



Современные аспекты генетической диагностики недостаточности 21-гидроксилазы

Н.С. Осиновская^{1,2}, Ю.А. Насыхова¹, М.И. Ярмолинская^{1,2}, О.Б. Главнова¹, А.С. Готов¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; Россия,

г. Санкт-Петербург

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Цель обзора: рассмотреть современные особенности генетической диагностики недостаточности 21-гидроксилазы.

Основные положения. Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) представляет собой группу патологий с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникновение которых связано с дефектом одного из ферментов или транспортных белков, участвующих в биосинтезе кортизола. В настоящее время получены сведения о генетических особенностях ВДКН, включающие данные о недостаточности 21-гидроксилазы. Разработаны методы неонатального скрининга, пренатальной и постнатальной диагностики дефицита 21-гидроксилазы. Установлено, что своевременная диагностика и правильное лечение способствуют нормальному физическому и психическому развитию пациента. Молекулярно-генетическое тестирование на ВДКН, вызванную дефицитом 21-гидроксилазы, широко распространено как в России, так и во всем мире и имеет большое значение для дифференциальной диагностики, выявления носителей патогенных вариантов в гене *CYP21A2* и адекватного медико-генетического консультирования.

Наилучшей стратегией для генетической диагностики недостаточности 21-гидроксилазы является 2-этапный анализ гена *CYP21A2*. Исследование должно включать как анализ последовательности гена и выявление точечных замен, небольших делеций и дупликаций (например, секвенирование по Сэнгеру или Next Generation Sequencing), так и обнаружение протяженных делеций и дупликаций (multiplex ligation dependent probe amplification, полимеразная цепная реакция в реальном времени). Такой комплексный подход поможет найти большинство типов потенциальных изменений.

Заключение. Правильно выбранные методы генетического тестирования позволяют установить патогенные варианты в гене *CYP21A2*, оценить возможную степень клинического проявления заболевания как при проведении пренатального исследования, так и в случае неустановленной клинической формы ВДКН; назначить адекватную терапию и обеспечить медико-генетическое консультирование с целью определения тактики ведения пациента, в том числе при планировании беременности у женщин с установленным диагнозом ВДКН.

Ключевые слова: врожденная дисфункция коры надпочечников, ген *CYP21A2*, генетическая диагностика, 21-гидроксилаза.

Вклад авторов: Осиновская Н.С. — обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи; Насыхова Ю.А., Главнова О.Б. — проверка и редактирование содержания статьи; Ярмолинская М.И. — разработка концепции, проверка и редактирование содержания статьи; Готов А.С. — утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Источник финансирования: Работа выполнена в рамках темы ПНИ № АААА-А20-120041390028-0.

Для цитирования: Осиновская Н.С., Насыхова Ю.А., Ярмолинская М.И., Главнова О.Б., Готов А.С. Современные аспекты генетической диагностики недостаточности 21-гидроксилазы. Доктор.Ру. 2021; 20(6): 73–79. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-6-73-79

Current Aspects of Genetic Diagnosis of 21-Hydroxylase Insufficiency

N.S. Osinovskaya^{1,2}, Yu.A. Nasykhova¹, M.I. Yarmolinskaya^{1,2}, O.B. Glavnova¹, A.S. Glotov¹

¹ Scientific and Research Institute of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine named after D.O. Ott; 3 Mendeleevskaya liniya, St. Petersburg, Russian Federation 199034

² I.I. Mechnikov Northwestern State Medical University, Russian Ministry of Health; 41 Kirochnaya St. Petersburg, Russian Federation 191015

ABSTRACT

Objective of the Review: To discuss the current peculiarities of 21-hydroxylase insufficiency diagnostics.

Key Points. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of autosomal-recessive pathologies, associated with a defective enzyme or transport protein participating in cortisol biosynthesis. Currently, there is information on CAH genetics including information on 21-hydroxylase insufficiency. Neonatal screening, antenatal and postnatal methods to diagnose 21-hydroxylase deficit have been developed. Timely diagnosis and correct therapy have been found to facilitate normal physical and mental development of patients. Molecular genetic

Осиновская Наталья Сергеевна (**автор для переписки**) — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории геномики с группой биоресурсной коллекции отдела геномной медицины ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»; ассистент кафедры медицинской генетики ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России. 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 3190-2307. <https://orcid.org/0000-0001-7831-9327>. E-mail: natosinovskaya@mail.ru

Насыхова Юлия Алмазовна — к. б. н., руководитель лаборатории геномики с группой биоресурсной коллекции отдела геномной медицины ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 9661-9416. <https://orcid.org/0000-0002-3543-4963>. E-mail: yulnasa@gmail.com
(Окончание на с. 74.)



testing for CAH associated with 21-hydroxylase deficit is widely used both in Russia and globally and is of importance for differential diagnosis, identification of pathogenic *CYP21A2* gene carriers and adequate genetic counselling.

The best strategy to diagnose 21-hydroxylase insufficiency is 2-stage *CYP21A2* gene analysis. The test should include both gene sequence analysis and identification of point replacements, minor deletions and duplication (e.g., dideoxynucleotide chain-termination method or Next Generation Sequencing), and identification of extended deletions and duplication (multiplex ligation dependent probe amplification, real-time polymerase chain reaction). Such a comprehensive approach can help finding a majority of types of possible changes.

Conclusion. Correct genetic testing methods ensure detection of pathogen variants in *CYP21A2* gene; evaluation of the possible rate of clinical manifestations of the disease, both during antenatal testing and if an unknown clinical CAH form is encountered; prescribing an adequate therapy; and ensuring genetic counselling in order to develop a management strategy, including when planning for pregnancy in a woman with confirmed CAH.

Keywords: congenital adrenal hyperplasia, *CYP21A2* gene, genetic counselling, 21-hydroxylase.

Contributions: Osinovskaya, N.S. — thematic publications reviewing; text of the manuscript; Nasykhova, Yu.A. and Glavnova, O.B. — text review and editing; Yarmolinskaya, M.I. — concept; text review and editing; Glotov, A.S. — approval of the manuscript for publication.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have any conflict of interests.

Source of funding: The work is prepared as a part of topic No. AAAA-A20-120041390028-0.

For citation: Osinovskaya N.S., Nasykhova Yu.A., Yarmolinskaya M.I., Glavnova O.B., Glotov A.S. Current Aspects of Genetic Diagnosis of 21-Hydroxylase Insufficiency. Doctor.Ru. 2021; 20(6): 73–79. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-6-73-79

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) относится к группе заболеваний, в основе которых лежат нарушения в процессе биосинтеза глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Дефицит ферментов стероидогенеза приводит к снижению выработки кортизола. По механизму отрицательной обратной связи недостаток кортизола вызывает повышение уровня адренокортикотропного гормона, что оказывает стимулирующее действие на кору надпочечников, а в дальнейшем приводит к ее гипертрофии и затем — к гиперплазии коркового слоя коры надпочечников и накоплению предшественников стероидов проксимальнее возникшего ферментативного блока.

При всех формах ВДКН ферментативные дефекты могут быть частичными или полными, что видно по широкому спектру клинических проявлений. Клиническая картина может включать различные симптомы, такие как надпочечниковая недостаточность, генитальная неопределенность и гиперандрогения (гирсутизм, акне и т. д.). Кроме того, возможны нарушения менструального цикла, невынашивание беременности или бесплодие. Серьезность и клинические особенности ВДКН варьируют в зависимости от ферментативного дефекта и остаточной активности фермента [1].

В настоящее время описаны семь форм ВДКН:

- липоидная гиперплазия коры надпочечников (дефицит StAR-протерина);
- дефицит 20,22-десмолазы;
- дефицит 17 α -гидроксилазы/17,20-лиазы;
- дефицит 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы;
- дефицит 21-гидроксилазы;
- дефицит 11 β -гидроксилазы;
- дефицит оксидоредуктазы.

Более чем в 95% случаев причиной ВДКН является недостаточность фермента 21-гидроксилазы. На втором месте находится гипертоническая форма ВДКН, которая проявляется при дефиците 11 β -гидроксилазы и встреча-

ется, по данным литературы, примерно у 1 из 100 000 новорожденных [2].

ВДКН включена в программу «Национальные приоритетные проекты» и введена в неонатальный скрининг с 2006 г. [3]. Ранее в клинических рекомендациях Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечебно-профилактическим мероприятиям при ВДКН, опубликованных в 2016 г., было указано, что при положительных или сомнительных результатах определения уровня 17-гидроксипрогестерона как основного диагностического критерия при недостаточности 21-гидроксилазы необходимо проведение нагрузочного теста с тетракозактидом (Синактеном) [4]. Более того, для генетического консультирования далее предлагалось проводить генотипирование (2В) [4].

Так как в настоящее время в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные препараты тетракозактида, а отечественный аналог не создан, проведение пробы становится невозможным. Вместе с тем в планируемом проекте новых рекомендаций предполагается продолжить осуществление генотипирования для генетического консультирования при положительных или пограничных результатах определения уровня 17-гидроксипрогестерона и невозможности проведения пробы с тетракозактидом [5].

Генотипирование является завершающим этапом верификации признаков, характерных для ВДКН, выявленных на более ранних этапах скрининга новорожденных. Кроме того, оно используется для решения спорных вопросов, возникающих при диагностике стертой (неклассической) формы, которая становится одной из причин нарушения репродуктивного здоровья (бесплодия, невынашивания беременности и т. д.).

Разработка оптимального подхода к молекулярной диагностике ВДКН необходима для получения корректных результатов генетического тестирования и проведения адекватного лечения пациентов с данным заболеванием.

Ярмолинская Марина Игоревна — профессор РАН, д. м. н., профессор, руководитель отдела гинекологии и эндокринологии, руководитель центра «Диагностика и лечение эндометриоза» ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»; профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России. 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 3686-3605. <https://orcid.org/0000-0002-6551-4147>. E-mail: m.yarmolinskaya@gmail.com

Главнова Ольга Борисовна — врач-эндокринолог отдела гинекологии и эндокринологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 8040-5425. <https://orcid.org/0000-0001-6087-252X>. E-mail: o.glavnova@mail.ru

Глотов Андрей Сергеевич — д. б. н., руководитель отдела геномной медицины ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта». 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. eLIBRARY.RU SPIN: 1406-0090. <https://orcid.org/0000-0002-7465-4504>. E-mail: anglotov@mail.ru

(Окончание. Начало см. на с. 73.)

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ДЕФИЦИТЕ 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ

При дефиците 21-гидроксилазы, фермента цитохрома P450 (P450C21), участвующего в биосинтезе кортизола и альдостерона, 21-гидроксилирование нарушается в пучковой зоне коры надпочечников. Таким образом, 17-гидроксипрогестерон и прогестерон не преобразуются в 11-дезоксикортизол и 11-дезоксикортикостерон соответственно (рис. 1).

Вследствие снижения концентраций альдостерона и кортизола уровень аденокортикотропного гормона увеличивается, что приводит к перепроизводству и накоплению гормонов-предшественников кортизола (особенно 17-гидроксипрогестерона), которые конвертируются в андростерон и тестостерон [6, 7]. Клинические проявления заболевания широко варьируют в зависимости от степени избытка андрогенов, а также от степени снижения концентраций кортизола и альдостерона.

Принято выделять классическую форму заболевания с выраженной недостаточностью 21-гидроксилазы, которая проявляется внутриутробной вирилизацией, и неклассическую форму с умеренно выраженным ферментативным дефектом, проявляющуюся в постнатальном периоде. Классическую форму подразделяют на сольтерьяющую (более 75% больных), при которой нарушен синтез альдостерона, и простую вирильную форму (приблизительно 25%) [8–10].

При сольтерьяющей форме недостаточности 21-гидроксилазы у новорожденных могут возникать угрожающие жизни сольтерьяющие кризы. Почка теряет способность реабсорбировать ионы натрия, что приводит к нарушению солевого обмена, гипонатриемии и гиперкалиемии. Избыточная продукция андрогенов у плодов женского пола уже на ранних стадиях внутриутробного развития (начиная с 7–8 недель) вызывает появление зачатков наружных половых органов по мужскому типу [11, 12]. Степень вирилизации зависит от выраженности ферментативного дефекта.

Простая вирильная форма характеризуется прогрессирующей вирилизацией и имеет практически те же клинические проявления, что и сольтерьяющая, за исключением симптомов потери соли [13–15].

При сохранении активности фермента до 50% развивается неклассическая форма ВДКН. В отличие от классических форм она является более мягкой и не приводит к надпочечниковой недостаточности. Неклассическая форма ВДКН включает различные симптомы постнатального избытка андрогенов, такие как преждевременное пубархе, гирсутизм, акне, нарушение менструального цикла, невынашивание беременности, бесплодие и т. д. [16, 17].

Частота ВДКН варьирует в зависимости от популяции и составляет от 1 : 5000 до 1 : 67 000 новорожденных. Согласно данным, полученным при массовых обследованиях (почти 6,5 млн новорожденных по всему миру), средняя частота заболевания — 1 на 15 000 младенцев [18, 19]. В исследовании М.А. Каревой отмечено, что частота классических вариантов дефицита 21-гидроксилазы в России оказалась выше среднемирового показателя и составляет 1 случай на 10 000 новорожденных [20].

Неклассическая форма ВДКН встречается гораздо чаще [21]. Она выявляется у 0,1–0,2% населения в европейской популяции, в некоторых областях ее распространенность доходит до 10% [22], что значительно выше, чем ранее предполагалось в программах неонатального скрининга.

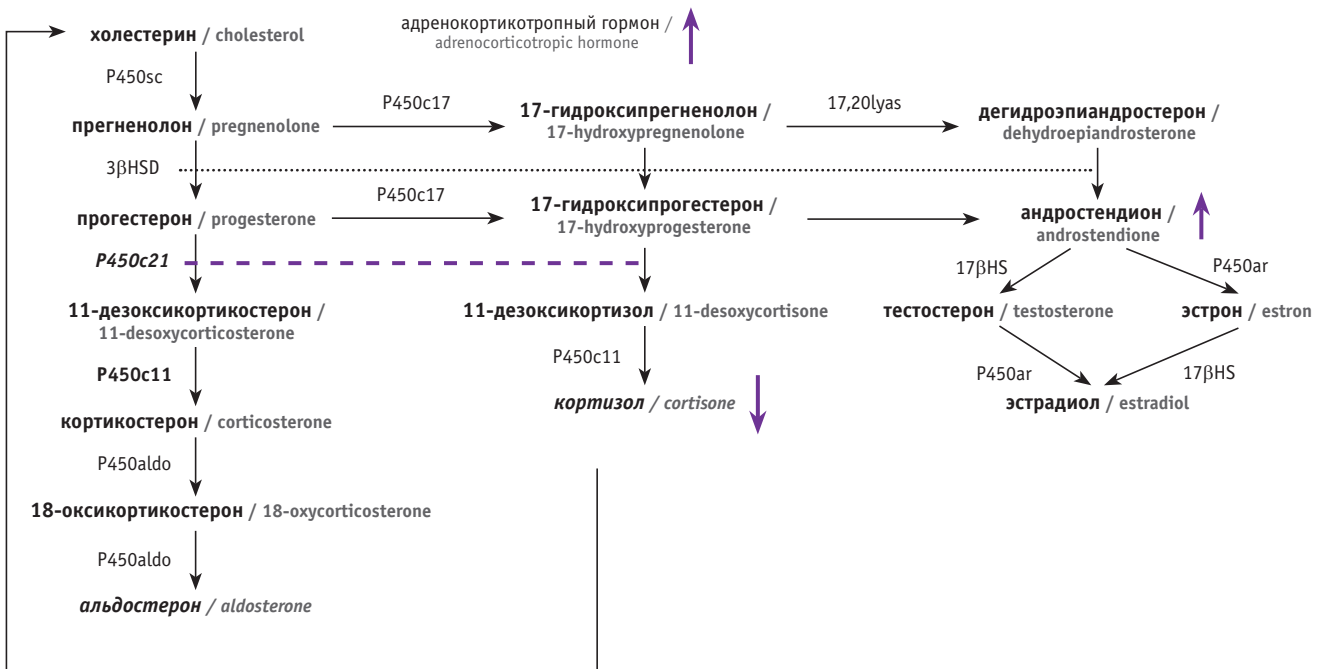
Нарушения в работе фермента 21-гидроксилазы возникают в результате наличия патогенных вариантов в гене *CYP21A2*, кодирующем данный фермент. Ген 21-гидроксилазы *CYP21A2* картирован на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3) [23].

Функциональный ген *CYP21A2* и его высокоомологичный псевдоген *CYP21A1P* расположены внутри главного комплекса гистосовместимости (МНС) в очень вариабельном локусе 6p21.33 [24]. До клонирования гена *CYP21A2* пренатальную диагностику ВДКН проводили с помощью HLA-типирования [25].

Как функциональный ген *CYP21A2*, так и псевдоген *CYP21A1P* образуют генетическую единицу — модуль RCCX — с несколькими соседними генами, включая ген *TNXB*.

Рис. 1. Схема биосинтеза гормонов в коре надпочечников

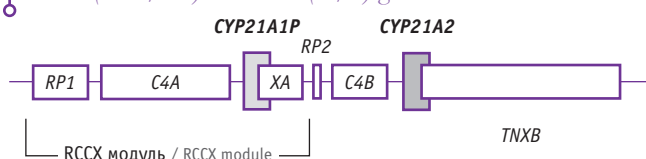
Fig. 1. Gene biosynthesis in adrenal cortex



Описаны вариации числа копий для локуса RCCX, причем нормой считается наличие двух модулей (рис. 2) [26]. Большинство вариантов, нарушающих функцию 21-гидроксилазы, являются результатом рекомбинационных событий или генной конверсии между функциональным геном *CYP21A2* и функционально неактивным псевдогеном *CYP21A1P* [27, 28].

На сегодняшний день в мире описаны более 200 мутаций в гене *CYP21A2*. Р. Concolino и А. Costella выделили 233 патогенных варианта, приводящих к заболеванию [29]. Однако существуют наиболее часто встречающиеся патогенные варианты, которые представляют около 75% всех аллелей при ВДКН (табл.). Кроме того, известно, что патогенные варианты в экзоне 6 гена *CYP21A2*: Ile237Asn, Val238Glu и Met240Lys — наследуются обычно кластером [30].

Рис. 2. Схема RCCX модуля, включающего гены *RP(1/2)*, *C4(A/B)*, *CYP21(A1P/A2)* и *TNX(A/B)*
Fig. 2. RCCX module including *RP(1/2)*, *C4(A/B)*, *CYP21(A1P/A2)* and *TNX(A/B)* genes



Конверсии, включающие несколько экзонов, а также крупные делеции, захватывающие область протяженностью до 30 т. п. н. с точками разрыва между экзонами 2 и 8 генов *CYP21A1P* и *CYP21A2*, составляют около 20–30% патогенных вариантов при ВДКН [33]. И лишь небольшое количество вариантов гена *CYP21A2*, влияющих на функцию 21-гидроксилазы (~10%), представляют собой новые варианты, не являющиеся производными генной конверсии между геном и псевдогеном [9].

Возможны два подхода к проведению пренатального молекулярно-генетического исследования или выявлению гетерозиготного носительства у родственников пробанда при наличии недостаточности 21-гидроксилазы:

- 1) прямой, основанный непосредственно на идентификации патогенного варианта [34];
- 2) косвенный (непрямой) анализ наследования полиморфных генетических маркеров (например, HLA локуса), сцепленных с геном заболевания, у больных и здоровых членов семьи, в том числе с целью проведения пренатальной диагностики [25].

Главное преимущество прямого подхода в диагностике недостаточности 21-гидроксилазы — возможность судить о наличии или отсутствии соответствующей мутации по анализу ДНК одного индивидуума. Такой подход особенно важен для семей с высоким риском рождения ребенка с ВДКН,

Таблица / Table

Наиболее частые патогенные варианты в гене *CYP21A2* [31]
Most common pathogenic variants in *CYP21A2* gene [31]

dbSNP	GRch38.p12 NC_000006.12	Комплементарная ДНК NM_000500.9 / Complementary DNA NM_000500.9	Белок NP_000491.4 / Protein NP_000491.4	Экзон/ интрон / Exon/ intron	Остаточная активность фермента, %* / Residual enzyme activity, %*	Форма врожденной дисфункции коры надпочечников / Form of congenital adrenal hyperplasia
rs9378251	chr6:32038514	c.92C>T	Pro31Leu	Экзон 1 / Exon 1	30–60	Неклассическая форма (НФ) / Non-classical form (NF)
rs6467	chr6:32039081	c.293-13C>G	Нарушения сплайсинга / Impaired splicing	Интрон 2 / Intron 2	< 2	Сольтеряющая форма (СТФ) / простая вирильная форма (ПФ) / Salt-losing form (SLF) / simple virile form (SF)
rs387906510	chr6:32039133-32039140	c.332_339del	Gly111fs	Экзон 3 / Exon 3	0	СТФ / SLF
rs6475	chr6: 32039426	c.518T>A	Ile173Asn	Экзон 4 / Exon 4	3–7	ПФ / SF
rs1554299737	chr6: 32039807	c.710T>A	Ile237Asn	Экзон 6 / Exon 6	0	СТФ / SLF
rs12530380	chr6: 32039810	c.713T>A	Val238Glu			
rs6476	chr6: 32039816	c.719T>A	Met240Lys			
rs6471	chr6: 32040110	c.844G>T	Val282Leu	Экзон 7 / Exon 7	20–50	НФ / NF
rs267606756	chr6:32040182	c.923dup	Leu 308fs	Экзон 7 / Exon 7	0	СТФ / SLF
rs7755898	chr6:32040421	c.955C>T	Gln319*	Экзон 8 / Exon 8	0	СТФ / SLF
rs7769409	chr6: 32040535	c.1069C>T	Arg357Trp	Экзон 8 / Exon 8	2	СТФ/ПФ / SLF/SF
rs6445	chr6: 3204100	c.1360C>T	Pro454Ser	Экзон 10 / Exon 10	20–50	НФ / NF

* По данным А. Rodríguez и соавт. [32].

* Source: A. Rodríguez et al. [32].

где уже погиб больной ребенок. Диагностика носительства мутации у членов такой семьи и, в особенности, пренатальная диагностика возможны только при наличии идентифицируемых мутаций у обоих родителей.

Поскольку более 70% «мутантных» аллелей несут один из 10 известных вариантов, описанных в международных базах данных, большинство случаев недостаточности 21-гидроксилазы при точно установленном по клиническим признакам диагнозе можно выявить путем скрининга таких мажорных вариантов. Для них разработаны специальные методы детекции, которые претерпели определенную эволюцию. Обычно проводят поэтапный поиск генетических вариантов, вовлеченных в развитие дефицита 21-гидроксилазы, с использованием различных молекулярно-генетических методов, что позволяет быстро идентифицировать наиболее распространенные варианты, вызывающие ВДКН, и потом, при необходимости, исследовать более редкие мутации.

Существуют различные методы генетической диагностики ВДКН. К ранним относят метод аллель-специфической гибридизации (allele-specific oligonucleotide hybridization), метод анализа конформационного полиморфизма ДНК, SSCP (single-strand conformation polymorphism) и гетеродуплексный анализ [35]. Затем стали применять технологии, основанные на ПЦР-ПДРФ анализе. Их особенностью является то, что при исследовании осуществляют 2-этапную амплификацию необходимого фрагмента гена *CYP21A2*. Полученный продукт ПЦР первого этапа, нужный для наработки последовательности гена, а не псевдогена, используют в качестве матрицы на втором этапе, добавляя в данную реакцию специальные модифицированные олигопраймеры с целью создания специфических сайтов рестрикции на каждую мутацию [36].

К технологиям, которые стали применять позднее, можно отнести метод мини-секвенирования Multiplex SNaPShot PCR с флуоресцентными дидезоксинуклеотидами для генотипирования наиболее распространенных патогенных вариантов при ВДКН [37]. В отдельных зарубежных центрах для диагностики ВДКН используют относительно простой стрип-тест (StripAssay) [38], позволяющий идентифицировать наиболее распространенные варианты. Процедура включает три этапа: 1) выделение ДНК; 2) ПЦР-амплификацию с использованием биотинилированных праймеров; 3) гибридизацию продуктов амплификации с тест-полоской, содержащей аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды, иммобилизованные в виде массива параллельных линий. Связанные биотинилированные последовательности обнаруживают при помощи стрептавидина-щелочной фосфатазы и субстратов различного цвета.

В случае если этими методами не выявлен ни один патогенный вариант или найден только один аллель с патогенным вариантом, для точной постановки диагноза проводят полное определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) гена *CYP21A2* [39]. Секвенирование по Сэнгеру выполняется для нахождения клинически значимых однонуклеотидных замен, небольших делеций и вставок на протяжении всей последовательности гена. Один или несколько фрагментов, покрывающих все 10 экзонов и экзон-фланкирующие регионы интронов, специфически амплифицируются с помощью селективных праймеров для ПЦР, дифференцирующих функциональный ген *CYP21A2* от псевдогена *CYP21A1P*. Далее проводят второй этап ПЦР с целью наработки фрагмента с последующим секвенированием по Сэнгеру.

В последние годы для изучения структуры генов активно применяется метод секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS). Технологии массового парал-

лельного секвенирования быстро развиваются, и данный метод представляет собой многообещающий инструмент для разработки новых подходов к молекулярной диагностике заболеваний. Он уже используется отдельными лабораториями при недостаточности 21-гидроксилазы. Но ввиду ограниченного опыта пока невозможно давать рекомендации по обязательному его применению.

В заключениях по диагностике методом NGS рекомендовано включать больше информации по биоинформатическим параметрам и способам оценки выявленных вариантов [31].

Так как в гене *CYP21A2* могут присутствовать не только единичные миссенс-варианты, но и множественные патогенные варианты в цис-положении (как результат генных конверсий), а также делеции и дупликации различной протяженности [40], применяют метод мультиплексной лигазной реакции (multiplex ligation dependent probe amplification) с последующим разделением фрагментов на капиллярном анализаторе [41]. Для определения количества копий гена в отдельных его областях проводят анализ на основе ПЦР в реальном времени (CAH RealFast™ CNV Assay). С этой же целью и для выявления «химерных» генов, возникших после слияния гена и псевдогена, можно использовать методику, описанную в работе А.П. Баранник и соавт., основанную на выделении специфических генных вариантов с последующим проведением ферментативного гидролиза и анализа длин выявленных фрагментов [42].

Известно, что последовательность гена *CYP21A2* может включать по всей своей протяженности отдельные участки последовательности псевдогена *CYP21A1P* (результат генной конверсии), несущие патогенные варианты, поэтому генетическую диагностику надо проводить в полном объеме, возможно для конкретной лаборатории, не останавливаясь на двух выявленных вариантах. Требуется также произвести анализ идентифицированных вариантов у родителей пробанда с целью верификации диагноза.

Тяжесть клинического проявления недостаточности 21-гидроксилазы практически всегда коррелирует с типом патогенных вариантов, присутствующих в гене *CYP21A2* [43], поэтому точное и максимально полное определение патогенных вариантов, вовлеченных в развитие заболевания, играет важнейшую роль при медико-генетическом консультировании пациентов с ВДКН как для назначения соответствующей терапии, так и с целью планирования беременности в семье, имеющей ребенка с ВДКН, а также определения гетерозиготного носительства у ближайших родственников пробанда.

Интерпретация полученных результатов и адекватное медико-генетическое консультирование больного и членов его/ее семьи требуют глубоких знаний генетических основ данной патологии [44, 45].

В соответствии с руководством Общества эндокринологов по клинической практике, при рождении ребенка с ВДКН следует проводить медико-генетическое консультирование родителей [46]. Чтобы обеспечить правильное медико-генетическое консультирование, необходимо учитывать следующее:

- только анализ гена *CYP21A2* позволяет выявить и подтвердить носительство у родителей, имеющих ребенка с ВДКН, а также исключить возникновение мутации *de novo*;
- генотипирование дает возможность оценить характер патогенных вариантов для уточнения клинической формы заболевания;
- информация о патогенных вариантах помогает понять, необходимо ли пренатальное исследование в семье

гетерозиготных носителей, и определить тактику ведения беременности у пациенток с ВДКН для исключения осложнений и уменьшения риска развития вирилизации у плодов женского пола;

- генотипирование *CYP21A2* можно использовать для выявления носительства у партнеров пациентов с ВДКН или партнеров гетерозиготных носителей патогенных вариантов в гене *CYP21A2* с целью уточнения риска рождения детей с ВДКН в данных семьях;
- информация о конкретных патогенных аллельных вариантах гена *CYP21A2* и полиморфных генетических маркерах (например, HLA локуса), сцепленных с геном заболевания, позволяет обнаружить носительство патогенных аллельных вариантов у клинически бессимптомных родственников из группы риска; это облегчает пренатальное или предимплантационное генетическое тестирование в программе ЭКО при последующей беременности в условиях ограниченного времени диагностики и делает ее более надежной;
- следует рассмотреть возможность диагностики патогенных вариантов в гене 21-гидроксилазы у пациентов (и доноров) перед ЭКО в программах ВРТ [47, 48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если при диагностике недостаточности 21-гидроксилазы использовать методы, которые охватывают только мажорные точечные замены, вызывающие заболевание, но не способствуют обнаружению крупных делеций/дупликаций, ограниче-

ния этих методов должны быть указаны в соответствующих генетических заключениях, поскольку в подобных случаях теряется возможность выявить определенный процент нарушений, включающих крупные перестройки гена *CYP21A2*.

Идентификация одного патогенного варианта в исследуемом гене, вызывающего заболевание, не исключает наличия других, не охваченных используемым методом анализа. Этот факт также следует упомянуть в генетических заключениях и учитывать при медико-генетическом консультировании [31]. Тем не менее все упомянутые методы имеют ограничения, и ни один из них не может идентифицировать 100% возможных вариантов из-за сложности локуса *CYP21A2*.

Наилучшей стратегией для генетической диагностики недостаточности 21-гидроксилазы является 2-этапный анализ гена *CYP21A2*. Исследование должно включать не только анализ последовательности гена и выявление точечных замен, небольших делеций и дупликаций (например, секвенирование по Сэнгеру или Next Generation Sequencing, NGS), но и обнаружение протяженных делеций и дупликаций (multiplex ligation dependent probe amplification, ПЦР в реальном времени). Такой комплексный подход поможет найти большинство типов потенциальных изменений. И, конечно, создание таргетных панелей для анализа методом NGS, включающих кодирующие области других генов (*CYP17A1*, *HSD3B*, *HSD3B2*, *POR*), задействованных в процессах стероидогенеза, позволит максимально охватить все возможные патогенные варианты, приводящие к врожденной дисфункции коры надпочечников.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hannah-Shmouni F., Chen W., Merke D.P. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2017; 46(2): 435–58. DOI: 10.1016/j.ecl.2017.01.008
2. Yuan X., Lu L., Chen S. et al. Chinese patient with 11 β -hydroxylase deficiency due to novel compound heterozygous mutation in *CYP11B1* gene: a case report. *BMC Endocr. Disord.* 2018; 18(1): 68. DOI: 10.1186/s12902-018-0295-6
3. Карева М.А. Аденогенитальный синдром: современные аспекты диагностики и лечения. *Фарматека.* 2011; 11(51): 34–9. [Kareva M.A. Adrenogenital syndrome: modern aspects of diagnosis and treatment. *Farmateka.* 2011; 11(51): 34–9. (in Russian)]
4. Мельниченко Г.А., Трошина Е.А., Молашенко Н.В. и др. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечебно-профилактическим мероприятиям при врожденной дисфункции коры надпочечников у пациентов во взрослом возрасте. *Consilium Medicum.* 2016; 18(4): 8–19. [Melnichenko G.A., Troshina E.A., Molashenko N.V. et al. Russian Association of Endocrinologists Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and preventive measures in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency patients in adulthood. *Consilium Medicum.* 2016; 18(4): 8–19. (in Russian)]
5. Мокрышева Н.Г., Мельниченко Г.А., Адамян Л.В. и др. Проект клинических рекомендаций. Врожденная дисфункция коры надпочечников (аденогенитальный синдром). 2021. URL: https://www.endocrinetr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/kr82_vdkn_u_vzroslyh_ot_10.03.2021.pdf (дата обращения — 20.04.2021). [Mokrysheva N.G., Melnichenko G.A., Adamyan L.V. et al. Draft clinical recommendations. Congenital adrenal hyperplasia (adrenogenital syndrome). 2021. URL: https://www.endocrinetr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/kr82_vdkn_u_vzroslyh_ot_10.03.2021.pdf (Accessed April 20, 2021). (in Russian)]
6. Miller W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 1988; 9(3): 295–318. DOI: 10.1210/edrv-9-3-295
7. Parsa A.A., New M.I. Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017; 165(Pt A): 2–11. DOI: 10.1016/j.jsmb.2016.06.015
8. New M.I., Peterson R.E. Disorders of aldosterone secretion in childhood. *Pediatr. Clin. North Am.* 1966; 13(1): 43–58. DOI: 10.1016/S0031-3955(16)31798-9
9. Speiser P.W., White P.C. Congenital adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(8): 776–88. DOI: 10.1056/NEJMra021561
10. Speiser P.W., Azziz R., Baskin L.S. et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(9): 4133–60. DOI: 10.1210/jc.2009-2631
11. Miller W.L., Levine L.S. Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. *J. Pediatr.* 1987; 111(1): 1–17. DOI: 10.1016/s0022-3476(87)80334-7
12. White P.C., Speiser P.W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Rev.* 2000; 21(3): 245–91 DOI: 10.1210/edrv.21.3.0398
13. Kowarski A., Finkelstein J.W., Spaulding J.S. et al. Aldosterone secretion rate in congenital adrenal hyperplasia: a discussion of the theories in the pathogenesis of the salt losing form of syndrome. *J. Clin. Invest.* 1965; 44(9): 1505–13. DOI: 10.1172/JCI105257
14. Simopoulos A.P., Marshall J.R., Delea C.S. et al. Studies on the deficiency of 21-hydroxylation in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1971; 32(3): 438–43. DOI: 10.1210/jcem-32-3-438
15. Migeon C.J., Donohoue P.A. Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency- its molecular basis and its remaining problems. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1991; 20(2): 277–96.
16. Falhammar H., Nordenström A. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine.* 2015; 50(1): 32–50. DOI: 10.1007/s12020-015-0656-0
17. Kohn B., Levine L.S., Pollack M.S. et al. Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 55(5): 817–27. DOI: 10.1210/jcem-55-5-817
18. Pang S., Clark A. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening.* 1993; 2(2–3): 105–39. DOI: 10.1016/0925-6164(93)90024-D

19. Grosse S.D., Van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia? *Horm. Res.* 2007; 67(6): 284–91. DOI: 10.1159/000098400
20. Карева М.А. Врожденная дисфункция коры надпочечников у детей: эпидемиология, генетическая основа, персонализированный подход к диагностике и лечению, мониторинг соматического и репродуктивного здоровья: Дис. ... докт. мед. наук. М.; 2018. 214 с. [Kareva M.A. Paediatric congenital adrenal hyperplasia: epidemiology, genetic make-up, individualised approach to diagnosis and management, somatic and reproductive health monitoring: Doctoral thesis. M.; 2018. 214 p. (in Russian)]
21. Speiser P.W., Dupont B., Rubinstein P. et al. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37(4): 650–67.
22. Baumgartner-Parzer S.M., Nowotny P., Waldhäusl W. et al. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-OH-deficiency) in a middle European population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(2): 775–8. DOI: 10.1210/JC.2004-1728
23. White P.C., New M.I., Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(14): 5111–15. DOI: 10.1073/pnas.83.14.5111
24. Higashi Y., Yoshioka H., Yamane M. et al. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(9): 2841–5. DOI: 10.1073/pnas.83.9.2841
25. Pollack M.S., Levine L.S., O'Neill G.J. et al. HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1981; 33(4): 540–50.
26. Blanchong C.A., Zhou B., Rupert K.L. et al. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in Caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex associated disease. *J. Exp. Med.* 2000; 191(12): 2183–96. DOI: 10.1084/JEM.191.12.2183
27. Sinnott P., Collier S., Costigan C. et al. Genesis by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to steroid hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87(6): 2107–11. DOI: 10.1073/PNAS.87.6.2107
28. Simonetti L., Bruque C.D., Fernández C.S. et al. CYP21A2 mutation update: comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Hum. Mutat.* 2018; 39(1): 5–22. DOI: 10.1002/HUMU.23351
29. Concolino P., Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of CYP21A2 gene. *Mol. Diagn. Ther.* 2018; 22(3): 261–80. DOI: 10.1007/S40291-018-0319-Y
30. Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Малиевский О.А. и др. Врожденная дисфункция коры надпочечников: поиск мутаций в гене CYP21A2. Вестник Башкирского университета. 2013; 18(4): 1039–41. [Rakhimkulova A.A., Akhmetova V.L., Malievsky O.A. et al. Congenital adrenal hyperplasia: identification of CYP21A2 mutant alleles. *Bulletin of Bashkir University.* 2013; 18(4): 1039–41. (in Russian)]
31. Baumgartner-Parzer S., Witsch-Baumgartner M., Hoepfner W. EMQN best practice guidelines for molecular genetic testing and reporting of 21-hydroxylase deficiency. *Eur. J. Hum. Genet.* 2020; 28(10): 1341–67 DOI: 10.1038/s41431-020-0653-5
32. Rodríguez A., Ezquieta B., Labarta J.I. et al. En representación del grupo de Hiperplasia Suprarrenal Congénita de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con formas clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa [Recommendations for the diagnosis and treatment of classic forms of 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia]. *An. Pediatr. (Barc.).* 2017; 87(2): 116.e1–10. DOI: 10.1016/j.anpedi.2016.12.002
33. Baumgartner-Parzer S.M., Schulze E., Waldhäusl W. et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(10): 4771–5. DOI: 10.1210/JCEM.86.10.7898
34. Wedell A., Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2(5): 499–504. DOI: 10.1093/HMG/2.5.499
35. Witchel S.F., Bhamidipati D.K., Hoffman E.P. et al. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1996; 81(11): 4081–8. DOI: 10.1210/JCEM.81.11.8923864
36. Lee H., Chao H., Ng H. et al. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J. Med. Genet.* 1996; 33(5): 371–5. DOI: 10.1136/JMG.33.5.371
37. Tokarska M., Barg E., Wikiera B. et al. Zastosowanie metody multipleksowego minisekwencjonowania (multiplex minisequencing) do wykrywania mutacji w ludzkim genie CYP21 [Multiplex minisequencing applied in detection of human functional CYP21 gene mutations]. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* 2007; 13(4): 183–6.
38. Németh S., Riedl S., Kriegshäuser G. et al. Reverse-hybridization assay for rapid detection of common CYP21A2 mutations in dried blood spots from newborns with elevated 17-OH progesterone. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 414: 211–4. DOI: 10.1016/J.CCA.2012.09.013
39. Menassa R., Tardy V., Despert F. et al. p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 93(5): 1901–8. DOI:10.1210/JC.2007-2701
40. Concolino P., Mello E., Minucci A. et al. A new CYP21A1P/CYP21A2 chimeric gene identified in an Italian woman suffering from classical congenital adrenal hyperplasia form. *BMC Med. Genet.* 2009; 10: 72. DOI: 10.1186/1471-2350-10-72
41. Greene C.N., Cordovado S.K., Turner D.P. et al. Novel method to characterize CYP21A2 in Florida patients with congenital adrenal hyperplasia and commercially available cell lines. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2014; 1: 312–23. DOI: 10.1016/J.YMGMR.2014.07.002
42. Баранник А.П., Колтунова А.А., Озолина Л.А. и др. Новая система ДНК диагностики мутаций в гене сур21 человека, ассоциированных с врожденной гиперплазией коры надпочечников. Биоорганическая химия. 2010; 36(3): 354–65. [Barannik A.P., Koltunova A.A., Ozoliny L.A. et al. New DNA system for diagnosing CYP21 mutations associated with congenital adrenal hyperplasia. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2010; 36(3): 354–65. (in Russian)]
43. Speiser P.W., Dupont J., Zhu D. et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 1992; 90(2): 584–95. DOI: 10.1172/JCI115897
44. Concolino P., Mello E., Minucci A. et al. Genes, pseudogenes and like genes: the case of 21-hydroxylase in Italian population. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 85–9. DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.019
45. Tsai L.P., Lee H.H. Analysis of CYP21A1P and the duplicated CYP21A2 genes. *Gene.* 2012; 506(1): 261–2. DOI: 10.1016/j.gene.2012.06.045
46. Speiser P.W., Arlt W., Auchus R.J. et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society Clinical practice guideline [published correction appears in *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(1): 39–40]. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018; 103(11): 4043–88. DOI: 10.1210/jc.2018-01865
47. Trakakis E., Dracopoulou-Vabouli M., Dacou-Voutetakis C. et al. Infertility reversed by glucocorticoids and full-term pregnancy in a couple with previously undiagnosed nonclassic congenital adrenal hyperplasia. *Fertil. Steril.* 2011; 96(4): 1048–50. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.1103
48. Baumgartner-Parzer S., Vytiska-Binsdorfer E., Kleinle S. et al. Unexplained infertility: increased risk for 21-hydroxylase-deficiency in parents and offspring? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2014; 182: 258–9. DOI: 10.1016/j.ajogrb.2014.09.014

Поступила / Received: 02.04.2021

Принята к публикации / Accepted: 28.04.2021