

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**

14.01.02 - эндокринология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва, 2019

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении  
«НМИЦ Эндокринологии» Минздрава России

**Научный консультант:**

**Петеркова Валентина Александровна**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

**Официальные оппоненты:**

**Куцев Сергей Иванович**

доктор медицинских наук, член-корр. РАН, Директор  
Федерального государственного бюджетного научного  
учреждения «Медико-генетический научный центр»  
Министерства науки и высшего образования Российской  
Федерации

**Башнина Елена Борисовна**

доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии  
Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Северо-Западный  
государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»  
Минздрава России

**Малиевский Олег Артурович**

доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной  
педиатрии Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования «Башкирский  
государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования Саратовский  
государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава  
России.

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д.208.126.01 в ФГБУ «НМИЦ  
эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117036, г. Москва, ул.  
Дмитрия Ульянова, д. 11

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ  
эндокринологии» Минздрава России и на сайте [www.endocrincentr.ru](http://www.endocrincentr.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

Елена Викторовна Суркова

## Общая характеристика работы

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) представляет собой группу заболеваний, обусловленных нарушением стероидогенеза в результате дефицита одного из ферментов, участвующих в биосинтезе кортизола. Дефицит фермента 21-гидроксилазы является самым частым вариантом и составляет более 90% всех случаев ВДКН. Мутации в гене данного фермента (гене *CYP21A2*) приводят к развитию заболевания. Прослеживается корреляционная связь между конкретной мутацией и тяжестью клинической картины. По степени тяжести выделяют три варианта дефицита 21-гидроксилазы: две классические формы - сольтеряющая и простая вирильная, и неклассическая форма. 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 адренархе. При сольтеряющей форме, которая составляет до 75% всех классических форм, имеется дефицит минералокортикоидов, проявляющийся синдромом потери соли. Неклассическая форма является более легкой и проявляется только в перипубертатном возрасте преждевременным адренархе и симптомами гиперандрогении, такими, как гирсутизм, дермопатия и алопеция.

17-гидроксипрогестерон (17ОНП) - специфический диагностический гормональный маркер дефицита 21-гидроксилазы. Исследование только 17ОНП достаточно для диагностики данной формы ВДКН. Таким образом, дефицит 21-гидроксилазы соответствует условиям включения в программу неонатального скрининга, поскольку является распространенным, потенциально летальным заболеванием, которое может быть диагностировано единственным лабораторным анализом. Тотальный неонатальный скрининг был внедрен во многих странах Европы и США и позволил улучшить показатели своевременной диагностики и успешного лечения данной патологии, снизить летальность от сольтеряющего криза и риск ошибки в выборе пола новорожденного. По результатам неонатального скрининга первого миллиона новорожденных в разных странах мира была определена частота классических форм дефицита 21-гидроксилазы - 1:14199 [Pang SY 1988]. В России до введения процедуры скрининга выполнены единичные эпидемиологические исследования, в которых частота ВДКН составляла от 1:17000 до 1:22000 [Карева М.А. 2004, Храмова Е.Б. 2007]. После введения неонатального скрининга определена частота дефицита 21-гидроксилазы в отдельных регионах России, которая варьирует от 1:5000 до 1:12000 [Григорьян В.В.2014, Ипатова О.Е.2009, Карева М.А. 2011, Храмова Е.Б.2007]. В Российской популяции частота ВДКН до настоящего момента не определена.

Для молекулярно-генетической диагностики дефицита 21-гидроксилазы были предложены разные методы исследования, но сложность организации и полиморфность

данного гена не позволяют выбрать наиболее информативную методику генетической диагностики [Concolino P 2018].

Несмотря на существование нескольких международных протоколов лечения пациентов с ВДКН, по-прежнему актуальны проблемы низкорослости и сниженной репродуктивной функции у этих больных. По данным всех крупных исследований, несмотря на регулярный пересмотр схем глюкокортикоидной терапии, отмечается снижение конечного роста у пациентов с классическими формами ВДКН, что требует продолжить исследования с целью оптимизации лечения для улучшения ростовых показателей.

По данным разных авторов женщины с ВДКН рожают существенно реже, чем средним в популяции: при сольтеряющей форме заболевания процент рожавших женщин стремится к нулю, и при вирильной форме родов меньше, чем в популяции, на 30-50%. Снижение сперматогенеза выявляется у 60% мужчин с классическими формами ВДКН. Причины снижения репродуктивных возможностей у взрослых могут быть связаны с нарушением развития половой системы у детей с ВДКН, что делает особенно актуальным исследование особенностей становления пубертата при данной патологии.

Ранняя диагностика и адекватное лечение дефицита 21-гидроксилазы являются актуальными задачами в современной эндокринологии. Несмотря на значительные успехи за последние несколько десятков лет, существует по-прежнему ряд нерешенных проблем, требующих дополнительного изучения.

### **Цель исследования**

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 исследования**

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 выбора схемы 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, обусловленного 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 год 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 сольтерную, 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 как количество копий 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 2016 г. 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 сольтерияющим, 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.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов, научных выводов и практических рекомендаций в диссертации определяется достаточной численностью групп пациентов для проведения эпидемиологического и клинического анализа, согласно принципам доказательной медицины, применением стандартных клинических, экспериментальных лабораторных методов исследования и методов статистической обработки, адекватных поставленным задачам. Результаты исследования согласуются с опубликованными данными по теме исследования, а также содержат новые данные.

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
- Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «ОРФАННЫЕ БОЛЕЗНИ», 1-3 июня 2017 года, Москва
- III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии», 1-4 марта 2017 года, Москва

### **Материалы и методы исследования**

#### **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 г. 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 включены 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.

Критериями диагностики 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 > 2лет от паспортного
- Уровень 17ОНП более 30 нмоль/л

Для сольтеряющего синдрома

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

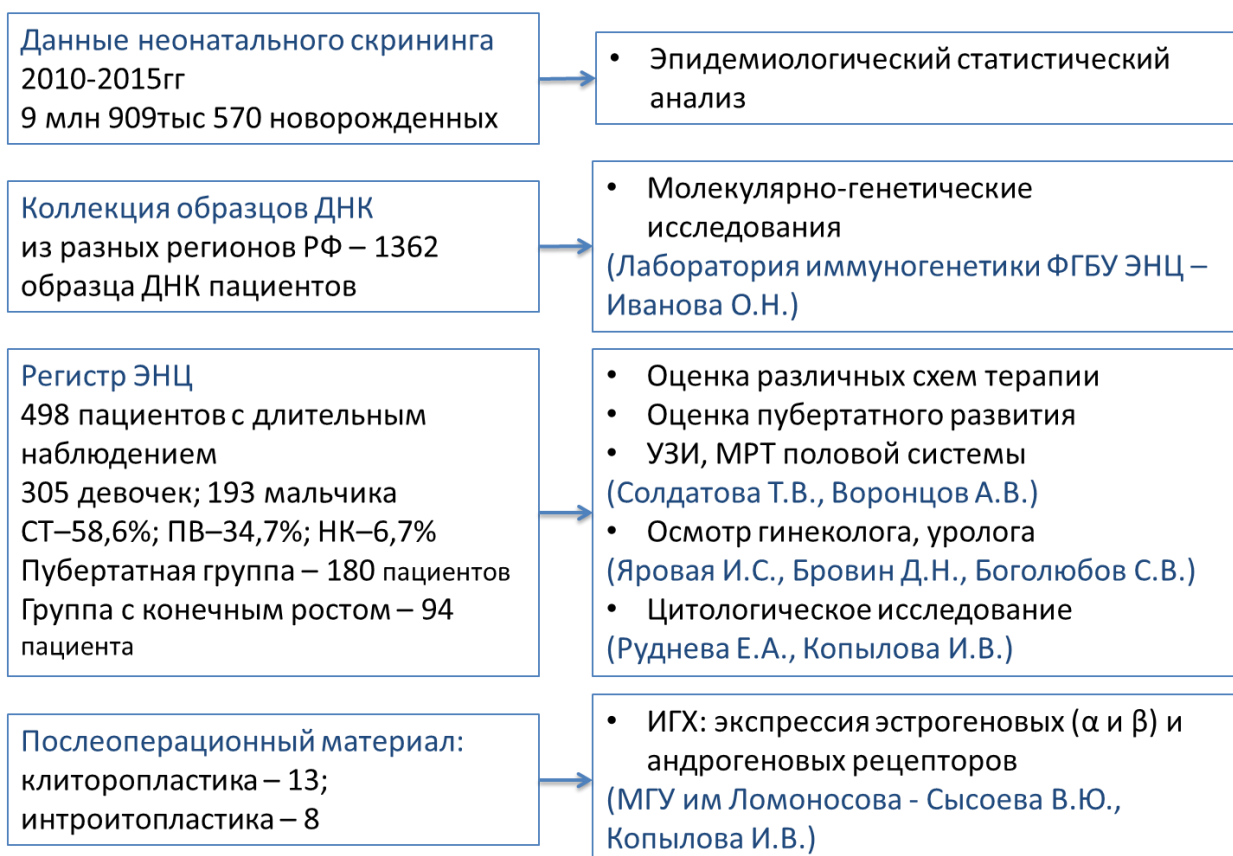
Для неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы

- Преждевременное адренархе (до 9 лет)
- опережение роста >2SD
- опережение костного возраста > 2лет от паспортного
- Уровень 17ОНП более 10 нмоль/л
- Результаты мультитероидного 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. и включает 498 пациентов с длительным наблюдением, из них 305 девочек и 193 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 сольтерьющей 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



**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 (Harpenderstadiometr, HoltainLtd, UK) до 2015 г. и с помощью телескопического механического ростомера Seca 222 (Германия) после 2015 г. 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 TannerJ и WhitehouseH.
- 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 (OrthoClinicalDiagnostix, «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 DirectRenin (DiaSorinS.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 BeckmanCoulter (BeckmanCoulter, Inc., США).
- Ультразвуковое исследование органов мошонки (отделение функциональной диагностики ФГБУ ЭНЦ, зав. отд., к.м.н. Солдатов Т.В.) проводилось на ультразвуковом сканере ToshibaAplio XG-790 (Япония) с использованием линейного датчика с частотой 10-12 МГц. Объем тестикул рассчитывался по формуле 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 ZeissPrimoStar 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:  $ИС = (\% ПР \times 0.5) + \% КП$ .
- Иммуногистохимическое определение эстрогеновых (ЭРа и ЭРβ) 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 ЭРа, ЭРβ и АР выполнено на парафиновых срезах толщиной 3 мкм по стандартной иммуногистохимической методике на иммуностейнере AutostainerLink 48 (Dako, США) с использованием коммерческих мышиных моноклональных антител против ЭРа (клон 6F11, в разведении 1:80); ЭРβ (клон EMR02, разведение 1:50); АР (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 PeroxidaseDetectionSystem (Novocastra, Великобритания). В качестве негативного контроля была использована ткань миндалин, в качестве положительного – ткань эндометрия (для ЭРа), кожи (для ЭРβ), карциномы простаты (для АР), рекомендованные в описании к коммерческим антителам. Для серо-негативного контроля был использован мышиный IgG (FLEXNegativeControlMouseCocktail; Dako). Морфометрический анализ проведен на микроскопе ZeissAxioscop 40, оснащенный камерой AxioCamMRc5 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.

- 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 (PromegaInc, США) согласно протоколу производителя. Метод аллель-специфической ПЦР использовали для детекции 12 точечных мутаций в гене *CYP21* по методике A.Wedell и H.Luthman 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 MicrosoftExcel 2003 с помощью пакета прикладных программ Statistica («StatSoftInc.», 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. 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.

## Результаты

### Эпидемиология

#### *Эпидемиологические результаты неонатального скрининга*

Всего процедуре неонатального скрининга с 2010 г. по 2015 г. 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. (Табл. 1)

**Таблица 1 - Данные по неонатальному скринингу на врожденную дисфункцию коры надпочечников по годам.**

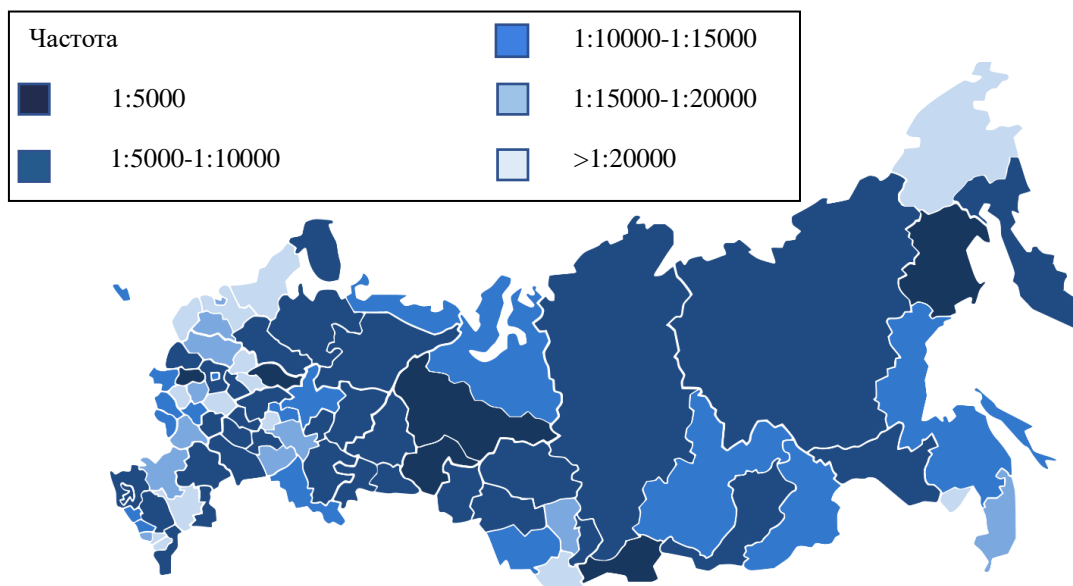
Год	Кол-во новорожденных	Кол-во прошедших скрининг (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
2010	1781965	1678771 (94,2%)	202	1:8310,7
2011	1782260	1660301 (93,16%)	174	1:9542
2012	1892342	1855295 (98,04%)	199	1:9323
2013	1167645	1127693 (96,58%)	106	1:10639
2014	1905694	1854839(97,33%)	180	1:10305
2015	1243192	1216154 (97,83%)	118	1:10306
Всего за 6 лет в России	9909570	9531917(96,2%)	989	1:9638

Наше исследование показывает, что частота классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в России оказалась выше среднемирового показателя (1 случай на 14198 новорожденных) и сравнима с Северной Европой (Швеция, Голландия) и Южной Америкой.

**Таблица 2 - Данные по неонатальному скринингу на врожденную дисфункцию коры надпочечников по округам Российской Федерации.**

Округ	Кол-во новорожденных	Кол-во прошедших скрининг	Охват (%)	Кол-во выявленных больных	Частота
Центральный ФО	2287154	2235635	97,75	229	1:9763
Северо-Западный ФО	864688	833067	96,34	56	1:14876
Южный ФО	1056103	998727	94,57	107	1:9334
Северо-Кавказский ФО	830891	737785	88,79	66	1:11179
Приволжский ФО	2021889	1958710	96,88	217	1:9026
Уральский ФО	946014	911172	96,32	135	1:6749
Сибирский ФО	1458948	1430487	98,05	149	1:9601
Дальневосточный ФО	443883	426335	96,05	30	1:14211
<b>Всего в РФ</b>	<b>9909570</b>	<b>9531917</b>	<b>96,19</b>	<b>989</b>	<b>1:9638</b>

В разных регионах Российской Федерации отмечаются различия в частоте данной патологии (Табл. 2). 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 (Рис. 1).



**Рисунок 1 - 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.

#### *Эпидемиология аллельных вариантов СYP21 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 3 - Распределение аллельных вариантов в разных этнических группах.**

		Частота аллельного варианта, %					
Регион (кол-во пациентов)	Этническая группа (кол-во хромосом)	Del	I2spl	I172N	Q318X	R356W	Другие варианты <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%

		Частота аллельного варианта, %					
Регион (кол-во пациентов)	Этническая группа (кол-во хромосом)	Del	I2spl	I172N	Q318X	R356W	Другие варианты <sup>1</sup>
	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%
к другим вариантам относятся мутации: L307insT, V281L, V237E, P30L, P453S, которые встречаются в единичных случаях во всех группах. у Башкир выявлено сочетание мутаций Q318X и R356W на одном аллеле в 5-и хромосомах.							

В регионах частота заболевания различалась от 1 случая на 5773 новорожденных в Удмуртии до 1:17996 – в Татарстане, в Башкирии частота 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 (Табл. 3).



**Таблица 4 - Распределение частых мутаций гена *CYP21* в разных этнических группах**

Этническая группа (количество хромосом)	Частота аллельного варианта, p - достоверность различий				
	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
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 (Табл. 4).

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.

### Молекулярная генетика

#### *Результаты генетического исследования методом аллель-специфической ПЦР на 12 частых мутаций в гене *CYP21* в группе пациентов с ВДКН и подозрением на данный диагноз*

Всего молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21* методом аллель-специфической ПЦР на 12 частых мутаций было проведено у 1362 пациентов (Табл. 5).

**Таблица 5 - Распределение по полу и форме заболевания в группе пациентов, которым проводилось молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21*.**

<b>Форма заболевания</b>	<b>Всего пациентов (% от всех форм)</b>	<b>Мальчики (% внутри данной формы)</b>	<b>Девочки (% внутри данной формы)</b>
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 (до клинического определения формы ВДКН)	33 (2,4%)	21 (63,6%)	12 (36,4%)

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%). 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).

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 (Табл. 6).

**Таблица 6 – Выявление частых мутаций в гене *CYP21* методом аллель-специфической ПЦР в зависимости от формы ВДКН**

<b>Форма ВДКН</b>	<b>Выявлено 2 мутации</b>	<b>Выявлена 1 мутация</b>	<b>Мутаций не выявлено</b>
Классические формы	85%	4%	11%
СТ	90,3%	2,9%	6,8%
ПВ	71,8%	7,2%	21%
Неклассическая форма	40%	8,4%	51,6%
Неопределенная форма при неонатальном скрининге	75,5%	0	24,5%

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). Низкий процент выявляемости мутаций при неклассической форме в нашем исследовании связан с отсутствием четких гормональных критериев для постановки данного диагноза в детском возрасте. Существующие критерии имеют большую специфичность для постпубертатного возраста, но не позволяют четко дифференцировать идиопатическое преждевременное adrenarхе от неклассической формы ВДКН.

### ***Результаты секвенирования гена CYP21 в группе пациентов с ВДКН и подозрением на данный диагноз***

Метод аллель-специфической ПЦР 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 гена *CYP21* было проведено у 27 пациентов (7 пациентов с сольтеряющей формой, 6 пациентов с вирильной формой, 10 пациентов с неклассической формой и 4 пациента с положительным результатом неонатального скрининга). В 16 случаях диагноз подтвержден, были найдены 11 редких мутаций или сложных перестроек гена. В 11 случаях диагноз дефицита 21-гидроксилазы был исключен. Мутаций не было выявлено у 6 из 10 пациентов с подозрением на неклассическую форму заболевания, у 4 из 4 пациентов с положительным неонатальным скринингом и у 1 мальчика с простой вирильной формой ВДКН, у которого в дальнейшем был установлен диагноз дефицита 11 $\beta$ -гидроксилазы. Результаты секвенирования гена *CYP21* представлены в таблице 7.

**Таблица 7 - Результаты секвенирования гена *CYP21***

<b>Пациент №, пол, форма заболевания</b>	<b>Метод АС-ПЦР</b>	<b>Секвенирование</b>	<b>Предсказанная форма для редкой мутации</b>
№1 жен ПВ	Q318X +/-	Q318X+/- R483Q+/-	ПВ
№2 жен СТ	Не удалось определить носительство мутации P453S	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 +/-	?

Пациент №, пол, форма заболевания	Метод АС-ПЦР	Секвенирование	Предсказанная форма для редкой мутации
№5 жен ПВ	Не удалось определить носительство мутаций R356W, Q318X, L307insT, V237E	Del 4-9 ex +/+	?
№6 муж ПВ	I172N +/-	I172N+/- R354C+/-	СТ
№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_394InsA/T93fsX94 +/-	?
№15 муж СТ	I172N+/-	I172N+/- R483W+/-	?
№16 жен СТ	Q318X+/-	Q318X +/- R483W+/-	?

***Результаты использования метода мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA) в группе пациентов с ВДКН и подозрением на данный диагноз***

Другим ограничением метода 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 как количество копий активного гена *CYP21A2*, так и количество копий

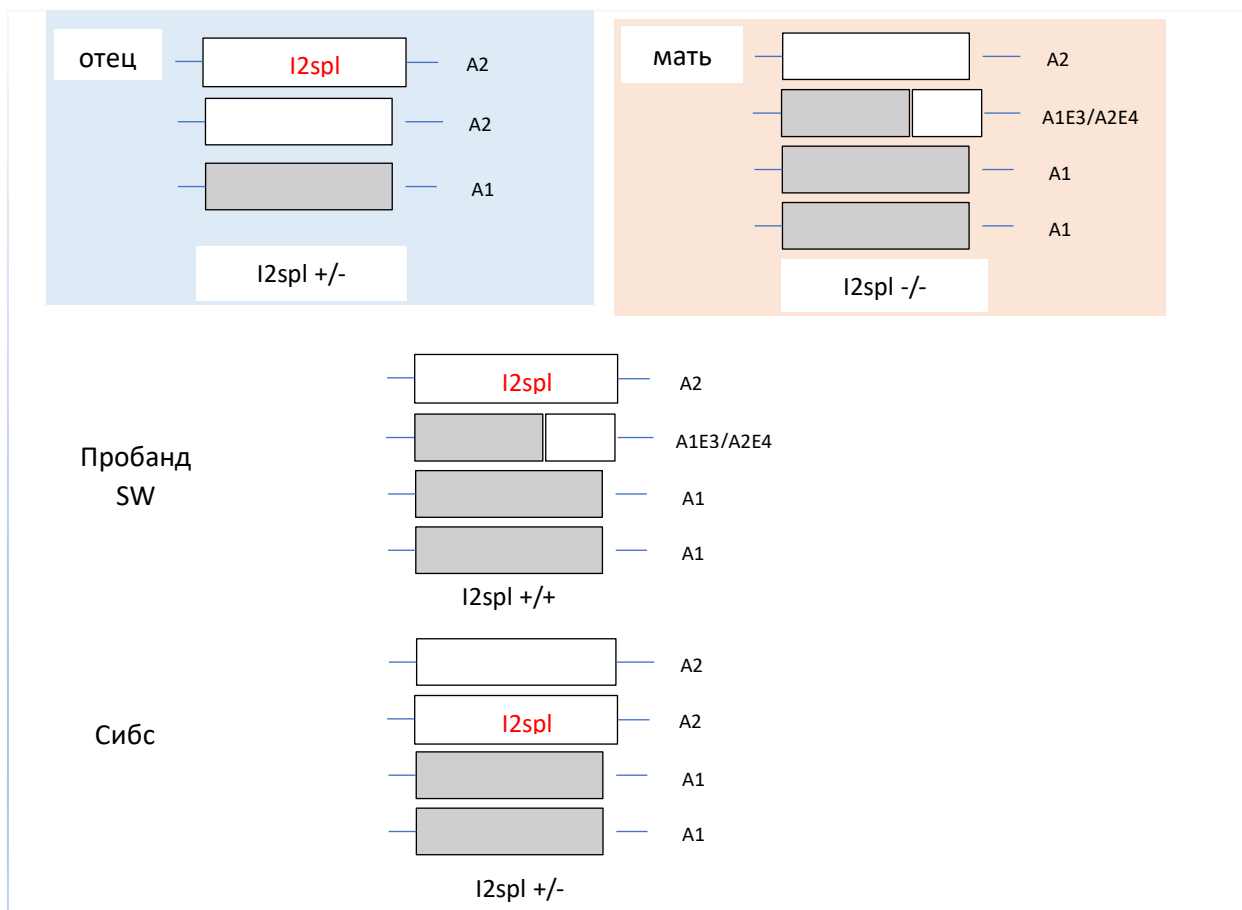
псевдогена *CYP21A1* (*CYP21P*), помимо этого, данный метод позволяет определить наличие сложных химерных генов.

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.

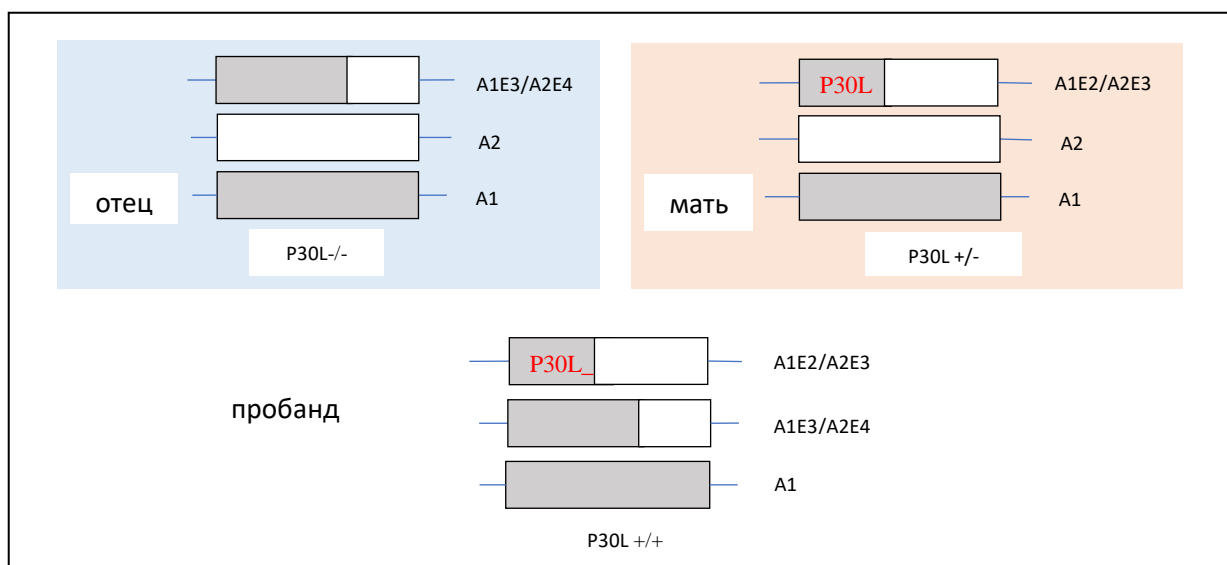
Всего в нашей группе было выявлено три типа химерных генов: самый частый вариант – СН1, промоторная область которого соответствует псевдогену, а точка соединения приходится в области 3-его интрона (*CYP21A1Ex3/CYP21A2Ex4*). Такой вариант химерного гена выявлен в 6 семьях (Рис. 2).

Второй вариант выявленного химерного гена – это так называемый аттенуированный химерный ген (СН4), 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 Р30L, которая соответствует неклассической или легкой вирильной форме заболевания. В нашей группе данный вариант химерного гена был выявлен в одной семье (Рис. 3).

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. Выявление данного варианта химерного гена у одной из пациенток позволило исключить диагноз неклассической формы ВДКН, тогда как методом аллель-специфической ПЦР у нее определялось носительство четырех гетерозиготных мутаций.

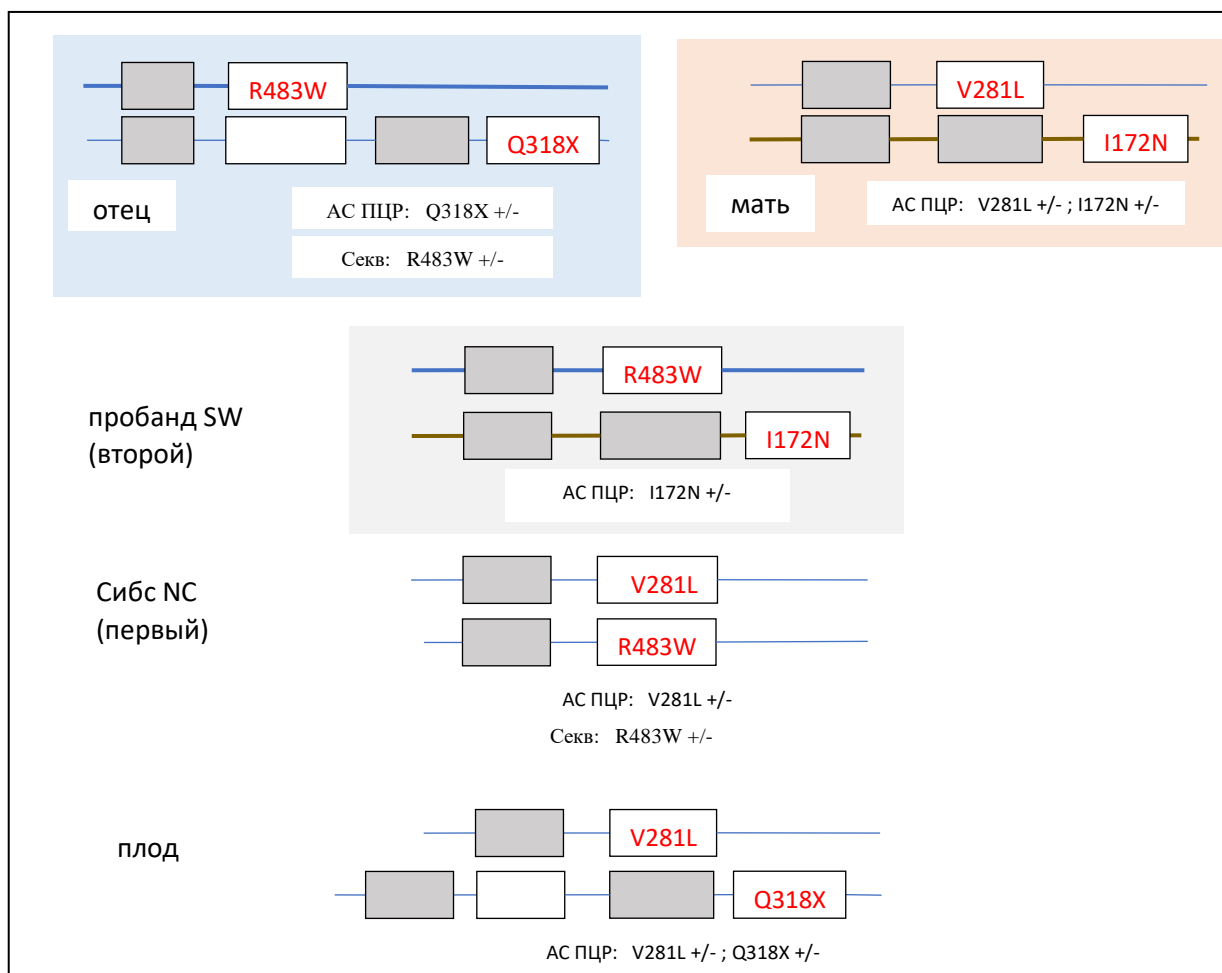


**Рисунок 2 -Схема распределения аллелей в семье №1.** (A1 – псевдоген *CYP21A1P*; A2 – активный ген *CYP21A2*, A1E3/A2E4 – химерный ген с промоторной областью и первыми тремя экзонами псевдогена и точкой соединения в третьем интроне; I2spl – мутация во втором интроне, приводящая к нарушению сплайсинга; +/- - гетерозиготная мутация; SW – сольтертяющая форма ВДКН).



**Рисунок 3 -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

Использование метода, позволяющего оценить распределение патогенных аллелей в семье, необходимо для предсказания формы заболевания при проведении пренатальной диагностики. Так в нашем исследовании использование метода MLPA позволило предсказать рождение здорового ребенка, у которого методом аллель-специфической ПЦР было выявлено две патогенные мутации с прогнозированием неклассической формы ВДКН (Рис. 4).



**Рисунок 4** -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; ++ - гомозиготная мутация; +/- - гетерозиготная мутация)

Таким образом, по результатам наших исследований молекулярно-генетическую диагностику врожденной дисфункции коры надпочечников целесообразно проводить поэтапно с использованием нескольких методик. На первом этапе целесообразно использовать метод аллель-специфической ПЦР, чувствительность которого составляет 85%. Для поиска редких мутаций в гене *CYP21A2* используется секвенирование. С целью

генетического консультирования семей и планирования пренатальной диагностики в ряде случаев дополнительно необходимо применять метод MLPA, позволяющий определять количество копий гена *CYP21A2* и гена *CYP21A1P*.

### **Корреляция генотипа с формой врожденной дисфункции коры надпочечников**

Определение корреляции между генетическим дефектом и клинической формой заболевания необходимо для пренатальной диагностики в семьях с историей врожденной дисфункции коры надпочечников. 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 Р30L, 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.

Для количественного анализа корреляции генотип-фенотип был использован показатель положительной предсказательной ценности (ППЦ) данного генотипа, который рассчитывается как отношение пациентов с предсказанной формой заболевания к количеству пациентов с данным генотипом.

**Таблица 8 - Сравнение генотип-фенотип**

Группа	генотип	Количество пациентов с сольтеряющей формой	Количество пациентов с вирильной формой	Количество пациентов с неклассической формой	ППЦ*
Группа 0	Del	233	1	-	99,6%
	Q318X	64	1	1	97%
	R356W	61	11	-	84,7%
	V237E	7	2	-	77,8%
	L307insT	2	-	-	100%
Группа А	I2spl	257	27	-	90,5%
Группа В	I172N	63	119	4	64%
Группа С	P30L	14	46	6	69,7%



Группа	генотип	Количество пациентов с сольтеряющей формой	Количество пациентов с вирильной формой	Количество пациентов с неклассической формой	ППЦ*
					для ПВ
	P453S	6	4	3	
	V281L	14	34	87	64,4%

\*ППЦ – позитивная предсказательная ценность

Выявлена высокая предсказательная ценность генотипов, приводящих к сольтеряющей форме заболевания (93,6% для генотипа «0» и 90,5% для генотипа «А»), в то время как для генотипов группы «В» и группы «С» предсказательная ценность значительно ниже (64%).

### *Роль генетического тестирования в неонатальном скрининге*

Одной из целей неонатального скрининга является предотвращение сольтеряющих кризов в неонатальном периоде. Однако по результатам скрининга выявляется часть пациентов с неклассической формой заболевания, не требующих терапии на первом году жизни. Следовательно, практический интерес представляет поиск критериев предсказания формы ВДКН на доклиническом этапе. Нами проведено сравнение уровня 17ОНП как одного из возможных маркеров формы ВДКН с генотипом пациентов.

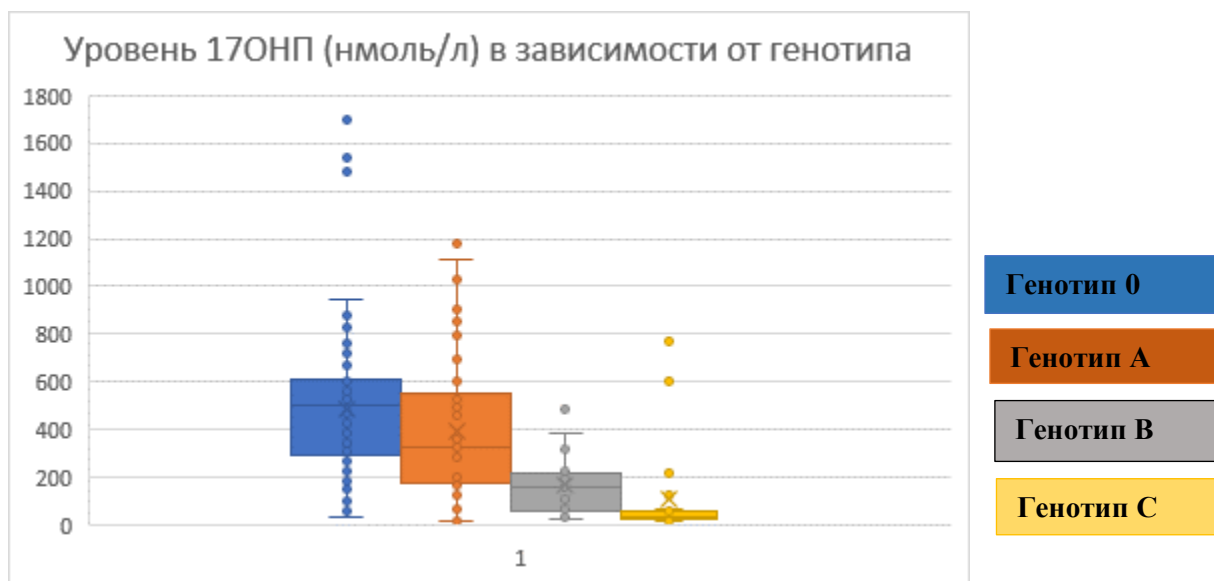
Молекулярно-генетическое исследование методом аллель-специфической ПЦР было проведено у 280 новорожденных с положительным результатом неонатального скрининга. Частые мутации были выявлены у 220 детей (78,6%), среди девочек мутации выявлены у 129 пациенток (83,2%), среди мальчиков – у 91 пациента (72,8%). По результатам генетического исследования пациенты были разделены на 4 группы в зависимости от предсказанной степени потери ферментативной активности. При сравнении медианы уровня 17ОНП в сформированных группах получена достоверная разница между всеми группами (метод Краскела-Уоллиса  $H=63,9 > 7,815$ ,  $P<0,001$ ) (Табл. 9).

**Таблица 9 - 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]

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 (Рис. 5).



**Рисунок 5 - Сравнение уровня 17ОНП в группах новорожденных с положительным результатом неонатального скрининга в зависимости от генотипа**

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.

### **Результаты длительного наблюдения за пациентами с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы**

#### *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 сольтеряющей формой заболевания (34 девочки и 12 мальчиков) и 48 пациентов с простой вирильной формой заболевания (29 девочек и 19 мальчиков) (Таблица 10).

**Таблица 10 - 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

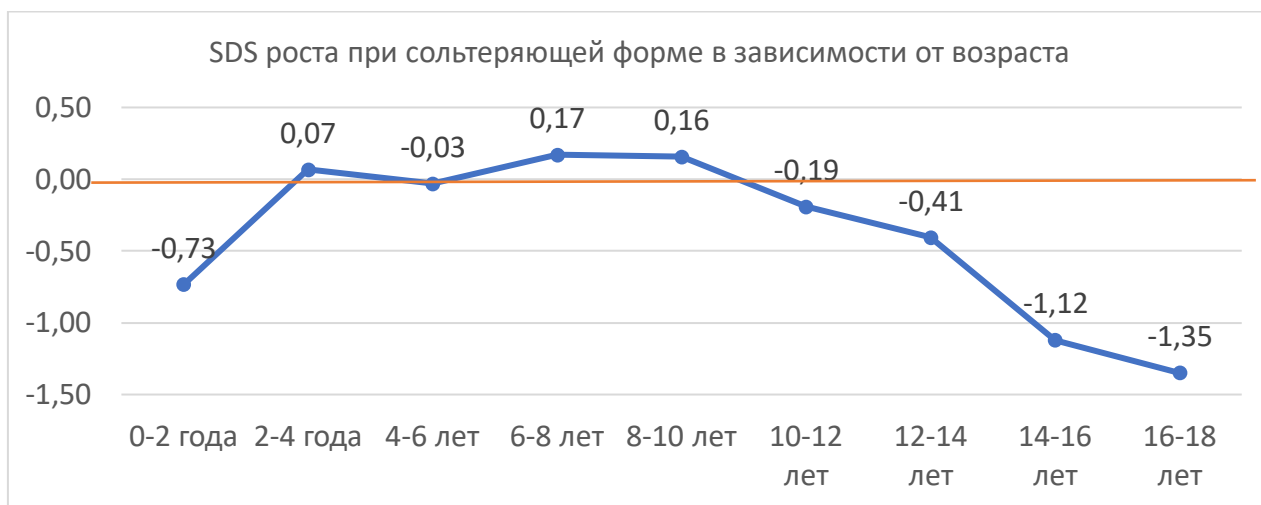
Конечный рост оказался ниже целевого во всех группах пациентов. У мальчиков отставание в росте от целевых значений составило 12,5см±7,8 при сольтеряющей форме и 15,8см±6,6 при вирильной форме, достоверно не различаясь между формами заболевания (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=0,5 < t_{кр}=2,1$ ;  $p>0,05$ ). Отставание в росте от целевых значений у девочек было значимо меньше и также не отличалось при сольтеряющей (7,6см±6,1) и при вирильной формах (7,9см±5,6) (t-критерий Стьюдента  $t_{эмп}=0,2 < t_{кр}=2$ ;  $p>0,05$ ).

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. 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.

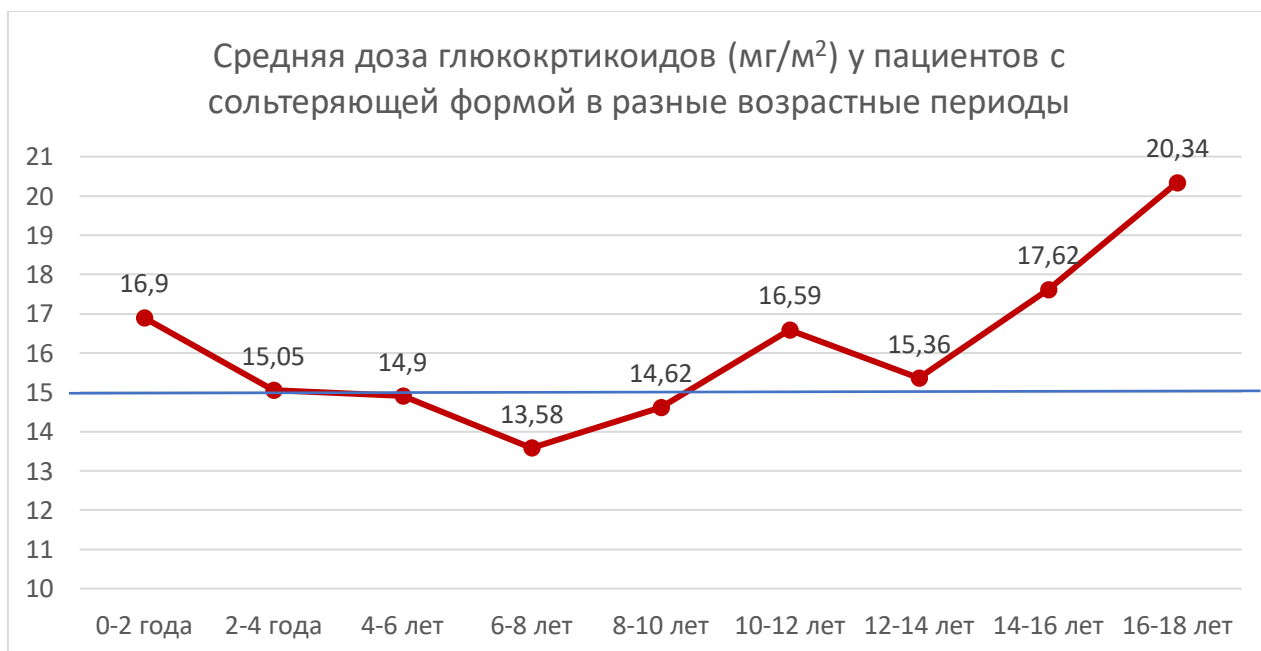
При анализе процесса роста в разные возрастные периоды при сольтеряющей форме заболевания обозначилось два возрастных периода, когда происходит снижение скорости роста: это период до 2-х лет жизни и период пубертата. SDS роста к двум годам в группе с сольтеряющей формой заболевания снизилось до -0,73±1,3, затем до начала полового развития показатели SDS колебались около +0, но в период пубертата планомерно снижались, достигая к окончанию процессов роста -1,3±1,2 (Рис. 6). 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.

Средние дозы глюкокортикоидных препаратов, используемых в первые два года жизни и во время полового созревания, были достоверно выше, чем дозы, используемые в период детства. 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 (Рис. 7). Между SDS роста и дозой глюкокортикоидов определяется сильная обратная корреляционная связь ( $R=-0,835$ ).



**Рисунок 6 - Динамика SDS роста при сольтерющей форме заболевания на протяжении периода детства**



**Рисунок 7 - Динамика суточной дозы глюкокортикоидных препаратов, рассчитанная как количество гидрокортизона на площадь поверхности тела, у пациентов с сольтерющей формой ВДКН на протяжении детства**

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). У одного мальчика с сольтеряющей формой заболевания 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 0,04 мг/кг/сут., у двух пациентов через 6 мес от начала терапии доза была увеличена до 0,05 мг/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 (23,8 мес).

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 11 - 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		Р (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) (Табл. 11).

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

### *Половое развитие девочек с классическими формами дефицита 21-гидроксилазы*

Для оценки становления пубертата была отобрана группа девочек с классическими формами ВДКН пубертатного возраста. В группу включено 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). 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) ( $p = 0,043$ ).

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 (объем матки 30,5 мл (20,9; 37,4)) по сравнению с аналогичными популяционными показателями для стадии полового созревания Таннер 5 (объем матки – 43 мл (12-82)).

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. 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 (Табл. 12).

**Таблица 12 - Сравнение размеров матки в группе девочек с ВДКН в стадии компенсации и у девочек с пубертатной гиперандрогенией.**

Показатель	Компенсация ВДКН	Пубертатная гиперандрогения	p (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
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.

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)). Сольтерьяющая форма ВДКН отмечалась у 10 девочек, 11 имели простую вирильную форму. Данные девочки были разделены на подгруппы с компенсацией (n=10) и декомпенсацией (n=11) заболевания в течение предшествующего исследованию года. 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. Результаты цитологического исследования в группах пациенток приведены в таблице 13.

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)).

**Таблица 13 - Цитологические показатели вагинального эпителия у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников в зависимости от компенсации заболевания в сравнении с группой контроля.**

	Группа 1 декомпенсации	Группа 2 компенсации	Р 1/2	Группа 3 контроль	Р 2/3
КП, %	6,5 (0,0;13,5)	24 (12; 29)	p=0,0014	22,2 (16; 30)	нд
ПР, %	84 (75;93,5)	76 (71; 88)	нд	76,7 (70; 84)	нд
ПБ, %	8,5 (0,0;20,5)	0,0 (0,0; 0,0)	p=0,003	0,0 (0,0; 0,0)	нд
ИС, %	48,3 (39,7; 53,7)	62 (56; 64,5)	p=0,0007	61,1 (57,6; 65,0)	нд

Нами была высказана гипотеза о возможном 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 (n=13) и участок стенки дистальной части влагалища, прилежащей ко входу, у пубертатных пациенток (n=8), полученные в процессе проведения феминизирующей пластики.

Общий процент клеток, экспрессирующий  $\alpha$ -эстрогеновые рецепторы (ЭР $\alpha$ ) оказался невысоким – 16,8% (12,7; 22,8). Распределялись ЭР $\alpha$  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).

Было выявлено высокое содержание клеток, экспрессирующих  $\beta$ -эстрогеновый рецептор (ЭР $\beta$ ) - 93,57% (86,2; 95,7). 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).

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).



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.

По результатам иммуногистохимического исследования стенки влагалища у пубертатных девочек общий процент иммунопозитивных ЭР $\alpha$  клеток в слизистой 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 ( $P < 0,05$ ). 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).

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, с **строме** встречались единичные АР-позитивные фибробласты. 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,  $p > 0,05$ ).

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.

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.

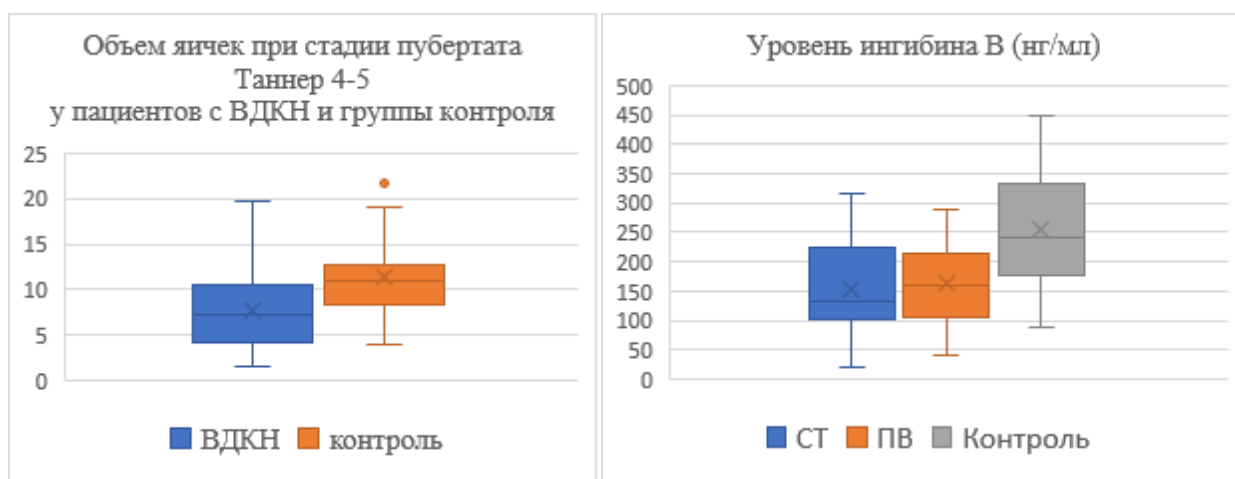
### *Половое развитие у мальчиков с врожденной дисфункцией коры надпочечников*

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.

Для оценки возраста вступления в истинный пубертат была выделена группа пациентов с объемом яичек по данным орхидометра более 4 мл и менее 6 мл (маркер

активации истинного пубертата). Данная группа состояла из 66 мальчиков, среди них сольтерьющая 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 сольтерьющей и при вирильной форме ВДКН возраст вступления в истинный пубертат достоверно не отличался. Медиана костного возраста на момент начала истинного пубертата в группе составила 13,5 лет (12;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, сопоставимая по возрасту и стадии полового развития, включающая 18 мальчиков пубертатного возраста, не имеющих эндокринной патологии и не получавших лечение препаратами глюкокортикоидов и половых стероидов. Объем яичек у пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников оказался достоверно меньше, чем в контрольной группе (7,29 мл (4,39; 10,12) против 10,95 мл (8,45; 12,2)  $p < 0,01$ ) (Рис. 8).



**Рисунок 8 - Объем яичек и уровень ингибина В у пациентов с ВДКН в стадии полового развития 4-5 по Таннер в сравнении с группой контроля**

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 151,7 нг/мл (105,87; 203,73), что оказалось достоверно ниже, чем в группе контроля (242,11 нг/мл (177,4; 317,37)).

#### *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 14.

**Таблица 14. 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 +/+
№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.

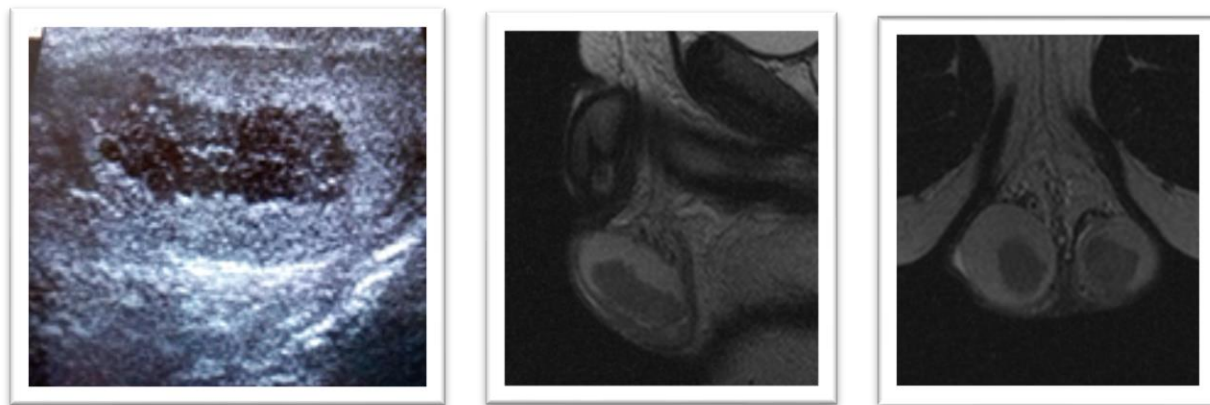
Среди пациентов с выявленными опухолями в яичках все, кроме одного (№6), были с сольтерьющей формой заболевания, частота выявления TART в группе пациентов с сольтерьющей формой составила – 28,6% (14/49), а в группе с вирильной форме – 3,2% (1/31).

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.

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.

При проведении УЗИ TART представляли собой зоны пониженной эхогенности с нечеткими контурами, расположенные в области средостенья яичек, по данным доплерографии выявлялся активный внутриузловой кровоток. При значительном размере образований отчетливо выявлялась компрессия здоровой ткани яичка (Рис. 9).

Вследствие отсутствия четких границ TART по данным УЗИ не всегда возможно достоверно определить размеры и объем опухолевой ткани. 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 (Рис. 9).



**Рисунок 9. УЗИ и МРТ яичек у пациентов с ВДКН.**

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 (68,9 нмоль/л (43,8; 209,75)) в сравнении с пациентами с сольтеряющей формой ВДКН без опухолей яичек (26,3 нмоль/л (6,1; 63)) ( $p < 0,01$ ). 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),  $p < 0,07$ ) (Рис.10).

Уровень ингибина В у пациентов, имеющих объемные образования в яичках, оказался достоверно ниже, чем у пациентов с сольтеряющей формой без очаговых изменений в яичках (104,5 нг/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.

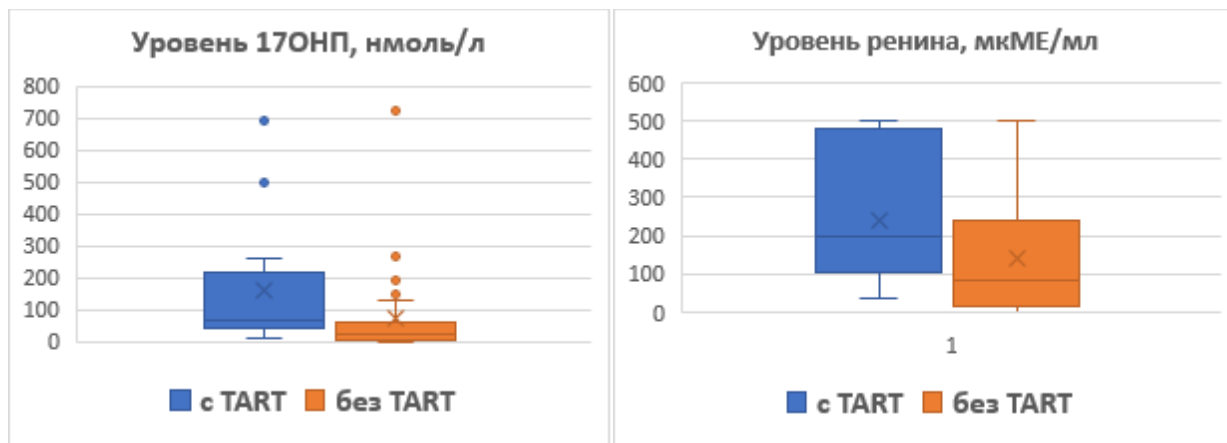


Рис. 10. Уровень 17ОНП и ренина у пациентов с TART и без TART.

### 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 7,5-8 см для девочек и 12-16 см 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 3 см 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 (testicularadrenalresttumors), преимущественно при сольтеряющей форме заболевания. Снижение уровня ингибина В более выражено у пациентов с TART по сравнению с пациентами с сольтеряющей формой ВДКН.

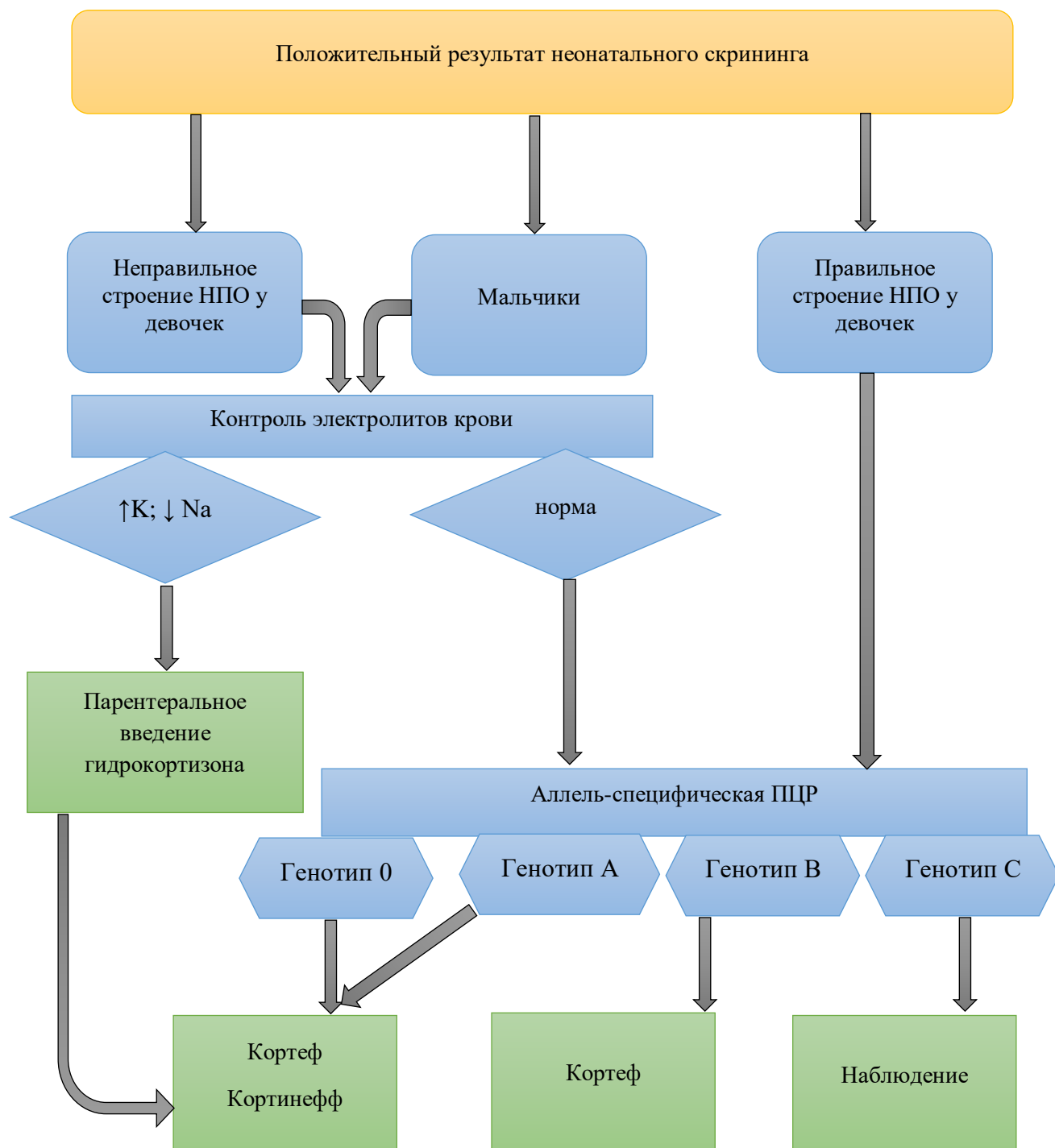
### **Практические рекомендации**

11. 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.
12. 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.

13. На первом году жизни рекомендуемые дозы гидрокортизона составляют до 15 мг/м<sup>2</sup>. Превышение указанной дозировки ведет к значимому снижению скорости роста.
14. Наблюдение за подростками с классическими формами ВДКН должно осуществляться чаще, чем за детьми допубертатного возраста, оптимальная частота наблюдения - 1 раз в 3 месяца.
15. 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.
16. В качестве дополнительного параметра, позволяющего определить степень эстрогеновой насыщенности тканей промежности и готовность к проведению интроитопластики у девочек-подростков, является цитологическое исследование влагалищных мазков.
17. 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.
18. Рекомендуемая доза глюкокортикоидных препаратов в подростковый период не должна превышать 18 мг/м<sup>2</sup> при условии отсутствия TART у мальчиков и удовлетворительных размеров 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 мг/м<sup>2</sup> 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 работ, опубликованных автором по теме диссертации

Всего 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», в национальном руководстве «Эндокринология», «Справочник по детской эндокринологии».

1. Метод аллель-специфической ПЦР в диагностике 21-гидроксилазной недостаточности: Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая эндокринология: достижения и перспективы» / М.А. Карева, И.В. Орловский, Д.А. Акжигитова, Л.А. Лоскутова, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова - С.-Петербург, 2003.
2. Карева М.А., Семичева Т.В. Современные методы диагностики и лечения ВДКН у детей // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Врачи мира пациентам» - С.Петербург, 2003.
3. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей (недостаточность 21-гидроксилазы) / В.А. Петеркова, Т.В. Семичева, М.А. Карева, О.В. Духарева, А.П. Андрейченко, Г.С. Колесникова, И.С. Яровая, С.А. Прокофьев, Д.А. Акжигитова - Москва, 2003 - Информационное письмо (№15).
4. Петеркова В. А. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей / В.А. Петеркова, Т.В. Семичева, М.А. Карева, Э.С. Кузнецова, И.С. Яровая // Пособие для врачей – Москва, 2003.
5. The spectrum of CYP21 gene mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia of Russian Federation»: Abstract of 6th European congress of Endocrinology / М.А. Kareva, I.V. Orlovski, E.I. Bateneva, D.A. Akzhitova, L.A. Loskutova, V.S. Ivoilov, E.S.

- Kuznetsova, T.V. Semitcheva, V.A. Peterkova // Hormone research in paediatrics – 2003 - vol. 80, Suppl. 2.
6. Дедов И. И. Молекулярная диагностика классических форм врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицит стероид-21-гидроксилазы) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции / И.И. Дедов, И.В. Орловский, М.А. Карева, Л.И. Лоскутова, Е.И. Батенева, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова // Молекулярная медицина - 2004 - №2 – С. 60-65.
  7. Epidemiology and genetics of 21-hydroxylase deficiency / М.А. Kareva, D. Akjigitova, S.A. Prokofiev, T.V. Semicheva, V.A. Peterkova // Hormone research in paediatrics - 2004 - vol. 62, Suppl. 2.
  8. Эпидемиология дефицита 21-гидроксилазы у детей : Тезисы научно-практической конференции по детской эндокринологии / М.А. Карева, Э.С. Кузнецова, О.В. Духарева, А.П. Андрейченко, В.Ф. Пилюттик, Е.И. Румянцева, Г.В. Фирсова, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова - Москва, 2005.
  9. Дедов И.И., Петеркова В.А. Руководство по детской эндокринологии // Москва: Универсум паблишинг -2006 – Т.600.
  10. Панфилова Е. В. Неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников у девочек-подростков / Е.В. Панфилова, М.А. Карева, Г.С. Колесникова, И.С. Яровая, О.Н. Иванова, Т.М. Атаманова, С.А. Прокофьев, Т.В. Семичева, П.М. Рубцов, В.А. Петеркова // Проблемы эндокринологии - 2006 - Т. 52 – №. 5. – С. 26-31.
  11. Дедова И.И., Мельниченко Г.А. (ред.) Рациональная фармакология в эндокринологии // М.: Литера, 2007.
  12. Карева М.А. АДРЕНОГЕНИТАЛЬНЫЙ СИНДРОМ-ОБЩАЯ ПРОБЛЕМА ЭНДОКРИНОЛОГОВ И ПЕДИАТРОВ // Доктор.ру -2008 - № 6 - С. 77-81.
  13. Орлова Е.М., Карева М.А. Первичная надпочечниковая недостаточность у детей» // Методическое пособие для врачей. – 2008.
  14. Карева М.А. Терапия минералокортикоидной недостаточности у детей // Фарматека - 2008 №17 (171) Эндокринология - С. 36–41.
  15. Опыт применения гормона роста у пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников : Тезисы. 7 Всероссийская научно-практическая конференция «Приоритетный национальный проект «Здоровье», задачи детской эндокринологии в его реализации»/ М.А. Карева, Е.М. Орлова, Э.С. Кузнецова, Т.Ю. Ширяева - Санкт-Петербург, 2-3 июня 2009.
  16. Богданова П.С., Карева М.А. Синдром гиперандрогении у девочек пубертатного возраста // Проблемы эндокринологии – 2010 - №6 – С. 48-54.
  17. Справочник детского эндокринолога / И.И. Дедов, В.А. Петеркова, Т.Ю. Ширяева, О.Б. Безлепкина, М.А. Карева, Т.Л. Кураева, Е.В. Нагаева, Е.М. Орлова, Н.А. Стребкова – М: Литтера, - 2011 – 528 с.

18. 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.
19. Блох С.П., Карева М.А. Анализ конечного роста у пациентов с классическими формами врожденной дисфункции коры надпочечников //Материалы VII Научно-практической конференции «Эндокринологические аспекты в педиатрии» - Москва – 2013.
20. Блох С.П., Карева М.А. Отрицательные последствия несоблюдения процедуры неонатального скрининга у пациенток с врожденной дисфункцией коры надпочечников. // Материалы первой научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья девочек» - Москва, 4-7 июня 2013 года - С. 34.
21. Карева М. А. и др. Эпидемиология и генетика адреногенитального синдрома //Медицинская генетика. – 2013. – Т. 12. – №. 10. – С. 7-11.
22. Размеры матки у девочек с классическими формами ВДКН : Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии» / И.В. Копылова, Т.М Глыбина., И.С. Яровая, М.А. Карева - Саратов, 2013.
23. Копылова И.В., Карева М.А. Факторы риска снижения фертильности у пациенток с врожденной дисфункцией коры надпочечников (обзор литературы) // Проблемы эндокринологии – 2013 - Т. 59 - № 3 – С. 51-56.
24. Копылова И.В., Яровая И.С., Карева М.А. Корреляция генотип-фенотип у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников // Материалы I Научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья девочек» - Москва, 2013 – с. 75-77.
25. Копылова И.В., Яровая И.С., Карева М.А. Степень созревания эпителия влагалища у девочек-подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников //Материалы VII Научно-практической конференции «Эндокринологические аспекты в педиатрии» - Москва, 2013.
26. Дифференциальная диагностика различных форм первичной надпочечниковой недостаточности : Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии» / Е.М. Орлова, М.А. Карева, А.М. Букина, Е.Ю. Захарова – Саратов, 2013.
27. Распространенность TARTs у мальчиков с ВДКН :/ Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии» / И.С. Чугунов, М.А. Карева, Э.С. Кузнецова, В.А. Петеркова – Саратов, 2013.

28. The variability of mutations in patients with 21-hydroxylase deficiency in some ethnic populations resident of the Russian Federation / S. Blokh, M. Kareva, O. Ivanova, O. Malievsky, G. Chistousova, I. Kostrova, O. Kunaeva // *Hormone research in paediatrics* - 2013 - vol. 80, Suppl. 1: 200.
29. Chugunov I., Kareva M., Orlova E., Bogolubov S. Testicular adrenal rest tumors in children with congenital adrenal hyperplasia» // *Hormone research in paediatrics* - 2013 - vol. 80, Suppl. 1: 211.
30. Reduced uterus body length in girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH) / I. Kopylova, I. Yarovaya, T. Glybyna, M. Kareva // *Hormone research in paediatrics* - 2013 - vol. 80, Suppl. 1: 204.
31. Карева М.А., Чугунов И.С. Федеральные клинические рекомендации - протоколы по ведению пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников в детском возрасте // *Проблемы эндокринологии*. - 2014 – Т. 60. – №. 2 -С. 42-50.
32. Копылова И. В. Эстрогенизация наружных половых органов у девочек дисфункцией коры надпочечников в период пубертата/ И.В. Копылова, С.П. Блох, М.А. Карева, И.С. Яровая, Е.А. Руднева, М.Б. Гарунова, Е.В. Сибирская, Т.М. Глыбина // *Проблемы репродукции*. – 2014. – №. 2. – С. 35-42.
33. Копылова И. В. Экспрессия эстрогеновых и андрогеновых рецепторов в тканях наружных половых органов у девочек с врожденной дисфункцией коры надпочечников/ И.В. Копылова, В.Ю. Сысоева, Т.М. Глыбина, М.А. Карева // *Проблемы эндокринологии*. – 2014. – Т. 60. – №. 6 – С. 14-20.
34. Insufficient Mineralocorticoid Replacement as a Predictor Factor for the TART in Boys with Congenital Adrenal Hyperplasia / I. Chugunov, M. Kareva, E. Orlova, E. Kuznecova // *Hormone Research in Paediatrics* - 2015; vol. 84, Suppl 1: 314-315.
35. Распространённость TARTs у мальчиков с ВДКН (дефицит 21-гидроксилазы) : тезисный доклад на межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии»/ И.С Чугунов, М.А Карева, Э.С Кузнецова, В.А. Петеркова -2015
36. Чугунов И. С. Развитие эктопической надпочечниковой ткани в яичках (TART) у детей и подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников / И.С. Чугунов, Т.В. Солдатова, А.В. Воронцов, В.П. Владимирова, С.В. Боголюбов, Е.М. Орлова, М.А. Карева // *Проблемы эндокринологии*. – 2015. – Т. 61. – №. 3 - С.: 9-15.
37. Чугунов И. С. Состояние клеток Сертоли у детей и подростков с врожденной дисфункцией коры надпочечников (дефицит 21-гидроксилазы)/ И.С. Чугунов, А.В. Ильин, С.В. Боголюбов, Э.С. Кузнецова, Е.М. Орлова, М.А. Карева // *Проблемы эндокринологии*. – 2015. – Т. 61. – №. 4 - С. 17-23.

## Список сокращений

Сокращение	Полное наименование
17ОНП	17-гидрокси-прогестерон
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification (мультиплексная лигазозависимая амплификация)
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
ВДКН	врожденная дисфункция коры надпочечников
ГнРГ	гонадотропин-рилизинг гормон
ГР	гормон роста
ИГХ	иммуногистохимическое исследование
ИС	индекс созревания
ИФР-1	инсулиноподобный фактор роста 1
КВ	костный возраст
ЛГ	лютеинизирующий гормон
МРТ	магнитно-резонансная томография
НК	неклассическая форма ВДКН
ПВ	простая вирильная форма ВДКН
ППЦ	позитивная предсказательная ценность
ПЦР	аллель-специфическая полимеразная цепная реакция
СТ	сольтеряющая форма ВДКН
СТГ	соматотропный гормон
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ЭР	эстрогеновый рецептор
17ОНП	17-гидрокси-прогестерон