

Клинико-гормональные особенности неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы у детей первого года жизни, выявленного по результатам неонатального скрининга

Т.А. ИОНОВА*, д.м.н. А.Н. ТЮЛЬПАКОВ

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва

До настоящего времени неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН) достаточно изучена только у пациентов препубертатного и пубертатного периода, а также у женщин репродуктивного возраста. С внедрением неонатального скрининга на врожденную дисфункцию коры надпочечников (ВДКН) НК21ОН все чаще стала выявляться у детей первого года жизни. В отечественной литературе отсутствуют клинико-лабораторные критерии НК21ОН у детей младшей возрастной группы. На основании обследования 50 детей с повышенными уровнями 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) по результатам неонатального скрининга за период 2011—2013 гг. нами сформированы две группы пациентов: 1-я группа ($n=20$) — пациенты с верифицированной НК21ОН и 2-я ($n=30$) — «здоровые» дети с ложноположительным повышением 17-ОНП. Во всех случаях проводилось подробное клинико-гормональное обследование, а также молекулярно-генетический анализ. Основным критерием включения пациентов в 1-ю группу являлось наличие мутаций в гене *CYP21A2*. Мы нашли, что наиболее специфические и точные результаты у пациентов 1 года жизни дает определение 17-ОНП методом тандемной масс-спектрометрии (ТМС), в том числе в рамках мультистероидного анализа, проведение которого показано всем пациентам, у которых в ходе неонатального скрининга на ВДКН выявляются незначительно повышенные значения 17-ОНП. На основании анализа группы «здоровых» пациентов нами определен референсный интервал для 17-ОНП и разработаны критерии заболевания по уровню 17-ОНП, измеренного методом ТМС. На группе пациентов с верифицированной НК21ОН продемонстрировано отсутствие клинико-лабораторных признаков надпочечниковой недостаточности и/или гиперандрогении у пациентов 1 года жизни.

Ключевые слова: неклассическая форма дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН), неонатальный скрининг, 17-гидроксипрогестерон (17-ОНП).

Specific clinical and hormonal features of the non-classical form of 21-hydroxylase deficiency in the children during the first year of life detected from the results of neonatal screening

T.A. IONOVA*, A.N. TYULPAKOV

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

The non-classical form of 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) has up to now been fairly well studied only in the patients of prepubertal and pubertal age as well as in the women of reproductive age. The advent of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (CAD) made it possible to more frequently detect 21-OHD in the children during the first year of life. The domestic literature proposes no clinical and laboratory criteria for 21-OHD in the young children. The results of neonatal screening of 50 children presenting with elevated 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels carried out in the period from 2011 to 2013 were used to form two groups of patients, one comprised of 20 children with verified 21-OHD (group 1), the other containing 30 “healthy” children showing the false-positive elevation of 21-OHD levels. All the patients underwent the comprehensive clinical and hormonal examination supplemented by the molecular-genetic analysis. The main criterion for the inclusion of children in group 1 was the presence of mutations in the *CYP21* gene. It was shown that determination of 21-OHD by tandem mass-spectrometry (TMS) including that in the framework of multisteroid analysis yields the most specific and accurate data in the children below one year of age; such analysis is indicated to all patients in whom the neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia reveals the slightly elevated 17-OHP levels. The analysis for the group of patients with verified 21-OHD has demonstrated the absence of clinical and laboratory signs of adrenal insufficiency and/or hyperandrogenism in the children aged below 1 year.

Key words: non-classical form of 21-hydroxylase deficiency (21-OHD), neonatal screening, 17-hydroxyprogesterone (17-OHP).

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) — группа заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, в основе которых лежит дефект одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в биосинтезе кортизола в коре надпочечников. Более чем в 90% случаев среди известных 7 форм ВДКН встречается дефицит 21-гидроксилазы (p450c21), причем как классические формы (простая вирильная и сольтеряющая),

так и неклассический вариант заболевания (НК21ОН) [1—3]. Распространенность неклассических форм дефицита 21-гидроксилазы колеблется от 1:27 до 1:1000 новорожденных [4—8]; в российской популяции, по нашим данным, эта величина равна 1:2206 новорожденных [9], что делает НК21ОН едва ли не самым частым моногенным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования. Несмотря на высокую распространенность в попу-

ляции, заболевание хорошо изучено лишь у пациентов пубертатного возраста и женщин репродуктивного периода, разработаны алгоритмы диагностики, терапевтическая тактика ведения пациентов этой возрастной группы. Благодаря внедрению исследования на ВДКН в программу неонатального скрининга, отдельным зарубежным исследователям удалось диагностировать НК21ОН в период новорожденности [10—14]. Однако полученные данные скудны и не систематизированы. Клинические наблюдения таких пациентов в отечественной литературе отсутствуют.

В настоящем исследовании проведен подробный анализ клинических и лабораторных показателей в группе детей первого года жизни с доказанной молекулярно-генетически НК21ОН, у которых диагноз был заподозрен на основании положительных результатов скрининга на ВДКН.

Материал и методы

1. Общая характеристика клинических наблюдений

За период 2011—2013 гг. нами наблюдались 50 детей, направленных в отделение наследственных эндокринопатий на дообследование, в связи с выявленным при неонатальном скрининге повышенным уровнем 17-гидроксипрогестерона (17-ОНП) (при первичном тестировании и/или ретестировании). У всех детей определяли уровень 17-ОНП методом иммуноферментного анализа (ИФА), исследовали стероидный профиль крови методом тандемной масс-спектрометрии (ТМС) и проводили молекулярно-генетическое исследование гена *CYP21A2* на частые мутации. При необходимости анализ гена *CYP21A2* на частые мутации дополнялся секвенированием того же гена. У части пациентов определяли также уровни АКТГ и кортизола и активность ренина плазмы (АРП). По результатам обследования были сформированы две группы пациентов: 1-ю (основная) группу ($n=20$) составили дети с НК21ОН; во 2-й группе ($n=30$) оказались пациенты с ложноположительными результатами неонатального скрининга. Основным критерием диагноза являлось наличие мутаций в гене *CYP21A2*. Возраст пациентов колебался от 1 мес до 1 года 2 мес; среди обследуемых было 18 девочек и 32 мальчика.

2. Методы обследования

2.1. Гормональные исследования

17-ОНП определяли методом ИФА с использованием наборов IMMUNOTECH. АРП измеряли радиоиммунологическим методом с помощью наборов той же фирмы. Уровень кортизола исследовали с помощью автоматического анализатора VITROS Eci («Johnson & Johnson», «Ortho-Clinical Diagnos-

tics»), уровень АКТГ — с помощью автоматического анализатора Cobase 411. Содержание кортизола, тестостерона, 21-дезоксикортизола, 17-ОНП, кортикостерона, прогестерона, 11-дезоксикортизола, андростендиона определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) в соответствии с методикой, разработанной в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ ЭНЦ (масс-спектрометр ABSCIEX SelexION). Такой анализ получил название мультистероидный профиль крови.

2.2. Молекулярно-генетические исследования

Геномную ДНК выделяли из периферических лейкоцитов с использованием стандартных методов. Детекцию 11 распространенных мутаций в гене *CYP21A2* методом аллель-специфической полимеразно-цепной реакции (ПЦР) проводили по методике А. Wedell и Н. Luthman с модификациями. Прямое секвенирование проводилось на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130 («Applied Biosystems»).

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка материала проводилась методом математической статистики и осуществлялась при помощи пакета прикладных программ Биостат («Практика», 1999) и Statistica 8 Portable. В ходе исследования анализировались выборки, не подчиняющиеся нормальному распределению и характеризующиеся показателем *Me* (25—75), где *Me* — медиана, 25 и 75% — разброс значений в виде соответствующих перцентилей. При сопоставлении двух независимых выборок пользовались критерием Манна—Уитни (*U*). Для множественных сравнений применялся показатель Краскела—Уоллиса (*H*). Используя принцип решающей матрицы, мы оценивали показатели диагностических тестов: истинно отрицательные результаты (ИО), истинно положительные результаты (ИП), ложноотрицательные результаты (ЛО), ложноположительные результаты (ЛП) и информативность данных признаков (чувствительность, специфичность, точность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата).

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

Результаты и обсуждение

Среди 50 детей, направленных в отделение наследственных эндокринопатий на дообследование в связи с выявленными при неонатальном скрининге повышенными уровнями 17-ОНП, 20 пациентам был поставлен диагноз неклассической формы дефицита 21-гидроксилазы (НК21ОН). Основным критерием диагностики заболевания являлось на-

личие мутаций, сочетание которых позволяло поставить диагноз НК21ОН. Эти пациенты составили основную группу наблюдения (1-я группа). У оставшихся пациентов (30 детей) повышение 17-ОНП оказалось ложноположительным (2-я группа). По результатам молекулярно-генетического исследования (аллель-специфическая ПЦР), из 30 пациентов 2-й группы ни у одного ребенка наиболее частых мутаций выявлено не было. Мы считаем, что эти данные позволяют с большой вероятностью исключить дефицит 21-гидроксилазы без проведения дополнительного секвенирования, о чем свидетельствуют и результаты наших предыдущих исследований [9].

В основной группе, по данным молекулярно-генетического анализа, у 14 (т.е. более чем в 60% случаев) детей встречалась мутация V281L, причем у 10 (71%) в гомозиготном состоянии, а в остальных случаях — в сочетании с другими гетерозиготными мутациями, характерными как для классических, так и для неклассических форм заболевания. Среди оставшихся 6 пациентов у 5 нами была выявлена мутация P30L, также характерная для НК21ОН, в гомозиготном положении или в сочетании с другими мутациями; у 1 пациентки «тяжелая» мутация Q318X сочеталась с ранее не описанной мутацией G130D (последняя выявлена путем секвенирования гена *CYP21A2*).

В основной группе пациентов были 10 мальчиков и 10 девочек; возраст обследуемых колебался от 14 дней до 1 года 2 мес, медиана возраста на момент постановки диагноза составила 120 (60; 150) дней. При этом 15 детей родились доношенными (срок гестации >37 нед и масса тела >2000 г) и 6 детей — на сроке гестации 35–36 нед, маловесных новорожденных среди наших пациентов не было. У 2 из 20 пациентов со слов родителей отмечалась недостаточная прибавка в массе тела, частые срыгивания. Однако к моменту первичного обращения в отделение у всех пациентов общее состояние было расценено как удовлетворительное; ни у одного ребенка основной группы признаков задержки/ускорения темпов физического развития отмечено не было.

Медиана уровней 17-ОНП в 1-й группе пациентов, по результатам тестирования в ходе неонатального скрининга на ВДКН, составила 33,2 (21,0; 37,5) нмоль/л с минимальным показателем 17,5 и максимальным — 105 нмоль/л, а по результатам ретестирования — 42,5 (31,5; 63,8) нмоль/л с разбросом значений от 20,0 до 90,0 нмоль/л. Таким образом, медианы уровней 17-ОНП превышают нормативные значения для используемых наборов (норма до 17 нмоль/л, DELFIA) в 1,5 и 2,5 раза соответственно. Интересно, что медианы уровней 17-ОНП во 2-й группе составили 22,1 (20,2; 30,8) нмоль/л в ходе тестирования с разбросом показателей от 13,0 до 97,0 нмоль/л и 26,0 (19,9; 32,7) нмоль/л по результатам ретестирования с минимальным значением

11,4 нмоль/л и максимальным — 70 нмоль/л. Не у всех пациентов были зафиксированы результаты и тестирования и ретестирования, однако у 12 из 19 пациентов 2-й группы отмечено нарастание уровня 17-ОНП при ретестировании. Для оценки различий показателя 17-ОНП у пациентов 1-й и 2-й группы нами был вычислен критерий Манна—Уитни. Достоверные различия уровней 17-ОНП в группах получены при ретестировании: $U=125,5$, $U_{0,05}=195$. При этом более высокие показатели соответствовали группе пациентов с НК21ОН. По результатам тестирования значения 17-ОНП достоверно не различались: $U=82$, $U_{0,05}=73$.

При анализе гормональных данных у пациентов 1-й группы к моменту первичного обращения в стационар были получены следующие данные: медиана уровней 17-ОНП, определяемых методом ИФА, составила 134,9 (56,7; 154,0) нмоль/л, минимальный уровень показателя — 23,5, максимальный — 282,3 нмоль/л. Медиана 17-ОНП, измеренного в рамках мультистероидного профиля крови — 58,1 (36,7; 115,3) с разбросом показателя от 15,5 до 622 нмоль/л. При аналогичных измерениях в группе пациентов с ложноположительным подъемом 17-ОНП медиана 17-ОНП, измеренного методом ИФА, оказалась равной 48,0 (33,3; 75,6) нмоль/л, а методом LS/MS-MS — 1,9 (1,4; 4,1) нмоль/л (см. рисунок). При вычислении критерия Манна—Уитни мы получили следующие результаты: уровень 17-ОНП, измеренный методом ИФА, достоверно не различался между группами ($U=414$, $U_{0,05}=156$), тогда как при использовании метода ТМС различия показателя оказались достоверными ($U=80$, $U_{0,05}=156$).

Для сравнения двух методов определения 17-ОНП в сыворотке вычисляли показатели чувствительности, точности, специфичности и прогностической ценности обоих методов (табл. 1). Метод LC/MS-MS оказался более специфичным, точным и прогностически более ценным при определении показателя 17-ОНП для диагностики НК21ОН у детей.

Четко разработанных критериев нормы для 17-ОНП, измеренного методом ТМС, до настоящего времени нет. Однако отсутствие частых мутаций в гене *CYP21A2* и значимых клинико-лабораторных отклонений у пациентов 2-й группы позволило нам использовать полученные методом ТМС значения 17-ОНП в качестве референсных для детей исследуемой возрастной группы. Таким образом, референсные значения 17-ОНП по методу ТМС: 1,5–4,3 нмоль/л (25 и 75 перцентили соответственно).

Учитывая разную степень нарушения функции фермента 21-гидроксилазы у пациентов с мутациями V281L и P30L, а также наличие их в гомозиготном состоянии или в сочетании с более «тяжелыми» мутациями, мы предприняли попытку разделить пациентов 1-й группы на три подгруппы в зависимости от молекулярно-генетического дефекта *CYP21A2*

Таблица 1. Сравнение двух методов (ИФА и ТМС) определения уровня 17-ОНП

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точность, %	Прогностическая ценность положительного результата, %	Прогностическая ценность отрицательного результата, %
ИФА	100	21,8	53	46,8	100
LC-MS/MS	100	94	96	91,6	100

для оценки разницы в уровнях 17-ОНП. В 1-ю подгруппу вошли пациенты с мутацией V281L в гомозиготном состоянии (10 человек), во 2-ю подгруппу пациенты, у которых мутация V281L сочеталась с другими мутациями (4); 3-ю подгруппу составили дети с мутацией P30L в гомозиготном положении или в сочетании с другими мутациями (4). Статистически значимых различий между подгруппами получить не удалось ($H=6,39$; $p=0,36$), что может объясняться малыми объемами выборок. Однако как по методу ИФА, так и по методу LC-MS/MS, медиана 17-ОНП имела тенденцию к более высоким значениям в 3-й подгруппе, чем в 1-й и 2-й подгруппах (183,7 по сравнению с 34,7 и 36,6 нмоль/л по методу ИФА, 52,6 по сравнению с 30,9 и 49,8 нмоль/л по методу ТМС).

При наличии дефицита 21-гидроксилазы, наряду с повышением уровня 17-ОНП, наблюдается повышение уровня таких стероидов, как 21-дезоксикортизол и андростендион, чего не должно быть у здоровых пациентов. Возможность одномоментного определения этих стероидов при использовании LC/MS-MS является еще одним важным его преимуществом перед ИФА. В качестве дополнительных критериев оценки мы сравнили уровень 21-дезоксикортизола и коэффициент 17-ОНП+андростендион/кортизол в двух группах наблюдения. Медиана 21-дезоксикортизола в группе здоровых детей составила 0,2 нмоль/л (0,1; 0,84), тогда как у пациентов с НК21ОН — 4,0 нмоль/л (2,2; 5,6). Медиана коэффициента 17-ОНП+андростендион/кортизол у пациентов 1-й группы с НК21ОН оказалась равной 0,3 (0,2; 0,6) нмоль/л и 0,03 (0,0095; 0,07) нмоль/л у пациентов 2-й группы. При вычислении критерия Манна—Уитни для двух исследуемых параметров с учетом критического значения показателя оказалось, что уровни 21-дезоксикортизола и коэффициента 17-ОНП+андростендион/кортизол были достоверно выше у пациентов с НК21ОН, чем у здоровых детей: $U=98$, $U_{0,05}=137$ и $U=62,5$, $U_{0,05}=149$ соответственно.

Для оценки функционального состояния коры надпочечников нами были оценены уровни кортизола, АКТГ и АРП. Определения кортизола проводились методами ИФА и ТМС. Медиана уровня кортизола, измеренного методом ИФА, в 1-й группе пациентов оказалась равной 337,5 (251,3; 455,8) нмоль/л, а у детей 2-й группы — 256 (134,5; 332,8) нмоль/л. Медиана уровня кортизола, измеренного методом

ТМС, у пациентов 1-й группы составляла 171,9 (113,4; 250) нмоль/л, а у пациентов 2-й группы — 281 (154; 393) нмоль/л. По уровням кортизола, определяемого обоими методами (критерий Манна—Уитни) достоверных различий между группами не выявлено. Уровень кортизола (ИФА) ниже референсных значений был выявлен только у 1 пациента (48,8 нмоль/л). Однако дальнейшее клиническое наблюдение и повторное гормональное исследование (кортизол, АКТГ) позволили нам исключить у ребенка надпочечниковую недостаточность. Медиана уровней АКТГ в плазме у пациентов с НК21ОН составила 40,1 (23,5; 96,8) с разбросом значений от 4,8 до 115 пг/мл (норма 7—60); повышенный уровень АКТГ был выявлен у 6 (33%) из 18 пациентов. Во 2-й группе АКТГ составил 39,7 (19,2; 49,5) пг/мл. Таким образом, сочетание нормального уровня кортизола у всех пациентов и нормального уровня АКТГ в $2/3$ случаев при отсутствии жалоб и патогномичных проявлений НК21ОН позволяет сделать вывод об отсутствии у этих пациентов надпочечниковой недостаточности, несмотря на высокие уровни 17-ОНП (по ИФА) при поступлении, это еще раз доказывает ложноположительный характер повышения уровня 17-ОНП. Однако повышенное содержание АКТГ (хотя и незначительное) у 33% пациентов исследуемой группы требует дальнейшего изучения.

Что касается уровня АРП, то медиана значений показателя у пациентов с НК21ОН была равна 9,0 (2,3; 12,7) нг/мл/ч, а во 2-й группе — 4,2 (1,1; 13,2) нг/мл/ч. Умеренное повышение АРП также без клинических проявлений минералокортикоидного дефицита может быть обусловлено частичной резистентностью к минералокортикоидам, характерной для детей первого года жизни. Значимые различия в АРП между группами отсутствовали.

У 6 (30%) из 20 детей 1-й группы было назначено лечение препаратами глюкокортикоидов. В табл. 2 представлены причины назначения и дозы используемых препаратов. Интересно, что в 5 из 6 случаев в ходе молекулярно-генетического исследования в гене *CYP21A2* обнаружено сочетание мутации, характерной для неклассической формы, с мутациями, характерными для вирильной/сольтеряющей формы дефицита 21-гидроксилазы, что, возможно, объясняет гормональные изменения и необходимость заместительной терапии. Планируется динамическое наблюдение за этими пациентами и коррекция заместительной терапии.

Таблица 2. Клинико-гормональные и молекулярно-генетические данные пациентов с НК21ОН, получавших лечение

Пациент (пол)	Возраст начала терапии	Причина назначения	Терапия	Мутации в гене CYP21A2
А. (ж.)	7 мес	17-ОНП: 276 нмоль/л; АКТГ: 111 пг/мл (7—60); АРП: 21,6 нг/мл/ч (0,5-1,9)	Кортеф: 18,7 мг/м ² /сут; Корти-нефф: 50 мкг/сутки	Q318X/G130D
А. 2 (ж.)	3 мес	17-ОНП: 175 нмоль/л; АКТГ: 96 пг/мл (7—60)	Кортеф: 7 мг/м ²	V281I/V281L
В. (ж.)	2 мес	Частые срыгивания, гипертрофия клитора (за счет кожной складки); 17-ОНП: 150,5 нмоль/л	Кортеф: 20 мг/м ² /сут; Корти-нефф: 100 мкг/сут	I2spl/V281L
Д. (м.)	3 мес	Частые срыгивания, гипонатриемия в анамнезе; 17-ОНП: 282,3 нмоль/л (0,7—9,1); АКТГ: 105,7 пг/мл (7—60), АРП: 12,4 нг/мл/ч (0,5—1,9)	Кортеф: 25 мг/м ² /сут; Корти-нефф: 50 мкг/сут	P30L/I172N
Э. (ж.)	2 мес	17ОНП: 253,9 нмоль/л; АКТГ: 99 пг/мл (7—60)	Преднизолон 1 мг/сут (14,2 мг/м ² по гидрокортизону)	V281L/V281L
А. (м.)	5 мес	17ОНП: 216,2 нмоль/л,	Кортеф: 8 мг/м ² /сут	I2spl /P30L

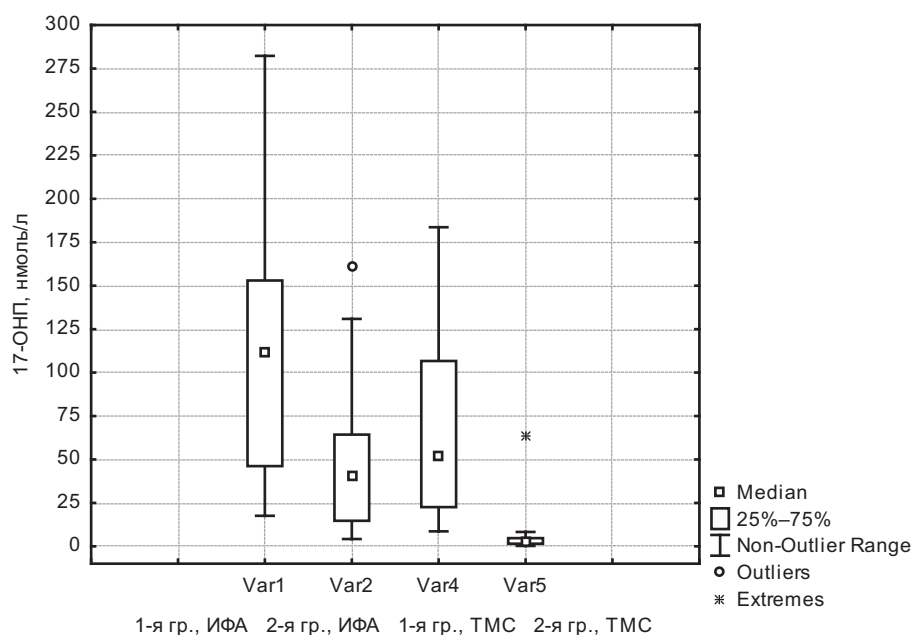
Первые описания НК21ОН, диагностированной у детей первого года жизни, принадлежат S. Pang и соавт. [10]. До настоящего времени в зарубежной литературе имеется 4 исследования с подробными описаниями НК21ОН у детей раннего возраста, у которых диагноз был установлен на основании неонатального скрининга.

За период 1991—1994 г. в Японии среди 4 500 000 новорожденных, по данным неонатального скрининга на ВДКН, было диагностировано 4 случая НК21ОН [11]. Двое из пациентов являлись родными братьями. По данным гормонального профиля, у всех 4 новорожденных в ходе скрининга было выявлено незначительное повышение базального уровня 17-ОНП (6—19 нг/мл при норме — до 5) с постепенным его нарастанием к первому месяцу жизни (максимально до 40 нг/мл). Определение 17-ОНП проводили методом ИФА. У всех пациентов уровни кортизола и тестостерона находились в пределах референсных значений, был повышен уровень АКТГ (260—356 пг/мл при норме 90—140). Ни у одного из пациентов клинических проявлений заболевания отмечено не было. Все 4 случая НК21ОН были подтверждены молекулярно-генетическим исследованием: у 3 новорожденных на одном аллеле гена располагалась мутация P30L, характерная для НК21ОН, на другом аллеле в одном случае выявлена мутация R356W, характерная для сольтерической формы заболевания, в другом случае та же мутация сочеталась с I172N, характерной для вирильной формы ВДКН. Интересно, что у одного новорожденного в ходе молекулярно-генетического исследования были обнаружены две компаундные гетерозиготные мутации, ассоциированные практически с полной потерей ферментативной активности 21-гидроксилазы, т.е. с сольтерической формой заболевания (генотип R356W/707del8). При этом до 2-летнего возраста клинические проявления заболевания отсутствовали. В ходе скрининга уровень 17-ОНП у этого ребенка был сравним с таковым у остальных 3 пациен-

тов, однако на фоне стимуляции аналогами АКТГ уровень 17-ОНП соответствовал сольтерической форме заболевания. При проведении стимуляционных проб с аналогами АКТГ у остальных новорожденных уровень 17-ОНП достигал промежуточных значений между принятыми критериями для диагностики классических и неклассических форм ВДКН [16]. При сочетании мутации, характерной для НК21ОН (во всех случаях P30L) с I172N, характерной для вирильной формы ВДКН, уровень 17-ОНП на фоне стимуляции был ниже, чем в случае сочетания той же мутации с R356W, характерной для сольтерической формы.

По данным другого исследования той же группы [4], из 7 случаев НК21ОН у 4 пациентов заболевание выявлено в ходе неонатального скрининга. У всех пациентов рост и масса тела при рождении соответствовали критериям доношенности, ни у одного из них не было клинических проявлений надпочечниковой недостаточности и/или синдрома гиперандрогении. По данным скрининга на ВДКН, уровень 17-ОНП (ИФА) был незначительно повышен (6,2—19 нг/мл) с постепенным нарастанием (у 3 пациентов к первому месяцу жизни уровень 17-ОНП колебался от 45 до 67 нг/мл, у 1 пациента к 3,5 годам он оказался равным 107 нг/мл). В ходе стимуляционной пробы с аналогами АКТГ уровень 17-ОНП достигал промежуточных значений между принятыми критериями для диагностики классических и неклассических форм ВДКН. При молекулярно-генетическом исследовании во всех 4 случаях на одном аллеле была выявлена характерная для НК21ОН мутация P30L, на втором аллеле — сочетание нескольких мутаций, встречающихся при классических формах заболевания: сплайсинговая мутация второго интрона, I172N, R356W. Указания на проводимое этим детям лечение отсутствовали.

В 2007 г. в Японии был описан еще один случай неклассической формы ВДКН, выявленной в ходе



Сравнение уровней 17-ОНП, измеренных методом ИФА и ТМС, у пациентов 1-й и 2-й групп.

неонатального скрининга. Заболевание было обусловлено гомозиготной мутацией V281L в гене *CYP21* [13]. У девочки, рожденной от неблизкородственного брака, родителей бразильского происхождения, в ходе неонатального скрининга было выявлено повышение уровня 17-ОНП до 8,8 нг/мл; при ретестировании отмечено нарастание показателя до 15 нг/мл. При обследовании в возрасте 2 мес признаки вирилизации и/или надпочечниковой недостаточности у пациентки отсутствовали; в крови нормокалиемия, нормонатриемия, уровень АКТГ в пределах нормы (22,6 пг/мл), уровень 17-ОНП слегка повышен (9,2 нг/мл). В возрасте 3 мес сохранялся незначительно повышенный уровень 17-ОНП (7,9 нг/мл), в ходе стимуляции аналогами АКТГ уровни кортизола и альдостерона до и после стимуляции соответствовали нормам для здоровых детей, а уровень 17-ОНП после стимуляции позволил диагностировать НК21ОН (т.е. соответствовал номограммам, приведенным М. New и соавт. [17]). Лечение пациентке не назначалось.

В последней из публикаций, датированной 2008 г., группа авторов из Японии приводит описание еще 3 пациентов с НК21ОН, заподозренной при скрининге [14]. Уровни 17-ОНП были незначительно повышены — до 25,1, 58,7 и 23 нмоль/л и нарастали при повторном исследовании. Ни у одного из пациентов не было клинико-гормональных признаков надпочечниковой недостаточности, биохимических признаков нарушений водно-электролитного баланса. У первого пациента (мальчик, возраст обследования

32 дня) базальный уровень 17-ОНП составил 22,6 нмоль/л, в ходе АКТГ-стимуляционной пробы — 289,9 нмоль/л; при молекулярно-генетическом анализе выявлена мутация P30L/I2spl. У второй пациентки (девочка, возраст обследования 67 дней), несмотря на нормальный базальный уровень 17-ОНП, в ходе стимуляции отмечено его повышение до 260 нмоль/л, что в совокупности с отсутствием клинических проявлений позволило диагностировать НК21ОН. По данным молекулярно-генетического анализа, в гене *CYP21A2* были обнаружены мутации I236N, V237E, M239K. Двое пациентов приходились друг другу родными братом и сестрой. У девочки, обследованной в возрасте 15 дней, базальный уровень 17-ОНП составлял 58,2 нмоль/л. Несмотря на умеренно повышенный уровень 17-ОНП в ходе АКТГ-стимуляционного теста (91,3 нмоль/л), максимальный уровень 17-ОНП, зафиксированный в течение суток, составил 736,2 нмоль/л. Эти данные в совокупности со значительно повышенным базальным уровнем 21-дезоксикортизола (до 308,8 нмоль/л) позволили заподозрить дефицит 21-гидроксилазы. Диагноз был подтвержден молекулярно-генетически: одна мутация была унаследована от отца (P30L), две другие (I172N и R356W) от матери. Из-за плохой прибавки в массе тела девочке был назначен гидрокортизон в дозе 12 мг/сут; лечение продолжалось до 11-месячного возраста.

Таким образом, полученные нами результаты и данные литературы позволяют сделать вывод о возможности диагностики НК21ОН у новорожденных.

Причиной обращения таких пациентов к эндокринологам служит незначительное повышение уровня 17-ОНП в отсутствие клинко-гормональных признаков надпочечниковой недостаточности. Дальнейшее тщательное обследование таких пациентов (гормональный профиль, молекулярно-генетический анализ) позволяет подтвердить или исключить заболевание.

Выводы

1. Уровень 17-ОНП, зарегистрированный при скрининге, позволяет заподозрить НК21ОН, однако, учитывая высокий процент ложноположительных результатов, не может служить критерием диагностики заболевания у новорожденных.

2. Метод LC/MS-MS является более специфичным, точным и прогностически более ценным при определении уровня 17-ОНП для диагностики НК21ОН у детей.

3. Несмотря на отсутствие нормативов уровня 17-ОНП, определяемого методом ТМС, значения показателя в группе «здоровых» детей (от 1,5 до 4,3 нмоль/л) могут быть приняты в качестве референсного интервала.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — А.Н. Тюльпаков, Т.А. Ионова

Сбор и обработка материала — Т.А. Ионова

Написание текста — Т.А. Ионова

Редактирование — А.Н. Тюльпаков

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

- White PC, Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91. doi: 10.1210/edrv.21.3.0398
- Speiser PW, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003;349(8):776-88. doi: 10.1056/NEJMra021561
- New MI, Wilson RC. Steroid disorders in children: Congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(22):12790-7. doi: 10.1073/pnas.96.22.12790
- Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37(4):650-667.
- Sherman SL, Aston CE, Morton NE, Speiser PW, New MI. A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1988;42(6):830-838.
- Baumgartner-Parzer SM, Nowotny P, Heinze G, Waldhäusl W, Vierhapper H. Carrier Frequency of Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency) in a Middle European Population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005;90(2):775-8. doi: 10.1210/jc.2004-1728
- Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, et al. Genotyping of CYP21, Linked Chromosome 6p Markers, and a Sex-Specific Gene in Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1999;84(3):960-6. doi: 10.1210/jcem.84.3.5550
- Schrijver I, Parajes S, Quinteiro C, Domínguez F, Loidi L. High Frequency of Copy Number Variations and Sequence Variants at CYP21A2 Locus: Implication for the Genetic Diagnosis of 21-Hydroxylase Deficiency. *PLoS One.* 2008;3(5):e2138. doi: 10.1371/journal.pone.0002138
- Ионова Т.А., Тюльпаков А.Н. Анализ распространенности неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников на примере популяции московской области. // Проблемы Эндокринологии. 2013;59(4):18-22. [Ionova TA, Tiul'pakov AN, Kalinenkova SG. The prevalence of the non-classical form of congenital adrenal hyperplasia as exemplified (by the population of the Moscow region). *Probl Endokrinol (Mosk).* 2013;59(4):18-22.] doi: 10.14341/probl201359418-22
- Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics.* 1988;81(6):866-874.
- Tajima T, Jun Nakae KF, Toyoura T, Shimozawa K, Kusuda S, Goji K, et al. Molecular Basis of Nonclassical Steroid 21-Hydroxylase Deficiency Detected by Neonatal Mass Screening in Japan. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1997;82(7):2350-6. doi: 10.1210/jcem.82.7.4094
- Tajima T, Fujieda K, Nakae JUN, Mikami A, Cutler GB. Mutations of the CYP21 Gene in Nonclassical Steroid 21-Hydroxylase Deficiency in Japan. *Endocr J.* 1998;45(4):493-7. doi: 10.1507/endocrj.45.493
- Shinagawa T, Horikawa R, Isojima T, Naiki Y, Tanaka T, Katsumata N. Nonclassic Steroid 21-Hydroxylase Deficiency due to a Homozygous V281L Mutation in CYP21A2 Detected by the Neonatal Mass-Screening Program in Japan. *Endocr J.* 2007;54(6):1021-5. doi: 10.1507/endocrj.K07-028
- Kashimada K-i, Ono M, Onishi T, Koyama S, Toyoura T, Imai K, et al. Clinical Course of Patients with Nonclassical 21-hydroxylase Deficiency (21-OHD) Diagnosed in Infancy and Childhood. *Endocr J.* 2008;55(2):397-404. doi: 10.1507/endocrj.K07E-057
- Дедов И.И., Петеркова В.А., Колесникова Г.С., Семичева Т.В., Карева М.А., Кузнецова Э.С., и др. Молекулярная диагностика классических форм врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицита стероид-21-гидроксилазы) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции. // Молекулярная медицина. 2004;(2):60-64. [Dedov II, Orlovsky IV, Kareva MA, Akzhigitova DA, Bateneva EI, Loskutova LA, et al. Molecular diagnosis of classic forms of congenital dysfunction of the adrenal cortex (deficiency of steroid 21-hydroxylase) by application of allele-specific polymerase chain reaction. *Molecular Medicine* 2004;(2):60-64.]
- New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, et al. Genotyping Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: Hormonal Reference Data*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1983;57(2):320-6. doi: 10.1210/jcem-57-2-320.