активного гена, при этом на одной хромосоме активный ген содержал патогенную мутацию *R483W*, а на второй хромосоме две копии активного гена, одна из которых несла патогенную мутацию *Q318X*, а вторая мутаций не содержала (Рисунок 15). При исследовании ДНК плода методом аллель-специфической ПЦР были выявлены две гетерозиготные мутации *V281L* и *Q318X*, при проведении секвенирования 10 экзона мутаций не выявлено и методом MLPA найдено 3 копии гена *CYP21A2*, одна из которых мутаций не содержит. Таким образом, если бы был использован только метод аллель-специфической ПЦР и секвенирование, то можно было бы прогнозировать рождение ребенка с неклассической формой дефицита 21-гидроксилазы, тогда как проведение MLPA позволяет предположить рождение здорового ребенка. Нами также была обследована старшая сестра нашего пациента 6 лет. При клиническом обследовании правильное строение наружных половых органов по женскому типу, отмечено небольшое опережение роста ( $SDS=1,89$ ), небольшое опережение костного возраста ( $KB=8$  лет) и повышение уровня *17ОНП* до 86 нмоль/л, что укладывается в диагноз неклассической формы врожденной дисфункции коры

надпочечников. При генетическом обследовании у девочки выявлено две гетерозиготные мутации V281L и R483W, что подтверждает неклассическую формы заболевания. Распределение аллелей в данной семье представлено на рисунке ниже.

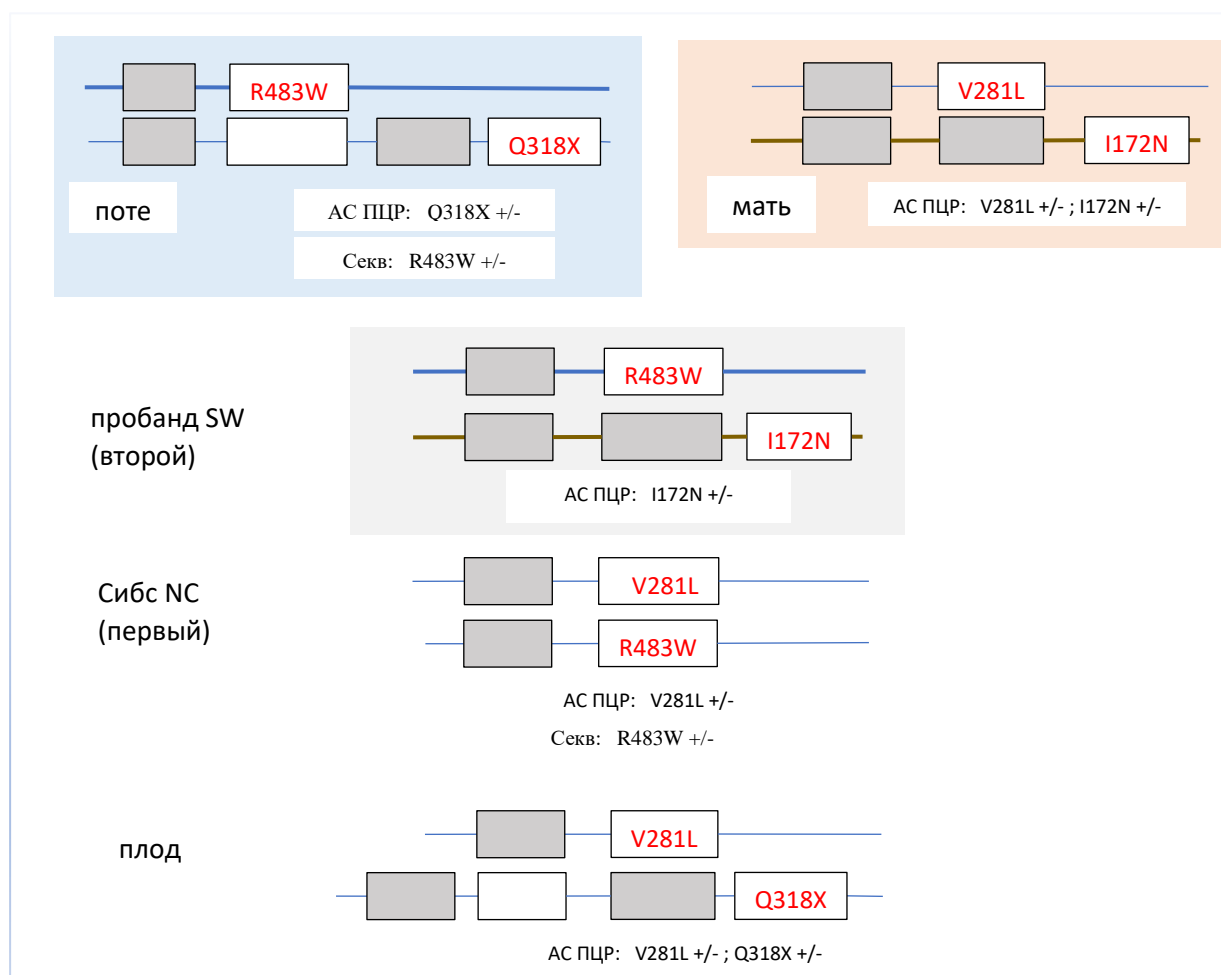


Рисунок 16 - Схема распределения аллелей в семье с пренатальной диагностикой (серый прямоугольник – псевдоген *CYP21A1P*; белый прямоугольник – активный ген *CYP21A2*; красным цветом внутри белого прямоугольника обозначена патогенная мутация; АС ПЦР – аллель-специфическая ПЦР; секв. – секвенирование гена *CYP21A2*; V281L – мисенс-мутация в 7 экзоне, соответствующая неклассической форме ВДКН; Q318X – нонсенс-мутация в 8 экзоне, соответствующая сольтеряющей форме ВДКН; R483W – мисенс-мутация в 10 экзоне, соответствующая сольтеряющей форме ВДКН; I172N – мисенс-мутация в 4 экзоне, соответствующая простой вирильной форме ВДКН; +/- - гетерозиготная мутация; ++ - гомозиготная мутация)

### 3.2.2. КОРРЕЛЯЦИЯ ГЕНОТИП-ФЕНОТИП

Определение корреляции между генетическим дефектом и клинической формой заболевания необходимо для пренатальной диагностики в семьях с историей врожденной дисфункции коры надпочечников. Мутации в гене *CYP21* вызывают разную степень потери ферментативной активности 21-гидроксилазы, что приводит к различной степени тяжести клинических проявлений. Исследования *in vitro* показывают высокую корреляцию степени тяжести заболевания с остаточной функциональной активностью фермента 21-гидроксилазы. Соответственно клиническую картину будет определять менее «тяжелая» мутация, при которой сохраняется больший процент активности фермента. При анализе корреляции фенотипических проявлений с мутациями в гене *CYP21* была использована традиционная методика разделения генотипов на 4 подгруппы в зависимости от носительства мутантных аллелей в гомо-, геми- или гетерозиготном состоянии и степени дефицита фермента 21-гидроксилазы:

- группа 0 - активность 21-гидроксилазы 0% (мутантные аллели del, Δ8bp, Q318X, R356W в гомо-, геми- или компаундном гетерозиготном состоянии с мутацией из данной группы),
- группа А – активность фермента <1% (I2splice в гомо-, геми- или гетерозиготном компаундном состоянии с мутацией из группы 0 и А (АА, А0)),
- группа В – активность фермента 1-5% (I172N в гомо-, геми- или гетерозиготном компаундном состоянии с мутацией из групп 0, А и В (ВВ, ВА, В0));
- группа С – активность фермента 10-50% (мутации P30L, V281L, P453S в гомо-, геми- или гетерозиготном компаундном состоянии с мутацией из любой группы (СС, СВ, СА, С0)).

Анализ корреляции генотип-фенотип проводился для пациентов с частыми мутациями в гене *CYP21*, выявленными методом аллель-специфической ПЦР. Группа состояла из 721 пациента с сольтеряющей формой, 245 пациентов с

вирильной формой и 101 с неклассической формой заболевания. Среди пациентов с генотипом группы «0» 95,8% имели сольтерющую форму, 4% - простую вирильную и у одного пациента (0,2%) была неклассическая форма ВДКН. У данного пациента с неклассической формой заболевания генотип был определен как компаундные гетерозиготные мутации Q318X и L307insT. Вероятнее всего, что у ребенка имеется дупликация гена *CYP21A2* на одном из аллелей, где одна копия несет мутацию Q318X, а на второй копии присутствует более мягкая мутация, которую мы не смогли выявить применяемыми методами генетического тестирования. В литературе имеется несколько описаний пациентов с гаплотипом дупликации гена *CYP21A2* в сочетании с мутацией Q318X. Аналогичный гаплотип выявлен в нашем исследовании еще в двух семьях.

При генотипе группы А (I2spl) сольтерющая форма отмечалась у 90,5% пациентов и вирильная форма у 9,5%.

Для группы В отмечалась большая фенотипическая вариабельность, у 64% пациентов отмечалась предсказанная вирильная форма, у 34% сольтерющая и у 2% неклассическая форма заболевания. Такая диссоциация генотип-фенотип описана еще в одном большом исследовании (более 1500 семей с ВДКН), где в 23% случаев пациенты с мутацией I172N имели сольтерющую форму ВДКН, и один пациент имел фенотип неклассической формы.

В отличие от всех исследований, в нашей группе отмечалась большая фенотипическая вариабельность в группе С, которая ассоциирована с неклассическим фенотипом. В данной группе только в 45% случаев была предсказанная неклассическая форма, в 39% - простая вирильная форма и в 16% случаев сольтерющая форма ВДКН. В большинстве исследований, посвященных анализу корреляции генотип-фенотип, описывают большие расхождения для мутации R30L из группы С, а для остальных отмечена высокая корреляция с неклассической формой. Наши данные, скорее всего, связаны с особенностью выборки, в которой доминировали пациенты с классическими формами ВДКН. Помимо особенностей выборки, относительно высокий процент сольтерющего

фенотипа при мутациях из группы С можно объяснить и отсутствием четких критериев для дифференциальной диагностики клинических форм заболевания. Повышенный уровень ренина в сочетании с гипонатриемией в неонатальный период позволяет установить сольтеряющую форму при отсутствии клинических признаков синдрома потери соли.

Таблица 15 - Сравнение генотип-фенотип

		Количество пациентов с сольтеряющей формой		Количество пациентов с вирильной формой		Количество пациентов с неклассической формой		ППЦ *
Группа	генотип	всего	В гомо/геми зиготном состоянии	всего	В гомо/геми зиготном состоянии	всего	В гомо/геми зиготном состоянии	
Группа 0	Del	233		1		-		99,6%
	Q318X	64	50	1	-	1	-	97%
	R356W	61	49	11	9	-	-	84,7%
	V237E	7	2	2	-	-	-	77,8%
	L307ins T	2	2	-	-	-	-	100%
Группа А	I2spl	257	217	27	21	-	-	90,5%
Группа В	I172N	63	41	119	87	4	4	64%
Группа С	P30L	14	2	46	17	6	2	69,7% для ПВ
	P453S	6	2	4	-	3	-	
	V281L	14	2	34	20	87	42	64,4%

\*ППЦ – позитивная предсказательная ценность

Для количественного анализа корреляции генотип-фенотип используется показатель позитивной предсказательной ценности (ППЦ) данного генотипа, который рассчитывается как отношение пациентов с предсказанной формой заболевания к количеству пациентов с данным генотипом. Так, для делеции гена *CYP21*, относящейся к группе 0 (нулевая активность фермента) ППЦ составляет 99,6%, т.е. среди всех пациентов с гомозиготной делецией гена сольтеряющая форма отмечалась у всех, кроме одной пациентки. Согласно всем представленным исследованиям, для гомозиготного варианта делеций гена и больших генных

конверсий ППЦ для сольтерющей формы составляет 100%. Диагноз у нашей пациентки с вирильной формой заболевания при гомозиготной делеции гена *CYP21* был установлен в неонатальный период на основании неправильного строения наружных гениталий и данных неонатального скрининга. С самого начала ребенок получал терапию минералокортикоидными препаратами в небольших дозах (0,025мг/сут), на фоне чего у девочки никогда не отмечалось клинической картины сольтерющих кризов и электролитных изменений, но уровень ренина ребенку не исследовался. Исходя из клинической картины девочке установлен диагноз простой вирильной формы заболевания, но учитывая постоянную терапию минералокортикоидными препаратами, точно разграничить в данном случае сольтерющую форму от простой вирильной не представляется возможным.

Для мутации I2splice, которая относится к группе А и должна определять сольтерющую форму заболевания (в гомо-, геми- и гетерозиготном состоянии в сочетании с более тяжелой мутацией из группы О или А), в нашей группе сольтерющую форму имели 257 пациентов из 284 – ППЦ составляет 90,5%. Если исключить из анализа составные сложные гетерозиготные состояния, а оценивать только гомо- и гемизиготные мутации I2spl, то ППЦ составляет 91,2% (217 из 238 пациентов).

Для мутации I172N, которая в исследованиях *in vitro* приводит к образованию белка с активностью 2%, и единственная из частых коррелирует с простой вирильной формой заболевания, ППЦ вирильной формы в нашей группе составила 64% (119 пациентов имели вирильную форму из 186, имеющих данный генотип). Для гомозиготного и гемизиготного состояния I172N ППЦ вирильной формы составляет 65,9%.

Высокую положительную прогностическую ценность сольтерющей формы заболевания имели мутации Q318X и R356W, для которых индекс ППЦ составил 97% и 84,7% соответственно. Выделение гомо- и гемизиготных вариантов повышает ППЦ до 100% для Q318X и 84,5% для R356W.

Для мутации P30L, относящейся к генотипам группы С, т.е. определяющим неклассическую форму заболевания, в литературе описан выраженный клинический полиморфизм, что объясняется не только снижением ферментативной активности мутантного белка, но и снижением его стабильности. В нашей группе пациентов мутация P30L значительно чаще встречалась при вирильной форме заболевания (46/66), чем при неклассической (6/66). Положительная предсказательная ценность данной мутации для вирильной формы составила 69,7%, тогда как для неклассической – 9%. Это объясняется еще и особенностями нашей выборки, в которой преобладают пациенты с классическими формами ВДКН.

Для самого частого среди «неклассических генотипов» V281L ППЦ для неклассической формы составила 64,4%. Это свидетельствует о неполной конкордантности данной мутации с неклассическим фенотипом, на что указывают многие авторы [227].

### 3.2.3. РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В НЕОНАТАЛЬНОМ СКРИНИНГЕ

Была сформирована группа пациентов, выявленных по неонатальному скринингу с 2013 по 2017г, которым было проведено молекулярно-генетическое исследование 12 частых мутаций в гене *CYP21*.

Всего в данную группу было включено 280 детей. Распределение по годам и по полу представлено в таблице ниже.

Таблица 16 - Распределение по годам и по полу в группе новорожденных, выявленных по неонатальному скринингу, которым был проведен молекулярно-генетическое исследование 12 частых мутаций в гене *CYP21*.

Год	Кол-во мальчиков	Кол-во девочек	Всего пациентов
2013	12	21	33
2014	17	33	50

<b>Год</b>	<b>Кол-во мальчиков</b>	<b>Кол-во девочек</b>	<b>Всего пациентов</b>
2015	23	33	56
2016	45	38	83
2017	28	30	58
<b>Всего за 5 лет</b>	<b>125</b>	<b>155</b>	<b>280</b>

Среди девочек 15 новорожденных с правильным строением наружных гениталий, что подразумевает неклассическую форму заболевания.

При молекулярно-генетическом исследовании методом аллель-специфической ПЦР частые мутации были выявлены у 220 детей (78,6%), среди девочек мутации выявлены у 129 пациенток (83,2%), среди мальчиков – у 91 пациента (72,8%).

В таблице ниже представлена частота различных мутаций в гене *CYP21* у пациентов с положительным результатом неонатального скрининга.

Таблица 17 - Частота различных мутаций в гене *CYP21* у пациентов с положительным результатом неонатального скрининга

<b>Мутация</b>	<b>Количество аллелей</b>	<b>Количество пациентов, для которых данная мутация определяет фенотип</b>
Del	129	73
I2spl	123	58
I172N	71	37
Q318X	36	14
R356W	25	10



Мутация	Количество аллелей	Количество пациентов, для которых данная мутация определяет фенотип
P30L	11	10
V281L	33	18

При сравнении 17ОНП в зависимости от выявленного генотипа во всех группах методом Краскела-Уоллиса получена достоверная разница между группами ( $H=63,9 > 7,815$ ,  $P<0,001$ ).

Таблица 18 - Уровень 17ОНП в зависимости от генотипа новорожденных с дефицитом 21-гидроксилазы, выявленных по данным неонатального скрининга.

Генотип	Генотип О (del, Q318X, R356W)	Генотип А (I2spl)	Генотип В (I172N)	Генотип С (P30L, V281L)
Кол-во пациентов	97	58	37	28
Медиана уровня 17ОНП, нмоль/л [Q1; Q3]	500 [298,5; 605,75]	325,5 [178,25; 536]	145,9 [49; 197]	28,45 [22,4; 55,9]

При попарном сравнении уровня 17ОНП у пациентов с разными генотипами методом расчета критерия Манна-Уитни для малых выборок с непараметрическим распределением выявлены достоверные различия во всех группах ( $p<0,01$ ), и только между группами с генотипом О и генотипом А достоверность различия находится в зоне неопределенности ( $0,01<p<0,05$ ).

Таблица 19 - Таблица расчета критерия Манна-Уитни для значений 17ОНП в группах с различными генотипами

	<b>U-эмпирический Манна-Уитни</b>	<b>U- критический <math>p&lt;0,01</math></b>	<b>U- критический <math>p&lt;0,05</math></b>
Генотип О и А	1287,5 ((0,01< $p<0,05$ ))	1234	1355
Генотип О и В	288 ( $p<0,01$ )	592	669
Генотип О и С	57,5 ( $p<0,01$ )	198	234
Генотип А и В	421 ( $p<0,01$ )	538	610
Генотип А и С	182,5 ( $p<0,01$ )	363	418
Генотип В и С	182 ( $p<0,01$ )	259	302

Несмотря на достоверные различия между уровнем 17ОНП во всех представленных группах, имеется индивидуальный перекрест значений даже в крайних группах, что не позволяет определять форму заболевания по уровню 17ОНП, полученному в ходе неонатального скрининга. Назначение терапии до начала развития сольтеряющего компонента является одной из основных целей неонатального скрининга, в то время как дети с неклассической формой заболевания часто не нуждаются в назначении глюкокортикоидной терапии в раннем возрасте, особенно мальчики. При неклассической форме заболевания назначение терапии может привести не только к ухудшению ростового прогноза, но и к ухудшению качества жизни за счет постоянного приема терапии и риска развития кризов надпочечниковой недостаточности на фоне хронического длительного подавления системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники.

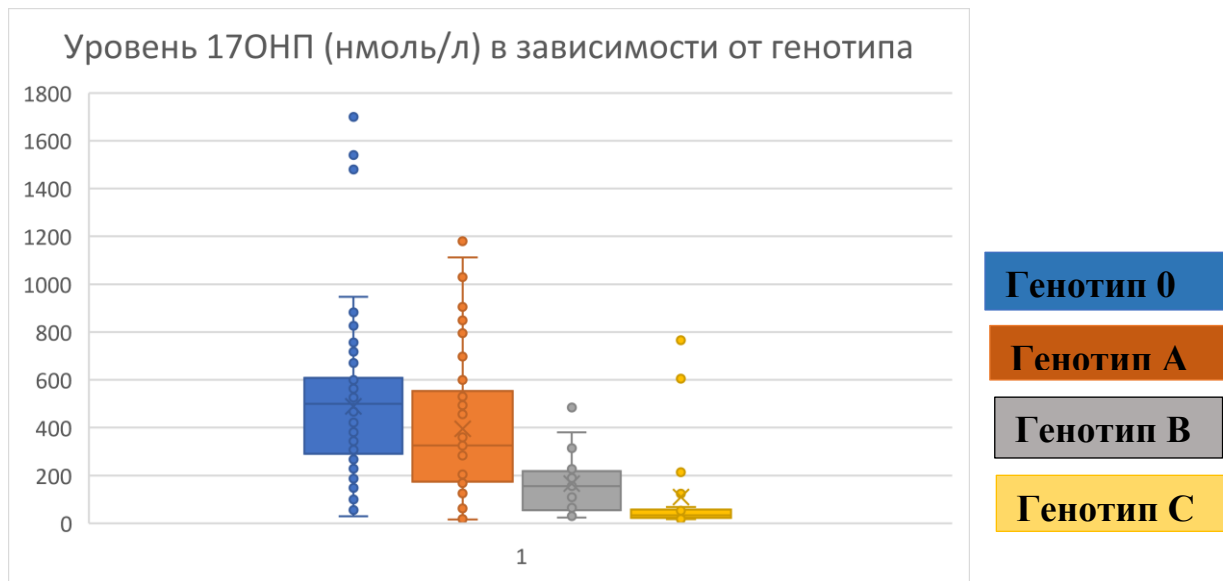


Рисунок 17 - Сравнение уровня 17ОНП в группах новорожденных с положительным результатом неонатального скрининга в зависимости от генотипа

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень 17ОНП, полученный в ходе неонатального скрининга не может надежно дифференцировать клиническую форму заболевания, а значит и определиться со схемой терапии. Определение генотипа ребенка с положительным скринингом будет полезным для прогнозирования формы заболевания до развития сольтеряющих кризов, а также позволит избежать назначения терапии пациентам с неклассическими формами дефицита 21-гидроксилазы.

### 3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ПАЦИЕНТАМИ С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

#### 3.3.1. РОСТ ПАЦИЕНТОВ С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Рост пациентов с ВДКН является одним из ключевых показателей течения заболевания. Пожизненная глюкокортикоидная терапия вызывает супрессию скорости роста. В то же время, недостаточное подавление надпочечников при низкой дозе глюкокортикоидов вызывает гиперандрогению с прогрессией костного возраста и ранним закрытием зон роста, снижая тем самым конечный рост пациентов. Следовательно, конечный рост является одним из маркеров компенсации заболевания на протяжении всего периода детства.

Конечного роста в нашей группе достигли 94 пациента. Среди них 46 пациентов с сольтерьющей формой заболевания (34 девочки и 12 мальчиков) и 48 пациентов с простой вирильной формой заболевания (29 девочек и 19 мальчиков) (Таблица 20).

Таблица 20 - Конечный рост пациентов в зависимости от формы заболевания и пола пациентов.

	Девочки		Мальчики	
	СТ	ПВ	СТ	ПВ
Конечный рост, см	155,5±6,7	153,3±4,8	162,9±10,8	161,8±8,0
SDS конечного роста	-1,07±1,1	-1,47±0,8	-1,76±1,6	-1,98±1,3
Целевой рост, см	163,2±5,6	161,2±4,5	175,8±4,8	177,6±8,3
SDS целевого роста	0,19±0,9	-0,13±0,7	0,17±0,7	0,45±1,2
Δ между целевым и конечным ростом, см	7,6±6,1	7,9±5,6	12,5±7,8	15,8±6,6
Δ SDS между целевым и конечным	1,26±1,0	1,34±0,94	2,11±1,6	2,43±0,96

Конечный рост оказался ниже целевого во всех группах пациентов. Самая большая разница между целевым и конечным достигнутым ростом оказалась в группе мальчиков с вирильной формой заболевания, что закономерно, поскольку конечного роста достигли только те пациенты, которые не вошли в программу неонатального скрининга, и значит, диагноз которым был поставлен на основании клинической картины после 4 лет при значимом опережении костного возраста. Однако, разница между конечным ростом у мальчиков с простой вирильной и сольтеряющей формами заболевания была статистически не значимой (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=0,2 < t_{кр}=2,1$ ;  $p>0,05$ ). Разница между конечным ростом у девочек также не зависела от формы заболевания (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=1,4 < t_{кр}=2$ ;  $p>0,05$ ). У мальчиков отставание в росте от целевых значений составило  $12,5 \pm 7,8$  см при сольтеряющей форме и  $15,8 \pm 6,6$  см при вирильной форме (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=0,5 < t_{кр}=2,1$ ;  $p>0,05$ ). Отставание в росте от целевых значений у девочек было значимо меньше и также не отличалось при сольтеряющей ( $7,6 \pm 6,1$ ) и при вирильной формах ( $7,9 \pm 5,6$ ) (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=0,2 < t_{кр}=2$ ;  $p>0,05$ ),

#### 3.3.1.1. ДИНАМИКА РОСТА НА ФОНЕ ТЕРАПИИ

Для анализа причин снижения конечного роста мы проследили за динамикой роста на протяжении всего периода детства. Для этого была сформирована группа пациентов, которые регулярно наблюдались в ФГБУ НМИЦ Эндокринологии с момента постановки диагноза и до достижения конечного роста. Данная группа состояла из 50 человек, среди которых было 25 мальчиков и 25 девочек, с сольтеряющей формой заболевания было 34 пациента (18 девочек и 16 мальчиков), с простой вирильной формой – 16 пациентов (7 девочек и 9 мальчиков). Всего проанализировано 789 визитов, дети младшего возраста наблюдались с частотой 1 раз в 3-6 мес, дети старше 2-х лет - с частотой 1 раз в 6-12 мес. Медиана возраста постановки диагноза при сольтеряющей форме заболевания достоверно не отличалась у девочек и у мальчиков (0,03 года (0,02; 0,12) у девочек против 0,08 года (0,07; 0,17 у мальчиков;  $p>0,05$ )), при вирильной форме у девочек возраст

постановки диагноза не отличался от сольтеряющей группы у всех пациенток кроме двух, которые были исключены из расчетов (0,1 года (0,06;0,5);  $p>0,05$ ), у мальчиков с вирильной формой срок постановки диагноза был достоверно выше (5,05 года (4,4; 5,8)  $p<0,01$ ). Поскольку возраст постановки диагноза отличался только у мальчиков с вирильной формой заболевания, то они были выделены в отдельную группу. Для всех пациентов были проанализированы средние антропометрические и гормональные показатели каждые 2 года на протяжении от постановки диагноза по закрытия зон роста.

При анализе процесса роста в разные возрастные периоды при сольтеряющей форме заболевания обозначилось два возрастных периода, когда происходит снижение скорости роста: это период до 2-х лет жизни и период пубертата. SDS роста к двум годам в группе с сольтеряющей формой заболевания снизилось до  $-0,73 \pm 1,3$ , затем до начала полового развития показатели SDS колебались около  $+0$ , но в период пубертата планомерно снижались, достигая к окончанию процессов роста  $-1,3 \pm 1,2$  (Рисунок 18). Несмотря на большие индивидуальные колебания SDS скорости роста и колебания этого показателя у каждого пациента между визитами, отмечена общая тенденция к явному снижению скорости роста в период полового созревания.

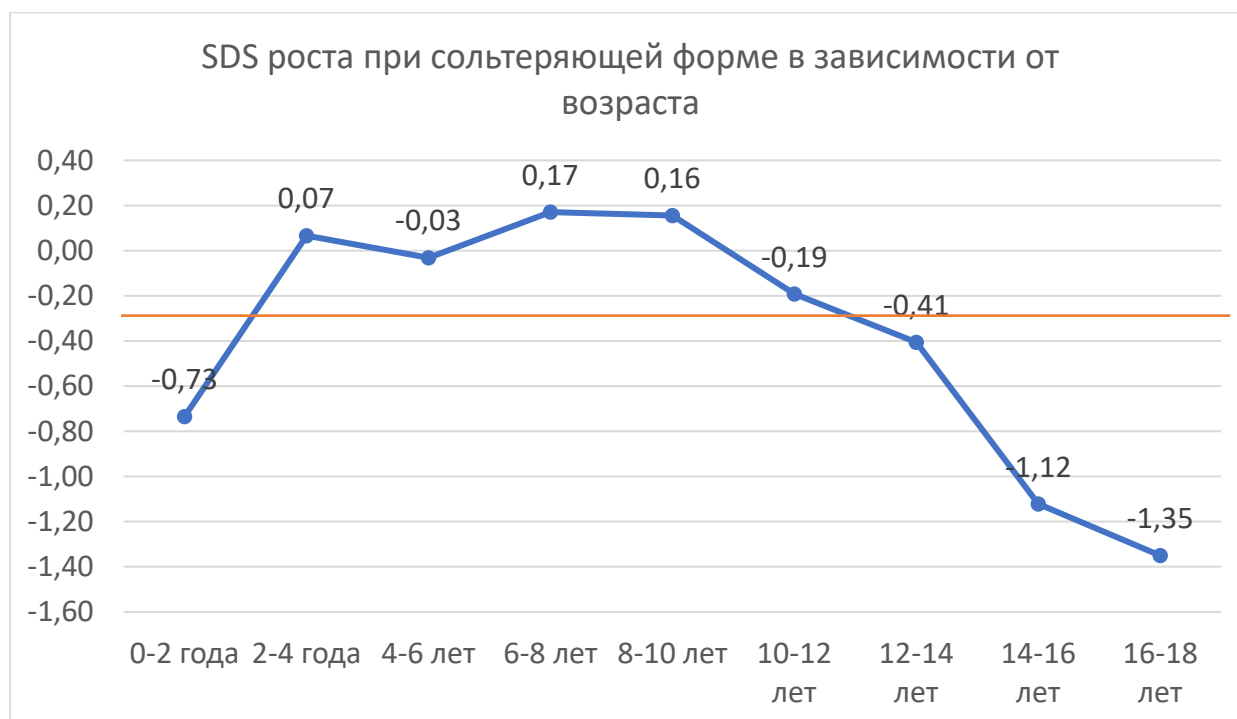


Рисунок 18 - Динамика SDS роста при сольтеряющей форме заболевания на протяжении периода детства

Средние дозы глюкокортикоидных препаратов, используемых в первые два года жизни и во время полового созревания, были достоверно выше, чем дозы используемые в период детства (Рисунок 19). Динамика средней дозы глюкокортикоидных препаратов в период от рождения до закрытия зон роста имела распределение, обратное SDS роста, т.е. до двух лет жизни суточная доза превышала  $15\text{мг}/\text{м}^2$ , затем снижалась и с началом пубертата опять превышала  $15\text{мг}/\text{м}^2$  достигая максимума  $20\text{мг}/\text{м}^2$  в самой старшей возрастной группе. Между SDS роста и дозой глюкокортикоидов определяется сильная обратная корреляционная связь ( $R=-0,835$ ).

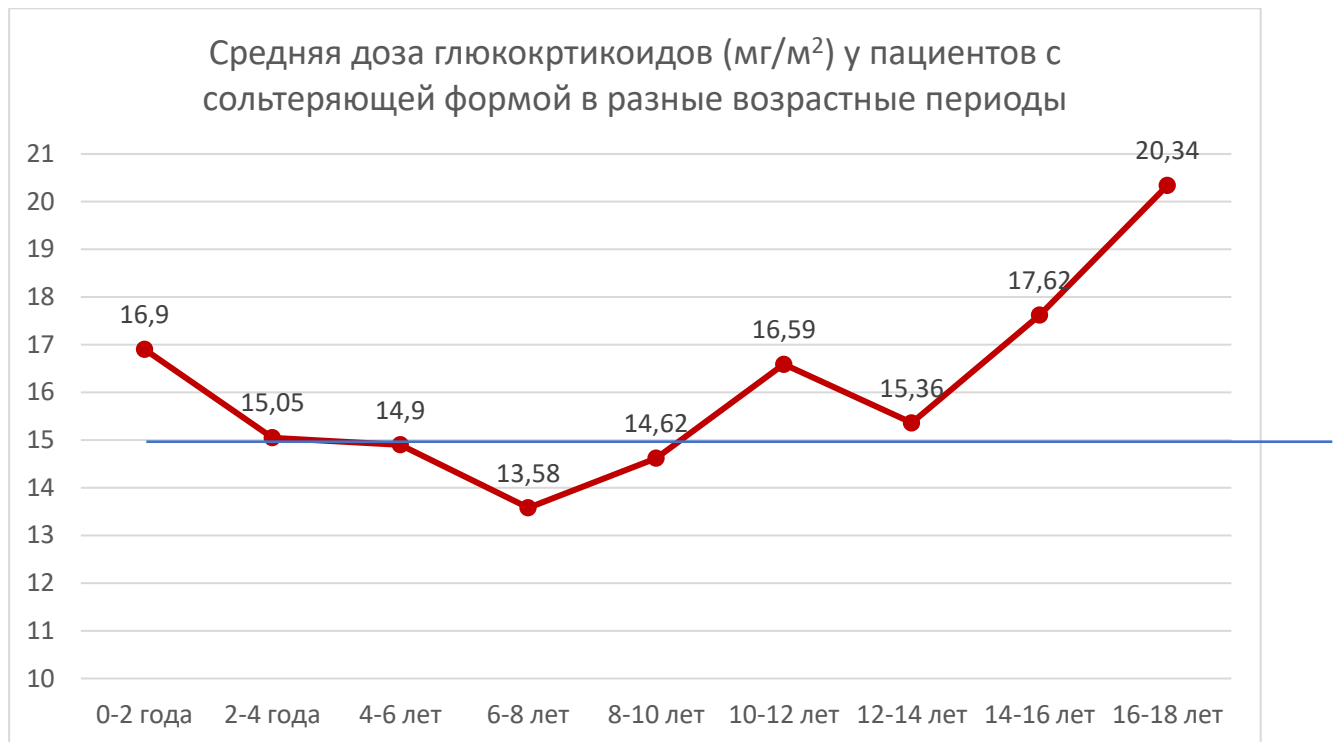


Рисунок 19 - Динамика суточной дозы глюкокортикоидных препаратов, рассчитанная как количество гидрокортизона на площадь поверхности тела, у пациентов с сольтеряющей формой ВДКН на протяжении детства

На основании полученных данных было выделено 3 возрастных диапазона в зависимости от возраста и полового развития: от момента постановки диагноза до 2-х лет жизни, от 2-х лет и до начала полового развития, и от момента начала пубертата до закрытия зон роста (Таблица 21).

Таблица 21 - Антропометрические и гормональные данные в зависимости от пола и формы ВДКН в возрастном диапазоне от 0 до 18 лет.

		<b>SDS роста</b>	<b>SDS скорости роста</b>	<b>Медиана 17ОНП, нмоль/л</b>	<b>Медиана дозы ГК, мг/м<sup>2</sup></b>
Девочки	0-2 года	-0,39 (-1,2; 0,44)	*	7,0 (2,1; 15,05)	13,5 (11,2; 16,5)
	2-начало пубертата	0,12 (-1,25; 1,3)	-0,19 (-1,3; 1,4)	3,95 (0,95; 23,5)	13,6 (10; 16,3)
	От начала пубертата до закрытия зон роста	-0,88 (-1,6; - 0,2)	-0,39 (-1,9; 1,9)	36,75 (4,8; 111,6)	15,9 (12,3; 18,8)



		<b>SDS роста</b>	<b>SDS скорости роста</b>	<b>Медиана 17ОНП, нмоль/л</b>	<b>Медиана дозы ГК, мг/м2</b>
Мальчики с СТ	0-2 года	-0,7 (-2,0; 0,07)	*	37,6 (10,2; 64,2)	14,4 (12,5; 16,7)
	2-начало пубертата	0,3 (-0,5; 1,04)	0,12 (-1,8; 2,5)	4,95 (1,15; 44,2)	13,6 (11,0; 16,0)
	От начала пубертата до закрытия зон роста	0,1 (-0,96; 0,6)	-0,65 (-3,3; 0,6)	26,8 (6,25; 71,2)	14,5 (12,9; 17,5)
Мальчики с ПВ	<9 лет	2,5 (1,2; 3,4)	-2,49 (-3,6; -1,4)	11,85 (1,65; 56,0)	17,1 (11,6; 25,3)
	9-13 лет	0,62 (0,47; 1,2)	-2,7 (-4,1; 0,09)	23,45 (10,8; 99,8)	15,5 (13,8; 18,1)
	>13 лет	-1,12 (-2,1; - 0,4)	-2,6 (-4,7; -0,9)	28,2 (12,7; 60)	17,5 (14,8; 22,6)

\*не достоверные данные, т.к. очень большой разброс величин в связи с частыми измерениями

Из полученных данных видно, что значимой разницы между девочками и мальчиками с сольтерьющей формой в отношении роста на всем протяжении детства не выявлено. Однако, имеется разница у мальчиков с сольтерьющей и вирильной формами заболевания, которая обусловлена возрастом постановки диагноза. При поздней диагностике у мальчиков с вирильной формой с момента начала глюкокортикоидной терапии скорость роста падает во всех возрастных промежутках (SDS скорости роста не различается в разных возрастных группах). Конечный рост пациентов с вирильной формой статистически значимо ниже, чем у мальчиков с сольтерьющей формой, получающих терапию с рождения (SDS в последней возрастной группе у пациентов с вирильной формой -1,12 (-2,1;-0,4) против SDS у мальчиков с сольтерьющей формой 0,1 (-0,96; 0,6)) (Рисунок 20). Средняя суточная доза глюкокортикоидов оказалась достоверно выше у пациентов с вирильной формой по сравнению с сольтерьющей ( $p<0,05$ ).

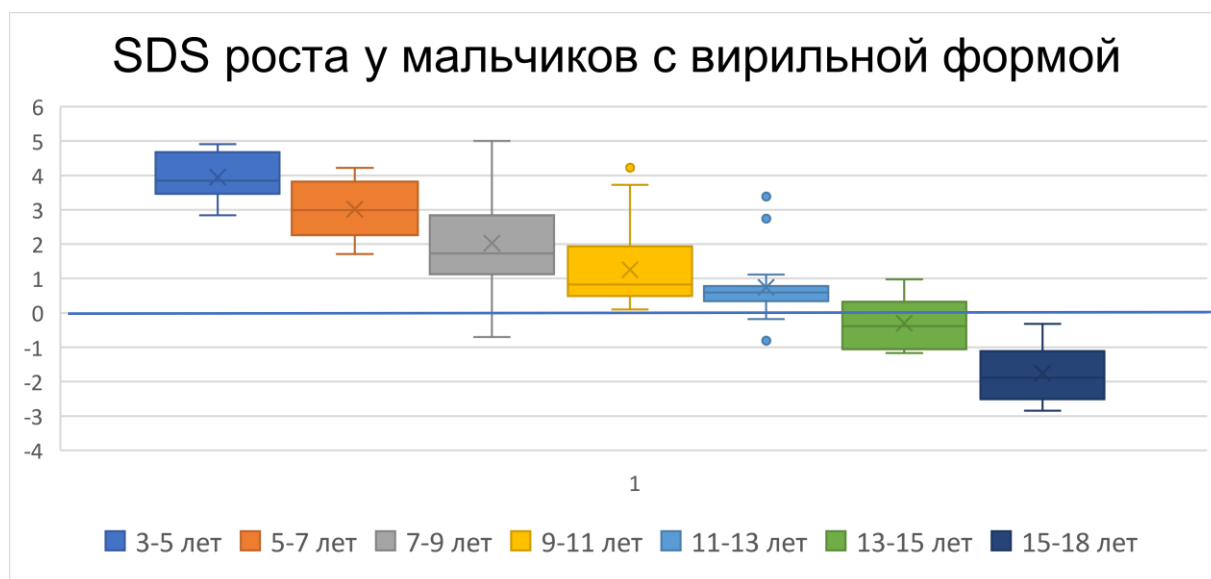


Рисунок 20 - SDS роста на протяжении периода детства у мальчиков с вирильной формой заболевания

При поздней постановке диагноза требуются большие дозы глюкокортикоидов для подавления надпочечниковых андрогенов. Низкий конечный рост пациентов с вирильной формой может быть обусловлен, с одной стороны, прогрессией костного возраста до постановки диагноза, с другой стороны, низкой скоростью роста после начала глюкокортикоидной терапии вследствие высокой дозы препаратов.

### 3.3.1.2. ПРИМЕНЕНИЕ ГОРМОНА РОСТА У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

С целью улучшения ростового прогноза мы использовали препараты гормона роста у детей, чей прогнозируемый конечный рост был меньше  $-2,5$  SD. В исследуемую группу (А) вошли 7 пациентов (6 мальчиков; 1 девочка) с дефицитом 21-гидроксилазы. 5 пациентов имели вирильную форму заболевания, медиана возраста постановки диагноза составила 4,7 года (от 4,3 до 7,7 лет), при этом медиана КВ на тот момент составила 12,75 лет (8-13,5). Один мальчик имел сольтерную форму заболевания, у которого прогрессия КВ была связана с декомпенсацией заболевания в возрасте 7 лет. Девочка имела неклассическую форму заболевания, диагностированную в возрасте 5,4 лет при костном возрасте - 8 лет. Стартовая доза ГР составляла 0,04мг/кг/сут, у двух пациентов через 6 мес от

начала терапии доза была увеличена до 0,05мг/кг/сут в связи с недостаточным ростовым эффектом. Четверо пациентов в дополнение к терапии ГР получали аналоги люлиберина (диферелин) в стандартной дозе 3,75мг/28 дней. Продолжительность терапии ГР была от 9 до 43 месяцев и в среднем составила 2 года (23,8мес).

Таблица 22 - Антропометрические характеристики пациентов, получавших терапию гормоном роста

	На момент постановки диагноза ВДКН	На момент начала терапии ГР	На момент окончания терапии ГР	На момент последнего обследования
Пациент 1 (О.Т.)				
Возраст, годы	4,5	5,0	6,4	15
Рост	123	124,3	131,7	164,5
SDS роста	3,8	3,4	2,8	- 0,86
SDS скорости роста		-3,6	0,7	
Костный возраст	13,5	13,5	13,5	18
SDS роста на КВ	-4,17	-4,01	-2,61	
Конечный прогнозируемый рост	141		151	164,5
Пациент 2 (Б.А.)				
Возраст	4,9	5,5	7,1	15
Рост	121,9	125	134,7	162
SDS роста	3,0	2,7	2,5	-1,27
SDS скорости роста		-3,7	0,5	
Костный возраст	13,5	13,5	14	18
SDS роста на КВ	-4,3	-3,92	-3,13	
Конечный прогнозируемый рост	139	143	149	162
Пациент 3 (М.Е.)				
Возраст	5,4	9,0	9,9	19
Рост	121,1	136,6	145,4	165
SDS роста	2,1	0,9	1,5	
SDS скорости роста		-2,6	5,1	
Костный возраст	8	12	12	16

	На момент постановки диагноза ВДКН	На момент начала терапии ГР	На момент окончания терапии ГР	На момент последнего обследования
SDS роста на KB	-0,68	-1,67	-0,51	
Конечный прогнозируемый рост	161	152	161	165
Пациент 4 (B.B.)				
Возраст	4,3	5,8	9,4	15,5
Рост	118,6	125,5	143,6	170,6
SDS роста	3,2	2,4	1,6	0,01
SDS скорости роста		-2,3	-1,5	-2,7
Костный возраст	11,5	13,5	14	16
SDS роста на KB	-3,76	-3,86	-2,06	
Конечный прогнозируемый рост	151	141	159	173
Пациент 5 (Г.С.)				
Возраст	4,5	8,2	9,8	18
Рост	130,8	147	161,2	171
SDS роста	5,7	3,4	4,1	
SDS скорости роста		-3,4	5,23	
Костный возраст	12	14	14	18
SDS роста на KB	-2,28	-1,65	0,06	
Конечный прогнозируемый рост	162	162	178	171
Пациент 6 (С.С.)				
Возраст	0,1	8,5	10,4	17
Рост		131,8	143,7	160
SDS роста		0,4	0,8	
SDS скорости роста		6,6	0,5	
Костный возраст		13,5	14	
SDS роста на KB		-3,08	-2,05	18
Конечный прогнозируемый рост		151	159	160
Пациент 7 (З.В.)				
Возраст	7,7	8,3	9,3	-

	На момент постановки диагноза ВДКН	На момент начала терапии ГР	На момент окончания терапии ГР	На момент последнего обследования
Рост	148	151,4	159,6	-
SDS роста	4,15	4,1	4,4	-
SDS скорости роста		-0,3	5,5	-
Костный возраст	13,5	13,5	14	-
SDS роста на КВ	-1,09	-0,67	0,28	-
Конечный прогнозируемый рост	169	170	176	-

Контрольную группу (В) составили 9 мальчиков с вирильной формой заболевания. Медиана возраста постановки диагноза составила 5,6 лет (5,16; 6,13), при этом медиана КВ соответствовала 13 годам (11,6; 13,9), таким образом по исходным параметрам группа пациентов, получающих ГР, и контрольная группа достоверно не отличались.

Таблица 23 - Антропометрические показатели в группе пациентов, получавших терапию гормоном роста в сравнении с контрольной группой

	На момент начала исследования		Р (1-2)*	На момент окончания терапии		З (3-4)*
	1	2		3	4	
	Группа А	Группа В		Группа А	Группа В	
Возраст, годы медиана (Q1;Q3)	8,2 (5,5; 8,5)	7,7 (4,9; 8,7)	0,16	9,8 (8; 10)	10,5 (9,6; 14,1)	0,047
Рост, см медиана (Q1;Q3)	131,8 (125; 147)	137,7 (132,5; 142,3)	0,09	143,7 (134,7; 159,6)	156,4 (146,5; 158,1)	0,072
Костный возраст, годы Медиана (Q1;Q3)	13,5 (13,5; 14)	13,5 (11,5; 14)	0,06	14 (14; 14)	14,6 (14; 16,7)	0,058
SDS роста на костный возраст Медиана (Q1;Q3)	-3,02 (-3,9; -1,65)	-2,22 (-2,6; -1,4)	0,19	-2,05 (-2,61; 0,06)	-1,94 (-2,3; 0,9)	0,9
Конечный прогнозируемый рост, см Медиана (Q1;Q3)	151 (142; 162)	157 (154,5; 168)	0,3	159 (154; 178)	161 (156,2; 166,5)	1

На фоне терапии гормоном роста отмечалось достоверное ускорение темпов роста, медиана SDS скорости роста составила 2,2 (0,5; 5,1). Средняя прибавка в росте на фоне терапии составила 6,9 см/год (5,1; 9,2).

SDS роста для костного возраста у пациентов, получающих терапию ГР увеличился от -3,02 (-4,3; -0,68) до -2,05 (-3,1; 0,3),  $p=0,0625$ . Конечный прогнозируемый рост, рассчитанный по таблицам Bayley-Pinneau с учетом костного возраста, также увеличился со 151см (142; 162) до 159см (154,5; 178),  $p=0,016$ .

При сравнении в двух группах конечного прогнозируемого роста и SDS роста для костного возраста достоверных различий выявлено не было.

На сегодняшний день все пациенты достигли конечного роста. Он оказался выше конечного прогнозируемого роста, рассчитанного на момент окончания терапии гормоном роста (159см (154,5; 178)) и составил 164,5 см (161,5; 170,7), тогда как в группе контроля медиана конечного роста составила 161,5см (155,5; 165) ( $p>0,05$ ).

На нашей маленькой выборке пациентов дополнительная терапия гормоном роста в течение двух лет оказалась не эффективной. Нужно отметить, что помимо малочисленности группы, состав пациентов был с крайне неблагоприятным ростовым прогнозом.

### 3.3.2. ПОЛОВОЕ РАЗВИТИЕ ДЕВОЧЕК С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Целью данной части исследования было оценить течение пубертата у девочек и проанализировать влияние гиперандрогении в разные возрастные периоды на становление и исход пубертата.

#### 3.3.2.1. СТАНОВЛЕНИЕ ПУБЕРТАТА У ДЕВОЧЕК С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Для оценки становления пубертата была отобрана группа девочек с классическими формами ВДКН пубертатного возраста. В группу вошло 100 девочек, из которых 53 девочки были с сольтеряющей формой заболевания и 47 девочек с вирильной формой. Средний возраст в группе составил 16,13 лет (14,2; 17,9), костный возраст 18 лет (15,6; 18). Распределение по стадиям полового развития представлено в таблице (Таблица 24).

Таблица 24 - Распределение девочек по стадиям полового развития по шкале Таннер

	Стадии полового развития по Таннер			
	2 ст	3 ст	4 ст	5 ст
Количество пациенток	12	25	22	41

Для оценки становления пубертата был исследован возраст менархе и становление менструального цикла. Менструальный цикл на момент последнего визита проанализирован у 100 пациенток. В обследуемой группе 18 девочек (18%) находились в пременархе и не достигали 16 лет (медиана возраста 11,66 (10,6; 13,2) лет, КВ 12 (11,5; 12,5) лет, половой статус Таннер 2 (2;3)). Из 82 пациенток постменархеального возраста 37 (44,6%) имели регулярный менструальный цикл, у остальных отмечались различные нарушения цикла (первичная аменорея – 9 девочек (10,8%), опсоменорея – 16 (19,3%), вторичная аменорея – 16 (19,3%), дисфункциональные кровотечения – 5 (6%)). Статистически достоверных различий

в процентном отношении различных нарушений цикла у девочек с СТ и ПВ формами выявлено не было ( $p=0,67$ )

Средний возраст менархе соответствовал 13 годам (12; 14) и был сопоставим с таковым в популяции здоровых девочек - 12,6 лет. Имелась достоверная разница между сольтеряющей формой заболевания, при которой возраст менархе составил 14,0 лет (13;15), и простой вирильной формой с возрастом менархе 13 лет (11,5;14) ( $p=0,043$ ).

### 3.3.2.2. ОЦЕНКА ЭСТРОГЕНИЗАЦИИ ВНУТРЕННИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ У ДЕВОЧЕК С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ В ПУБЕРТАТЕ

Для оценки степени эстрогенизации внутренних гениталий использовались размеры матки по данным УЗИ у девочек с гинекологическим возрастом более 1 года ( $n=45$ ). Медиана возраста у этих девочек составила 17,5 (15,7; 19,0) лет, стадия полового созревания – Таннер 5 (4; 5). Было отмечено уменьшение размеров матки в данной когорте пациенток по сравнению с аналогичными популяционными показателями для стадии полового созревания Таннер 5 (Таблица 25).

Таблица 25 - Ультразвуковые размеры матки у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников в сравнении с популяционными нормами для здоровых девушек.

Показатель	ВДКН	Популяционная норма для Таннер 5
Объем яичников, мл	6,9 (4,6; 9,6)	$6,88 \pm 0,27$
Длина тела матки, см	4,4 (4,0; 4,8)	$4,5 \pm 0,3$
Ширина матки, см	3,4 (3,0; 3,9)	$3,9 \pm 0,3$
Толщина матки	2,5 (2,1; 2,8)	$3,0 \pm 0,1$
Шейка матки, см	2,7 (2,5; 2,9)	$2,0 \pm 0,2$
V матки, мл	<b>30,5</b> (20,9; 37,4)	<b>43</b> (12-82)



Среди 45 девочек 23 имели удовлетворительную компенсацию гиперандрогении на момент обследования и в течение предшествующего года, а 22 девочки находились в стадии декомпенсации заболевания. Статистически значимой разницы в УЗ-параметрах матки и яичников между девочками с удовлетворительным и неудовлетворительным контролем гиперандрогении выявлено не было ( $p>0,05$ ) (Таблица 26).

Таблица 26 - Размеры матки по данным УЗИ у девочек с ВДКН в зависимости от компенсации гиперандрогении

Показатель	Компенсация (n=23)	Декомпенсация (n=22)	p (комп/ декомп)
Длина тела матки, см	4,2 (4,0; 4,5)	4,0 (3,7; 4,6)	нд
Ширина матки, см	3,5 (3,1; 3,9)	3,3 (3,1; 3,6)	нд
Толщина матки	2,5 (2,1; 2,8)	2,4 (2,0; 2,8)	нд
Объем матки, мл	30,6 (21,8; 37,4)	27,3 (21,1; 33,4)	нд
Объем яичников, мл	7,1 (4,46; 11,3)	7,5 (5,5; 9,3)	нд
17ОНП, нмоль/л	14,2 (4,1; 42,2)	107,9 (84,4; 150)	<0,01
Тестостерон, нмоль/л	0,7 (0,26; 1,6)	3 (1,4; 5,1)	<0,01
Суточная доза глюкокортикоидов, мг/м <sup>2</sup>	18,9 (17,5; 21,3)	19,5 (16,5; 21,9)	нд
Эстрадиол (с коррекцией на тестостерон)	150 (93; 195)	156,4 (117; 214)	нд

Для оценки влияния пубертатной гиперандрогении была сформирована группа сравнения, включавшая 12 девочек с синдромом пубертатной гиперандрогении. Группа была сопоставима по возрасту, стадии полового

развития и гинекологическому возрасту, который был также более 1 года. У всех пациенток из группы сравнения исключен диагноз ВДКН либо по результатам молекулярно-генетического исследования гена *CYP21*, либо по результатам стимуляционной пробы с аналогом АКТГ - синактеном. Все девочки из группы сравнения имели в анамнезе правильный порядок появления вторичных половых признаков (телархе, затем адренархе), таким образом, у них было исключено допубертатное влияние гиперандрогении на размеры матки. При сравнении размеров матки у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников в стадии компенсации гиперандрогении с размерами матки у девочек с овариальной гиперандрогенией имелись достоверные различия в объеме матки в основном за счет снижения ширины у девочек с ВДКН. При этом размеры матки у девочек с пубертатной овариальной гиперандрогенией не отличались от популяционных нормативов (Таблица 27).

Таблица 27 - Сравнение размеров матки в группе девочек с ВДКН в стадии компенсации и в группе девочек с пубертатной гиперандрогенией.

Показатель	Компенсация ВДКН	Пубертатная гиперандрогения	<i>p</i> (ВДКН /ГА)
Возраст, годы	17,0 (15,8; 17,8)	16,5 (15,4; 17,2)	нд
Менархе, годы	14 (13; 15)	12 (11,75; 12,75)	0,0016
Таннер	5 (4; 5)	5 (4; 5)	нд
17ОНП, нмоль/л	13,8 (4,1; 42,2)	4,5 (2,8; 5,51)	0,011
Тс, нмоль/л	0,66 (0,25; 1,6)	1,65 (1,15; 1,85)	0,005

Показатель	Компенсация ВДКН	Пубертатная гиперандрогения	<i>p</i> (ВДКН /ГА)
Э <sub>2</sub> , пмоль/л	161,9 (95,1; 196,5)	136,3 (111,9; 152,6)	нд
Объем яичников, мл	7,12 (4,46; 11,3)	10,3 (8,3; 12,8)	0,026
Длина тела матки, см	4,3 (4,0; 4,5)	4,4 (4,0; 4,8)	нд
Ширина матки, см	3,6 (3,1; 3,9)	4,05 (3,7; 4,35)	0,03
Толщина матки, см	2,6 (2,1; 2,8)	2,8 (2,5; 2,95)	нд
Объем матки, мл	30,5 (21,8; 37,4)	42,8 (34,7; 52,02)	0,0074

Поскольку уровень эстрадиола крови не различался в двух группах, то можно говорить о том, что допубертатная или внутриутробная гиперандрогения у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников может приводить к снижению чувствительности к эстрогенам в пубертатный период.

### 3.3.2.3. ОЦЕНКА ЭСТРОГЕНИЗАЦИИ НАРУЖНЫХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ У ДЕВОЧЕК С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ В ПУБЕРТАТЕ.

Оценивать эстрогенизацию по уровню эстрадиола крови при наличии гиперандрогении не корректно, так как имеется процесс внегонадной ароматизации надпочечниковых андрогенов в эстрогены, который вызывает ложное повышение уровня эстрадиола в крови. Степень эстрогенизации наружных половых органов оценивалась по цитологической картине вагинального мазка. Цитологическое

исследование вагинального эпителия было проведено у 21 пациентки (медиана возраста 15,8 лет (14,1;16,9), стадия полового развития Таннер 4 (3; 4)). Сольтерная форма ВДКН отмечалась у 10 девочек, 11 имели простую вирильную форму. Всем пациенткам из данной группы было проведено трансабдоминальное УЗИ органов малого таза, по результатам которого медиана объема яичников соответствовала пубертатным значениям (6,4 (4,5;10,1)). Данные девочки были разделены на подгруппы с компенсацией (n=10) и декомпенсацией (n=11) заболевания (в течение предшествующего исследованию года) (Таблица 28). За критерии компенсации были приняты: средний показатель 17ОНП (17ОНП) менее 50 нмоль/л, тестостерона (Тс) менее 2 нмоль/л и регулярный менструальный цикл. Пациентки с сочетанием минимум двух критериев были отнесены к группе компенсации. Для подгруппы с компенсацией ВДКН была набрана группа контроля, состоящая из 12 здоровых девочек сопоставимого возраста и стадии полового созревания, с гинекологическим возрастом более 1 года и с регулярным менструальным циклом.

Таблица 28 - Характеристика группы девочек, которым проводилось исследование вагинального мазка с целью оценки степени эстрогенизации наружных генталий

	<b>Компенсация</b>	<b>Декомпенсация</b>	<b><i>p</i> (комп/декомп)</b>
Число пациентов	10	11	
Форма ВДКН, СТ/ПВ	5/5	5/6	
Менархе, годы	13 (12,5; 13,5)	11,25 (10; 12)	нд
Менструальный цикл	Регулярный – 6  Опсоменорея - 4	Регулярный - 2  Аменорея 1 – 2  Аменорея 2 – 4  Пременархе - 3	$p=0,005$

	Компенсация	Декомпенсация	<i>p</i> (комп/декомп)
Эстрогенизация слизистой в зоне гименального кольца (удовлетворит/слабая)	7/3	2/9	$p=0,05$
17ОНП, нмоль/л	45,5 (19,6; 86,5)	114,4 (105,3; 171,2)	$p=0,004$
Тс, нмоль/л	0,81 (0,58; 1,4)	2,5 (1,1; 7)	$p=0,009$
Э <sub>2</sub> , пмоль/л	170,7 (121,5; 201)	154,4 (131; 222,3)	нд
Объем яичников, мл	5,58 (4,46; 9,9)	8,2 (5,4; 10,3)	нд

В данной группе был проведен подсчет количества поверхностных (с пикнотичными ядрами), промежуточных и базально-парабазальных клеток и был вычислен процент каждого типа клеток (%КП, %ПР и %ПБ, соответственно). Для статистической обработки данных был также использован общепринятый расчетный показатель - индекс созревания (ИС), являющийся маркером эстрогеновой насыщенности слизистой влагалища. Данный показатель был вычислен по формуле:  $ИС = (\% ПР \times 0.5) + \% КП$ .

У девочек с удовлетворительным контролем гиперандрогении при ВДКН в мазках преобладали промежуточные клетки, отмечалось умеренное количество поверхностных клеток и полностью отсутствовали незрелые клетки глубоких слоев

эпителия влагалища, при декомпенсации гиперандрогении также преобладали промежуточные клетки, но процент поверхностных клеток с кариопикнозом был достоверно ниже и встречались базальные-парабазальные клетки, которых не отмечалось у здоровых девочек.

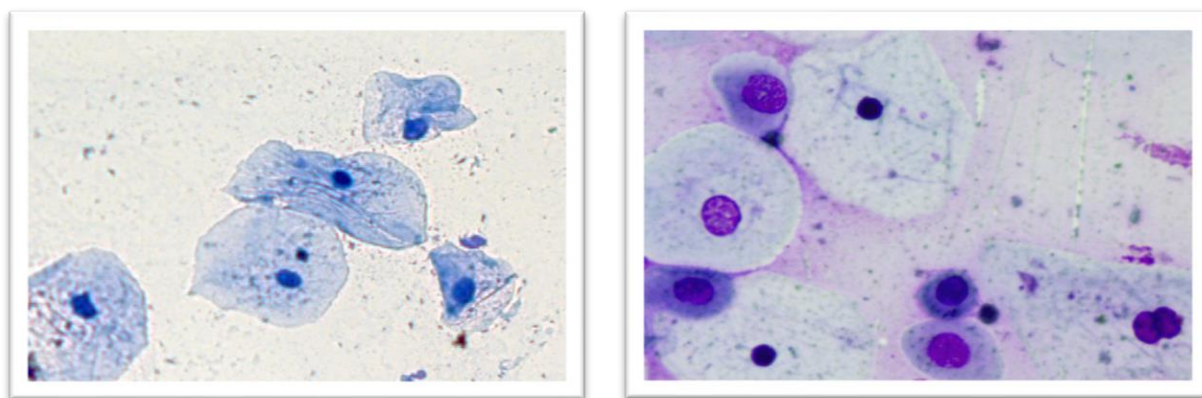


Рисунок 21 - Вагинальные мазки девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников: левая панель – поверхностная клетка с кариопикнозой и зрелая промежуточная клетка при компенсации гиперандрогении; правая панель – промежуточные и базальные-парабазальные клетки при декомпенсации гиперандрогении

Полученные данные в группах пациенток с компенсацией и декомпенсацией гиперандрогении в сравнении с контрольной группой здоровых девочек приведены в таблице.

Таблица 29 - Цитологические показатели вагинального эпителия у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников в зависимости от компенсации заболевания в сравнении с группой контроля.

	<b>Группа 1 декомпенсации</b>	<b>Группа 2 компенсации</b>	<b>Р 1/2</b>	<b>Группа 3 контроль</b>	<b>Р 2/3</b>
КП, %	6,5 (0,0;13,5)	24 (12; 29)	p=0,0014	22,2 (16; 30)	nd
ПР, %	84 (75;93,5)	76 (71; 88)	nd	76,7 (70; 84)	nd
ПБ, %	8,5 (0,0;20,5)	0,0 (0,0; 0,0)	p=0,003	0,0 (0,0; 0,0)	nd

	Группа 1 декомпенсации	Группа 2 компенсации	Р 1/2	Группа 3 контроль	Р 2/3
ИС, %	48,3 (39,7; 53,7)	62 (56; 64,5)	p=0,0007	61,1 (57,6; 65,0)	nd

Индекс созревания достоверно не отличался у девочек с ВДКН в стадии компенсации гиперандрогении по сравнению с группой контроля (62 (56; 64,5) против 61,1 (57,6; 65,0)), тогда как при декомпенсации ВДКН индекс созревания был статистически значимо снижен (48,3 (39,7; 53,7)).

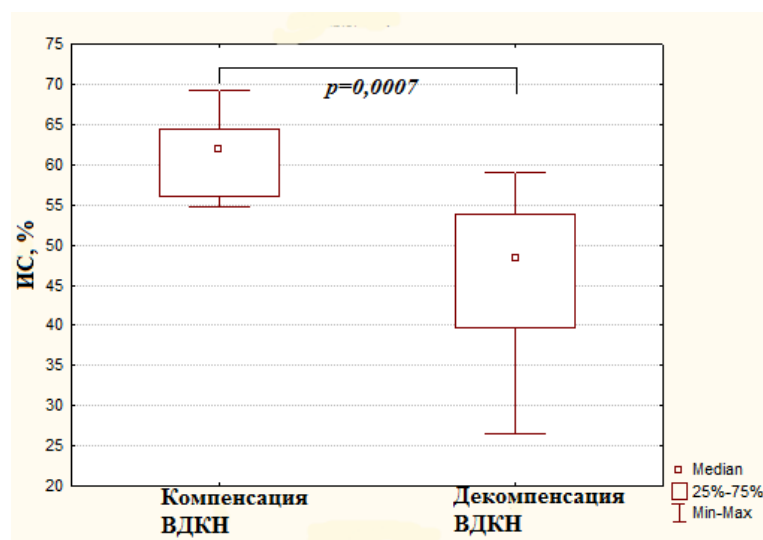


Рисунок 22 - Индекс созревания вагинального эпителия в зависимости от степени компенсации гиперандрогении у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников

Не было выявлено достоверных различий в степени созревания вагинального эпителия в подгруппе девочек с компенсацией заболевания в зависимости от формы заболевания (ИС при СТ (n=5) 62,5% (56;64,5) против 61,5% (58,25; 62,5) при ПВ форме (n=5), p=0,67). В подгруппе пациенток с декомпенсацией ВДКН также не было выявлено статистически значимой разницы в индексе созревания между пациентками с сольтеряющей (n=5) и вирильной (n=6) формами (39,7% (37,5;47,5) против 51,4% (48,3; 53,7), p=0,14, соответственно), но отмечалось

достоверное увеличение процента базальных-парабазальных клеток при сольтеряющей форме по сравнению с ПВ (20,15% (20;25) против 1,75% (0,0;8,5),  $p=0,049$ , соответственно) (Рисунок 22). Таким образом, у пациенток с сольтеряющей формой заболевания в состоянии декомпенсации отмечается более выраженная атрофия слизистой влагалища.

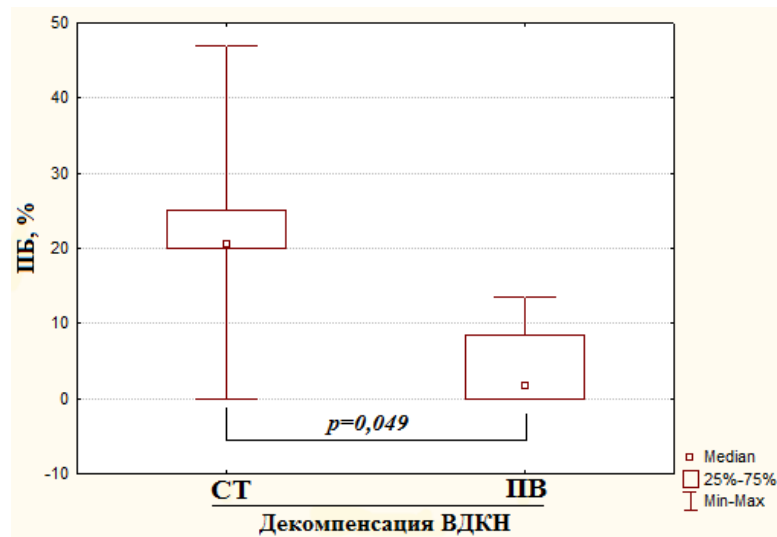


Рисунок 23 - Количество незрелых парабазальных клеток в вагинальном мазке у девочек с декомпенсацией ВДКН в зависимости от формы заболевания

При проведении корреляционного анализа не было выявлено статистически значимой связи индекса созревания влагалищного эпителия с уровнем эстрадиола крови. Была выявлена положительная корреляционная связь уровня тестостерона крови с процентом базальных-парабазальных незрелых клеток и отрицательная с процентом поверхностных кариопикнотических клеток и с индексом созревания (Таблица 30, Рисунок 24).

Таблица 30 - Взаимосвязь процента поверхностных кариопикнотических (КП), парабазальных (ПБ) клеток и индекса созревания вагинального эпителия (ИС) с гормональными показателями (Ts, 17ОНП, Э2)

Процент клеток	Гормональный показатель	Коэффициент корреляции	Статистическая значимость (p)
КП, %	Ts, средний за год, нмоль/л	-0,4	н/д



Процент клеток	Гормональный показатель	Коэффициент корреляции	Статистическая значимость ( <i>p</i> )
	Тс при обследовании, нмоль/л	-0,5	$p < 0,05$
	17ОНП при обследовании, нмоль/л	-0,4	<i>nd</i>
	Э <sub>2</sub> при обследовании, пмоль/л	0,2	<i>nd</i>
ПБ, %	Тс, средний за год, нмоль/л	0,34	<i>nd</i>
	Тс при обследовании, нмоль/л	0,53	$p < 0,05$
	17ОНП при обследовании, нмоль/л	0,3	<i>nd</i>
	Э <sub>2</sub> при обследовании, пмоль/л	0,09	<i>nd</i>
ИС, %	Тс, средний за год, нмоль/л	-0,45	$p < 0,05$
	Тс при обследовании, нмоль/л	-0,57	$p < 0,05$
	17ОНП, средний за год, нмоль/л	-0,45	$p < 0,05$
	17ОНП при обследовании, нмоль/л	-0,44	$p < 0,05$
	Э <sub>2</sub> при обследовании, пмоль/л	0,18	<i>nd</i>

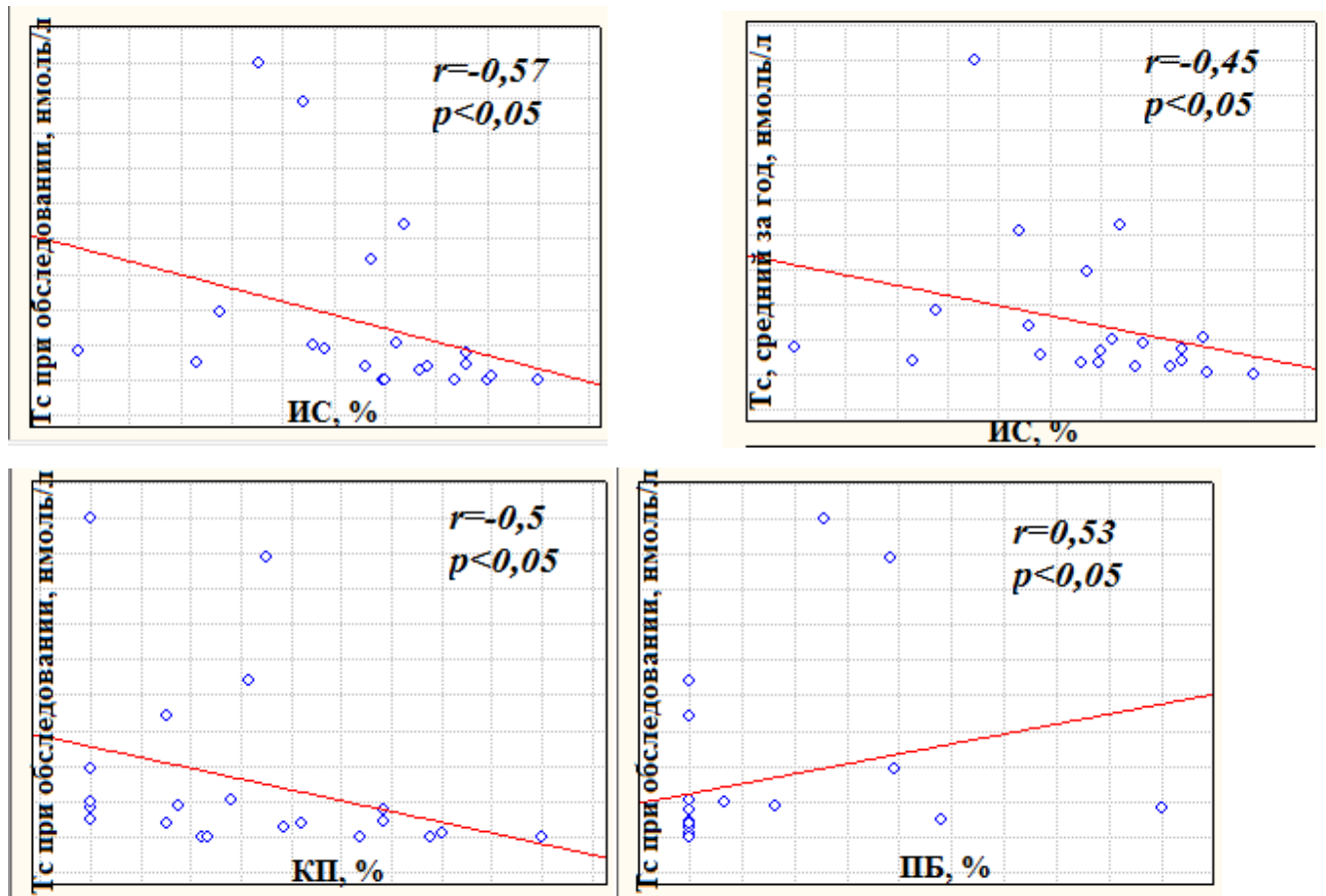


Рисунок 24 - Корреляция индекса созревания, процента поверхностных и базальных клеток с уровнем тестостерона в крови

Отсутствие связи цитологических маркеров созревания вагинального эпителия с уровнем эстрадиола крови свидетельствуют о низкой информативности определения уровня эстрадиола в крови при гиперандрогении, и невозможности его использовать для оценки эстрогеновой насыщенности в таких случаях. Интересно, что максимальная корреляционная связь была выявлена между индексом созревания эпителия и уровнем тестостерона в крови при настоящем обследовании, а не со средним уровнем тестостерона за предшествующий год, что говорит о высокой чувствительности вагинального эпителия к колебанию уровня половых стероидов (соотношению андрогенов/эстрогенов) и о быстром нарастании атрофии слизистой влагалища при декомпенсации заболевания.

Анализ результатов вагинальных мазков у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников свидетельствуют о том, что основную роль в эстрогенизации наружных гениталий играет компенсация заболевания.

Дополнительным методом оценки эстрогеновой насыщенности слизистых является исследование вагинального мазка.

#### 3.3.2.4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНДРОГЕНОВЫХ И ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НАРУЖНЫХ ПОЛОВЫХ ОРГАНАХ У ДЕВОЧЕК С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ДЕФИЦИТА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Нами была высказана гипотеза о влиянии внутриутробной гиперандрогении на постнатальную чувствительность к андрогенам и эстрогенам вследствие нарушения эмбриональной закладки рецепторов к половым стероидам. Для проверки данной гипотезы мы изучали экспрессию рецепторов в наружных половых органах на гистологическом материале, полученном при проведении феминизирующей пластики.

Материал для проведения иммуногистохимического исследования представлял собой участок кожи малых половых губ, прилежащих к гипертрофированному клитору у допубертатных девочек и участок стенки дистальной части влагалища, прилежащей ко входу. Ткань малых половых губ была получена во время проведения клиторотомии у 13 девочек, среди которых у 11 была диагностирована сольтерьяющая форма, а у двух - простая вирильная. Медиана возраста феминизирующей пластики в данной группе составила 2,4 года (2,4; 4,0). С минимальной степенью вирилизации, соответствующей второй стадии по шкале Прадера была только 1 девочка, с вирилизацией, соответствующей 3 степени по Прадеру – 8 девочек и у 4 пациенток имелась 4 степень вирилизации. Все дети были компенсированы по врожденной дисфункции коры надпочечников на момент оперативного лечения: средний уровень 17ОНП=11,03 нмоль/л (1,33; 54,3), активность ренина плазмы (АРП) = 1,95 нг/мл/ч (0,5; 3,4).

Общий процент клеток, экспрессирующий  $\alpha$ -эстрогеновые рецепторы (ЭРа) оказался невысоким – 16,8% (12,7; 22,8), что соответствует данным литературы о содержании данного типа рецепторов в коже вульвы у здоровых женщин репродуктивного возраста. Распределялись ЭРа только в глубоких базальных слоях

эпидермиса на границе с дермой и в фибробластах и гладкомышечных клетках дермы. Статистически значимой разницы в общем количестве ЭР $\alpha$ -иммунопозитивных клеток в эпидермисе (14,7% (11,8; 25,3)) и дерме (18,2% (16,3; 31,8)) выявлено не было ( $p>0,05$ ) (Рисунок 25).

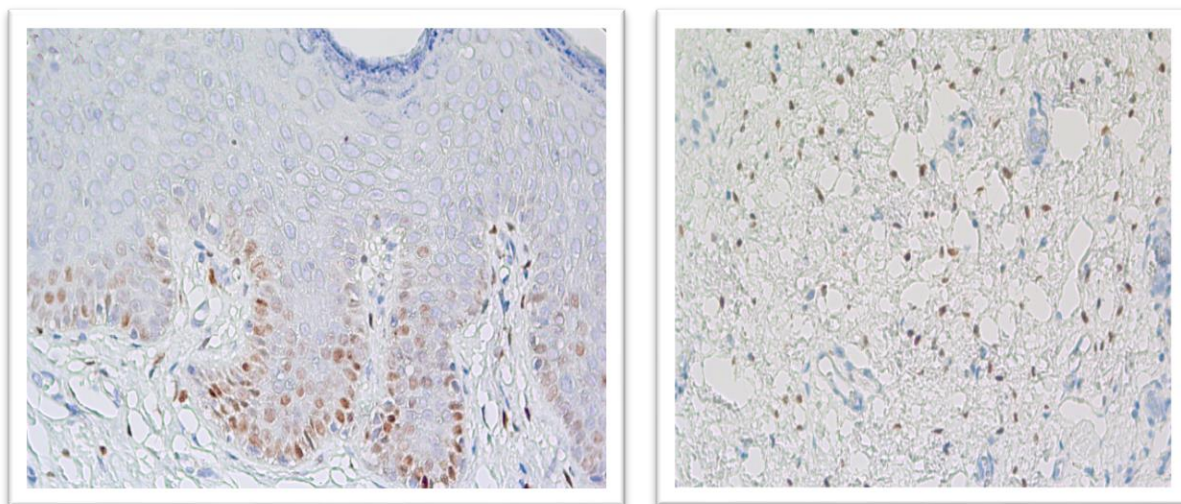


Рисунок 25 - Ядерное окрашивание ЭР $\alpha$  в клетках базано-парабазального слоя эпидермиса (левая панель) и в фибробластах дермы малых половых губ (правая панель)

Было выявлено высокое содержание клеток, экспрессирующих  $\beta$ -эстрогеновый рецептор (ЭР $\beta$ ) - 93,57% (86,2; 95,7). Распределялись эти клетки во всех слоях эпидермиса, в фибробластах и гладкомышечных клетках дермы, в эндотелии сосудов и в эпителиальных клетках протоков апокринных желез. Причем содержание иммунопозитивных клеток в эпидермисе было статистически значимо выше, чем в дерме (100% (98; 100) против 73,1% (63,9; 83,9), соответственно,  $p<0,01$ ). Такое интенсивное окрашивание ЭР $\beta$  было выявлено также в вульве здоровых женщин репродуктивного возраста. И хотя биологическая роль ER $\beta$  до сих пор полностью не изучена, предполагается, что ЭР $\beta$  оказывает ингибирующее действие на ЭР $\alpha$ -опосредованную экспрессию генов.

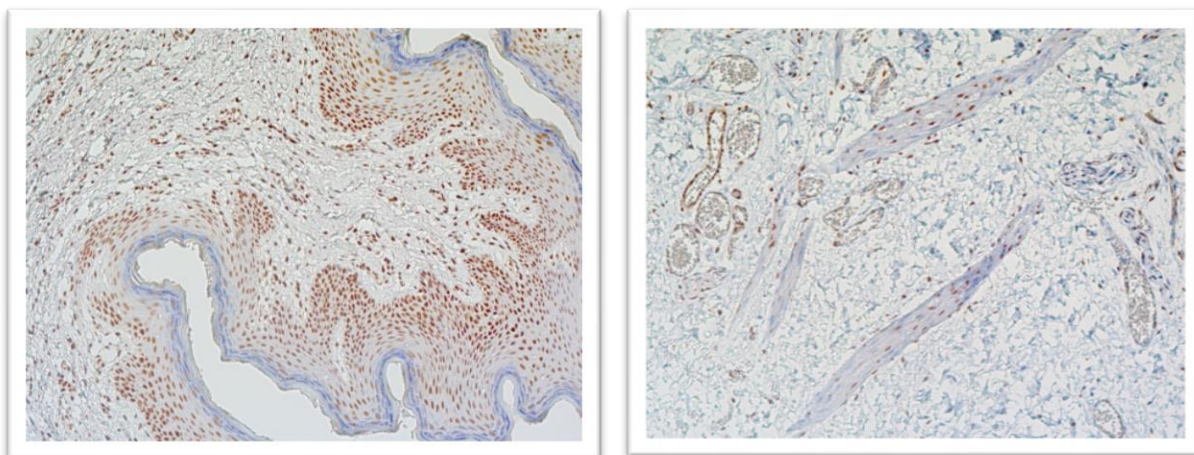


Рисунок 26 - Ядерное окрашивание ЭРβ в коже малых половых губ: левая панель – экспрессия ЭРβ в клетках эпидермиса, х200; правая панель – ЭРβ в гладкомышечных клетках дермы и в клетках эндотелия сосудов дермы, х200

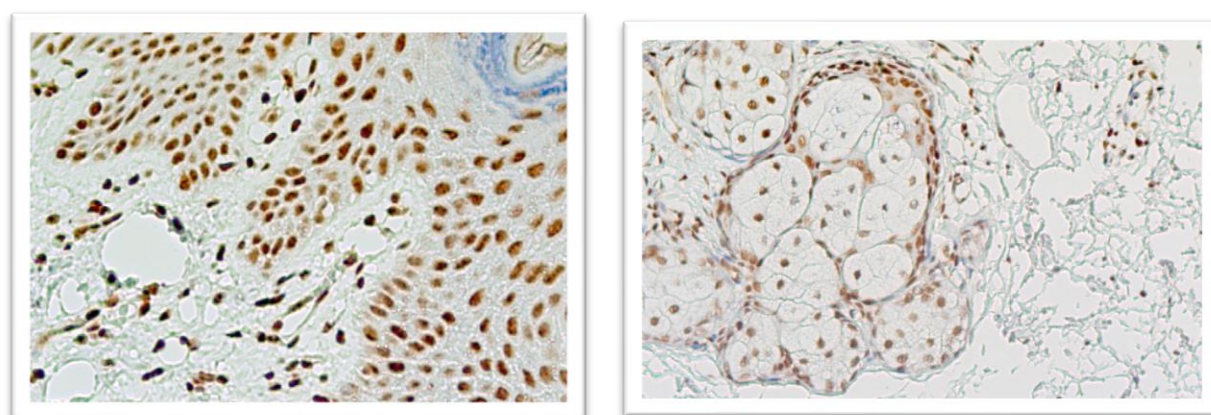


Рисунок 27 - Ядерное окрашивание ЭРβ в коже малых половых губ: левая панель – Эрβ в фибробластах дермы, х400; правая панель – Эрβ в эпителиальных клетках протоков желез, х200

Общий процент клеток, ядра которых экспрессировали андрогеновый рецептор (АР) в коже малых половых губ, оказался невысоким - 11,1% (8,1; 17,6). При этом было отмечено, что окрашенные клетки были расположены в основном в эпидермисе - 15,95% (10,2; 18,7) против 1,8% (1,5; 3) в дерме, различие достоверно ( $p < 0,01$ ). В эпидермисе АР выявлен в клетках, прилежащих к базальному слою, а также в эпителиальных протоковых клетках.



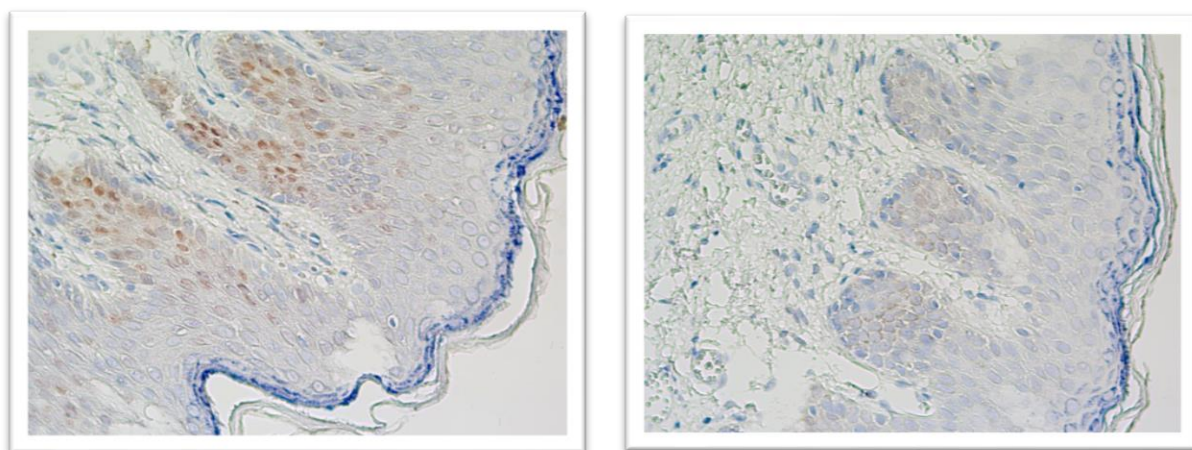


Рисунок 28 - Ядерное окрашивание АР в эпидермисе наружной (левая панель) и внутренней (правая панель) поверхности малых половых губ, х400

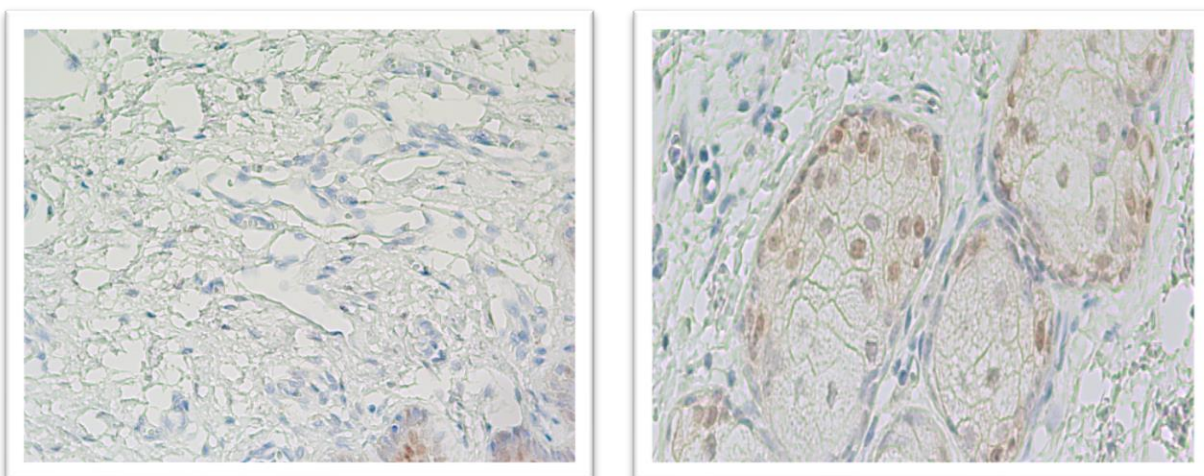


Рисунок 29 - Слабое окрашивание АР в дерме малых половых губ (левая панель) в эпителиальных клетках протоков желез (правая панель), х400

При сравнении разных участков кожи малых половых губ отмечалось неравномерное распределение рецепторов, ЭР $\alpha$  преобладали на внутренней стороне половых губ, прилежащей к клитору, тогда как АР наоборот максимально определялись в эпидермисе наружной части малых половых губ (Рисунок 30). Таким образом, экспрессия и распределение андрогеновых и эстрогеновых рецепторов в коже малых половых губ у девочек с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников существенно не отличается от здоровых женщин репродуктивного возраста.

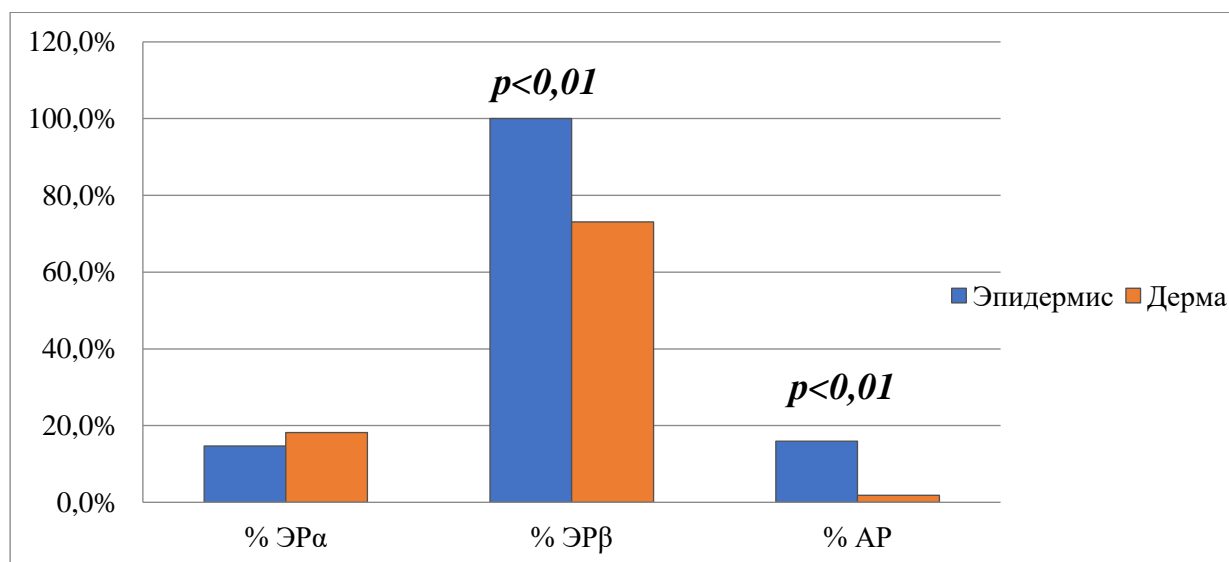


Рисунок 30 - Распределение рецепторов в разных слоях кожи малых половых губ

Зависимости экспрессии и распределения андрогеновых и эстрогеновых рецепторов от степени вирилизации наружных половых органов выявлено не было.

Таблица 31 - Общий процент иммунопозитивных клеток в зависимости от степени вирилизации наружных гениталий.

Тип рецептора	Степень вирилизации по Прадеру		Достоверность
	3	4	
ЭР $\alpha$	15,4% (12; 18,35)	20,8% (14,7; 25)	p=0,5
ЭР $\beta$	94% (86,2; 96,2)	92,6% (88,1; 96,7)	p=0,9
AP	15,6% (7,08; 20,9)	10,4% (6,04; 11,9)	p=0,2

Степень вирилизации наружных половых органов отражает выраженность внутриутробной гиперандрогении. Следовательно, отсутствие различий в экспрессии как эстрогеновых, так и андрогеновых рецепторов при разной степени выраженности вирилизации наружных гениталий свидетельствует о незначительном влиянии внутриутробной гиперандрогении на закладку рецепторов к половым гормонам у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников.

Интересно отметить, что достоверных различий в проценте иммунопозитивных клеток у девочек младше 4-х лет по сравнению с девочками старше 6 лет, когда начинается адренархе, выявлено не было. Как и не отмечено корреляции между уровнем 17ОНП и процентом клеток экспрессирующих ЭР и АР (коэффициент корреляции  $ЭР\alpha = -0,54$ ;  $ЭР\beta = -0,11$ ;  $АР = 0,4$ ). Эти данные позволяют предположить, что экспрессия рецепторов к половым гормонам зависит от внутриутробной закладки, и существенно не зависит от уровня половых гормонов.

Материал стенки влагалища для проведения иммуногистохимического исследования был получен у 8 девочек во время проведения интроитопластики, среди них было 3 девочки с сольтеряющей формой и 5 девочек с простой вирильной формой ВДКН. Медиана возраста проведения интроитопластики в этой группе составил 16,75 лет (15,2; 17,65). Степень вирилизации наружных половых органов варьировала от 2 стадии по Прадеру у одной пациентки, до 3 стадии – у 3-х и 4 стадии у 2-х девочек. У двух пациенток, которым первый этап феминизирующей пластики был проведен по месту жительства, не имелось сведений о степени вирилизации гениталий при рождении. Все пациентки были компенсированы по гиперандрогении на момент проведения хирургического лечения, медиана уровня 17ОНП в сыворотке крови составила 13,8 нмоль/л (5,54; 31,9), уровня тестостерона – 0,2 нмоль/л (0,17-0,5).

По результатам иммуногистохимического исследования общий процент иммунопозитивных ЭР $\alpha$  клеток в слизистой влагалища составил 49,5% (41,8; 58,7). Иммунореактивность в эпителиальном слое была достоверно выше, чем в собственной пластинке (61,3% (55,7; 65,7) против 23,7% (14,3; 43,9), соответственно,  $p < 0,01$ ). В эпителиальном слое ЭР $\alpha$  локализовались в клетках базального-парабазального слоя вдоль базальной мембраны (73,8% (60,8; 87,2)) и в меньшем проценте в клетках промежуточного слоя (52,1% (49,6; 54)), разница достоверна ( $P < 0,05$ ). В поверхностном слое слизистой оболочки влагалища клеток, экспрессирующих ЭР $\alpha$  не выявлено. В собственной пластинке слизистой



влагалища ЭР $\alpha$  были выявлены в фибробластах и гладкомышечных клетках. Преобладание ЭР $\alpha$ -позитивных клеток преимущественно в базально-парабазальном слое слизистой влагалища свидетельствует о значимой роли эстрогенов в дифференцировке и пролиферации клеток влагалищного эпителия.

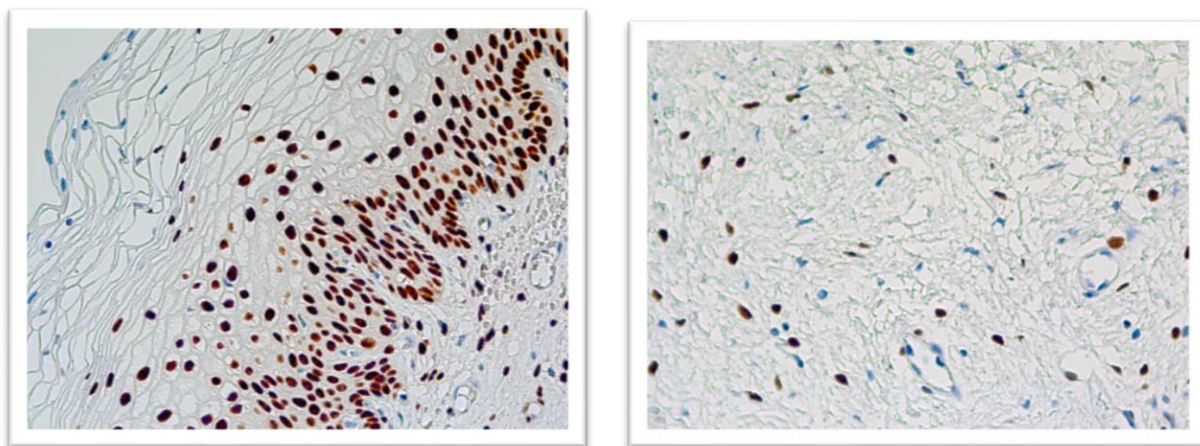


Рисунок 31 - Ядерное окрашивание ЭР $\alpha$  в слизистой влагалища: правая панель – базальный и промежуточный слой эпителия, х400; левая панель – фибробласты собственной пластинки, х400

Экспрессия ЭР $\beta$  в слизистой дистальной части влагалища оказалась сопоставимой с экспрессией ЭР $\alpha$ , общий процент иммунопозитивных клеток составил 48,1% (34,5; 67,7). В эпителиальном слое ЭР $\beta$  локализовались преимущественно в базальном-парабазальном слое по сравнению с промежуточным (77% (62,7; 91,6) против 54,7% (25; 72,6),  $p < 0,05$ , соответственно), в отличие от ЭР $\alpha$ , ЭР $\beta$  встречались в единичных клетках функционального поверхностного слоя. В собственной пластинке ЭР $\beta$  локализовались в фибробластах и в эндотелии сосудов, где отмечалось не только ядерное, но и цитоплазматическое окрашивание. Число иммунопозитивных клеток в эпителиальном слое и в собственной пластинке статистически значимо не различалось (55,7% (40,9; 80,3) против 45,1% (32,7; 62,7), соответственно,  $p > 0,05$ ).

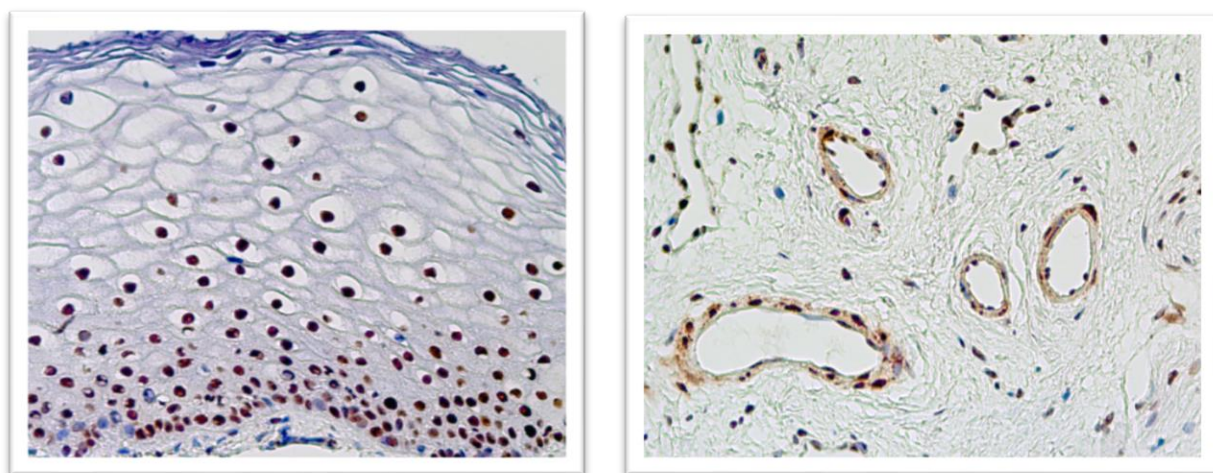


Рисунок 32 - Окрашивание ЭРβ в слизистой влагалища: левая панель - экспрессия ЭРβ в базально-парабазальных и промежуточных клетках эпителия, х400; правая панель - ЭРβ в фибробластах и эндотелии сосудов собственной пластины, х400

По результатам ИГХ-окрашивания в слизистой оболочке влагалища отмечалась очень слабая экспрессия андрогеновых рецепторов, общий процент АР-позитивных клеток составил всего 6,6% (3,6; 16,5). В эпителиальном слое АР были локализованы только в базальном слое вдоль базальной мембраны, в строме встречались единичные АР-позитивные фибробласты (Рисунок 33). Число АР-позитивных клеток в эпидермисе было ниже, но статистически значимо не отличалась от такового в дерме (5,4% (2; 18,1) против 8,4% (2,3; 18,8), соответственно,  $p > 0,05$ ) (Рисунок 33).

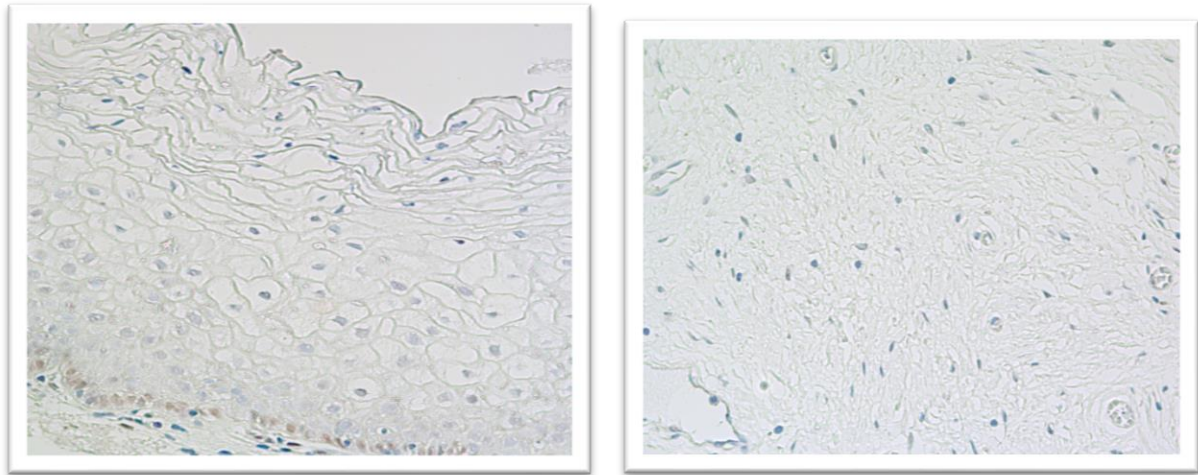


Рисунок 33 - Ядерное окрашивание AP в слизистой влагалища: левая панель - AP в базальных клетках эпителия слизистой, х400; правая панель - единичные AP-позитивные фибробласты стромы, х400

В целом распределение андрогеновых и эстрогеновых рецепторов в слизистой оболочке влагалища у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников не отличается от распределения у здоровых женщин репродуктивного возраста (Рисунок 34).

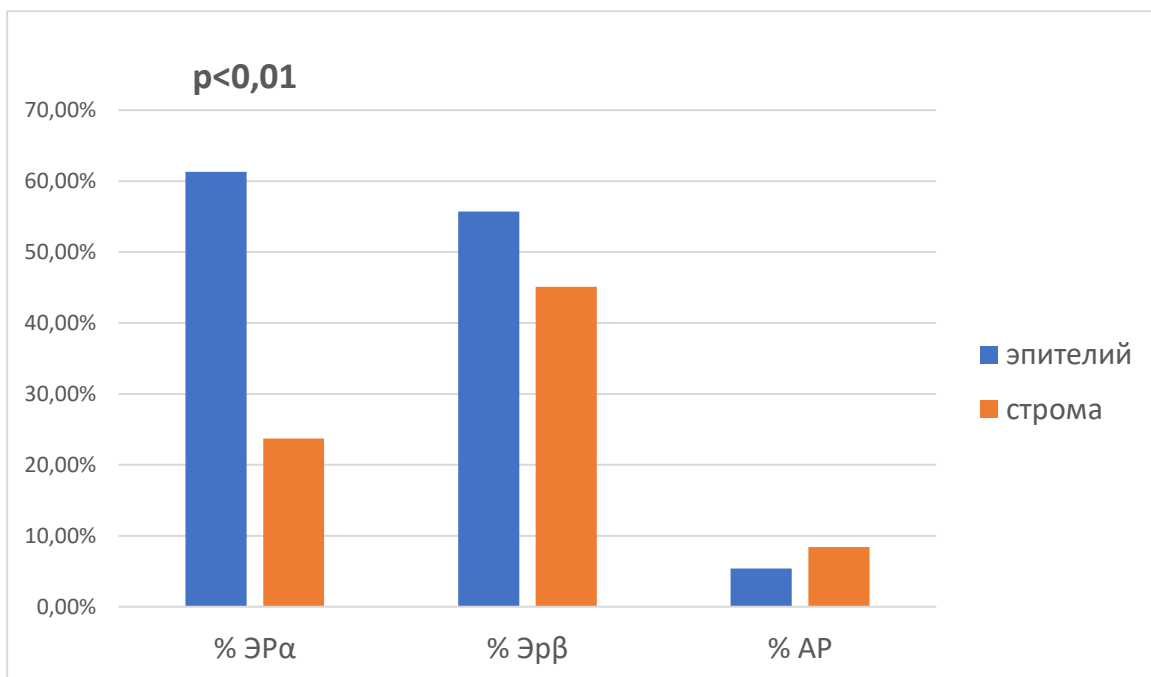


Рисунок 34 - Распределение эстрогеновых (ЭР $\alpha$  и ЭР $\beta$ ) и андрогеновых (AP) рецепторов в слизистой оболочке влагалища

При иммуногистохимическом исследовании ЭР и АР у женщин-транссексуалов, готовящихся к операции по смене женского пола на мужской, было показано, что длительный прием препаратов тестостерона приводит к истончению и снижению пролиферации вагинального эпителия (отсутствие в эпидермисе клеток поверхностного слоя, истончение промежуточного слоя), а также к снижению в слизистой влагалища экспрессии мРНК ЭРа и ЭРβ и к увеличению экспрессии мРНК АР. По нашим данным статистически значимой корреляции между количеством рецепторов ЭРа, ЭРβ, АР и показателями андрогенов (тестостерон, 17ОНП) выявлено не было. Но такой результат может объясняться тем фактом, что все пациентки перед проведением II этапа феминизирующей пластики находились в состоянии компенсации в течение 6-12 месяцев, т.е. имели низкий уровень тестостерона в сыворотке крови. Число клеток, несущих рецепторы, и их локализация во влагалище не различались между пациентками с сольтерющей и вирильной формами, с различной вирилизацией гениталий, а также с регулярным и нерегулярным менструальным циклом. Последнее подтверждается данными литературы, доказывающими отсутствие изменения экспрессии эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в зависимости от возраста, фазы и характера менструального цикла [203; 127].

Полученные данные опровергают нашу гипотезу о том, что внутриутробная гиперандрогения у девочек с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы влияет на эмбриональную закладку рецепторов к половым стероидам в тканях наружных половых органов, снижая тем самым чувствительность к эстрогенам в постнатальный период.

### 3.3.3. Половое развитие у мальчиков с врожденной дисфункцией коры надпочечников

#### 3.3.3.1. СТАНОВЛЕНИЕ ПУБЕРТАТА И РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ У МАЛЬЧИКОВ С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

При анализе развития половой системы у мальчиков с ВДКН мы изучили возраст вступления в пубертат, структуру и функцию гонад к моменту окончания пубертата и оценили предикторы фертильности у подростков с ВДКН.

При оценке полового развития у мальчиков с ВДКН нельзя опираться на классическую систему Таннера, т.к. надпочечниковая гиперандрогения может приводить к прогрессии полового оволосения и увеличению размеров полового члена в отсутствии активации гонад. Следовательно, единственным клиническим признаком гонадотропинзависимого полового развития у мальчиков с ВДКН может служить размер яичек.

Для оценки возраста вступления в истинный пубертат была выделена группа пациентов с объемом яичек по данным орхидометра более 4мл и менее 6мл (маркер активации истинного пубертата). Данная группа состояла из 66 мальчиков, среди них сольтеряющая форма была у 29 мальчиков, простая вирильная – у 37 мальчиков. Средний возраст начала гонадотропинзависимого полового развития составил 8,96 лет (6,64; 11 ,07), что значительно ниже, чем в популяции, где самый ранний возраст составляет 9 лет, а средние показатели 11,5-12 лет. При сольтеряющей и при вирильной форме ВДКН возраст вступления в истинный пубертат достоверно не отличался. Медиана костного возраста на момент начала истинного пубертата в группе составила 13,5лет (12;14). Раннее начало пубертата снижает ростовой прогноз у пациентов, поэтому двадцати семи пациентам (из 67) была рекомендована терапия пролонгированными аналогами гонадотропин-рилизинг гормона с целью блокировать пубертат, тем самым замедлить прогрессирование костного возраста. Среди пациентов, которым было назначено лечение, блокирующее гонадотропинзависимое половое развитие, только 7 пациентов были с сольтеряющей формой, и 20 мальчиков - с простой вирильной

формой. Это объясняется тем, что большинство пациентов в нашей группе были рождены до 2006г, т.е. до начала неонатального скрининга, следовательно, диагноз вирильной формы им был поставлен в возрасте 5,2 года (4,3; 7,0), когда костный возраст значительно опережал паспортный 13,5лет (11,5;14).

Максимального размера яички достигают к концу пубертата, т.е. к 4-5 стадии по шкале Таннер. Для анализа развития гонад была выделена группа пациентов с половым развитием, соответствующим 4 -5 стадии по Таннер. Данная группа состояла из 49 пациентов, медиана возраста - 14,1 лет (12,4;16,5), медиана костного возраста - 16 лет (14;17). Была подобрана контрольная группа из 18 мальчиков пубертатного возраста, не имеющих эндокринной патологии и не получавших лечение препаратами глюкокортикоидов и половых стероидов. Контрольная группа была сопоставима по возрасту (медиана возраста составляла 14 лет (12,0;15,0) и стадии полового развития.

Всем пациентам было проведено ультразвуковое исследование мошонки. Объем яичек у пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников оказался достоверно меньше, чем в контрольной группе (7,29мл (4,39; 10,12) против 10,95мл (8,45; 12,2)  $p < 0,01$ ).

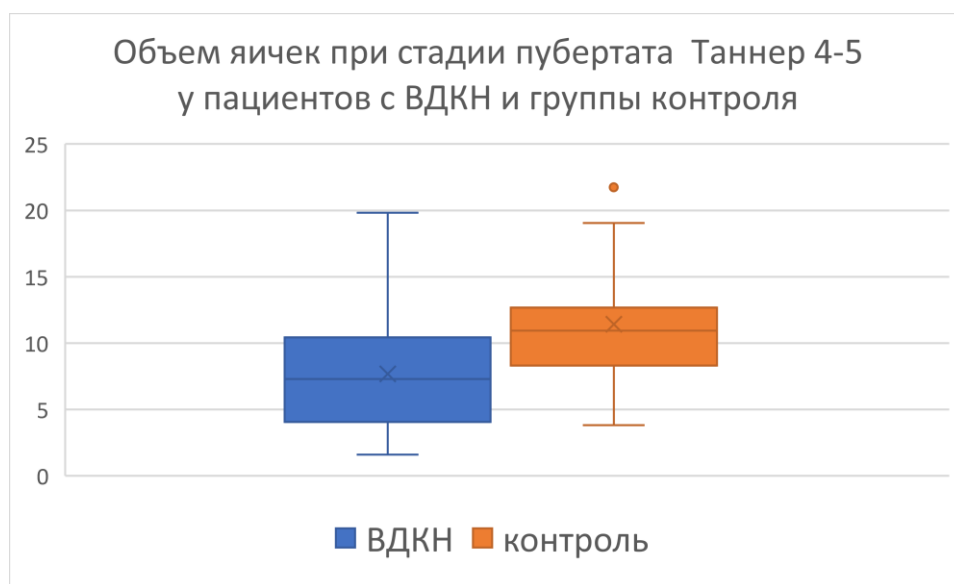


Рисунок 35 - Объем яичек у пациентов с ВДКН в стадии полового развития 4-5 по Таннер в сравнении с группой контроля



При сравнении объема яичек у пациентов с сольтерьющей формой и с простой вирильной достоверных различий выявлено не было (при сольтерьющей форме медиана объема яичек составляла 6,89мл (4,7; 10,84) против 7,5мл (4,23; 9,73) при простой вирильной форме).

Ингибин В является продуктом клеток Сертоли, и может быть использован как косвенный маркер сперматогенеза у взрослых мужчин. У детей и подростков уровень ингибина В в крови отражает функциональное состояние клеток Сертоли и является предиктором сперматогенеза. В нашей группе обследованных пациентов медиана уровня ингибина В составила 151,7нг/мл (105,87; 203,73), что оказалось достоверно ниже, чем в группе контроля (242,11нг/мл (177,4; 317,37)). Следует отметить, что уровень ингибина В у подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников определялся в пределах референсных значений. Как и при сравнении объема яичек не было выявлено различий при сольтерьющей и при вирильной форме заболевания, так и уровень ингибина В не различался при разных формах (132,1нг/мл (115,2; 194,6) против 159,9нг/мл (115,1; 201,2)).

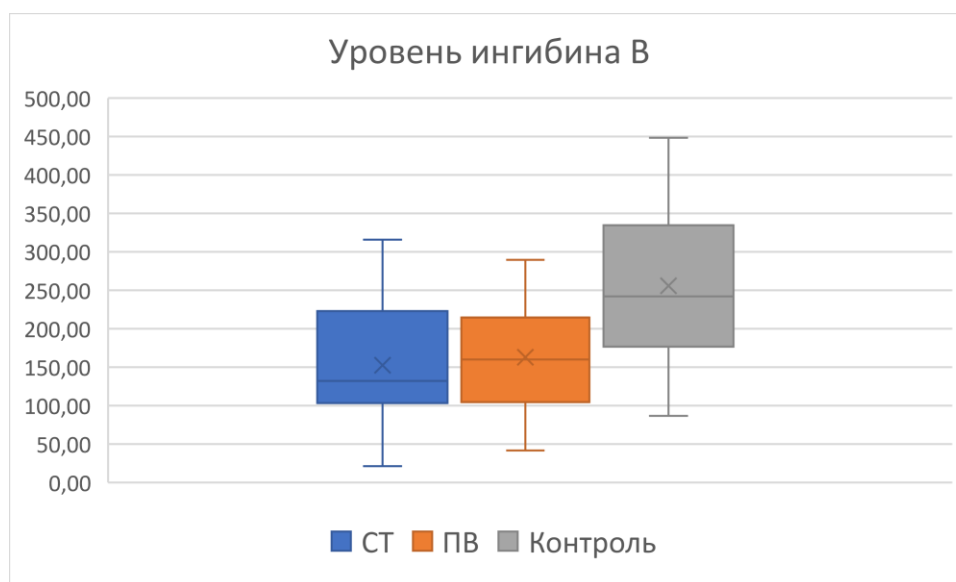


Рисунок 36 - Уровень ингибина В у пубертатных пациентов с сольтерьющей и вирильной формой ВДКН и в группе контроля

При проведении корреляционного анализа имелась положительная статистически значимая корреляционная связь между уровнем ингибина В и размером тестикул ( $r=0,64$ ) и уровнем тестостерона крови ( $r=0,63$ ), аналогичная

связь выявлена и в группе контроля. Это отражает процесс естественного пубертатного развития, когда активация системы гипоталамус-гипофиз-гонады приводит к созреванию клеток Лейдига и Сертоли и к увеличению объема яичек. При этом не было выявлено достоверной связи между уровнем ингибина В и показателями компенсации заболевания (17ОНП, АКТГ, ренин) как на момент обследования, так и за период двух лет, предшествующих обследованию.

Снижение объема тестикул и уровня ингибина В у пациентов с ВДКН позднего пубертатного возраста свидетельствует о снижении репродуктивных возможностей у пациентов с ВДКН. Можно предполагать, что проблемы репродуктивной системы у мальчиков с ВДКН закладывается уже в период детства. Ранний возраст вступления в истинный пубертат обусловлен надпочечниковой гиперандрогенией, которую не удастся контролировать на всем протяжении детства, даже у тех пациентов, которые регулярно наблюдаются у врачей. Сниженный уровень ингибина В у пациентов с ВДКН отражает дисфункцию клеток Сертоли. В норме, с наступлением пубертата и повышением концентрации ФСГ, начинается процесс функционального созревания клеток Сертоли, когда они начинают формировать между собой плотные контакты, создавая структуры для созревания сперматозоидов, а сами при этом теряют способность к пролиферации. Можно предположить, что ранний возраст активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы приводит к недостаточной пролиферации клеток Сертоли. В тоже время, персистирующая надпочечниковая гиперандрогения приводит к снижению уровня гонадотропных гормонов: снижение ЛГ вызывает уменьшение уровня интратестикулярного тестостерона, что в совокупности со снижением уровня ФСГ ведет к недостаточной стимуляции клеток Сертоли и негативно влияет на созревание сперматогенного эпителия.

### 3.3.3.2. РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧЕК ИЗ ЭКТОПИРОВАННОЙ НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ ТКАНИ

При проведении УЗИ мошонки у 80 пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы у 15 пациентов были выявлены опухоли яичек из



эктопированной надпочечниковой ткани (TART). Таким образом, частота TART в нашей группе составила 18,75%, что сопоставимо с мировыми данными, где частота опухолей среди пациентов пубертатного возраста составляет 20-25%, тогда как среди взрослых пациентов частота увеличивается до 60%. Характеристика пациентов с TART представлена в таблице ниже.

Таблица 32. Характеристика пациентов с опухолями яичек из эктопированной надпочечниковой ткани (TART).

Пациент №	Форма ВДКН	Возраст выявления TART, лет	Стадия пубертата по Таннер	КВ на момент выявления TART, лет	Стадия TART	Объем яичек по УЗИ (D/S ), мл	Длительность отсутствия терапии	Генотип
№1 Г.	СТ	4	4	12	4	5,2/5,7	4,8	P453S +/+
№2 З.	СТ	18	5	18	3 (D)*	4,65/7,33	0	Del +/+
№3 Л.	СТ	15	3	18	3	6,24/3,82	0,5	I2spl +/+
№4 М.	СТ	10	1	11	3	1,62/0,7	0	I2spl+/- I172N +/-
№5 Пс.	СТ	10	3	13,5	4	7,36/6,2	1	R356W +/-
№6 Р.	ПВ	8	2	16	2	5,45/5,83	5,8	R483W +/+
№7 Ск.	СТ	6	2	13,5	4	1,72/1,52	6,5	I2spl +/+
№8 Сн.	СТ	12	3	14,5	4	10,3/8,14	1	Q318X +/+
№9 См.	СТ	13	3	14,5	3	3,8/4,1	1	I2spl +/+

Пациент №	Форма ВДКН	Возраст выявлен ия TART, лет	Стадия пуберт ата по Таннер	КВ на момент выявлени я TART, лет	Стадия TART	Объем яичек по УЗИ (D/S ), мл	Длитель ность отсутств ия терапии	Генотип
№10 Ст.	СТ	17	5	18	5	6,55/7,12	17	Del +/+
№11 Еп.	СТ	17	4	17	4	3,3/2,8	17	Del +/+
№12 К.	СТ	11	2	14	2	3,5/2,7	1	I2spl +/+
№13 Пх.	СТ	16	4	17	3 (S)*	16,2/9,4	0	Del +/+
№14 Ч.	СТ	13	5	15	4	9,0/10,9	0	Del +/+
№15 Б.	СТ	5	1	10	2	1,0/0,8	2	Q318X +/+

\*одностороннее поражение D-справа, S-слева.

Среди пациентов с выявленными опухолями в яичках все, кроме одного (№6), были с сольтерьющей формой заболевания, частота выявления TART в группе пациентов с сольтерьющей формой составила – 28,6% (14/49), а в группе с вирильной форме – 3,2% (1/31).

У всех пациентов TART был выявлен с помощью УЗИ органов мошонки. В одном случае (при TART 5 стадии) наличие опухолей было заподозрено при клиническом осмотре, по данным пальпации определялась неоднородность структуры яичек в виде бугристых уплотнений. Это подтверждает данные литературы, свидетельствующие о том, что пальпаторно TART может быть выявлен только на поздних стадиях, когда размеры опухолей превышают 2см [74]. При проведении УЗИ яичек TART представляли собой зоны пониженной эхогенности с нечеткими контурами в средостенье яичка, по данным

доплерографии выявлялся активный внутриузеловой кровоток. При значительном размере образований отчетливо выявлялась компрессия здоровой ткани яичка.



Рисунок 37 -. Эхографические признаки TART: гипохойное образование в средостении яичка, компрессия здоровой ткани яичка

Вследствие отсутствия четких границ TART по данным УЗИ, не всегда возможно достоверно определить размеры и объем опухолевой ткани. Применение эластографии в некоторых случаях помогло четче определить границу между здоровой тканью яичка и эктопированной надпочечниковой тканью. Другим методом визуализации является МРТ органов мошонки. МРТ в нашей группе было проведено 4 пациентам. TART имели гиперинтенсивный сигнал на T1 взвешенных изображениях и гипоинтенсивный сигнал на T2 взвешенных изображениях с супрессией сигнала от жировой ткани (Рисунок 38). Преимуществом данного метода визуализации является возможность точно оценить размеры опухоли и подсчитать объем пораженной и здоровой ткани яичка. Однако, учитывая стоимость и длительность исследования, рекомендовать проведение МРТ яичек можно в сомнительных случаях или при планирующемся хирургическом лечении.

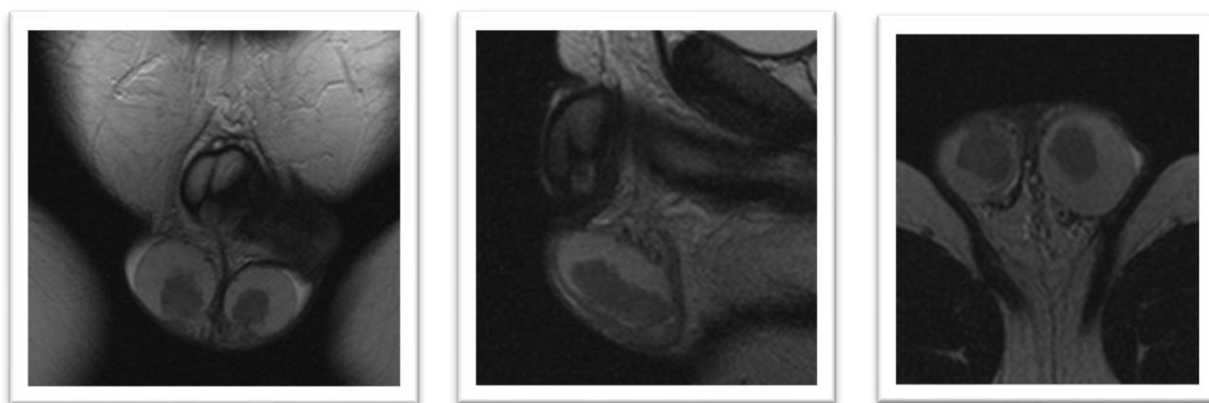


Рисунок 38 МРТ яичек у пациентов с ВДКН (режим T2 с подавлением жировой ткани)

В двух случаях TART локализовались в одном яичке, во всех остальных случаях процесс был двусторонний. Самый ранний возраст выявления TART – 4 года. У двух пациентов (№4 и №15) TART был выявлен при отсутствии признаков истинного полового развития, т.е. в допубертатном возрасте, что исключает стимулирующее влияние ЛГ на развитие TART. Еще одним подтверждением отсутствия определяющего влияния уровня ЛГ на развитие TART, может служить клиническое наблюдение, когда TART был выявлен у пациента спустя год терапии пролонгированными аналогами гонадотропин-рилизинг гормона.

У всех пациентов уровень онкомаркеров (ЛДГ, АФП,  $\beta$ ХГЧ) был отрицательный. Не было выявлено достоверной связи между конкретной мутацией в гене *CYP21* и частотой выявления TART. У всех пациентов с TART, кроме одного (№4), мутации соответствовали сольтеряющей форме заболевания и относились к генотипам группы 0 и А. У единственного пациента с клинически вирильной формой (№6), мутация R483W, которая была найдена в гомо/гемизиготном состоянии, по данным литературы коррелирует с сольтеряющей формой. В нашем случае диагноз ВДКН пациенту был установлен только в возрасте 5 лет 9 мес, ни до начала терапии, ни на фоне терапии глюкокортикоидами не было отмечено клинических проявлений сольтеряющего синдрома. У другого пациента (№6), несущего две гетерозиготные мутации I2splice (группа А) и I172N (группа В), что предсказывает фенотип вирильной формы заболевания, диагноз был установлен

только в возрасте 5 лет, но из анамнеза известно, что на первом году жизни у ребенка отмечались клинические проявления сольтеряющего синдрома, требующие инфузионной терапии, а в последующем повышенное потребление соли компенсировало клинические симптомы. Таким образом, можно говорить о развитии опухолей в яичках из эктопированной надпочечниковой ткани преимущественно у пациентов с тяжелыми мутациями в гене *CYP21*, приводящими к практически полному отсутствию ферментативной активности, но в то же время об отсутствии корреляционной связи между конкретной мутацией и развитием TART у мальчиков с дефицитом 21-гидроксилазы. Учитывая возникновение TART преимущественно при сольтеряющей форме заболевания, можно предположить влияние высокого уровня ангиотензина 2, способного стимулировать эктопические надпочечниковые клетки.

Для оценки влияния компенсации заболевания на развитие TART было сформировано две группы пациентов с сольтеряющей формой - одна группа с наличием TART, а вторая без изменений в яичках. Уровень 17ОНП на момент обследования был достоверно выше в группе пациентов с TART в сравнении с пациентами с сольтеряющей формой без опухолей яичек (68,9 нмоль/л (43,8; 209,75) у пациентов с TART против 26,3 нмоль/л (6,1; 63) у пациентов без TART,  $p < 0,01$ ). Уровень ренина был выше у пациентов с TART, но различия не носили статистически достоверного уровня (200 мкМЕ/мл (113,1; 303,3) против 81,1 (18,2; 234,2),  $p < 0,07$ ).

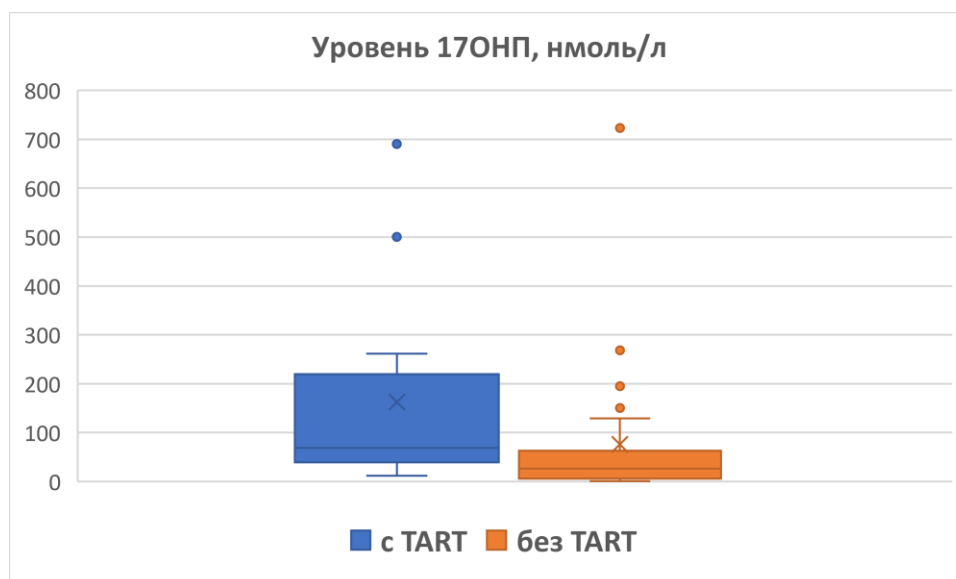


Рисунок 39 - Уровень 17ОНП у пациентов с и без TART

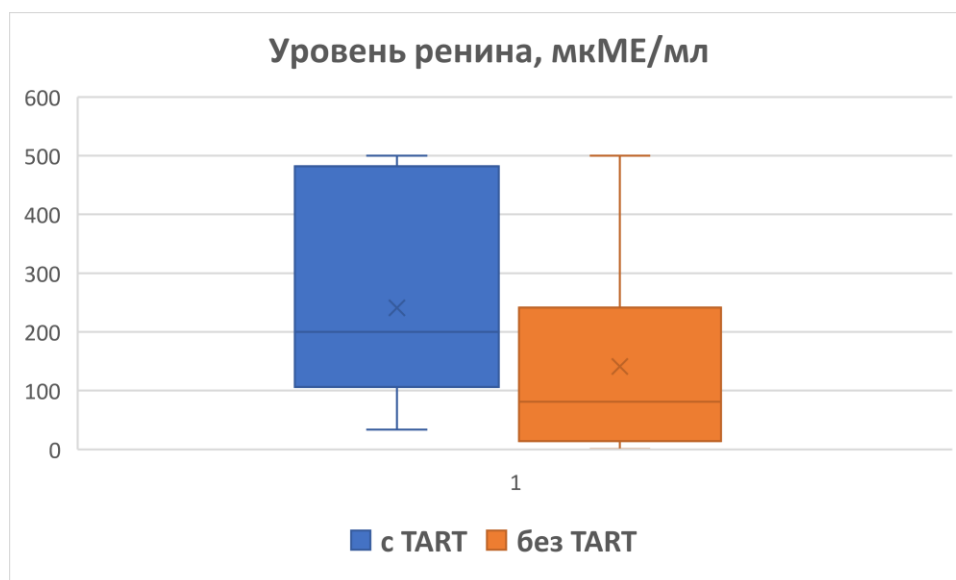


Рисунок 40 - Сравнение уровня ренина плазмы у пациентов с сольтерьющей формой ВДКН с TART и без TART

Полученные результаты позволяют говорить о том, что декомпенсация заболевания является одним из предикторов развития опухолей яичек из эктопированной надпочечниковой ткани. Можно предполагать, что длительно существующий высокий уровень АКТГ и/или ангиотензина-2 является стимулятором гиперплазии эктопической надпочечниковой ткани. Однако, при гипертонической форме ВДКН вследствие дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы по данным литературы частота развития TART выше, чем при дефиците 21-гидроксилазы. Данный факт свидетельствует против гипотезы о значимой роли ангиотензина-2 в

развитии TART. Видимо, определяющим моментом является высокий уровень АКТГ на фоне дисгенезии эктопической надпочечниковой ткани при ВДКН. Чем тяжелее мутация, тем более выраженную дисгенезию надпочечниковой ткани можно ожидать, что справедливо как для дефицита 21-гидроксилазы, так и для 11 $\beta$ -гидроксилазы. Но при гипертонической форме ВДКН чаще отмечается субкомпенсация заболевания из-за отсутствия клинических проявлений процесса. Иллюстрацией к данной гипотезе служит клиническое наблюдение.

*Клинический случай. Пациенту 3. диагноз простой вирильной формы врожденной дисфункции коры надпочечников был установлен в возрасте 2-х лет на основании ускорения роста, признаков преждевременного полового развития и повышения уровня 17ОНП (68нмоль/л). С 2-х лет он получал регулярно терапию гидрокортизоном и флудрокортизоном. Ежегодно проходил обследование по м/ж, согласно представленным выпискам, уровень 17ОНП никогда не превышал 35нмоль/л, что соответствовало компенсации заболевания. Доза флудрокортизона на протяжении всего периода детства составляла 0,05мг/сут, на этом фоне уровень электролитов крови находился в пределах нормальных значений, а уровень ренина не исследовался. С 15 лет у пациента отмечен набор веса и повышение уровня АД до 160/100 мм.ртут.ст. Артериальная гипертензия была расценена как осложнение прогрессирующего ожирения и была рекомендована гипотензивная терапия, на фоне которой стойкого снижения АД не происходило. После достижения 18 лет пациент не проходил регулярного обследования и коррекции терапии. С того же возраста не проводилось контроля АД, и отмечались эпизоды нерегулярного приема препаратов. Изменений в самочувствии пациент не отмечал, продолжал учиться и работать.*

*Поводом для обследования в настоящее время послужило появление гематоспермии. Пациенту в настоящее время 28 лет, он получает терапию кортефом 30мг/сут и кортинеффом 0,05мг/сут. Его рост составляет 172см, вес 69кг. При осмотре не выявлено клинических признаков передозировки глюкокортикоидных препаратов. Уровень АД 160/120 мм.ртут.ст. Половое*

развитие соответствует половозрелому субъекту, яички расположены в мошонке плотноватые при пальпации, объемом 20мл правое и 15мл левое по орхидометру Прадера. Учитывая наличие стойкой артериальной гипертензии у пациента с вирильной формой ВДКН, была заподозрена гипертоническая форма ВДКН вследствие дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы. По результатам гормонального обследования получен низкий уровень ренина крови (2,1мкМЕ/мл (5-45)) и повышенный уровень 11-дезоксикортизола (31,2нмоль/л (0-16)), при нормальном уровне 17ОНП (1,94нмоль/л (1,5-7,2)). Был подтвержден диагноз дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы, при котором с высокой частотой встречаются опухоли яичек из эктопированной надпочечниковой ткани. В дальнейшем диагноз подтвержден результатами молекулярно-генетического исследования – выявлена гомозиготная мутация в гене CYP11B1. Пациенту была изменена терапия: отменены кортеф и кортинефф, назначены преднизолон в суточной дозе 7,5мг и добавлена гипотензивная терапия амлодипином 5мг/сут. Можно говорить о длительной декомпенсации заболевания, поскольку доза глюкокортикоидных препаратов подбиралась по уровню 17ОНП, который нельзя рассматривать как критерий компенсации при гипертонической форме ВДКН.

При дальнейшем обследовании воспалительные заболевания мочеполовой системы были исключены. При проведении УЗИ органов мошонки в правом яичке в верхнем сегменте по задней поверхности определялось гиперваскулярное образование с четкими контурами 1,6х1,2х1,1см, в левом яичке в среднем сегменте аналогичное образование 1,8х1,5х1,3см. На основании наличия врожденной дисфункции коры надпочечников и двустороннего характера поражения яичек было предположено развитие опухолей яичек из эктопированной надпочечниковой ткани, но нехарактерное расположение образования в правом яичке и высокая васкуляризация образования вызвали сомнение в однозначной трактовке. Пациенту была проведена мультиспиральная компьютерная томография забрюшинного пространства, где была выявлена двусторонняя узелковая гиперплазия надпочечников с максимальным размером узлового образования в



медиальной ножке левого надпочечника 23,0x18,1x21,7мм (нативная плотность 32НУ, в артериальную фазу 96НУ, в венозную фазу 74НУ, в паренхиматозную фазу 74НУ), также дополнительные образования в воротах почек до 15мм с активным накоплением контрастного препарата в артериальную фазу (измененные л/уз?). Таким образом, по результатам визуализационных методов обследования нельзя было исключить сочетанную патологию – опухоль правого яичка с метастазами в л/уз забрюшинного пространства. Анализ крови на онкомаркеры не показал патологического повышения АФП, ЛДГ и ХГЧ. Поскольку ни один из методов обследования не позволил дифференцировать злокачественную опухоль яичка от TART, было принято решение о проведении биопсии образований в яичках. Предварительно была проведена криоконсервация спермы. Учитывая размер образований было принято решение о попытке энуклеации образований при возможности с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием и определением дальнейшей тактики. В случае, если это окажется злокачественной опухолью и потребуются проведение орхидэктомии, было запланировано провести интратестикулярный забор сперматозоидов (microTESE) с их последующей криоконсервацией. В том случае, если это окажется TART, то их удаление является одним из способов сохранить здоровую тестикулярную ткань и избежать развития обструктивной азооспермии. По результатам иммуногистохимического исследования, где определялось положительное окрашивание с ингибином и меланом А и отрицательное окрашивание с цитокератином и ХГЧ, был установлен окончательный диагноз: двусторонние опухоли из эктопической надпочечниковой ткани.

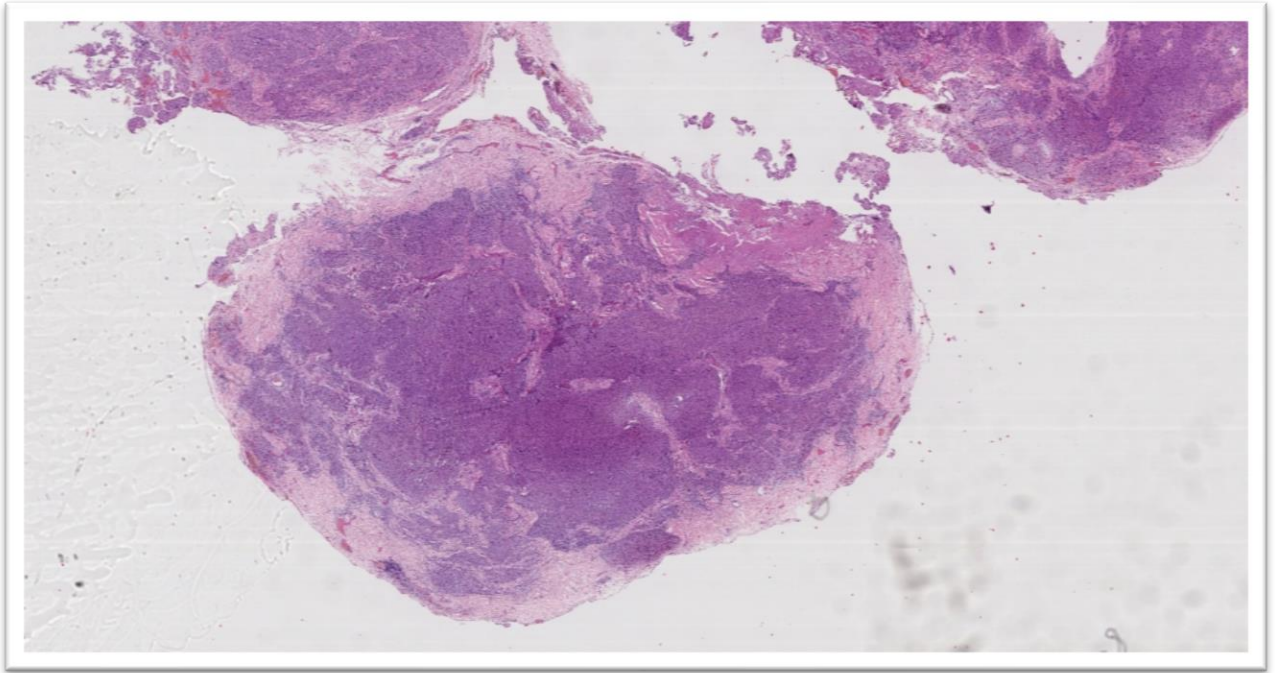


Рисунок 41 - Микроскопическая картина удаленной опухоли яичек (TART) гематоксилин-эозин, ув. х1

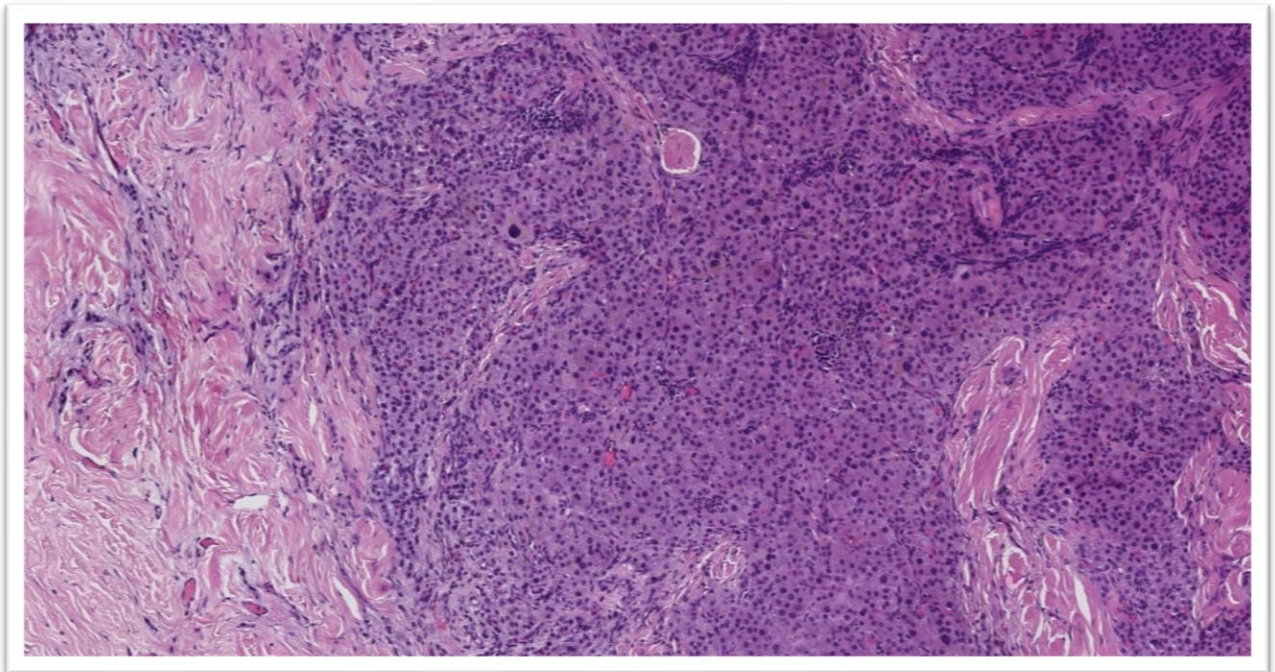


Рисунок 42 - Микроскопическая картина удаленной опухоли яичек (TART) гематоксилин-эозин, ув. х9

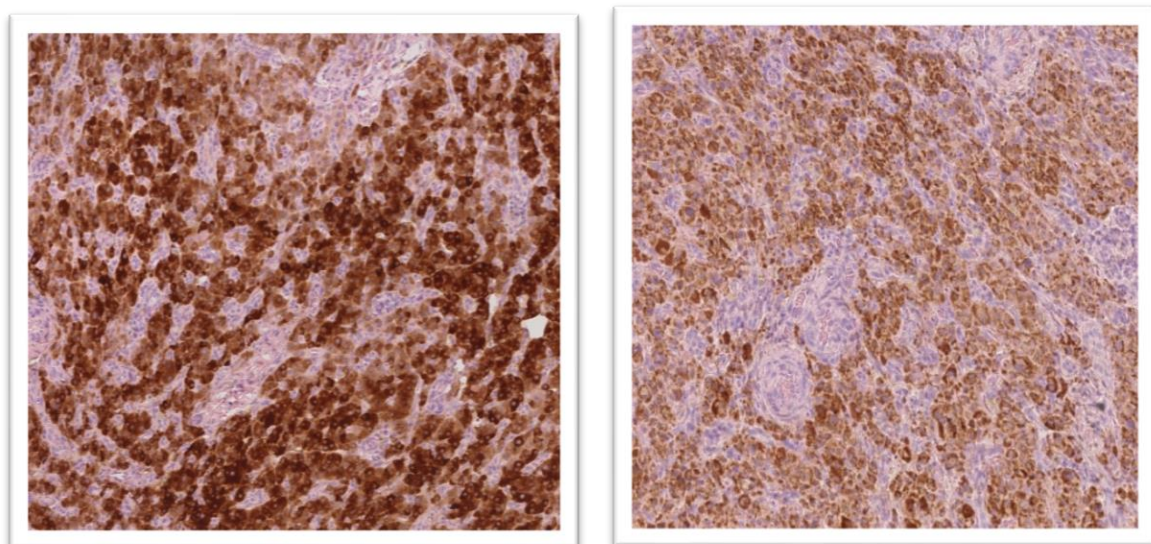


Рисунок 43 - Иммуногистохимическое окрашивание удаленной опухоли на ингибин ув. x10 (левая панель) и на мелан А ув. x15(правая панель)

*Дополнительные образования в области ворот почек с двух сторон можно рассматривать как гиперплазию добавочной надпочечниковой ткани в условиях длительной декомпенсации врожденной дисфункции коры надпочечников. После смены гормональной терапии и включения гипотензивных препаратов самочувствие пациента удовлетворительное, уровень АД стабильный 120-140/80-90 мм.ртут.ст.*

Уровень ингибина В у пациентов, имеющих объемные образования в яичках, оказался достоверно ниже, чем у пациентов с сольтеряющей формой без очаговых изменений в яичках (104,5нг/мл (64,6; 136,5) против 149.8 [127.7;215.4]  $p=0,03$ ). Снижение уровня ингибина В говорит о неблагоприятном воздействии опухолей яичек из эктопической надпочечниковой ткани на здоровую тестикулярную ткань, и позволяет предположить, что наличие TART является одним из факторов, снижающих репродуктивный потенциал у пациентов с ВДКН.



### 3.4. СОПУТСТВУЮЩАЯ ПАТОЛОГИЯ, ВЛИЯЮЩАЯ НА ДИАГНОСТИКУ И ЛЕЧЕНИЕ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

#### 3.4.1. ЯЗВЕННОЕ ПОРАЖЕНИЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Терапия врожденной дисфункции коры надпочечников проводится глюкокортикоидами. Одним из основных побочных эффектов терапии является ее ulcerогенный эффект. У одного из пациентов была выявлена язвенная болезнь 12-перстной кишки и язвенный гастрит. Пациент И. наблюдается в ЭНЦ с 3 мес жизни. Диагноз врожденной дисфункции коры надпочечников дефицита 21-гидроксилазы сольтеряющей формы ему был установлен в 1 мес жизни на основании клинической картины сольтеряющего синдрома с электролитными нарушениями в сочетании с данными наследственного анамнеза (в семье умер ребенок в неонатальном периоде с клинической картиной сольтеряющего синдрома, у которого на вскрытии была выявлена гиперплазия надпочечников). Диагноз у нашего пациента подтвержден результатом молекулярно-генетического исследования — выявлена гомозиготная мутация I2splice, которая может соответствовать сольтеряющей форме заболевания. С 1 мес жизни наш пациент получал терапию гидрокортизоном и флудрокортизоном. В возрасте 15 лет в терапии гидрокортизон был заменен на преднизолон (в связи с отсутствием препарата в аптечной сети). На фоне терапии преднизолоном у мальчика появились боли в животе, в терапию были добавлены обволакивающие и антацидные препараты. Спустя 1 мес у ребенка развилось желудочно-кишечное кровотечение, осложненное постгеморрагической анемией, проводилось стационарное консервативное лечение. При проведении контрольной ЭГДС картина гастрита и рубцующейся язвы 12-перстной кишки. С тех пор ребенок получает постоянную терапию ингибиторами протонной помпы. С 16 лет преднизолон заменен на гидрокортизон. На фоне терапии глюкокортикоидами и минералокортикоидами в сочетании с поддерживающей терапией язвенной болезни (диета и ингибиторы протонной помпы) у пациента имел место однократный рецидив язвы 12-перстной кишки с кровотечением. Пациенту была предложена парентеральная терапия

глюкокортикоидами в виде подкожного введения гидрокортизона с помощью инсулиновой помпы, от которой пациент отказался. В течение последних 5 лет рецидивов язвенной болезни не отмечалось. Среди наблюдаемых регулярно 378 пациентов, больше ни у кого не было выявлено язвенного поражения желудка или 12-перстной кишки. Из чего можно сделать вывод о наличии у пациента сопутствующей патологии, которая осложняет лечение основного заболевания.

### 3.4.2. ДЕФИЦИТ ГОРМОНА РОСТА

При отсутствии неонатального скрининга одним из первых симптомов вирильной формы дефицита 21-гидроксилазы является ускорение роста, лишь затем появляются признаки преждевременного полового развития. Поздняя постановка диагноза ведет к конечной низкорослости, поскольку надпочечниковые андрогены вызывают раннее закрытие зон роста.

Клинический случай: Пациент 3. впервые обследован в ЭНЦ в возрасте 5 лет 1 мес в связи с задержкой роста. Задержка роста у мальчика отмечалась с 2-х лет. На момент первичного обследования в 5 лет рост составлял см ( $SDS$  роста = -2,66), половое развитие соответствовало 1 стадии по Таннер, и имелась небольшая задержка костного возраста (КВ соответствовал 4,5 годам). Ребенку на основании отсутствия выброса СТГ на пробе с клонидином (максимальный выброс составил 2,9 нг/мл) и данных МРТ головного мозга, где была выявлена гипоплазия аденогипофиза и воронки и эктопия нейрогипофиза, был установлен диагноз изолированного СТГ-дефицита. На тот момент у ребенка отмечалась удовлетворительная скорость роста – 7,5 см/год, поэтому от терапии препаратами гормона роста решено было воздержаться. При повторном обследовании в возрасте 6 лет у пациента отмечалась удовлетворительная скорость роста – 6 см/год, при низком уровне ИФР1=64 нг/мл и была выявлена значительная прогрессия костного возраста, который соответствовал 8,5 годам, т.е. на 4 года за предшествующий год. Стадия полового развития была допубертатной, и причина прогрессии костного возраста оставалась неясной. С 6,5 лет в связи с неудовлетворительным ростовым прогнозом была рекомендована

терапия препаратами гормона роста. На фоне терапии у пациента отмечалось ускорение скорости роста. При обследовании в возрасте 7,5 лет скорость роста составляла 11см в год, половое развитие оставалось на допубертатном уровне (отсутствовало половое оволосение, объем тестикул 2мл), отмечалась дальнейшая прогрессия костного возраста до 11,5 лет, т.е. костный возраст увеличился на 3 года за предшествующий год. При гормональном обследовании был выявлен высокий уровень  $17\text{ОНП}=423\text{нмоль/л}$  и высокий уровень тестостерона  $=2\text{нмоль/л}$ , что позволило установить диагноз врожденной дисфункции коры надпочечников. При проведении молекулярно-генетического исследования методом аллель-специфической ПЦР была выявлена гетерозиготная мутация  $\text{P172N}$ . В дальнейшем проведено секвенирование гена  $\text{CYP21}$ , была выявлена вторая мутация  $\text{P459S}$ , что окончательно генетически подтвердило диагноз дефицита 21-гидроксилазы и соответствие данного генотипа простой вирильной форме заболевания. Таким образом, сложность диагностики состояла в сочетании у мальчика врожденного дефицита гормона роста и врожденной дисфункции коры надпочечников. Первый симптом врожденной дисфункции коры надпочечников в виде ускорения роста отсутствовал у ребенка по причине дефицита гормона роста. У нашего пациента есть родной старший брат, который к врачам не обращался. При подробном расспросе выяснилось, что у старшего брата с 3 лет отмечалась высокая скорость роста и в 6 лет появилось адренархе. На момент диагностики заболевания у младшего брата старшему исполнилось 14 лет, и у него при обследовании также выявлена врожденная дисфункция коры надпочечников на основании повышенного уровня  $17\text{ОНП}=220\text{нмоль/л}$  и результатов молекулярно-генетического исследования ( $\text{P172N/P459S}$ ). На момент диагностики заболевания зоны роста у старшего брата были уже закрыты и его конечный рост составляет 161см. Младшему брату на сегодняшний день 11 лет, его рост составляет 143,3см  $\text{SDS}$  роста = -0,33, костный возраст соответствует 13,5 годам, и по результатам обследования у него отмечено начало гонадотропин-зависимого полового развития. Учитывая неблагоприятный ростовой прогноз было решено добавить в

*терапию пролонгированные аналоги гонадотропин-рилизинг гормона для блокирования пубертата.*

*Обычно, при отсутствии неонатального скрининга, диагноз простой вирильной формы мальчикам устанавливается в 3-5 лет на основании преждевременного адренархе. На момент диагностики костный возраст значительно опережает паспортный. Так в нашей когорте пациентов, которым диагноз вирильной формы был установлен на основании клинической картины (т.е. до 2007г, когда была начата процедура неонатального скрининга) конечный рост составил  $161,8 \pm 8$  см. Наличие сопутствующего изолированного дефицита гормона роста в данном случае не только затруднило диагностику дефицита 21-гидроксилазы, но и привело к еще более значимому ухудшению ростового прогноза пациента.*

### 3.4.3. СОЧЕТАНИЕ ДВУХ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Пациент Б. наблюдается в ЭНЦ с 4-х лет 11 мес.*

*Перинатальный анамнез без особенностей. С 3-х лет отмечено ускорение роста, в 4 года появилось половое оволосение, огрубение голоса и угревая сыпь на лице. На тот момент его рост составлял 121,9 см ( $SDS=3,0$ ) и костный возраст соответствовал 13,5 годам, половое развитие соответствовало 3 стадии по Таннер, размер яичек не превышал 2 мл по орхидометру Прадера. По данным гормонального анализа выявлено значимое повышение 17ОНП и тестостерона. На основании клинической картины ложного преждевременного полового развития, ускорения роста и костного возраста и данных гормонального обследования установлен диагноз вирильной формы врожденной дисфункции коры надпочечников. При проведении молекулярно-генетического исследования выявлена гомо(геми)зиготная мутация I2splice. С 4 лет 11 мес ребенок получает терапию таблетированным гидрокортизоном.*

*В связи с крайне неудовлетворительным ростовым прогнозом (конечный прогнозируемый рост, рассчитанный по методу Bayley-Pinneau, составлял 139 см)*

*с 5,5 до 7,5 лет пациент получал терапию препаратами гормона роста. С 6 до 9 лет в связи с началом гонадотропин-зависимого преждевременного полового развития ребенок получал пролонгированные аналоги гонадотропи-рилизинг гормона.*

*С 5 лет у ребенка отмечались частые переломы конечностей после травмы, всего с 5 до 14 лет было 7 переломов трубчатых костей предплечья, голени, кистей и стоп и один перелом позвоночника после падения на спину с высоты своего роста в возрасте 11 лет. По данным денситометрии позвоночника в возрасте 12 лет выявлена остеопения ( $Z$  критерий= -1,7). После 14 лет переломов костей не отмечалось, при этом мальчик занимается активными видами спорта. По данным денситометрии в возрасте 15 лет снижения минеральной плотности костной ткани не отмечалось.*

*При обследовании в возрасте 7,5 лет выявлено повышение активности ренина плазмы при нормальных показателях электролитов крови и отсутствии клинических проявлений сольтеряющего синдрома, в терапию добавлен кортинефф. На фоне чего произошло снижение ренина крови до нормальных показателей. С 10 лет у ребенка появились эпизоды неукротимой рвоты, требующие инфузионной терапии, которые расценивались как проявления сольтеряющего синдрома, но уровень электролитов в моменты кризов не измерялись. При обследовании у гастроэнтеролога выявлена дискинезия желчевыводящих путей и рекомендована симптоматическая терапия. Однако, приступы неукротимой рвоты продолжались с обострением в летнее время года.*

*При обследовании в возрасте 12,5 лет в биохимическом анализе крови выявлена гиперкальциемия (2,74ммоль/л), гипофосфатемия (1,19ммоль/л), по данным УЗИ была выявлена гиперплазия правой верхней околощитовидной железы и установлен диагноз первичного гиперпаратиреоза. При проведении молекулярно-генетического исследования с помощью NGS с использованием панели генов, ответственных за врожденные нарушения фосфорно-кальциевого обмена патологии выявлено не было. При уточнении наследственного анамнеза было*



выяснено, что папа ребенка страдал язвенной болезнью желудка, никаких опухолевых заболеваний в семье не отмечалось. Пациенту была рекомендована гипокальциемическая диета, на фоне которой произошла нормализация уровня кальция крови. С тех пор прекратились приступы неукротимой рвоты. При динамическом наблюдении уровень кальция и паратгормона определялись в пределах нормальных значений, но сохранялась гипофосфатемия (ПТГ=54,7нмоль/л (15-65),  $Ca^{++}$ =1,22ммоль/л (1,03-1,29), фосфор=1,34ммоль/л (1,45-1,78)).

В 16 лет у пациента возобновились приступы рвоты, при обследовании выявлено повышение уровня кальция крови (ПТГ=56,8нмоль/л (15-65),  $Ca$ =2,74ммоль/л (2,1-2,55), фосфор=1,1ммоль/л (1,45-1,78)) и выявлена гиперкальциурия (суточная экскреция кальция составляла 7,64ммоль/сут (2,5-7,5)). При проведении молекулярно-генетического исследования выявлено две гетерозиготные мутации в гене *MEN1*: с.744 C>G p.I248M; с.734\_745 del p.P245\_D248del. Обе мутации ранее не описаны и патогенность их не определена. У мамы пациента данных мутаций не выявлено, папе анализ не проводился (погиб). При дальнейшем обследовании у пациента по данным УЗИ выявлена гиперплазия обеих правых и левой верхней паращитовидных желез. При проведении МРТ головного мозга выявлена гормонально-неактивная микроаденома гипофиза 5мм. По данным МРТ забрюшинного пространства выявлены множественные образования тела и хвоста поджелудочной железы, размеры максимального составляли 2,3см. При исследовании уровня гормональных маркеров нейроэндокринных опухолей выявлено небольшое повышение уровня хромогранина  $A = 137,8$ нг/мл (до 108), глюкагона = 437нг/мл (до 400) и ВИП = 410пг/мл (до 180), значимое повышение уровня панкреатического полипептида = 3256пг/мл (до 800) и нормальный уровень гастрина = 22,4пг/мл (13-115). На основании полученных результатов пациенту был установлен конкурирующий диагноз синдрома множественных эндокринных неоплазий I типа: первичный гиперпаратиреоз,

*гормонально-неактивная микроаденома гипофиза, множественные гормонально-неактивные нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы.*

*Наличие у пациента врожденной дисфункции коры надпочечников привело к отсроченной диагностике второго моногенного заболевания – синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа. Клинические проявления гиперкальциемии в виде приступообразных неукротимых рвот расценивались как сольтеряющие кризы, обусловленные врожденной дисфункцией коры надпочечников. Назначение пациенту препаратов гормона роста могло ускорить рост нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы или микроаденомы гипофиза.*

*В настоящее время пациенту планируется проведение хирургического лечения образований поджелудочной железы. Показаниями к операции является размер образований, что не позволяет исключить их злокачественный характер. При проведении МСКТ брюшной полости и грудной клетки признаков метастатического поражения выявлено не было. Для определения хирургической тактики было выполнено эндоскопическое УЗИ (Рисунок 44), расположение образований позволяет планировать удаление тела и хвоста поджелудочной железы с попыткой энуклеации образования крючковидного отростка.*

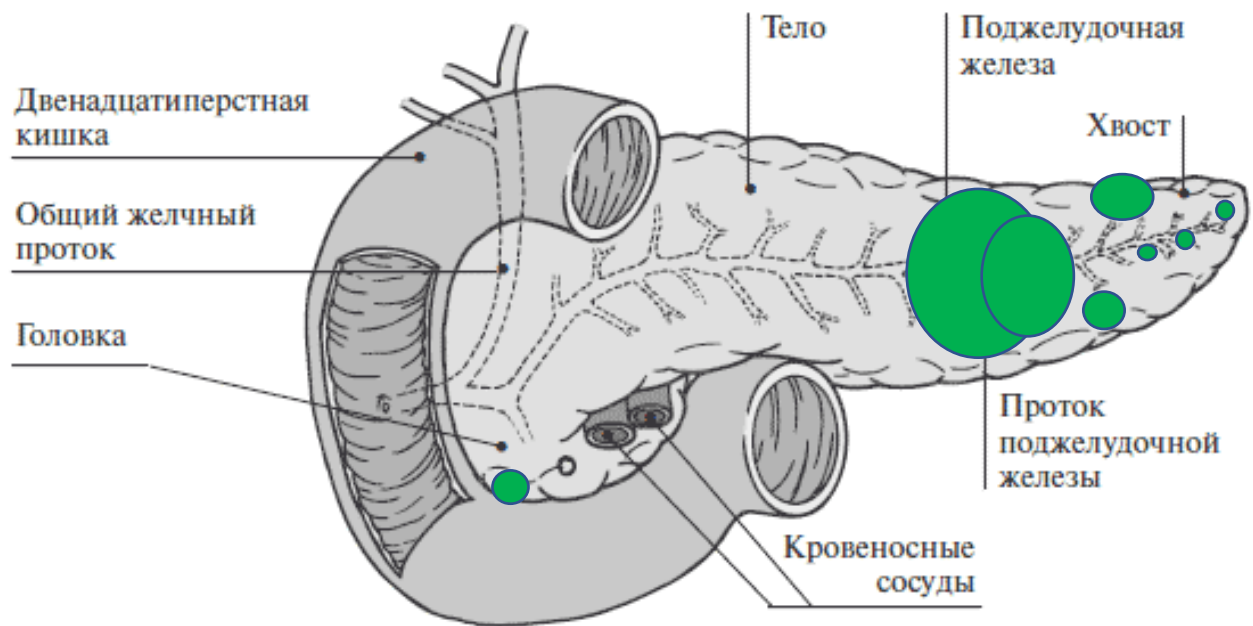


Рисунок 44 - Схема расположения образований в поджелудочной железе у пациента Б. по результатам эндоскопического УЗИ

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начиная с середины 2006 г. в России проводится тотальный неонатальный скрининг на выявление врожденной дисфункции коры надпочечников. Более 10 лет процедуры скрининга позволяют оценить распространенность дефицита 21-гидроксилазы в Российской популяции. За проанализированный период с 2010 по 2015гг охват скринингом на ВДКН составил 96,2%, исследование было проведено у 9 млн 531 тыс 917 новорожденных и выявлено 989 случаев врожденной дисфункции коры надпочечников. Частота дефицита 21-гидроксилазы в Российской популяции составила 1 случай на 9638 живых новорожденных. Данный показатель выше распространенности, рассчитанной по результатам скрининга первого миллиона новорожденных во всем мире – 1:14198. Ближе всего к нашим данным оказалась частота ВДКН в странах Южной Америки и в Северной Европе [114; 221; 238]

Можно было бы предположить, что на территории России максимальная частота ожидалась бы в Северо-Западном регионе, учитывая этническую близость народов данного региона к жителям Скандинавии, и в регионах с высокой частотой близкородственных браков. Однако, данные предположения не нашли подтверждения, самая высокая частота заболевания оказалась в Уральском Федеральном округе (1:6749), а в Северо-Западном регионе частота ВДКН оказалась минимальной 1:14876, что соответствует показателю в Центральной Европе.

Согласно данным литературы дефицит 21-гидроксилазы встречается во всем мире, но распространенность данного заболевания отличается в разных странах более чем в 2 раза. Интересно, что и частота распределения патогенных мутаций в гене *CYP21A2* отличается в разных этнических группах. В нашем исследовании получена достоверная разница распределения гаплотипов в отдельных этнических популяциях. Абсолютное доминирование мутации I2spl среди удмуртов аналогично распределению мутаций у эскимосов Юппи, в иранской группе

пациентов и среди мексиканцев [68; 270]. Высокая частота встречаемости мутации Q318X в нашем исследовании выявлена у народов Дагестана, что сравнимо с распределением мутаций у арабского населения США и среди восточных индусов [270]. Так же, как и высокий удельный вес мутации R356W у татар и башкир сравним с высокой частотой данной мутации у японцев и хорватов [125; 270]. Помимо интереса с точки зрения популяционной генетики, данные о частоте разных мутаций помогают оптимизировать генетическую диагностику. Применяемый во многих лабораториях метод аллель-специфической ПЦР для частых мутаций проводится последовательно, а значит порядок проведения связан с частотой той или иной мутации в регионе.

В нашем исследовании молекулярно-генетический анализ гена *CYP21* проводился несколькими методами. Всем пациентам на первом этапе была проведена аллель-специфическая ПЦР на 12 частых мутаций. По данным литературы эффективность данной методики составляет 80-85%, что обусловлено именно такой распространенностью частых мутаций, которые конвертированы из псевдогена [263]. В нашей когорте из 1362 детей с установленным диагнозом дефицита 21-гидроксилазы или с подозрением на данный диагноз мутации были выявлены в 80% аллелей. При этом мутации в двух аллелях были выявлены у 85% детей с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы и только у 40% детей с подозрением на неклассическую форму заболевания. Этот результат является закономерным, поскольку клинико-гормональные критерии постановки диагноза классических форм ВДКН высоко информативны, и в данном случае генетическое исследование проводится не с целью подтверждения диагноза, а для предсказания формы у новорожденных и для генетического консультирования семьи. Соответственно, можно сделать вывод, что в Российской популяции имеется такая же, как и в мировой популяции, встречаемость 12 частых мутаций.

Низкий процент выявления частых мутаций в нашей группе пациентов с подозрением на неклассическую форму дефицита 21-гидроксилазы связан с отсутствием четких гормональных диагностических критериев у детей и

подростков. Согласно мировому консенсусу по диагностике ВДКН для подтверждения диагноза должна быть использована проба с введением препарата АКТГ, который отсутствует в настоящее время в России [135]. Именно со сложностями в гормональном подтверждении диагноза, а не с наличием в Российской популяции редких патогенных гаплотипов, связан низкий процент выявления мутаций среди пациентов с подозрением на неклассическую форму дефицита 21-гидроксилазы. В условиях отсутствия диагностического препарата, проведение молекулярно-генетического исследования можно включить в дифференциально-диагностический протокол обследования детей с преждевременным адренархе.

На втором этапе молекулярной диагностики в нашей работе у части пациентов было проведено секвенирование всего гена *CYP21A2* в поисках редких мутаций, не присутствующих в псевдогене. Всего секвенирование было проведено 27 пациентам и редкие мутации были выявлены у 16 из них. Соответственно в 11 случаях диагноз дефицита 21-гидроксилазы был исключен. Среди этих 11 пациентов было 8 девочек с подозрением на неклассическую форму заболевания и 2 мальчика с положительным результатом неонатального скрининга. И в одном случае была установлена гипертоническая форма ВДКН вследствие дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы.

Согласно полученным результатам, можно говорить о необходимости проведения поэтапной генетической диагностики у пациентов с положительным результатом неонатального скрининга. Использование на первом этапе метода аллель-специфической ПЦР позволяет подтвердить диагноз и прогнозировать форму заболевания в 85% случаев. Преимуществом данного метода является его относительная быстрота и низкая стоимость в сравнении с секвенированием всего гена. У оставшихся 15% процентов пациентов необходимо проведение секвенирования всего гена для подтверждения или исключения диагноза. На сегодняшний день опубликовано более 230 мутаций, выявленных в гене *CYP21* с анализом клинической картины и предсказанием формы заболевания [78].

Результаты использования метода MLPA в генетическом анализе демонстрируют необходимость в ряде случаев проведения данного исследования для последующего генетического консультирования семьи и для проведения пренатальной или преимплантационной диагностики. Высокая полиморфность области, где расположен ген *CYP21A2* определяет большое разнообразие гаплотипов у пациентов с ВДКН. В нашем исследовании классические бимодульные гаплотипы были выявлены только в 32,4% случаев (12 из 37 человек), а дупликация гена *CYP21A2* выявлена в 4 случаях. Дупликация гена может приводить к ошибкам в трактовке результатов аллель-специфической ПЦР, когда выявление двух компаундных гетерозиготных мутаций не может служить подтверждением диагноза, учитывая наличие трех копий активного гена. Дифференцировать гомо- и гемизиготные мутации важно для последующего предсказания риска рождения ребенка с тяжелой сольтеряющей формой у пациентов с легкими неклассическими вариантами ВДКН. Так, в случае наличия у пациента гомозиготной мутации, характерной для неклассической формы ВДКН, в следующем поколении может родиться ребенок только с неклассической формой, а при наличии гемизиготной мутации есть вероятность рождения потомства с тяжелой сольтеряющей формой заболевания. Метод аллель-специфической ПЦР не позволяет разграничить гомо- и гемизиготные варианты, если при этом не исследуется кровь родителей, что не всегда возможно. Можно рекомендовать проведение генетического исследования методом MLPA в случае несоответствия клинической картины заболевания генетическому дефекту, выявленному другими методами и в случае генетического консультирования пациентов с гомозиготными мутациями в гене *CYP21*.

Степень тяжести врожденной дисфункции коры надпочечников, а значит и клиническая форма, зависят от остаточной активности фермента 21-гидроксилазы. В свою очередь степень потери ферментативной активности зависит от конкретной мутации гена *CYP21*. На исследованиях *in vitro* было показано, что каждая мутация приводит к разному снижению ферментативной активности для 17ОНП и для

прогестерона, а на клинических данных была выявлена взаимосвязь между конкретной мутацией и клинической формой заболевания. Предсказание клинической формы крайне важно в двух случаях. Во-первых, для пренатальной диагностики. Врожденная дисфункция коры надпочечников является курабельным заболеванием, при котором отсутствуют абсолютные показания к прерыванию беременности, в то же время, качество жизни пациентов коррелирует с клинической формой заболевания. Поэтому при тяжелой сольтеряющей форме некоторые родители выбирают пренатальную или преимплантационную диагностику. Во-вторых, прогноз формы заболевания у новорожденных с положительным результатом скрининга помогает определить схему терапии, воздержаться от назначения терапии при неклассической форме и назначить адекватную дозу минералокортикоидных препаратов при сольтеряющей форме, не дожидаясь сольтеряющего состояния. В нашем исследовании анализ корреляции выявленных мутаций с клинической формой заболевания был проведен у 1067 пациентов. Получены данные о высокой прогностической ценности генотипа группы 0 (т.е. при мутациях, приводящих по данным исследований *in vitro* к полной потере ферментативной активности 21-гидроксилазы), которая составила 95,8%. Несколько ниже, но все равно высокой оказалась прогностическая ценность мутации I2spl (группа А) – 90,5%. Полученные данные совпадают с данными других исследователей, которые также отмечают самую высокую прогностическую ценность генотипа 0 [145; 227; 258]. При этом для мутаций R365W и V237E из группы 0, несмотря на полную потерю ферментативной активности по лабораторным тестам, отмечается большая вариабельность фенотипа, также как и в нашей группе пациентов [85]. Согласно полученным результатам можно сделать вывод, что высокая прогностическая ценность «тяжелых» генотипов позволяет предсказать сольтеряющую форму у новорожденных с положительным результатом скрининга с высокой долей вероятности и начать адекватную терапию.



Значительно ниже оказалась прогностическая ценность «мягких» генотипов. По нашим данным ППЦ в целом для группы С в отношении неклассической формы составила 45%, а для самой частой мутации V281L - 64,4%. Ряд публикаций также говорит о низкой предсказательной ценности генотипов группы С, и чаще это связывают с мутацией Р30L. Для данной мутации характерно не только снижение ферментативной активности, но и снижение стабильности самого фермента, чем и объясняются более тяжелые проявления, чем предсказанные в исследованиях *in vitro*. В нашей группе пациентов мутация Р30L чаще встречалась при вирильной форме (70% при данном генотипе), чем при неклассической. Низкий показатель предсказательной ценности не позволяет ориентироваться только на результаты генетического тестирования для выбора схемы терапии у новорожденных с положительным результатом скрининга.

Также не позволяет предсказать форму заболевания и уровень 17ОНП, полученный в ходе неонатального скрининга. При сравнении 17ОНП в группах с разными генотипами получены достоверные различия между уровнем 17ОНП в группах с сольтеряющими и неклассическими генотипами, но отмечен большой перекрест индивидуальных показателей. Таким образом, для предсказания формы заболевания у новорожденных с положительным результатом неонатального скрининга необходимо ориентироваться на совокупность данных гормонального и молекулярно-генетического исследований. Даже результаты комплексного обследования не могут со 100% вероятностью определить необходимую схему терапии.

Введение тотального неонатального скрининга, безусловно, показало свою эффективность, поскольку частота выросла, на примере Московского региона, где был составлен регистр пациентов, с 1 случая на 17240 новорожденных до 1 случая на 9025 новорожденных. Можно говорить об увеличении количества диагностированных случаев почти в 2 раза за счет введения процедуры скрининга. Практически во всех публикациях получены аналогичные данные по росту частоты ВДКН после введения неонатального скрининга [229; 255; 110].

Введение процедуры тотального неонатального скрининга позволило решить основные вопросы диагностики классических форм дефицита 21-гидроксилазы. Однако, выбор оптимальной терапии на сегодняшний день вызывает вопросы. Данные литературы по длительному катамнестическому наблюдению за пациентами с классическими формами ВДКН указывают на снижение соматического и репродуктивного здоровья. При анализе ростовых показателей пациентов с классическими формами заболевания нами были получены данные о снижении конечного роста у всех пациентов вне зависимости от пола и формы заболевания. Максимальное снижение конечного роста отмечено у пациентов мужского пола с вирильной формой ВДКН, которые не доросли до целевых показателей на 15,8см. Дефицит конечного роста у мальчиков с сольтеряющей формой был несколько меньше – 12,5см, но различия не имели статистической достоверности. У девочек дефицит роста оказался меньше и составил 7-8см по сравнению с целевыми показателями, также без достоверных различий при сольтеряющей и вирильной формах. Согласно последнему метаанализу, опубликованному в 2010 г., средний SDS конечного роста у пациентов с классическими формами ВДКН по совокупности публикаций составил -1,38 [179], что сопоставимо с нашими данными (SDS= -1,49 для общей группы пациентов). Данные о факторах, влияющих на конечный рост пациентов с ВДКН противоречивы. Часть авторов находит зависимость от сроков постановки диагноза и начала глюкокортикоидной терапии [54; 122; 218; 162], при этом другими авторами такой зависимости не найдено [58; 247; 249]. В одном исследовании получена связь конечного роста с приемом минералокортикоидных препаратов [44]. Нами была выявлена корреляция между дозой глюкокортикоидных препаратов и степенью задержки роста на протяжении периода детства и выявлены критические для роста периоды, а именно от рождения до 2-х лет жизни и период пубертата. Важно отметить, что при анализе зависимости уровня 17ОНП, как маркера адекватности дозы глюкокортикоидов, не выявлено корреляции ни с дозой глюкокортикоидов, ни с SDS роста. Следовательно, можно говорить о том, что для достижения удовлетворительного конечного роста нельзя подбирать дозу

глюкокортикоидных препаратов, ориентируясь только на гормональные показатели. В попытке нормализовать уровень 17ОНП в раннем детстве и в процессе пубертатного развития, повышение дозы глюкокортикоидов приводит к снижению темпов роста.

С другой стороны, при анализе полового развития у пациентов с ВДКН нами были получены данные о снижении по сравнению с популяцией возраста вступления в пубертат у мальчиков и соответствие сроков начала пубертата у девочек, даже с некоторой задержкой менархе при сольтеряющей форме. Возможно, что именно этим объясняется разница в степени снижения конечного роста у мальчиков и девочек.

Недавно было предложено использование препаратов гормона роста для улучшения конечного роста у пациентов с ВДКН [158; 208]. Мы использовали гормон роста в группе пациентов с классическими формами ВДКН с неудовлетворительным ростовым прогнозом. По нашим данным применение гормона роста в течение двух лет в дозе, превышающей заместительную (0,04мг/кг/сут против заместительной 0,03мг/кг/сут) привело к повышению скорости роста и достоверному увеличению конечного прогнозируемого роста, рассчитанного с учетом костного возраста по формуле. Однако, суммарная прибавка к конечному росту у пациентов, получавших гормон роста по сравнению с группой, не получавшей лечение гормоном роста составила в среднем 3см (164,5см против 161,5см).

Известно, что репродуктивная функция снижена у пациентов с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы, как у женщин, так и у мужчин [191; 131; 20; 72]. Мы проанализировали течение полового развития у пациентов с ВДКН в попытке найти причины снижения репродуктивного потенциала в пубертатном возрасте. Нами было выявлено снижение объема тестикул и снижение уровня ингибина В, который может служить маркером потенциала сперматогенеза. Также при анализе сроков вступления в пубертат выявлено снижение возраста начала полового развития не только у мальчиков с поздно диагностированной

вирильной формой, но и у мальчиков с сольтеряющей формой, получавших терапию с рождения. Возможно, что ранняя активация системы гипоталамус-гипофиз-гонады, которая происходит вследствие надпочечниковой гиперандрогении, приводит к тому, что раньше прерывается пролиферация клеток Сертоли. Недостаточное количество клеток Сертоли может объяснять снижение уровня ингибина В и может приводить к снижению сперматогенеза.

Однако, основным фактором, снижающим репродуктивную функцию во взрослом возрасте, является развитие опухолей в яичках из эктопированной надпочечниковой ткани. Именно у данной категории больных, которая составляет 18,75% в нашей группе пациентов, имелся самый низкий уровень ингибина В. При анализе факторов, влияющих на развитие TART, не было выявлено корреляции с конкретными мутациями в гене *CYP21*, но отмечено, что TART был выявлен в основном у пациентов с сольтеряющей формой заболевания (14 пациентов с СТ и 1 пациент с ПВ). Также у пациентов с TART на момент выявления данных образований уровень компенсации заболевания был хуже, т.е. значимо выше определялись уровни 17ОНП и ренина. Возможно, что дефицит фермента 21-гидроксилазы внутриутробно приводит к дисгенезии надпочечниковой ткани, в том числе и эктопированной, и степень дефицита коррелирует со степенью дисгенезии. В свою очередь высокий уровень АКТГ и/или ренина являются провоцирующими факторами гиперплазии эктопированной дисгенетичной ткани.

Надпочечниковая гиперандрогения оказывает значительно более выраженное влияние на развитие половой системы у девочек, чем у мальчиков. И коэффициент фертильности у женщин с классическими формами ВДКН снижен значительно, так при анализе когорты пациентов, наблюдающихся в Эндокринологическом научном центре Сазоновой А.И. беременность наступила у 6 пациенток из 39, при этом только при вирильной форме заболевания [20]. При анализе полового развития у девочек с ВДКН, несмотря на средний срок менархе, совпадающий с популяционными показателями, нами было выявлено достоверное уменьшение объема матки у девочек с классическими формами ВДКН, даже при

компенсации гиперандрогении в подростковом возрасте. Интересно, что при сравнении размеров матки у девочек с ВДКН и у ровесниц с яичниковой пубертатной гиперандрогенией, сохраняется такая же разница, как и со здоровыми девочками. Данный факт свидетельствует о том, что допубертатная или внутриутробная гиперандрогения может вносить вклад в недостаточную эстрогенизацию матки у девочек с ВДКН при адекватном контроле гиперандрогении в период пубертата.

Мы предположили, что внутриутробная гиперандрогения может приводить к нарушению закладки рецепторов к эстрогенам и андрогенам в тканях-мишенях. Для подтверждения данной гипотезы были проведены иммуногистохимические исследования тканей промежности на экспрессию андрогеновых и эстрогеновых рецепторов. Оказалось, что количество и распределение эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$ , а также андрогеновых рецепторов в тканях препуциума и в слизистой интроитуса не отличается у девочек с ВДКН от здоровых женщин репродуктивного возраста. Таким образом, можно сделать вывод о том, что внутриутробная гиперандрогения не влияет на рецепторную закладку андрогеновых и эстрогеновых рецепторов в тканях промежности у девочек с классическими формами ВДКН.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ результатов неонатального скрининга на ВДКН в Российской Федерации за 6 лет позволил определить частоту классических форма дефицита 21-гидроксилазы, которая составляет 1 случай на 9638 живых новорожденных, что выше, чем средняя распространенность данной патологии в мире (1:14198). Определена достоверная разница в частоте заболевания в разных регионах Российской Федерации от 1: 6604 в Уральском ФО до 1:15501 в Северо-Западном ФО.
2. Выявлена достоверная разница в распределении патологических мутаций в гене *CYP21A2* в разных этнических группах, так, доминирующей мутацией среди удмуртов является I2spl (73,3% аллелей против 26,8% в общей группе), у башкир – R356W (46,9% против 6,8%) и у народов Дагестана – Q318X (28,2% против 6,4%), что позволило модифицировать последовательность генетического тестирования для отдельных регионов России.
3. Чувствительность метода аллель-специфической ПЦР в диагностике классических форм дефицита 21-гидроксилазы в российской популяции составила 85%. Метод мультиплексной лигазозависимой амплификации позволяет определять количество копий генов и распределение патологических аллелей в семье, что необходимо для проведения пренатальной диагностики.
4. При анализе корреляции генотипа с клинической картиной заболевания выявлена высокая позитивная предсказательная ценность для тяжелых генотипов (генотип «0» - 95,8%; генотип «А» - 90,5%), приводящих к сольтеряющей форме заболевания, тогда как средние и легкие мутации имеют большую фенотипическую вариабельность (генотип «В» - 64%).
5. Уровень 17ОНП по данным неонатального скрининга не позволяет предсказать форму заболевания и выбрать тактику лечения, поскольку выявлен межгрупповой перекрест данного гормонального маркера при сольтеряющем, вирильном и неклассическом генотипах.

6. Конечный рост пациентов с ВДКН достоверно ниже целевого вне зависимости от пола и формы заболевания, разница между целевым и конечным ростом составляет 7,5-8см для девочек и 12-16см для мальчиков. Выявлено два критических для роста возрастных периода - до 2-х лет жизни и пубертатный возраст, когда отмечается снижение скорости роста на фоне высокой дозы глюкокортикоидных препаратов. Применение гормона роста у пациентов с ВДКН достоверно увеличивает скорость роста на фоне терапии, но значимо не улучшает ростовой прогноз (конечный рост выше на 3см по сравнению с контрольной группой).
7. Половое развитие у девочек с классическими формами ВДКН происходит в те же сроки, что и у здоровых детей, но отмечен более поздний срок менархе при сольтеряющей форме по сравнению с вирильной. Выявлено уменьшение объема матки у девочек с ВДКН вне зависимости от формы заболевания и получаемой терапии, при этом отмечается достоверная корреляция между степенью эстрогенизации наружных гениталий и компенсацией гиперандрогении.
8. Внутриутробная гиперандрогения не влияет на рецепторную чувствительность тканей промежности у девочек с ВДКН.
9. Половое развитие мальчиков с ВДКН наступает раньше, чем у здоровых детей. Размер тестикул на поздних стадиях пубертата достоверно ниже по сравнению с нормой, а уровень ингибина В, как маркера репродуктивного потенциала, находится в пределах референсных значений, но достоверно ниже, чем в контрольной группе здоровых юношей.
10. У 18,75% мальчиков с ВДКН выявлен TART (testicular adrenal rest tumors), преимущественно при сольтеряющей форме заболевания. Снижение уровня ингибина В более выражено у пациентов с TART по сравнению с пациентами с сольтеряющей формой ВДКН.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать молекулярно-генетические исследования в качестве подтверждающей диагностики на втором этапе неонатального скрининга. Чувствительность метода аллель-специфической ПЦР составляет 85%. Выявление патогенных мутаций позволяет не только подтвердить диагноз, но и предсказать сольтеряющую форму заболевания с вероятностью 95,8% для генотипа группы 0 и 90,5% для генотипа группы А и, следовательно, назначить адекватную схему терапии, включающую глюко- и минералокортикоиды.
2. Рекомендуется использовать метод аллель-специфической ПЦР в качестве первого метода генетической диагностики. При отсутствии мутаций или при выявлении одной патогенной мутации у пациента, рекомендуется проводить секвенирование гена *CYP21A2*.

Последовательность проведения аллель-специфической ПЦР определяется распространенностью мутаций в российской популяции, согласно полученным данным. Для отдельных регионов с преобладанием этнически однородного населения рекомендуется особый порядок проведения аллель-специфической ПЦР. При отсутствии корреляции между определенным генотипом и клиническим течением заболевания рекомендуется использовать дополнительно метод мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA) для определения количества копий гена *CYP21A2*.

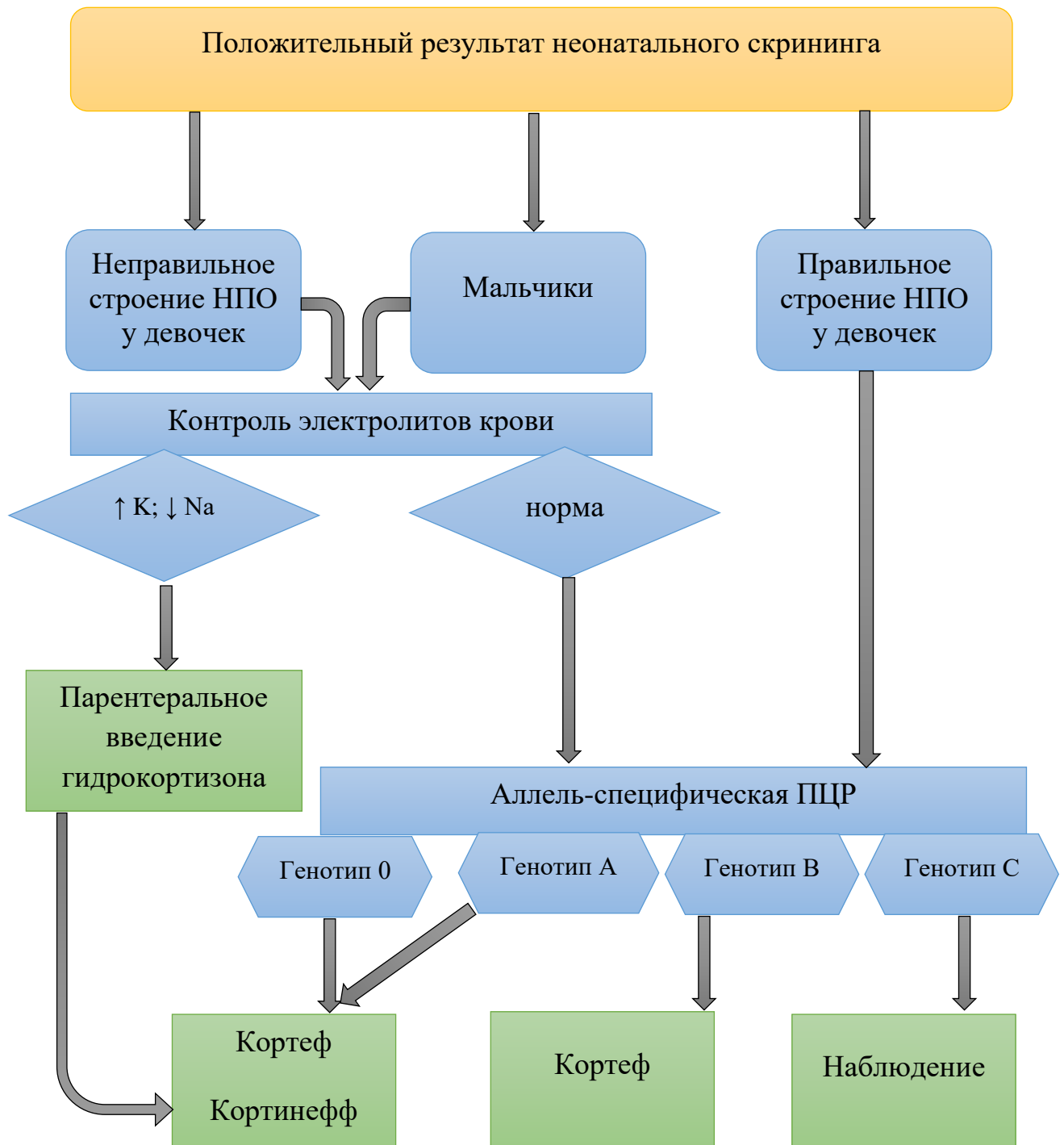
При планировании пренатальной или предимплантационной диагностики рекомендуется дополнительное исследование методом MLPA для пробанда и родителей с целью уточнения количества копий генов и определения распределения патогенных аллелей в семье.

3. На первом году жизни рекомендуемые дозы гидрокортизона составляют до 15 мг/м<sup>2</sup>. Превышение указанной дозировки ведет к значимому снижению скорости роста.



4. Наблюдение за подростками с классическими формами ВДКН должно осуществляться чаще, чем за детьми допубертатного возраста, оптимальная частота наблюдения - 1 раз в 3 месяца.
5. Протокол наблюдения за девочками пубертатного возраста должен включать в себя УЗИ органов малого таза. Размеры матки являются одним из критериев компенсации заболевания и служат прогностическим показателем будущей фертильности.
6. В качестве дополнительного параметра, позволяющего определить степень эстрогеновой насыщенности тканей промежности и готовность к проведению интроитопластики у девочек-подростков, является цитологическое исследование влагалищных мазков.
7. Учитывая высокую частоту развития опухолей яичек из эктопической надпочечниковой ткани (TART) в детском возрасте, рекомендуется проводить УЗИ яичек у мальчиков с сольтеряющей формой ВДКН начиная с 5 лет жизни, при удовлетворительном течении заболевания с частотой 1 раз в 2 года, при длительной декомпенсации заболевания – ежегодно. При выявлении TART рекомендуется ужесточение контроля компенсации и интенсификация схемы терапии.
8. Рекомендуемая доза глюкокортикоидных препаратов в подростковый период не должна превышать  $18\text{мг/м}^2$  при условии отсутствия TART у мальчиков и удовлетворительные размеры матки и яичников у девочек.

# АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ВДКН В НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА



При получении положительного результата неонатального скрининга у новорожденного с неправильным строением наружных гениталий ребенок

регистрируется в женском поле и проводится контроль электролитов крови. При наличии гиперкалиемии/гипонатриемии начинают с парентерального введения гидрокортизона из расчета  $100\text{мг/м}^2$  поверхности тела. При нормализации электролитов крови переходят на сочетанную терапию таблетированным гидрокортизоном и флудрокортизоном.

В случае положительного результата скрининга у мальчика (яички пальпируются в мошонке) проводится контроль электролитов крови и берется анализ крови для генетического исследования. Если электролиты крови в пределах нормы, то ожидаются результаты генетического исследования.

В случае положительного результата скрининга у девочки с правильным женским строением наружных гениталий берется кровь для проведения генетического исследования.

По результатам генетического исследования при генотипе из группы 0 и А – начинается терапия таблетированными препаратами гидрокортизона и флудрокортизона; при генотипе группы В – достаточно терапии только гидрокортизоном, но под контролем электролитов крови. При генотипе С показано наблюдение за ребенком с контролем набора веса и динамикой роста.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА  
ПАЦИЕНТАМИ С КЛАССИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ВДКН В РАЗНЫЕ  
ВОЗРАСТНЫЕ ПЕРИОДЫ

**Грудной возраст**

- Контроль веса – 1 раз в месяц
- Контроль электролитов крови – 1 раз в месяц

Кортеф до 15мг/м<sup>2</sup>

Кортинефф 0,1-0,3мг/сут

**Допубертатный возраст**

- Контроль роста – 1 раз в 6 мес
- Контроль костного возраста – 1 раз в год
- Контроль 17ОНР и ренина – 1 раз в 6 мес

Кортеф 10-12мг/м<sup>2</sup>

Кортинефф 0,025-0,15мг/сут

**Пубертатный возраст**

- Контроль роста – 1 раз в 3 мес
- Контроль костного возраста – 1 раз в 6-12 мес
- Контроль 17ОНР и ренина – 1 раз в 3 мес
- Контроль тестостерона у девочек – 1 раз в 3 мес
- УЗИ матки у девочек и яичек у мальчиков – 1 раз в 6-12 мес

Кортеф до 18мг/м<sup>2</sup>

Кортинефф 0,1-0,2мг/сут

Для детей с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы на первом году жизни основными критериями адекватности терапии являются набор веса и уровень электролитов крови. Доза гидрокортизона на первом году жизни не должна превышать  $15\text{мг/м}^2$  поверхности тела.

В период детства основными критериями подбора дозы являются темпы роста и прогрессия костного возраста, а также уровень 17ОНП в сыворотке и ренина плазмы. Кратность обследования детей в допубертатном возрасте составляет 6 мес.

С момента начала полового созревания необходимо сократить интервал наблюдения до 3 мес. В дополнение к антропометрическим и гормональным анализам у девочек пубертатного возраста рекомендуется регулярно проводить УЗИ органов малого таза с оценкой размеров матки, а у мальчиков – УЗИ яичек с оценкой их размеров и структуры. Недостаточный рост размеров матки у девочек или размеров яичек у мальчиков, так же, как и появление в яичках TART, требуют повышения дозы глюкокортикоидов, иногда в ущерб ростовому прогнозу пациентов, в попытке сохранения репродуктивного потенциала.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сокращение	Полное наименование
17ОНП	17-гидрокси-прогестерон
DLK1	delta-like 1 homolog (эмбриональный ростовой фактор)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification (мультиплексная лигазозависимая амплификация)
NGS	next generation sequencing (секвенирование нового поколения)
SDS	standard deviation score (коэффициент стандартного отклонения)
TART	testicular adrenal rest tumor (гиперплазия эктопической надпочечниковой ткани в яичках)
АКТГ	адренокортикотропный гормон
АР	андрогеновый рецептор
АРП	активность ренина плазмы
АФП	альфа-фетопротеин
ВДКН	врожденная дисфункция коры надпочечников
ВИП	вазоинтестинальный пептид
ГнРГ	гонадотропин-рилизинг гормон
ГР	гормон роста
ИГХ	иммуногистохимическое исследование
ИС	индекс созревания
ИФР-1	инсулиноподобный фактор роста 1

<b>Сокращение</b>	<b>Полное наименование</b>
ИФР-3	инсулиноподобный фактор роста 3
КВ	костный возраст
КРГ	кортикотропин-рилизинг гормон
ЛГ	лютеинизирующий гормон
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
МРТ	магнитно-резонансная томография
МСКТ	мультиспиральная компьютерная томография
НК	неклассическая форма ВДКН
ПВ	простая вирильная форма ВДКН
ППЦ	позитивная предсказательная ценность
ПТГ	паратиреоидный гормон
ПЦР	аллель-специфическая полимеразная цепная реакция
СТ	сольтеряющая форма ВДКН
СТГ	соматотропный гормон
ТМС	тандемная масс-спектрометрия
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека
ЭГДС	эзофаго-гастро-дуоденоскопия
ЭР	эстрогеновый рецептор

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы детской эндокринологии (труды 1-ой Всесоюзной конференции по детской эндокринологии). Под редакцией профессора М.А. Жуковского. Иваново 1972г. 370 с.
2. Бурая Т.И. Рост и развитие детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. М., 1969
3. Бурая Т.И. Рост и развитие детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников. Мат. III Всерос. съезда врачей. М. 1969
4. Васюкова Е.А., Моисеенко М.Д., Касаткина Э.П. Клиника и лечение врожденной дисфункции коры надпочечников. Гипофиз-кора надпочечников. Киев, 1964, с. 114-133.
5. Верещинский А.О. Надпочечно-половой синдром с точки зрения хирургической патологии и терапии. Вестник хирургии, 1923, Т. 4, №3, с. 207-219.
6. Григорьян В.В., Шашель В.А., Матулевич С.А. ДНК-ДИАГНОСТИКА ФОРМ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ДЕТЕЙ //Кубанский научный медицинский вестник 2014, № 7 (149), 32-35. URL: <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2014-7-32-35>
7. Духарева О.В., Новицкая А.И., Пилютник В.Ф. Анализ скрининга ВДКН у новорожденных Москвы //Сборник тезисов Всерос. конф. педиатров-эндокринологов «Достижения эндокринологии -здоровью детей» -М., 2011. -С.7-8.  
1
8. Жуковский М.А., Бурая Т.И., Кузнецова Э.С. Врожденные дисфункции коры надпочечников у детей // Москва : «Медицина», 1977.
9. Закиров А.К. Совершенствование хирургической коррекции нарушений формирования пола у девочек : дис. канд. мед. Наук : 14.01.19 / Закиров Айдар Камилевич. - Уфа, 2014. – 111 с
- 10.Ипатова О.Е. Неонатальный скрининг на адреногенитальный синдром в Архангельской области: клинико-лабораторная интерпретация результатов :



Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук – спец. 14.00. 09.—2009.—23 с, 2009.

11. Карева М.А. Эпидемиология и генетика дефицита 21-гидроксилазы у детей : дис. – М. : [Эндокринолог. науч. центр РАМН], 2004.
12. Карева М.А., Петеркова В.А. Актуальные вопросы неонатального скрининга на врожденную дисфункцию коры надпочечников //Сборник тезисов Всерос. конф. педиатров-эндокринологов «Достижения эндокринологии -здоровью детей»/М., - 2011 – С. 4-6.
13. Касаткина Э.П. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей - 1965.
14. Кузнецова Э.С. Отдаленные результаты лечения врожденной дисфункции коры надпочечников у детей. Материалы. III Всерос. съезда детских врачей - 1969.
15. Кузнецова Э.С. Отдаленные результаты лечения детей с врожденной дисфункцией коры надпочечников. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. М., 1970
16. Кунаева О.В., Зернова Л.Ю., Коваленко Татьяна Викторовна, Осипова Е.В. Итоги и перспективы неонатального скрининга врожденной дисфункции коры надпочечников: региональные аспекты //Лечение и профилактика – 2014 - №1 (9) - С. 10-15.
17. Молчанов В.И., Давыдовский И.В. К клинике и патогенезу гирсутизма. Русский клиницист, 1926, т.6, №30, с. 454-480.
18. Окулов А.Б., Негмаджанов Б.Б. Хирургические болезни репродуктивной системы и секстрасформационные операции: Руководство для врачей // М.: Медицина.- 2000.- С. 193-197
19. Раскин А.М. Врожденная вирилизирующая гиперплазия коры надпочечников. Проблемы эндокринологии, 1962, №6, с. 88-97.
20. Сазонова А.И. Соматический статус и метаболические нарушения у взрослых пациентов с различными формами врожденной дисфункции коры надпочечников : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.02 / М.: ФГБУ Эндокринологический научный центр,- 2013. – 137 с.

- 21.Свинарев М.Ю., Андреева Л.П., Аракович В.В., Иванова С.Б. и др. Неонатальный скрининг на ВДКН в Саратовской области//Сборник тезисов Всерос. конф. педиатров-эндокринологов «Достижения эндокринологии -здоровью детей» -М., 2011. -С. 19 -20.
- 22.Старкова Н.Т. Основные этапы отечественных исследований в области изучения патогенеза, клиники и лечения заболеваний надпочечников. Проблемы эндокринологии, 1965, т.13, №5, с. 29-38.
- 23.Файзулин А.К., Батыгин М.П., Глыбина Т.М., Штырь З.В. Современные методы хирургической коррекции пороков наружных гениталий у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников // Андрология и генитальная хирургия. – 2011.- №3.- с. 69-73
- 24.Фомина М.А., Бижанова Д.А., Арзамасцева Л.В., Протасов А.А., Карманов М.Е., Дядик Т.Г. Оценка результатов феминизирующей пластики у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников в отдаленном послеоперационном периоде // Детская больница. - 2010. - №2. - с. 35-39
- 25.Храмова Е.Б. Эпидемиология, скрининг, диагностика врожденной дисфункции коры надпочечников в Западно-Сибирском регионе. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Тюмень - 2007
- 26.Шерешевский Н.А. Клиническая эндокринология. М., «Медгиз», 1946.
- 27.Al Hosani H. et al. Expanding the comprehensive national neonatal screening programme in the United Arab Emirates from 1995 to 2011. – 2014.
- 28.al Saedi, s., Dean, H., Dent, w., stockl, e. & Cronin, C. screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia screening test overestimates serum 17-hydroxyprogesterone in preterm infants // Pediatrics -1996 -Т. 97 - №1 – С. 100–102.
- 29.Al-Agha O.M., Axiotis C.A. An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis //Archives of pathology & laboratory medicine. - 2007. -Т. 131 - № 2 - С. 311–317.
- 30.Alizai N.K., Thomas D.F., Lilford R.J., Batchelor A.G., Johnson N. Feminizing genitoplasty for congenital adrenal hyperplasia: what happens at puberty? //The Journal of urology. – 1999. – Т. 161. – №. 5. – С. 1588-1591.

- 31.Allen, D. B. et al. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. //The Journal of pediatrics. – 1997. – T. 130. – №. 1. – C. 128-133.
- 32.Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC Mutation in the *CYP21B* gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – T. 85. – №. 5. – C. 1600-1604.
- 33.Aycan Z., Baş V. Cetinkaya S. et al. Prevalence and Long-term Follow-up Outcomes of Testicular Adrenal Rest Tumors in Children and Adolescent Males with Congenital Adrenal Hyperplasia //Clinical endocrinology. – 2013. – T. 78. – №. 5. – C. 667-672.
- 34.Baldassarre M., Giannone F.A., Foschini M.P., Battaglia C., Busacchi P., Venturoli S., Meriggiola M.C. Effects of long-term high dose testosterone administration on vaginal epithelium structure and estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  expression of young women // /International journal of impotence research. – 2013. – T. 25. – №. 5. – C. 172.
- 35.Baldassarre M., Perrone A.M., Giannone F.A., Armillotta F., Battaglia C., Costantino A., Venturoli S., Meriggiola M.S. Androgen receptor expression in the human vagina under different physiological and treatment conditions // International Journal of Impotence Research. - 2013. - T. 25. - C. 7-11.
- 36.Balsamo A., Cicognani A., Baldazzi L., Barbaro M., Baronio F., Gennari M., Bal M., Cassio A., Kontaxaki K., Cacciari E. *CYP21* Genotype, Adult Height, and Pubertal Development in 55 Patients Treated for 21-Hydroxylase Deficiency //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2003. – T. 88. – №. 12. – C. 5680-5688.
- 37.Barbat B, Bogyo A, Raux-Demay MC, et al. Screening of *CYP21* gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency //Human mutation. – 1995. – T. 5. – №. 2. – C. 126-130.
- 38.BARTTER FC, FORBES AP, LEAF A. Congenital adrenal hyperplasia associated with the adrenogenital syndrome: an attempt to correct its disordered hormonal pattern. //The Journal of clinical investigation. – 1950. – T. 29. – №. 6. – C. 797.
- 39.Baş F. et al. *CYP21A2* Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype–phenotype correlation in Turkish children //Journal of clinical research in pediatric endocrinology. – 2009. – T. 1. – №. 3. – C. 116.

40. Belgorosky A., Pepe C., Marino R. et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterozygote for two new point mutations of the CYP19 gene // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003. № 11 (88). C. 5127–5131.
41. Benvenga S., Smedile G., Lo Giudice F. et al. Testicular adrenal rests: evidence for luteinizing hormone receptors and for distinct types of testicular nodules differing for their autonomization // *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 1999. № 3 (141). C. 231–237.
42. Bercovici J.P., Fiet J., Gibault L. et al. Testicular adrenal rest tumours in salt wasting congenital adrenal hyperplasia (in vivo and in vitro studies) // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005. № 1 (93). C. 67–72.
43. Bernbaum J.C., Umbach D.M., Ragan N.B., Ballard J.L., Archer J.I., Schmidt-Davis H., Rogan W.J. Pilot studies of estrogen-related physical findings in infants // *Environ Health Perspect.* - 2008. - T. 116. - C. 416–420
44. Bizzarri C, Improda N, Maggioli C, Capalbo D, Roma S, Porzio O, Salerno M, Cappa M. Hydrocortisone therapy and growth trajectory in children with classical congenital adrenal hyperplasia // *Endocrine Practice*. – 2017. – T. 23. – №. 5. – C. 546-556.
45. Blakeman P.J., Hilton P., Bulmer J.N. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status // *BJU Int.* - 2000. - T. 86. - C. 32–38
46. Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, Chung EK, Jones KN, Sotos JF, Zipf WB, Rennebohm RM, Yung YuC. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease // *The Journal of experimental medicine*. – 2000. – T. 191. – №. 12. – C. 2183.
47. Blum W.F., Albertsson-Wikland K., Rosberg S., Ranke M.B. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 reflect spontaneous growth hormone secretion // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1993. – T. 76. – №. 6. – C. 1610-1616

48. Bocciardi A., Lesma A., Montorsi F., Rigatti P. Passerini-Glazel Feminizing Genitoplasty: a long-term followup study // *The Journal of Urology*. - 2005. - T.174. - C. 284–288
49. Bois E. et al. Congenital adrenal hyperplasia (21-OH) in France. Population genetics // *Archives francaises de pediatrie*. – 1985. – T. 42. – №. 3. – C. 175-179.
50. Bonaccorsi A.C., Adler I., Figueiredo J.G. Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients // *Fertility and Sterility*. – 1987 – T. 47.- № 4 - C. 664–670.
51. Bongiovanni A.M., Root A.W. The adrenogenital syndrome. // *New England Journal of Medicine* – 1963 – T. 268 - № 23 – C.1283-1289;1342-1351; 1391-1399.
52. Bouvattier C. Carel J., Lecoindre C. et al. Postnatal changes of T, LH, and FSH in 46,XY infants with mutations in the AR gene // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2002 - T.87 - № 1 - C. 29–32.
53. Bouvattier C., Maione L., Bouligand J. et al. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism // *Nature Reviews. Endocrinology*. – 2012 – T.8 - № 3 - C. 172–182.
54. Brunelli VL, Russo G, Bertelloni S, Gargantini L, Balducci R, Chiesa L, Livieri C, De Sanctis C, Einaudi S, Virdis R, Saggese G, Chiumello G. Final height in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: the Italian experience. // *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. – 2003. – T. 16. – C. 277-283.
55. Bry-Gauillard H., Cartes A., Young J. Mitotane for 21-hydroxylase deficiency in an infertile man // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – T. 371. – №. 21. – C. 2042-2044.
56. Bryś M., Szyłło K., Romanowicz-Makowska H., Dobrowolski Z., Masłowska I., Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol // *Sao Paulo Med J*. - 2009. -T. 127. -№3. - C.128-133
57. Budzyńska E., Beń-Skowronek I. Testicular adrenal rest tumours in boys with congenital adrenal hyperplasia: case report and literature review // *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*. – 2011 -T.17 - № 4 - C. 239–242.

58. Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2001. – T. 86. – №. 7. – C. 3070-3078
59. Cacciari E. et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia // Archives of disease in childhood. – 1983. – T. 58. – №. 10. – C. 803-806.
60. Çakir E.D.P., Mutlu F.S., Eren E. et al. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia // Journal of clinical research in pediatric endocrinology. – 2012. – T. 4. – №. 2. – C. 94–100.
61. Carrera P. et al. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency // Human genetics. – 1996. – T. 98. – №. 6. – C. 662-665.
62. Castera's A., De Silva P., Rumsby G., Conway G.S. Reassessing fecundity in women with classical congenital adrenal hyperplasia (CAH): normal pregnancy rate but reduced fertility rate // Clinical Endocrinology. - 2009. - T. 70. - №6. - C. 833–837
63. Charmandari E., Charles G.D. Brook, Hindmarsh P.C. Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty // Europ J Endocrinol. - 2004. -T. 151. - C.77–82
64. Charmandari E., Hindmarsh P.C., Johnston A., Brook C.G. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: alterations in cortisol pharmacokinetics at puberty // J Clin Endocrinol Metab. - 2001. - T. 86. - C. 2701–2708
65. Chen G.D., Oliver R.H., Leung B.S., Lin L.Y., Yeh J. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression in the vaginal walls and uterosacral ligaments of premenopausal and postmenopausal women // Fertil Steril. - 1999. - T. 71. - №6. - C. 1099–1102
66. Chen W, Xu Z, Sullivan A, Finkelstein GP, Van Ryzin C, Merke DP, McDonnell NB. Junction site analysis of chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* genes in 21-hydroxylase deficiency. // Clinical chemistry. – 2012. – T. 58. – №. 2. – C. 421-430.
67. Chiou, S.-H., Hu, M.-C., Chung, B. A missense mutation at ile172-to-asn or arg356-to-trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – T. 265. – №. 6. – C. 3549-3552
68. Claahsen-van der Grinten H.L, Otten B., Sweep F. et al. Testicular tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency show functional features

- of adrenocortical tissue // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2007. – T. 92. – №. 9. – C. 3674-3680.
- 69.Claahsen-van der Grinten H.L., Dehzad F., Kamphuis-Van Ulzen K. et al. Increased prevalence of testicular adrenal rest tumours during adolescence in congenital adrenal hyperplasia // Hormone research in paediatrics. – 2014. – T. 82. – №. 4. – C. 238-244.
- 70.Claahsen-van der Grinten H.L., Otten B., Hermus A. et al. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia can cause severe testicular damage // Fertility and sterility. – 2008. – T. 89. – №. 3. – C. 597-601.
- 71.Claahsen-van der Grinten H.L., Otten B., Sweep F. et al. Repeated successful induction of fertility after replacing hydrocortisone with dexamethasone in a patient with congenital adrenal hyperplasia and testicular adrenal rest tumors // Fertility and sterility. – 2007. – T. 88. – №. 3. – C. 705. e5-705. e8.
- 72.Claahsen-van der Grinten H.L., Stikkelbroeck N.M., Sweep C.G, Hermus A.R., Otten B.J. Fertility in patients with congenital adrenal hyperplasia // Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2006. – T. 19. – №. 5. – C. 677-686
- 73.Claahsen-van der Grinten H.L., Sweep F., Blickman J. et al. Prevalence of testicular adrenal rest tumours in male children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency //European Journal of Endocrinology. – 2007. – T. 157. – №. 3. – C. 339-344.
- 74.Claahsen-van der Grinten H.L.,Otten B., Stikkelbroeck M. et al. Testicular adrenal rest tumours in congenital adrenal hyperplasia // Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2009. – T. 23. – №. 2. – C. 209-220.
- 75.Clark R.V., Albertson B., Munabi A. et al. Steroidogenic enzyme activities, morphology, and receptor studies of a testicular adrenal rest in a patient with congenital adrenal hyperplasia // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 1990. – T. 70. – №. 5. – C. 1408-1413.
- 76.Collet T.-H., Pralong F.P. Reversal of primary male infertility and testicular adrenal rest tumors in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2010. – T. 95. – №. 5. – C. 2013-2014.

77. Concolino P, Mello E, Toscano V, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of *CYP21A2* gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. // *Clinica chimica acta*. – 2009. – T. 402. – №. 1-2. – C. 164-170.
78. Concolino P, Costella A Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of *CYP21A2* Gene. // *Molecular diagnosis & therapy*. – 2018. – C. 1-20.
79. Costa E.M., Mendonca B.B., Inácio M. Management of ambiguous genitalia in pseudohermaphrodites: new perspectives on vaginal dilation. // *Fertility and Sterility*. – 1997. – T. 67. – №. 2. – C. 229-232.
80. Coulm B. et al. Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003 // *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. – 2012. – T. 166. – №. 2. – C. 113-120.
81. Creighton S., Chernausk S.D., Romao R., Ransley Ph., Salle J.P. Timing and nature of reconstructive surgery for disorders of sex development - Introduction // *Journal of Pediatric Urology*. - 2012. - T. 8. - C. 602-610
82. Creighton S.M., Minto S.L., Steele S.J. Objective cosmetic and anatomical outcomes at adolescence of feminising surgery for ambiguous genitalia done in childhood // *Lancet*. - 2001. - T. 14. - C. 124–125
83. Cutfield W. S., Webster D. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand // *The Journal of pediatrics*. – 1995. – T. 126. – №. 1. – C. 118-121.
84. Dahl E.V., Bahn R.C. Aberrant Adrenal Cortical Tissue Near the Testis in Human Infants // *The American journal of pathology*. – 1962. – T. 40. – №. 5. – C. 587.
85. Dardis A. et al. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. – 1997.
86. David M, Sempe M, Blanc M, Nicolino M, Forest MG, Morel Y Final height in 69 patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. // *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. – 1994. – T. 1. – №. 4. – C. 363.



87. Debré R., Sémélaigne G. Hypertrophie considerable des capsules surrénales chez un nourrisson mort a 10 mois sans avoir augmenté de poids depuis sa naissance //Bull Soc Pediatr (Paris). – 1925. – T. 23. – C. 270-271.
88. De\_Crecchio L. Sopra un caso di apparenze virili in una donna. – Stab. tip. di F. Vitale, 1865.
89. Delfino M., Elia J., Imbrogno N. et al. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia: prevalence and sonographic, hormonal, and seminal characteristics // Journal of ultrasound in medicine. – 2012. – T. 31. – №. 3. – C. 383-388.
90. Devi A. R. R., Naushad S. M. Newborn screening in India //The Indian Journal of Pediatrics. – 2004. – T. 71. – №. 2. – C. 157-160.
91. Dogra V., Nathan J., Bhatt S. Sonographic appearance of testicular adrenal rest tissue in congenital adrenal hyperplasia // Journal of ultrasound in medicine. – 2004. – T. 23. – №. 7. – C. 979-981
92. Dolž V. et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia //European Journal of Endocrinology. – 2005. – T. 153. – №. 1. – C. 99-106.
93. Dumic K. et al. Classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia between 1995 and 2006 //Hormone Research in Paediatrics. – 2009. – T. 72. – №. 4. – C. 247-251.
94. Escala J.-M., Cadena Y., Lopez P.-G., Angel L., Retamal M.G., Letelier N., Zubieta R. Feminizing genitoplasty in adrenal congenital hyperplasia: one or two surgical steps? // Arch Esp Urol. - 2009. - T. 62. - №9. - C. 724-730
95. Eugster EA, Dimegli LA, Wright JC, et al. Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis. //The Journal of pediatrics. – 2001. – T. 138. – №. 1. – C. 26-32.
96. Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, et al. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. //Clinical genetics. – 2002. – T. 62. – №. 2. – C. 181-188.

97. Fechner P.Y., Davenport M. Qualy R. et al. Differences in follicle-stimulating hormone secretion between 45,X monosomy Turner syndrome and 45,X/46,XX mosaicism are evident at an early age // The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2006. – T. 91. – №. 12. – C. 4896-4902.
98. Fibiger J. Beiträge zur Kenntnis des weiblichen Scheinzwittertums // Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. – 1905. – T. 181. – №. 1. – C. 1-51.
99. Finkelstein G.P., Kim M., Sinaii N. et al. Clinical Characteristics of a Cohort of 244 Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2012. – T. 97. – №. 12. – C. 4429-4438.
100. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2011. – T. 96. – №. 1. – C. E161-E172.
101. Fitness, J. et al. Genotyping of *CYP21*, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1999. – T. 84. – №. 3. – C. 960-966.
102. Fleming L, Van Riper M, Knafl K. Management of Childhood Congenital Adrenal Hyperplasia-An Integrative Review of the Literature. // Journal of Pediatric Health Care. – 2017. – T. 31. – №. 5. – C. 560-577.
103. Frisch H, Waldhauser F, Lebl J, Solyom J, Hargitai G, Kovacs J, Pribilincova Z, Krzisnik C, Battelino T; MEWPE-CAH Study Group. Congenital adrenal hyperplasia: lessons from a multinational study. // Hormone Research in Paediatrics. – 2002. – T. 57. – №. Suppl. 2. – C. 95-101.
104. Fu X., Rezapour M., Wu X.X., Li L., Sjogren C., Ulmsten U. Expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent women // Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct. - 2003. - T. 14. - C. 276–281
105. Galeotti C., Lahlou Z., Goullon D. et al. Longitudinal evaluation of the hypothalamic-pituitary-testicular function in 8 boys with adrenal hypoplasia congenita (AHC) due to NR0B1 mutations // PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. e39828.

106. Gastaud F., Bouvattier C., Duranteau L., Brauner R., Thibaud T., Kuttan F., Bougne P. Impaired sexual and reproductive outcomes in women with classical forms of congenital adrenal hyperplasia // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2007. – T. 92. – №. 4. – C. 1391-1396.
107. Gatelais, F. et al. effect of single and multiple courses of prenatal corticosteroids on 17-hydroxyprogesterone levels: implication for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia. // *Pediatric research*. – 2004. – T. 56. – №. 5. – C. 701.
108. Giacaglia L.R., Mendonca B.B, Madureira G. et al. Adrenal nodules in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: regression after adequate hormonal control // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. – 2001. – T. 14. – №. 4. – C. 415-420.
109. Girgis R, Winter JS The effects of glucocorticoid replacement therapy on growth, bone mineral density, and bone turnover markers in children with congenital adrenal hyperplasia. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1997. – T. 82. – №. 12. – C. 3926-3929.
110. Gleeson H. K. et al. Two-year pilot study of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New South Wales compared with nationwide case surveillance in Australia // *Journal of paediatrics and child health*. – 2008. – T. 44. – №. 10. – C. 554-559.
111. Globerman, H., Amor, H., Parker, K. L., New, M. I., White, P. C. A nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. // *The Journal of clinical investigation*. – 1988. – T. 82. – №. 1. – C. 139-144.
112. González E. C. et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Cuba: six years of experience // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – T. 421. – C. 73-78.
113. Gruñeiro-Papendieck, L. et al. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2001. – T. 55. – №. 6. – C. 271-277
114. Gruñeiro-Papendieck L. et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: experience and results in Argentina // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – T. 21. – №. 1. – C. 73-78.

115. Gu X., Zhou J., Ye J. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Shanghai areas // *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine]. – 2002. – T. 36. – №. 1. – C. 16-18.
116. Hagenfeldt K., Janson P.O., Holmdahl G., Falhammar H., Filipsson H., Frise L. Fertility and pregnancy outcome in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Human Reproduction*. - 2008. - T. 23. - №7. - C. 1607–1613
117. Hagenfeldt K., Janson P.O., Holmdahl G., Falhammar H., Filipsson H., Frise L. Fertility and pregnancy outcome in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Human Reproduction*. - 2008. - T. 23. - №7. - C. 1607–1613
118. Hagenfeldt K.B. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency – the adult woman // *Growth Hormone & IGF Research*. - 2004. - T. 14. - C. 67–71
119. Haglund-Stengler B, Martin Ritzen E, Gustafsson J, Luthman H. Haplotypes of the steroid 21-hydroxylase gene region encoding mild steroid 21-hydroxylase deficiency. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – T. 88. – №. 19. – C. 8352-8356.
120. Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, Yuen T, Zaidi M, New MI Structure-phenotype correlations of human *CYP21A2* mutations in congenital adrenal hyperplasia. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110. – №. 7. – C. 2605-2610.
121. Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke D.P. Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. // *Endocrinology and Metabolism Clinics*. – 2017. – T. 46. – №. 2. – C. 435-458
122. Hargitai G, Solyom J, Battelino T, Lebl J, Pribilincova Z, Hauspie R, Kovacs J, Waldhauser F, Frisch H; MEWPE-CAH Study Group. Growth patterns and final height in congenital adrenal hyperplasia due to classical 21-hydroxylase deficiency. Results of a multicenter study. // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2001. – T. 55. – №. 4. – C. 161-171.
123. Hauffa BP, Winter A, Stolecke H Treatment and disease effects on short-term growth and adult height in children and adolescents with 21-hydroxylase deficiency. // *Klinische Pädiatrie*. – 1997. – T. 209. – №. 02. – C. 71-77.

124. Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2015. – T. 100. – №. 3. – C. 1002-1008.
125. Higashi Y. et al. Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene on the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency //The Journal of Biochemistry. – 1991. – T. 109. – №. 4. – C. 638-644.
126. Higashi, Y., Tanae, A., Inoue, H., Hiromasa, T., Fujii-Kuriyama, Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase (P-450[C21]) deficiency in humans: possible gene conversion products. //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – T. 85. – №. 20. – C. 7486-7490.
127. Hodgins M.B., Spike R.C., Mackie R.M., MacLean A.B. An immunohistochemical study of androgen, oestrogen and progesterone receptors in the vulva and vagina // British Journal of Obstetrics and Gynaecology. - 1998. - T. 105. - C. 216-222
128. Holmes-Walker D.J., Conway G.S., Honour J.F., Rumsby G., Jacobs H.S. Menstrual disturbance and hypersecretion of progesterone in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21 -hydroxylase deficiency // Clin Endocrinol. - 1995. - T. 43. - C. 291-296
129. Ildgruben A., Sjöberg T.I., Hammarström M.-L., Bäckström T. Steroid receptor expression in vaginal epithelium of healthy fertile women and influences of hormonal contraceptive usage // Contraception. - 2005. - T. 72. - C. 383– 392
130. Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, et al. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) deficiency: good correlation in a well defined population. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1997. – T. 82. – №. 10. – C. 3293-3297.
131. Jaaskelainen J., Hippelainen M., Kiekara O., Voutilainen R. Child rate, pregnancy outcome and ovarian function in females with classical 21-hydroxylasedeficiency // Acta Obstet Gynecol Scand. - 2000. - T. 79. - C. 687–692

132. Jang J.H., Jin D.K., Kim J.H., et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification assay for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. //Annals of Clinical & Laboratory Science. – 2011. – T. 41. – №. 1. – C. 44-47.
133. Janzen, N. et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography– tandem mass spectrometry. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2007. – T. 92. – №. 7. – C. 2581-2589.
134. Johannsen T.H., Ripa C.P.L., Starup E.J. Charlsen, Nielsen O.H., Schwartz M., Drzewiecki K.T., Mortensen E.L., Main K.M. Long-Term Gynecological Outcomes in Women with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency // International journal of pediatric endocrinology. – 2010. – T. 2010. – №. 1. – C. 784297.
135. Joint LWPES/ESPE CAH Working Group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2002. – T. 87. – №. 9. – C. 4048-4053
136. Kang M.J., Kim J., Lee S. et al. The prevalence of testicular adrenal rest tumors and associated factors in postpubertal patients with congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency // Endocrine journal. – 2011. – T. 58. – №. 6. – C. 501-508
137. Kaupert LC, Lemos-Marini SH, De Mello MP, et al. The effect of fetal androgen metabolism-related gene variants on external genitalia virilization in congenital adrenal hyperplasia. //Clinical genetics. – 2013. – T. 84. – №. 5. – C. 482-488.
138. Kaur G, Thakur K, Kataria S, et al. Current and future perspective of newborn screening: an Indian scenario. //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2016. – T. 29. – №. 1. – C. 5-13.
139. Khalid J. M. et al. Incidence and clinical features of congenital adrenal hyperplasia in Great Britain //Archives of disease in childhood. – 2012. – T. 97. – №. 2. – C. 101-106.
140. King, J. L. et al. Antenatal corticosteroids and newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. //Archives of pediatrics & adolescent medicine. – 2001. – T. 155. – №. 9. – C. 1038-1042

141. Klingensmith G., Garcia S., Jones H. Glucocorticoid treatment of girls with congenital adrenal hyperplasia: effects on height, sexual maturation, and fertility // *The Journal of pediatrics*. – 1977. – T. 90. – №. 6. – C. 996-1004.
142. Koppens P.F., Hoogenboezem T, Degenhart H.J. Duplication of the *CYP21A2* gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. // *Human genetics*. – 2002. – T. 111. – №. 4-5. – C. 405-410
143. Kosel, s. et al. rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. // *Clinical chemistry*. – 2005. – T. 51. – №. 2. – C. 298-304.
144. Krege S., Walz K.H., Hauffa B.P., Korner I., Rubben H. Long-term follow-up of female patients with congenital adrenal hyperplasia from 21-hydroxylase deficiency, with special emphasis on the results of vaginoplasty // *BJU Int*. - 2000. - T. 86. - C. 253-259
145. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2000. – T. 85. – №. 3. – C. 1059-1065.
146. Kulshreshtha B., Eunice M., Ammini A.C. Pubertal development among girls with classical congenital adrenal hyperplasia initiated on treatment at different ages // *Indian journal of endocrinology and metabolism*. - 2012. - T. 16. - C. 599-603
147. L'Allemand D, Tardy V, Gruters A, et al. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2000. – T. 85. – №. 12. – C. 4562-4567.
148. Lacey, J. M. et al. improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. // *Clinical Chemistry*. – 2004. – T. 50. – №. 3. – C. 621-625.
149. Lako M. et al. Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis // *Journal of medical genetics*. – 1999. – T. 36. – №. 2. – C. 119-124.

150. Larsson A, Thil'en A, Hagenfeldt L, Dobeln von U & Guthenberg C. Screening of half a million Swedish newborn infants for congenital adrenal hyperplasia. //Screening. – 1992. – T. 1. – №. 3. – C. 159-166.
151. Lee HH, Chao HT, Ng HT, et al. Direct molecular diagnosis of *CYP21* mutations in congenital adrenal hyperplasia. //Journal of medical genetics. – 1996. – T. 33. – №. 5. – C. 371-375
152. Lee HH, Lee YJ, Chan P, et al. Use of PCR-based amplification analysis as a substitute for the southern blot method for *CYP21* deletion detection in congenital adrenal hyperplasia. //Clinical chemistry. – 2004. – T. 50. – №. 6. – C. 1074-1076.
153. Lee H.H. Chimeric *CYP21P/CYP21* and *TNXA/TNXB* genes in the RCCX module. //Molecular genetics and metabolism. – 2005. – T. 84. – №. 1. – C. 4-8.
154. Levo A., Partanen J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles //Human genetics. – 1997. – T. 99. – №. 4. – C. 488-497.
155. Liao X. Y., Zhang Y. F., Gu X. F. *CYP21* gene point mutations study in 21-hydroxylase deficiency patients //Zhonghua er ke za zhi= Chinese journal of pediatrics. – 2003. – T. 41. – №. 9. – C. 670-674.
156. Liivak K. et al. Incidence of classical 21-hydroxylase deficiency and distribution of *CYP21A2* mutations in Estonia //Hormone Research in Paediatrics. – 2008. – T. 69. – №. 4. – C. 227-232.
157. Lim YJ, Batch JA, Warne GL Adrenal 21-hydroxylase deficiency in childhood: 25 years' experience. //Journal of paediatrics and child health. – 1995. – T. 31. – №. 3. – C. 222-227.
158. Lin-Su K, Harbison MD, Lekarev O, Vogiatzi MG, New MI Final adult height in children with congenital adrenal hyperplasia treated with growth hormone. hormone //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2011. – T. 96. – №. 6. – C. 1710-1717.
159. Liu L., Fan J., Gan C., Tian G. Staged reconstruction of the labia minora and reductionclitoroplasty for female pseudohermaphroditism // Aesth Plast Surg. - 2010. -T. 34. - C. 652–656



160. Loke K. Y. et al. Epidemiology of 21-hydroxylase deficiency in Singapore //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2002. – T. 15. – №. 4. – C. 397-404.
161. Lottrup G., Nielsen J., Skakkebaek et al. Abundance of DLK1, differential expression of CYP11B1, *CYP21A2* and MC2R, and lack of INSL3 distinguish testicular adrenal rest tumours from Leydig cell tumours //European journal of endocrinology. – 2015. – T. 172. – №. 4. – C. 491-499
162. Manoli I, Kanaka-Gantenbein Ch, Voutetakis A, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. Early growth, pubertal development, body mass index and final height of patients with congenital adrenal hyperplasia: factors influencing the outcome. // Clinical Endocrinology. – 2002. – T. 57. – №. 5. – C. 669-676
163. Mao X. M., Jing M., Tian H. Y. Screening and follow-up treatment of 160 046 neonates with congenital adrenal hyperplasia in Ningxia, China //Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese journal of contemporary pediatrics. – 2016. – T. 18. – №. 8. – C. 698-701.
164. Marchini G.S. , Cocuzza M., Pagani R. et al. Testicular adrenal rest tumor in infertile man with congenital adrenal hyperplasia: case report and literature review // /Sao Paulo Medical Journal. – 2011. – T. 129. – №. 5. – C. 346-351.
165. Martinez-Aguayo A., Rocha A., Rojas N. et al. Testicular Adrenal Rest Tumors and Leydig and Sertoli Cell Function in Boys with Classical Congenital Adrenal Hyperplasia // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2007. – T. 92. – №. 12. – C. 4583-4589.
166. Mathur R. et al. Molecular characterization of mutations in Indian children with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2001. – T. 14. – №. 1. – C. 27-36.
167. Mauthe I., Laspe D. K. The frequency of congenital adrenal hyperplasia (cah) in Munich (author's transl) //Klinische Padiatrie. – 1977. – T. 189. – №. 2. – C. 172-176.
168. Mesiano S., Katz S.L., Lee J.Y., Jaffe R.B. Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal

- cortical cells: implications for adrenal androgen regulation // J Clin Endocrinol Metab. - 1997. - T. 82. - C. 1390–1396
169. Mikami A, Fukushi M, Oda H, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo City: sixteen years experience. //The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. – 1999. – T. 30. – C. 100-102.
  170. Miller WL. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1997. – T. 82. – №. 4. – C. 1304-1304.
  171. Minutti, C. Z. et al. steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2004. – T. 89. – №. 8. – C. 3687-3693.
  172. Moghetti P., Castello R., Negri C., Tosi F., Spiazzi G.G., Brun E., Balducci R., Toscano V., Muggeo M. Insulin infusion amplifies 17 alpha-hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of 17,20-lyase activity //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1996. – T. 81. – №. 3. – C. 881-886.
  173. Moriya K., Higashiyama H., Tanaka H., Mitsui T., Nakamura M., Nonomura K. Long-Term Outcome of Vaginoplasty With the Bilateral Labioscrotal Flap // The Journal of Urology. - 2009. - T. 182. - C. 1876-1881
  174. Mornet E, Crete P, Kuttann F, Raux-Demay MC, Boue J, White PC, Boue A. Distribution of deletions and seven point mutations on *CYP21B* genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. //American journal of human genetics. – 1991. – T. 48. – №. 1. – C. 79.
  175. Moura-Massari VO, Cunha FS, Gomes LG, et al. The presence of clitoromegaly in the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency could be partially modulated by the CAG polymorphic tract of the androgen receptor gene. //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 2. – C. e0148548.
  176. Mouritsen A., Jørgensen, N., Main K. et al. Testicular adrenal rest tumours in boys, adolescents and adult men with congenital adrenal hyperplasia may be associated with

- the *CYP21A2* mutation // //International journal of andrology. – 2010. – T. 33. – №. 3. – C. 521-527
177. Mouritsen A., Juul A., Jørgensen N. Improvement of semen quality in an infertile man with 21-hydroxylase deficiency, suppressed serum gonadotropins and testicular adrenal rest tumours // International journal of andrology. – 2010. – T. 33. – №. 3. – C. 518-520.
  178. Murphy H., George C., de Kretser D. et al. Successful treatment with ICSI of infertility caused by azoospermia associated with adrenal rests in the testes: case report // Human Reproduction. – 2001. – T. 16. – №. 2. – C. 263-267.
  179. Muthusamy K, Elamin MB, Smushkin G, et al. Adult height in patients with congenital adrenal hyperplasia: a systematic review and metaanalysis. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2010. – T. 95. – №. 9. – C. 4161-4172.
  180. Nascimento M. L. et al. Ten-year evaluation of a Neonatal Screening Program for congenital adrenal hyperplasia //Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. – 2014. – T. 58. – №. 7. – C. 765-771.
  181. Nermoen I., Rørvik J., Holmedal S. et al. High frequency of adrenal myelolipomas and testicular adrenal rest tumours in adult Norwegian patients with classical congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency //Clinical endocrinology. – 2011. – T. 75. – №. 6. – C. 753-759.
  182. New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 7. – C. 2611-2616.
  183. Nomura, s. immature adrenal steroidogenesis in preterm infants. //Early human development. – 1997. – T. 49. – №. 3. – C. 225-233.
  184. Nordenskjold A., Holmdahl G., Frisen L., Falhammar H., Filipsson H., Thoren M., Janson P.O., Hagenfeldt K. Type of Mutation and Surgical Procedure Affect Long-Term Quality of Life for Women with Congenital Adrenal Hyperplasia // J Clin Endocrinol Metab. - 2008. - T. 93. - №2. - C. 380–386

185. Nordenstrom A, Thilen A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1999. – T. 84. – №. 5. – C. 1505-1509.
186. Nyirady P., Bianchi A., Gough D.C. An insight into vaginal surgery in a severely masculinized CAH patient // International urology and nephrology. – 2008. – T. 40. – №. 3. – C. 557-559.
187. Odenwald B. et al. Classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase-deficiency: 13 years of neonatal screening and follow-up in Bavaria //Klinische Pädiatrie. – 2015. – T. 227. – №. 05. – C. 278-283.
188. Ohkubo, s., shimozawa, K., Matsumoto, M. & Kitagawa, T. Analysis of blood spot 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentration in premature infants—proposal for cutoff limits in screening congenital adrenal hyperplasia. //Pediatrics International. – 1992. – T. 34. – №. 2. – C. 126-133.
189. Olgemoller, B., roscher, A. A., Liebl, B. & Fingerhut, r. screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2003. – T. 88. – №. 12. – C. 5790-5794.
190. Ordonez-Sanchez ML, Ramirez-Jimenez S, Lopez-Gutierrez AU, et al. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. //Human genetics. – 1998. – T. 102. – №. 2. – C. 170-177.
191. Otten BJ, Stikkelbroeck MM, Claahsen-van der Grinten HL, Hermus AR. Puberty and fertility in congenital adrenal hyperplasia. //Abnormalities in puberty. – Karger Publishers, 2005. – T. 8. – C. 54-66
192. Owerbach, D., Sherman, L., Ballard, A.-L., Azziz, R. Pro453-to-ser mutation in *CYP21* is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. //Molecular endocrinology. – 1992. – T. 6. – №. 8. – C. 1211-1215.

193. Pang S, Clark A. Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. //Trends in Endocrinology & Metabolism. – 1990. – T. 1. – №. 6. – C. 300-307.
194. Pang S, Hotchkiss J, Drash AL, Levine LS, New MI. Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay:its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1977. – T. 45. – №. 5. – C. 1003-1008.
195. Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, La Franchi S, Surve AS, New MI A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1982. – T. 55. – №. 3. – C. 413-420
196. Pang S, Shook M.K. Current status of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. //Current opinion in pediatrics. – 1997. – T. 9. – №. 4. – C. 419-423.
197. Pang S, Spence DA, New MI Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia with special reference to screening in Alaska. //Annals of the New York Academy of Sciences. – 1985. – T. 458. – №. 1. – C. 90-102.
198. Pang S. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. //Pediatric annals. – 2003. – T. 32. – №. 8. – C. 516-523.
199. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. //Pediatrics. – 1988. – T. 81. – №. 6. – C. 866-874.
200. Paulino L. C. et al. Mutation distribution and *CYP21/C4* locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency //Acta Paediatrica. – 1999. – T. 88. – №. 3. – C. 275-283.
201. Pearce M. et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State //Molecular genetics and metabolism reports. – 2016. – T. 7. – C. 1-7.
202. Pelletier G., El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2000. – T. 85. – №. 12. – C. 4835-4840.

203. Pérez-López F.R., Campo-López C., Alós L., Juste G., Ibañez F., Martínez-Hernández H. Oestrogen and progesterone receptors in the human vagina during the menstrual cycle, pregnancy and postmenopause // *Maturitas*. - 1993. - T. 16. - C. 139-144
204. Pezzuti I. L. et al. A three-year follow-up of congenital adrenal hyperplasia newborn screening // *Jornal de pediatria*. – 2014. – T. 90. – №. 3. – C. 300-307.
205. Pierre P., Despert F., Tranquart F. et al. Adrenal rest tissue in gonads of patients with classical congenital adrenal hyperplasia: multicenter study of 45 French male patients // *Annales d'endocrinologie*. – Elsevier Masson, 2012. – T. 73. – №. 6. – C. 515-522.
206. Piffer R.C., Garcia P., Gerardin D. et al. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2009. – T. 21. – №. 5. – C. 634-639.
207. Pippi Salle J.L., Lorenzo A.J., Jesus L.E., Leslie B., AlSaid A., Macedo F.N., Jayanthi V.R., de Castro R. Surgical Treatment of High Urogenital Sinuses Using the Anterior Sagittal Transrectal Approach: A Useful Strategy to Optimize Exposure and Outcomes // *The Journal of Urology*. - 2012. - T. 187. - C. 1024-1031
208. Quintos JB1, Vogiatzi MG, Harbison MD, New MI. Growth hormone therapy alone or in combination with gonadotropin-releasing hormone analog therapy to improve the height deficit in children with congenital adrenal hyperplasia. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2001. – T. 86. – №. 4. – C. 1511-1517.
209. Ramezani Tehrani F., Noroozzadeh M., Zahediasl S. et al. Prenatal Testosterone Exposure Worsen the Reproductive Performance of Male Rat at Adulthood // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – №. 8. – C. e71705.
210. rauh, M., Gröschl, M., rascher, w. & Dörr, H. G. Automated, fast and sensitive quantification of 17  $\alpha$ -hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. // *Steroids*. – 2006. – T. 71. – №. 6. – C. 450-458.
211. Recabarren M.P., Pojas-Garcia P., Einspanier R. et al. Pituitary and testis responsiveness of young male sheep exposed to testosterone excess during fetal development // *Reproduction*. – 2013. – T. 145. – C. 567-576.

212. Reisch N., Flade L., Scherr M. et al. High prevalence of reduced fecundity in men with congenital adrenal hyperplasia //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2009. – T. 94. – №. 5. – C. 1665-1670.
213. Rich M.A., Keating M. Levin H. et al. Tumors of the adrenogenital syndrome: an aggressive conservative approach //The Journal of urology. – 1998. – T. 160. – №. 5. – C. 1838-1841.
214. Rink R.C., Adams M.C. Feminizing genitoplasty: state of the art // World journal of urology. – 1998. – T. 16. – №. 3. – C. 212-218
215. Rojas-García P.P., Recabarren M., Sarabia L. et al. Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams //American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2010. – T. 299. – №. 6. – C. E998-E1005.
216. Sack J. et al. 21-hydroxylase deficiency: Screening and incidence in Israel //Hormone Research in Paediatrics. – 1997. – T. 48. – №. 3. – C. 115-119.
217. Salardy S., Orsini L.F., Cacciari E., Partesotti S. Pelvic ultrasoundgraphy in girls with precocious puberty, congenital hyperplasia, obesity, or hirsutism //The Journal of pediatrics. – 1988. – T. 112. – №. 6. – C. 880-887.
218. Savage M.O. et al. Growth abnormalities associated with adrenal disorders and their management. // Hormone Research in Paediatrics. – 2001. – T. 56. – №. Suppl. 1. – C. 19-23.
219. Shanklin D.R., Richardson A.P., Rothstein G. TESTICULAR HILAR NODULES IN ADRENOGENITAL SYNDROME. THE NATURE OF THE NODULES // American Journal of Diseases of Children. – 1963. – T. 106. – №. 3. – C. 243-250.
220. Shimozawa K. et al. A neonatal mass-screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan //European Journal of Endocrinology. – 1984. – T. 107. – №. 4. – C. 513-518.
221. Silveira E. L. et al. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred-an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2008. – T. 21. – №. 5. – C. 455-460.

222. Skala C.E., Petry I.B., Albrich S.B., Puhl A., Naumann G., Koelbl H. The effect of hormonal status on the expression of estrogen and progesterone receptor in vaginal wall and periurethral tissue in urogynecological patients // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2010. – T. 153. – №. 1. – C. 99-103.
223. Smeets E.E.J.W. , Span P. Van Herwaarden A. et al. Molecular Characterization of Testicular Adrenal Rest Tumors in Congenital Adrenal Hyperplasia: Lesions With Both Adrenocortical and Leydig Cell Features // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2015. – T. 100. – №. 3. – C. E524-E530.
224. Sólyom J., Hughes I. A. Value of selective screening for congenital adrenal hyperplasia in Hungary // *Archives of disease in childhood*. – 1989. – T. 64. – №. 3. – C. 338-342.
225. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HF, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC. A Summary of the Endocrine Society Clinical Practice Guidelines on Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. // *International journal of pediatric endocrinology*. – 2010. – T. 2010. – №. 1. – C. 494173.
226. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, et al. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. // *American journal of human genetics*. – 1985. – T. 37. – №. 4. – C. 650.
227. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. // *The Journal of clinical investigation*. – 1992. – T. 90. – №. 2. – C. 584-595.
228. Speiser, P. W., New, M. I., White, P. C. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. // *New England Journal of Medicine*. – 1988. – T. 319. – №. 1. – C. 19-23
229. Steigert M, Schoenle EJ, Biason-Lauber A & Torresani T. High reliability of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2002. – T. 87. – №. 9. – C. 4106-4110.



230. Stikkelbroeck N.M.M.L., Hermus A., Suliman H. et al. Asymptomatic testicular adrenal rest tumours in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia: basal and follow-up investigation after 2.6 years //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2004. – T. 17. – №. 4. – C. 645-654.
231. Stikkelbroeck N.M.M.L., Hermus A.R.M.M., Braat D.D.M., Otten B.J. Fertility in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency //Obstetrical & gynecological survey. – 2003. – T. 58. – №. 4. – C. 275-284
232. Stikkelbroeck N.M.M.L., Suliman H., Otten B. et al. Testicular adrenal rest tumours in postpubertal males with congenital adrenal hyperplasia: sonographic and MR features //European radiology. – 2003. – T. 13. – №. 7. – C. 1597-1603.
233. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, et al. *CYP21* gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2003. – T. 88. – №. 8. – C. 3852-3859.
234. Sweeten TL et al. C4B null alleles are not associated with genetic polymorphisms in the adjacent gene *CYP21A2* in autism. //BMC medical genetics. – 2008. – T. 9. – №. 1. – C. 1.
235. Tajima, T., Fujieda, K., Nakae, J., Mikami, A. & Cutler, G. B. Jr. Mutations of the *CYP21* gene in nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency in Japan. //Endocrine journal. – 1998. – T. 45. – №. 4. – C. 493-497.
236. Taylor A.H., Guzail M., Al-Azzawi F. Differential expression of oestrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis //British Journal of Dermatology. – 2008. – T. 158. – №. 2. – C. 319-328.
237. Therrell, B. L. Jr et al. results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. //Pediatrics. – 1998. – T. 101. – №. 4. – C. 583-590.
238. Thilen A., Larsson A. Congenital Adrenal Hyperplasia in Sweden 1969-1986 Prevalence, Symptoms and Age at Diagnosis //Acta Paediatrica. – 1990. – T. 79. – №. 2. – C. 168-175.

239. Thompson R., Seargeant L., Winter J. S. D. Screening for congenital adrenal hyperplasia: distribution of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentrations in neonatal blood spot specimens //The Journal of pediatrics. – 1989. – T. 114. – №. 3. – C. 400-404.
240. Tiryaki T., Aycan Z., Hücümenoğlu S. et al. Testis sparing surgery for steroid unresponsive testicular tumors of the congenital adrenal hyperplasia //Pediatric Surgery International. – 2005. – T. 21. – №. 10. – C. 853-855.
241. Török D., Eckhardt G., Sólyom J. Twenty years experience in rapid identification of congenital adrenal hyperplasia in Hungary //European journal of pediatrics. – 2003. – T. 162. – №. 12. – C. 844-849.
242. Trinh L., Nimkarn S., New M.I., Lin-Su K. Growth and pubertal characteristics in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2007. – T. 20. – №. 8. – C. 883-892
243. Tsuji A. et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study //BMC pediatrics. – 2015. – T. 15. – №. 1. – C. 209.
244. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (*CYP21*) using recombinant vaccinia virus. //Journal of Biological Chemistry. – 1990. – T. 265. – №. 34. – C. 20916-20922
245. Tusie-Luna, M.-T., Speiser, P. W., Domic, M., New, M. I., White, P. C. A mutation (pro30-to-leu) in *CYP21* represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. //Molecular endocrinology. – 1991. – T. 5. – №. 5. – C. 685-692.
246. Tyndall V., Broyde M., Sharpe R., Welsh M., Drake A.J., McNeilly A.S. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats //Reproduction. – 2012. – T. 143. – №. 1. – C. 21-33
247. Urban MD, Lee PA, Migeon CJ Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia. //New England Journal of Medicine. – 1978. – T. 299. – №. 25. – C. 1392-1396
248. Val P., Jeays-Ward K., Swain A. Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis //Developmental biology. – 2006. – T. 299. – №. 1. – C. 250-256.

249. Van der Kamp HJ, Otten BJ, Buitenweg N, De Muinck Keizer-Schrama SM, Oostdijk W, Jansen M, Delemarre-de Waal HA, Vulsma T, Wit JM. Longitudinal analysis of growth and puberty in 21-hydroxylase deficiency patients. //Archives of disease in childhood. – 2002. – T. 87. – №. 2. – C. 139-144
250. van der Kamp, H. J. & wit, J. M. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. //European journal of endocrinology. – 2004. – T. 151. – №. Suppl 3. – C. U71-U75.
251. van der Kamp, H. J. et al. Cutoff levels of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2005. – T. 90. – №. 7. – C. 3904-3907
252. van der Kamp, H. J. et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in The Netherlands. //Pediatrics. – 2001. – T. 108. – №. 6. – C. 1320-1324.
253. Vermeirsch H., Van den Broeck W., Simoens P. Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations // Reprod Fertil Dev. - 2002. - T. 14. - C. 251–258
254. Votava F. et al. estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. //European journal of endocrinology. – 2005. – T. 152. – №. 6. – C. 869-874.
255. Wallace A. M. et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: a programme based on a novel direct radioimmunoassay for 17-hydroxyprogesterone in blood spots // Journal of endocrinology. – 1986. – T. 108. – №. 2. – C. 299-308
256. Wedell A., Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations //Human Molecular Genetics. – 1993. – T. 2. – №. 5. – C. 499-504.
257. Wedell A, Stengler B, Luthman H. Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. //Human genetics. – 1994. – T. 94. – №. 1. – C. 50-54.
258. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and

- association with disease manifestations. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1994. – T. 78. – №. 5. – C. 1145-1152.
259. Werder E. A. et al. The incidence of congenital adrenal hyperplasia in Switzerland - a survey of patients born in 1960 to 1974 // *Helvetica paediatrica acta*. – 1980. – T. 35. – №. 1. – C. 5-11.
260. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1985. – T. 82. – №. 4. – C. 1089-1093.
261. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1986. – T. 83. – №. 14. – C. 5111-5115.
262. White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2009. – T. 5. – №. 9. – C. 490.
263. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. // *Endocrine reviews*. – 2000. – T. 21. – №. 3. – C. 245-291.
264. White, P. C., Vitek, A., Dupont, B., New, M. I. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – T. 85. – №. 12. – C. 4436-4440.
265. Wiesemann C., Ude-Koeller S., Sinnecker H.G., Thyen U. Ethical principles and recommendations for the medical management of differences of sex development (DSD)/intersex in children and adolescents // *European journal of pediatrics*. – 2010. – T. 169. – №. 6. – C. 671-679.
266. Willhite L. A., O'Connell M. B. Urogenital atrophy: prevention and treatment // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2001. – T. 21. – №. 4. – C. 464-480.
267. WILKINS L. Adrenogenital syndrome due to enzymatic defects in cortisol synthesis. // *The American journal of clinical nutrition*. – 1961. – T. 9. – №. 6. – C. 661-668.

268. Wilkins L., Fleischmann W., Howard J.E. Macrogenitosomia Precox Associated with Hyperplasia of the Androgenic Tissue of the Adrenal and Death from Corticoadrenal Insufficiency Case Report //Endocrinology. – 1940. – T. 26. – №. 3. – C. 385-395.
269. Wilson R. C. et al. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1995. – T. 80. – №. 8. – C. 2322-2329.
270. Wilson RC<sup>1</sup>, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar MR, Najmabadi H, Saffari F, New MI. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. //Molecular genetics and metabolism. – 2007. – T. 90. – №. 4. – C. 414-421.
271. Witchel S.F. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia //Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. – 2012. – T. 19. – №. 3. – C. 151-158.
272. Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, et al. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1996. – T. 81. – №. 11. – C. 4081-4088.
273. wong, T., shackleton, C. H., Covey, T. r. & ellis, G. identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone radioimmunoassays. //Clinical Chemistry. – 1992. – T. 38. – №. 9. – C. 1830-1837.
274. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase *CYP21*, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – №. 17. – C. 12147-12156
275. Young MC, Ribeiro J, Hughes IA Growth and body proportions in congenital adrenal hyperplasia. //Archives of disease in childhood. – 1989. – T. 64. – №. 11. – C. 1554-1558.
276. Zaparackaite I., Barauskas V., Nielsen O.H., Jokela R. Adrenogenital syndrome: feminizing genital reconstruction //Medicina. – 2002. – T. 38. – C. 706-711.

277. Zhong K, Wang W, He F, et al. The status of neonatal screening in China, 2013  
//Journal of medical screening. – 2016. – T. 23. – №. 2. – C. 59-61