https://doi.org/10.26442/26586630.2021.2.200903

BY-NC-SA 4.0

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

# Клиническая гетерогенность и молекулярно-генетические причины в когорте пациентов с нарушением формирования пола

И.Л. Никитина✉, Л.Р. Саракаева, А.А. Костарева, Е.К. Кудряшова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация**

**Обоснование.** Нарушения формирования пола (НФП) относятся к группе редких врожденных аномалий, которые характеризуются несоответствием генетического, гонадного, фенотипического и психологического пола. Диагностика и планирование оказания помощи требуют комплексного подхода и должны осуществляться мультидисциплинарной группой специалистов.

**Цель.** Анализ частоты установления генетических причин при различных формах НФП путем применения оригинальной панели таргетного секвенирования с последующим установлением ассоциаций выявленных генетических вариантов с характером клинических проявлений.

**Материалы и методы.** Проведено молекулярно-генетическое исследование с помощью метода таргетного секвенирования нового поколения (NGS) на приборе MiSeq (платформа Illumina) с участием 28 пациентов с клинически верифицированным диагнозом НФП кариотипа 46, XY. Для данного исследования разработали панель генов HaloPlex (Agilent), включающую в себя кодирующие области 80 генов-кандидатов, ассоциированных с НФП. Выявленные варианты затем проверили секвенированием по Сэнгеру. Биоинформационный анализ проводился с использованием баз OMIM, проекта «1000 геномов», ESP6500, Genome Aggregation Database projects. Генетические варианты классифицировали в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики.

**Результаты.** Генетические варианты, оцененные как вероятно патогенные, патогенные и неизвестной значимости, выявили у 39% пациентов с НФП. В ассоциации с клиническим фенотипом нарушения половой дифференцировки их определили в качестве каузативных. В 82% случав выявлено не более одного вероятно патогенного варианта, в 18% – два, что свидетельствовало об олигогенном генезе НФП. К ранее не описанным отнесли 43% среди выявленных генетических вариантов. В ассоциации с клиническим фенотипом варианты в генах *NR5A1* и *MAP3K1* выявили у 4 пациентов с гонадным дисгенезом (по 2 случая). Мутации в гене *AR* были представлены полной резистентностью к андрогенам у 3 пациентов. Вариант в гене *MAMLD1* имел место у пациента с проксимальной формой гипоспадии, в гене *CYP17A1* – при редкой форме врожденной гиперплазии коры надпочечников – дефиците фермента 17α-гидроксилазы. У 2 пациентов обнаружили олигогенный генез НФП. У 1-го представлен мутациями в генах *MAP3K1* и *MAMLD1* с клиническим фенотипом промежностной гипоспадии, у 2-го – мутациями в *AR* и *SEMA3A*, что клинически было продемонстрировано парциальной формой резистентности к андрогенам и явилось основанием для смены пола воспитания на женский. Оба случая вариантов в гене стероидогенного фактора *NR5A1* были представлены семейными формами.

**Заключение.** Включение в спектр обследования при НФП секвенирования нового поколения с использованием таргетных панелей генов улучшает понимание генетических основ нарушений половой дифференцировки, что в ряде случаев также оказывает влияние на коррекцию терапии и присвоение паспортного пола воспитания.

**Ключевые слова:** нарушения формирования пола, секвенирование нового поколения, дисгенезия гонад, полная резистентность к андрогенам, парциальная резистентность к андрогенам, нарушения биосинтеза андрогенов, паспортный пол

**Для цитирования:** Никитина И.Л., Саракаева Л.Р., Костарева А.А., Кудряшова Е.К. Клиническая гетерогенность и молекулярно-генетические причины в когорте пациентов с нарушением формирования пола. Современные подходы к оперативному лечению детей с несовершенным остеогенезом. Педиатрия. Consilium Medicum. 2021; 2: 194–202. DOI: 10.26442/26586630.2021.2.200903

Нарушения формирования пола (НФП) – гетерогенная группа врожденных аномалий половой системы, возникающих вследствие несоответствия генетического, гонадного, фенотипического (или соматического) и психологического пола. Данные нарушения могут произойти на ранних этапах эмбриогенеза плода и привести к необратимым анатомическим нарушениям формирования половых желез, внутренних и наружных половых органов, что впоследствии после рождения ребенка ведет к ошибкам в определении половой принадлежности. Последнее по мере роста и взросления пациента проявляется различными нарушениями развития в пубертате, отсутствием способности к репродукции, ассоциированными психологическими и социальными проблемами. Именно это указывает на значимость данной проблемы не только как медицинской, но и серьезной медико-социальной, определяющей при несвоевременной и неадекватной диагностике и тактике формирование дезадаптации растущих пациентов в обществе с точки зрения их гендерной роли и способности к репродукции [1–6].

Наука о поле является относительно молодой во временном аспекте, но при этом интенсивно развивающейся, о чем свидетельствуют многочисленные работы в данной области. Исследования направлены на поиск генетических причин НФП, анализ их влияния на адаптацию пациентов в присвоенном поле, способность к репродукции, сексуальную удовлетворенность, общее соматическое здоровье, что осуществляется на основе длительного проспективного наблюдения, корректности применяемой тактики в отношении пациентов с НФП [2, 5–9].

**Информация об авторах / Information about the authors**

✉*Никитина Ирина Леоровна* – д-р мед. наук, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». E-mail: nikitina0901@gmail.com; ORCID: 0000-0002-3713-5350

*Саракаева Лейла Рамазановна* – мл. науч. сотр., ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». E-mail: sarale723@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2752-861X

*Костарева Анна Александровна* – д-р мед. наук, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». ORCID: 0000-0002-9349-6257

*Кудряшова Елена Константиновна* – канд. мед. наук, науч. сотр., ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». E-mail: aksi-lena@rambler.ru

✉*Irina L. Nikitina* – D. Sci. (Med.), Almazov National Medical Research Centre. E-mail: nikitina0901@gmail.com; ORCID: 0000-0002-3713-5350

*Leyla R. Sarakaeva* – Res. Assist., Almazov National Medical Research Centre. E-mail: sarale723@gmail.com; ORCID: 0000-0002-2752-861X

*Anna A. Kostareva* – D. Sci. (Med.), Almazov National Medical Research Centre. ORCID: 0000-0002-9349-6257

*Elena K. Kudryashova* – Cand. Sci. (Med.), Almazov National Medical Research Centre. E-mail: aksi-lena@rambler.ru

https://doi.org/10.26442/26586630.2021.2.200903

ORIGINAL ARTICLE

# Clinical heterogeneity and molecular genetic causes in a cohort of patients with disorders/differences of sex development

Irina L. Nikitina✉, Leyla R. Sarakaeva, Anna A. Kostareva, Elena K. Kudryashova
Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

**Abstract**
**Background.** Disorders of sex development (DSD) are a group of rare congenital conditions. Clinical management of patients with DSD is often difficult and requires multidisciplinary approach.
**Aim.** Analysis of the frequency of establishing genetic causes in various forms of DSD by using an original targeted sequencing panel with subsequent establishment of associations of the identified genetic variants with the nature of clinical manifestations.
**Materials and methods.** Conducted a clinical examination, karyotype analysis followed by the next generation sequencing (NGS) using MiSeq (Illumina) with the twenty-eight patients with different forms of 46, XY DSD were included. We designed HaloPlex (Agilent) gene panel that included coding regions of 80 candidate genes associated with DSD. All variants identified by NGS were confirmed by Sanger sequencing. We performed bioinformatics analysis using OMIM, "1000 genomes", ESP6500, Genome Aggregation Database projects. To assess the clinical significance of the identified variants we used ClinVar database and American College of Medical Genetics and Genomics criteria.
**Results.** Out of 28 patients pathogenic, likely pathogenic, variants with unknown significance were identified in 11 patients (39%). In combination with clinical phenotype these variants were determined as causative for DSD. Nine patients (82%) had likely causative variants in one gene (of monogenic origin), while 18% had variants in two genes simultaneously (of oligogenic origin). 43% of the identified gene variants have not been previously reported. The variants in *NR5A1* were associated with gonadal dysgenesis in two patients; the variants in *MAP3K1* were also found in another two patients with gonadal dysgenesis, variants in *AR* – in three patients with CAIS, variant in *MAMLD1* was associated with proximal form of hypospadias, variant in *CYP17A1* was associated with testosterone biosynthetic defect. Among the two patients with variants of oligogenic origin, one had variants in *MAP3K1* and *MAMLD1* genes and was clinically characterized by hypospadias; the second had variants in *AR* and *SEMA3A* and was diagnosed with PAIS. There were also two patients with variants in *NR5A1* of familial inheritance.
**Conclusion.** NGS-based targeted sequencing is a promising technique to improve the differential diagnosis, genetic counseling and management strategies for patients with DSD. Complex clinical examination followed by molecular genetic analysis improves the diagnosis, genetic counseling, and management strategies for patients with DSD including the assignment of sex of rearing.

**Keywords:** disorders of sex development, next generation sequencing, gonadal dysgenesis, complete androgen insufficiency, partial androgen insufficiency, testosterone biosynthetic defect, sex of rearing
**For citation:** Nikitina IL, Sarakaeva LR, Kostareva AA, Kudryashova EK. Clinical heterogeneity and molecular genetic causes in a cohort of patients with disorders/differences of sex development. Pediatrics. Consilium Medicum. 2021; 2: 194–202. DOI: 10.26442/26586630.2021.2.200903

С точки зрения практической эндокринологии наиболее важным направлением является создание программ, сосредоточенных на максимально корректной тактике в отношении лиц с НФП. Тактика оказания помощи должна включать раннее выявление аномалий с обязательным уточнением нозологического варианта нарушения дифференцировки пола. На основании установленного диагноза принимают решение о выборе паспортного пола, основанного на прогнозировании психологического комфорта человека, половой самоидентификации, соматического здоровья пациента в период его взрослой жизни. Уточнение генетических основ разных форм НФП, накопление опыта длительного наблюдения пациентов с известными клиническими фенотипами и установленными генетическими вариантами имеют несомненную актуальность для формирования последующих рекомендаций в отношении тех или иных групп заболевания [2, 3, 10, 11]. Учитывая большое разнообразие клинических вариантов нарушений половой дифференцировки наряду с продолжающимся пополнением знаний о роли генетических вариантов в генезе НФП, лежащем в основе постоянного обновления таргетных панелей генов при данной патологии, в публикации мы приводим результаты собственных наблюдений в данной области, а именно итоги когортного исследования группы пациентов с НФП с фокусом на анализ ассоциаций выявленных генетических вариантов с клиническими проявлениями и обсуждением возможностей использования полученных данных для улучшения в перспективе оказания помощи пациентам с заболеванием.

## Материалы и методы

Проведено стандартное клинико-лабораторное обследование с целью верификации клинического диагноза 28 пациентов с различными формами НФП. Оно включало клиническую часть: оценка соматического статуса и полового развития по шкале Tanner, строение наружных гениталий с описанием степени вирилизации по Prader, маскулинизация по шкале Ahmed. Использовались визуализационные (включая лучевые) и другие инструментальные методы диагностики – ультразвуковое исследование и магнитно-резонансная томография органов малого таза, диагностическая лапароскопия, диагностическая биопсия. Проводилось гормональное обследование: фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, тестостерон, эстрадиол, панель стероидогенеза коры надпочечников и др. В ряде случаев определялся уровень антимюллерова гормона, ингибина B и проводились функциональные пробы для оценки функции гонад.

Цитогенетическое исследование проводилось на микроскопе LEICA DMLS, оборудованном объективами FLUOTAR 20×/0,40 и 100×/1,30–0,60, автоматической фотонасадкой, блоком светофильтров для флуорохромов FITC и DAPI. Для анализа видеоизображения использовали программное обеспечение Adobe Photoshop 7.0. Препараты применяли после окрашивания флуорохромом Hoechst 33258. Для QFH-окрашивания препаратов метафазных хромосом использовали метод QFH/AcD, проводимый по стандартной методике.

Молекулярно-генетическое исследование выполнили с помощью метода таргетного секвенирования нового поколения (NGS) на приборе MiSeq (платформа Illumina). Для данного исследования была разработана панель генов HaloPlex Custom Panel (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) согласно протоколу производителя «HaloPlex target enrichment system for illumina

https://doi.org/10.26442/26586630.2021.2.200903

**Таблица 1. Анализ выявленных вариантов в генах, ассоциированных с НФП**
**Table. 1. Analysis of identified variants in genes associated with disorders of sexual development (DSD)**

| Пациент (номер) | Ген (OMIM) | Выявленная замена | Патогенность |
|---|---|---|---|
| 1 | *MAP3K1* (600982) | chr5:56178269, rs754640057, NM_005921.1:c.T3242A:p.Met1081Lys в гетерозиготном состоянии (рис. 1) | VUS |
| 2 | *MAP3K1* (600982) | chr5:56177906, rs763146065, NM_005921:c.G2879A:p.Gly960Asp в гетерозиготном состоянии (рис. 2) | VUS |
| | *MAMLD1* (300120) | chrX:149638811, rs782039491, NM_005491.4:c.A966C:p.Gln322His в гемизиготном состоянии (рис. 3) | VUS |
| 3 | *MAMLD1* (300120) | chrX:149639353, rs367735248, NM_001177465.3:c.C1433A:p.Ala478Glu в гемизиготном состоянии (рис. 4) | VUS |
| 4 | *CYP17A1* (609300) | chr10:102832577, rs104894139, c.1073G>A:p.Arg358Gln в гомозиготном состоянии | LP |
| 5 | *AR* (313700) | chrX:66941694, NM_000044: exon6:c.C2338T:p.Arg780Trp в гемизиготном состоянии (рис. 5) | LP |
| 6 | *AR* (313700) | chrX:66766549, NM_000044:c.A1561T:p.lys521Ter в гемизиготном состоянии (рис. 6) | P |
| 7 | *AR* (313700) | chrX:66905958, NM_000044.6:c.G1875T:p.M et625Ile в гемизиготном состоянии | LP |
| | | chrX:66905959, rs1569305860, NM_000044.6:c.A1876T:p.Thr626Ser в гемизиготном состоянии | LP |
| 8 | *NR5A1* (184757) | chr9:127265603, NM_004959.3:c.C72G:p.His24Gln в гетерозиготном состоянии (рис. 7) | LP |
| 9 | *SEMA3A* (603961) | chr7:83636785, NM_006080.2:c.A1024G:p.M et342Val в гетерозиготном состоянии (рис. 8) | VUS |
| | *AR* (313700) | chrX:66942818, NM_000044:c.G2599C:p.Val8 67Leu в гемизиготном состоянии (рис. 9) | P |
| 10 | *NR5A1* (184757) | chr9:127245206, NM_004959.3:c.1216_1217 delCT:p.Leu406fs в гетерозиготном состоянии (рис. 10) | LP |
| 11 | *MAP3K1* (600982) | chr5:56152500, NM_005921.2:c.A556G:p.A rg186Gly в гетерозиготном состоянии (рис. 11) | VUS |

**Примечание.** P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, VUS – вариант с неопределенной клинической значимостью (согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики).

sequencing», включающая в себя кодирующие области следующих 80 генов-кандидатов, ассоциированных с развитием НФП, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями: *AKR1C2*, *AKR1C4*, *AMH*, *AMHR2*, *AR*, *ARL6*, *ARMC5*, *ARX*, *AVP*, *BBS1*, *BBS10*, *BBS12*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS9*, *CBX2*, *CD96*, *CDKN1C*, *CEP41*, *CHD7*, *CYB5A*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *CYP21A2*, *DHCR7*, *DHH*, *DMRT1*, *DMRT2*, *DUSP6*, *DVL1*, *ESR1*, *ESR2*, *FEZF1*, *FGF17*, *FGF8*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FLRT3*, *FOXL2*, *FREM2*, *FSHB*, *GATA4*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *HSD17B3*, *HSD3B2*, *IGF2*, *IL17RD*, *KAL1*, *KISS1*, *KISS1R*, *LHB*, *LHCGR*, *MAMLD1*, *MAP3K1*, *NR0B1*, *NR5A1*, *NSMF*, *PROK2*, *PROKR2*, *RSPO1*, *SEMA3A*, *SOX3*, *SOX9*, *SPRY4*, *SRD5A2*, *SRY*, *STAR*, *TAC3*, *TACR3*, *WDR11*, *WNT4*, *ZFPM2*, *ZNRF3*. Обработка данных секвенирования проведена с использованием алгоритма, включающего в себя: выравнивание прочтений (BWA-MEM-0.7.1) на референсную последовательность генома человека (GRCh37/hg19); постпроцессинг выравнивания (Picard 2.9); выявление вариантов нуклеотидной последовательности, отличающихся от референсной последовательности (GATK4.0.11.0); фильтрацию вариантов по качеству; аннотацию выявленных вариантов (Annovar) по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster); методы расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Выявленные варианты в генах верифицированы методом секвенирования по Сэнгеру у пациентов и их родителей (при возможности). Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура, представленная на сайте http://www.HGVS.org/varnomen. Генетические варианты классифицированы в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики, согласно которым учитывались патогенные, вероятно патогенные и неопределенного значения варианты нуклеотидной последовательности (мутации), не рассматривались вероятно доброкачественные варианты. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов применялись база данных OMIM и литературные данные [12–16].

## Результаты

В исследование включили 28 пациентов с разными нозологическими формами НФП, исключая хромосомные. Во всех представленных случаях в кариотипе имела место Y-хромосома, нозологические варианты НФП представлены дисгенезией гонад, нарушением синтеза или чувствительности к андрогенам, а также проксимальными формами гипоспадии. Все пациенты прошли молекулярно-генетическое исследование, по результатам которого у 11 (39%) пациентов в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП, выявлены варианты, классифицированные как патогенные (9%), вероятно патогенные (45,5%) или варианты с неопределенной клинической значимостью (45,5%). С учетом наличия клинического фенотипа НФП данные варианты приняты в качестве каузативных. Среди выявленных нуклеотидных замен 43% не было ранее описано в научной литературе. У 18% пациентов установлены семейные формы патологии, так как причинные варианты были также обнаружены у близких родственников пациентов (у отца в одной семье, у матери – в другой). При этом фенотип НФП имел место только у пробандов – именно они имели несоответствие генетического пола фенотипическому и полу воспитания. У родителей же такого несоответствия не наблюдалось, их генетический пол соответствовал фенотипическому и паспортному, но в одной семье наличие генетического варианта привело к развитию функциональной неполноценности гонад с развитием во взрослом возрасте гипергонадотропного гипо-

**Рис. 1. Пациент 1. Молекулярно-генетическое исследование гена *MAP3K1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 1. Molecular genetic study of *MAP3K1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

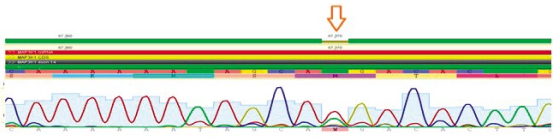


**Рис. 2. Пациент 2. Молекулярно-генетическое исследование гена *MAMLD1*, гена *MAP3K1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 2. Patient 2. Molecular genetic study of the *MAMLD1* gene, *MAP3K1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

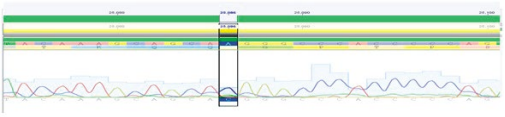


**Рис. 3. Пациент 2. Молекулярно-генетическое исследование гена *MAMLD1*, гена *MAP3K1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 3. Patient 2. Molecular genetic study of the *MAMLD1* gene, *MAP3K1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

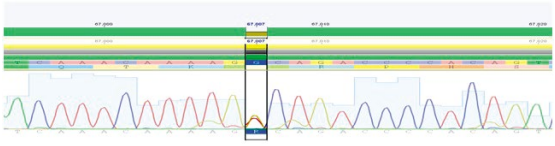


**Рис. 4. Пациент 3. Молекулярно-генетическое исследование гена *MAMLD1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 4. Patient 3. Molecular genetic study of the *MAMLD1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

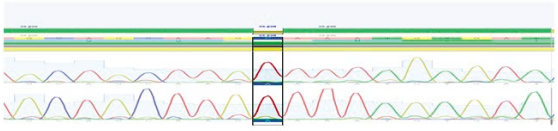


**Рис. 5. Пациент 5. Молекулярно-генетическое исследование гена *AR* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 5. Patient 5. Molecular genetic study of the *AR* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

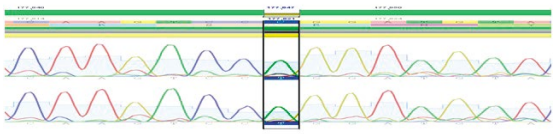


**Рис. 6. Пациент 6. Молекулярно-генетическое исследование гена *AR* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 6. Patient 6. Molecular genetic study of the *AR* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

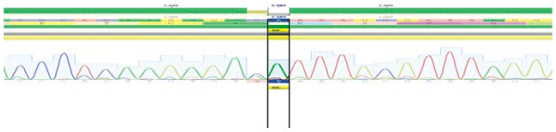


**Рис. 7. Пациент 8. Молекулярно-генетическое исследование гена *NR5A1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 7. Patient 8. Molecular genetic study of the *NR5A1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

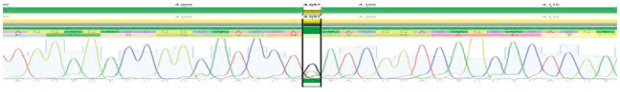


**Рис. 8. Пациент 9. Молекулярно-генетическое исследование гена *SEMA3A*, гена *AR* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 8. Patient 9. Molecular genetic study of *SEMA3A* gene, *AR* gene (sequencing fragment of the gene with identified variant).**

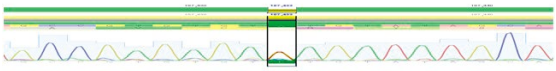


**Рис. 9. Пациент 9. Молекулярно-генетическое исследование гена *SEMA3A*, гена *AR* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 9. Patient 9. Molecular genetic study of the *SEMA3A* gene, *AR* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

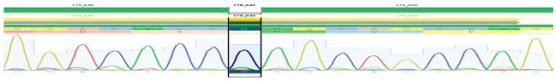


**Рис. 10. Пациент 10. Молекулярно-генетическое исследование гена *NR5A1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 10. Patient 10. Molecular genetic study of *NR5A1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**

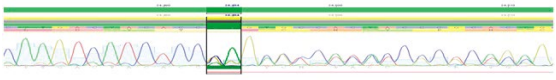
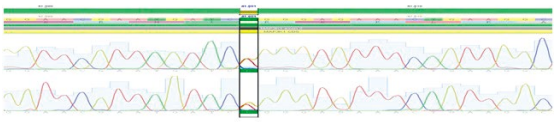


**Рис. 11. Пациент 11. Молекулярно-генетическое исследование гена *MAP3K1* (фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом).**

**Fig. 11. Patient 11. Molecular genetic study of the *MAP3K1* gene (sequencing fragment of the gene with the identified variant).**



https://doi.org/10.26442/26586630.2021.2.200903

**Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов с НФП (генетический пол 46, XY – мужской)**
**Table. 2. Clinical characteristics of patients with DSD (genetic sex 46, XY - male)**

| Пациент (номер) | Генетический пол | Паспортный пол | Клиническая характеристика |
|---|---|---|---|
| 1 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады представлены рубцовыми тяжами. Наружные гениталии развиты правильно по женскому типу, внутренние гениталии – гипоплазированная матка с трубами. Функциональная активность гонад отсутствует |
| 2 | 46, XY – мужской | Мужской | Яички в мошонке. Наружные гениталии – мошоночная гипоспадия, расщепление мошонки. Функциональная активность гонад сохранена |
| 3 | 46, XY – мужской | С рождения женский, смена на мужской и вновь на женский | Гонады в малом тазу не визуализируются. Наружные гениталии сформированы неопределенно, гипоплазированная мошонка, микропенис 1 см, деформированный за счет мошоночной гипоспадии, урогенитальный синус, внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад отсутствует |
| 4 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады в наружных отделах паховых каналов. Наружные гениталии сформированы по женскому типу, атрезия влагалища, внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад низкая |
| 5 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады в малом тазу у входа в паховый канал. Наружные гениталии сформированы по женскому типу, наружное отверстие уретры смещено к преддверию влагалища, слепо заканчивающегося, внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 6 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады в малом тазу. Наружные гениталии сформированы по женскому типу, влагалище слепо заканчивается, внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 7 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады в паховых каналах. Наружные гениталии сформированы по женскому типу, внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 8 | 46, XY – мужской | Женский | Левая гонада у наружного края пахового канала, правая в малом тазу. Наружные гениталии – смешанное строение с урогенитальным синусом, вирилизация в пубертате (кавернозные тела 3,5 см), внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 9 | 46, XY – мужской | С рождения мужской, смена на женский | Гонада справа в мошонке, слева по ходу пахового канала. Наружные гениталии – неопределенное строение, мошонка частично расщеплена, урогенитальный синус, половой член практически не сформирован, головка отсутствует; внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 10 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады в паховых каналах. Наружные гениталии – близко к женскому полу, частичное сращение промежностного шва, урогенитальный синус, кавернозные тела значительно гипоплазированы; внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Функциональная активность гонад сохранена |
| 11 | 46, XY – мужской | Женский | Гонады представлены рубцовыми тяжами. Наружные гениталии сформированы правильно по женскому типу; внутренние гениталии – дериваты мюллеровых протоков (гипоплазированная матка с трубами). Функциональная активность гонад отсутствует |

гонадизма. Моногенные варианты выявлены в 82% случаев, в то время как 18% – олигогенные с вариантами, оцененными как вероятно каузативные в двух генах. Вероятно доброкачественные варианты не учитывались.

В табл. 1 представлена характеристика генетических вариантов, выявленных в когорте пациентов с НФП.

Краткая клиническая характеристика пациентов с НФП и выявленными генетическими вариантами представлена в табл. 2.

## Обсуждение

**Цель исследования** – анализ частоты установления генетических причин при различных формах НФП путем применения оригинальной панели таргетного секвенирования с последующим установлением ассоциаций выявленных генетических вариантов с характером клинических проявлений.

На первом этапе работы провели сопоставление полученных в результате генетического исследования результатов с данными научных публикаций. Генетические исследования, проведенные с помощью метода NGS при нарушениях половой дифференцировки, немногочисленны, что обосновало научный интерес и актуальность в этой части. Генетические варианты, принятые за потенциально каузативные, были определены у 39% пациентов с фенотипом НФП, при этом 43% вариантов ранее не описано в генетических базах. В одной из публикаций, посвященных данной теме, Y. Fan и соавт. отмечают, что применение таргетного секвенирования методом NGS по сравнению с ранее проводимым исследованием отдельных генов, считавшихся причинами НФП, позволило почти в 3 раза (с 10 до 28%) повысить выявляемость патологических вариантов и, таким образом, не только улучшить генетическую диагностику нарушений дифференцировки пола, но и обогатить базы, так как около 88% выявленных замен были отнесены к ранее не описанным. В целом в обследованной когорте генетические причины НФП были установлены у 9 человек из 32 обследованных, т.е. в 28% случаев [17]. В работе других авторов, включивших в когорту 21 пациента с НФП, методом NGS подтверждено наличие генетических вариантов в 52% случаев [18]. В исследовании, включившем более 300 пациентов с нарушением дифференцировки пола, авторы определили сопоставимую частоту каузативных вариантов, а именно 43% среди всей когорты обследованных [19].

Сравнивая с выявленной в проведенном нами исследовании частотой идентификации генетических причин НФП, следует отметить тот факт, что применение таргетного секвенирования методом NGS с использованием больших панелей генов, включенных по принципу высокой вероятности или известного участия в процессах дифференцировки пола, значительно повышает частоту установления генетических причин НФП. Также оно позволяет расширить базы данных ранее не описанными вариантами, однако не полностью, позволяя на данном этапе определять от 1/3 до 1/2 мутаций, приводящих к пренатальному сбою дифференцировки пола.

Следует отметить, что в исследовании к числу каузативных/вероятно каузативных отнесли лишь те замены, которые имели низкую популяционную встречаемость и выявлялись в генах, принимающих участие в пренатальной дифференцировке пола при наличии клинических признаков его нарушения. Большая же часть находок имела высокую частоту и в соответствии с международной классификацией была отнесена к полиморфизмам или доброкачественным заменам, не имеющим отношения к фенотипу НФП.

На следующем этапе вызывают интерес проанализированные генетические варианты, представленные как каузативные в ассоциации с фенотипом НФП у конкретных пациентов. В данной группе наблюдались мутации в следующих генах: стероидогенном факторе *NR5A1* (*SF1*) – у 2 человек, *MAP3K1* – тоже у 2, андрогеновом рецепторе (*AR*) – 4, *MAMLD1* – 2, *CYP17A1* – 1. Еще у 2 пациентов обнаружили по 2 мутации в генах, ассоциированных с дифференцировкой пола, причем в обоих случаях они имели низкую популяционную частоту и являлись каузативными, что в целом было расценено как олигогенный генез НФП. У 1-го человека выявили мутации в виде вариантов в генах *MAP3K1* и *MAMLD1*, у 2-го – в *AR* и *SEMA3A*. В научной литературе встречаются подобные описания олигогенного генеза НФП [19].

По типу наследования большинство замен находилось в гетерозиготном состоянии. Их определили в генах, участвующих в дифференцировке пола, и описали как каузативные при формах НФП с аутосомно-доминантным типом наследования. Один пациент имел вариант в гомозиготном состоянии в гене с ранее представленным аутосомно-рецессивным типом наследования при НФП.

Важной задачей явилось сопоставление выявленных генетических вариантов с клиническим фенотипом НФП в обследованной когорте пациентов. Это имеет значение для определения вероятных закономерностей в презентации патологии и принятия решений, касающихся выработки персональной программы оказания помощи, а также для семейного генетического консультирования. Важность анализа ассоциаций генотип–фенотип объясняется и тем фактом, что клинические проявления многих форм нарушения половой дифференцировки имеют схожие симптомы, но при этом разный ресурсный потенциал в дальнейшем. Это касается функциональных возможностей половых желез, степени онкологического риска, а также прогноза половой идентификации и сексуальной ориентации взрослеющих пациентов. Поэтому знание генетических основ НФП способно оказать реальную помощь в предикции названных проблем на основе знаний сценария полового развития в подобных случаях, ранее описанных в научной литературе. У пациентов обследованной когорты с диагнозом гонадного дисгенеза генетическое подтверждение имело место в 1/2 случаев. Это были нуклеотидные замены в генах *MAP3K1* и *NR5A1*. Клинический фенотип при вариантах в *MAP3K1* характеризовался у 2 пациентов полной дисгенезией гонад (синдром 46, XY – женщины), причем у одного пациента, имевшего пол воспитания и самоидентификацию в женском поле, был идентифицирован ранее не описанный вариант нуклеотидной замены в гене *MAP3K1*chr5:56152500, NM_005921.2:c.A556G:p.Arg186Gly в гетерозиготном состоянии. При вариантах в гене *NR5A1* клинические проявления соответствовали парциальной дисгенезии гонад. В целом в когорте пациентов вариант в *MAP3K1* идентифицировали у 3 пациентов, причем у 3-го установлен олигогенный тип, проявившийся сочетанием патогенных вариантов в *MAP3K1* и *MAMLD1*. В клинической презентации у 3-го пациента имела место проксимальная гипоспадия, которая часто описывается в литературе в ассоциации с вариантами именно гена *MAMLD1*.

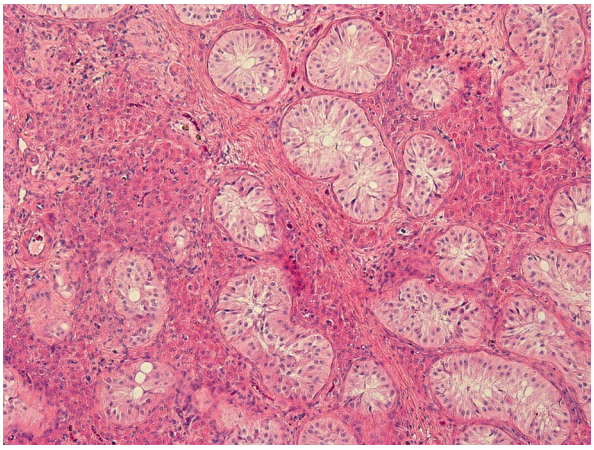
Ген *MAP3K1* известен как один из компонентов МАРК-сигнального пути, он кодирует митогенактивированную протеинкиназу киназы-1. В последние годы варианты в данном гене привлекают внимание исследователей с точки зрения его разграничивающего влияния на развитие и дифференцировку тестикул, а также в связи с большим полиморфизмом клинических проявлений патологии, возникающей в связи с мутациями в *MAP3K1*. Есть описания как гонадного дисгенеза, так и сочетания гипоспадии с крипторхизмом и микрофалусом.

Зарегистрированные в генетических базах данных мутации в *MAMLD1*, как было упомянуто, клинически в большинстве случаев представлены проксимальной гипоспадией иногда в сочетании с крипторхизмом. В когорте пациентов варианты в *MAMLD1*, расцененные как каузативные, идентифицировали у 2 пациентов. Один из них имел значительную недостаточность маскулинизации наружных гениталий (микропенис, крипторхизм, проксимальную гипоспадию), вследствие чего дважды подвергся процедуре смены паспортного пола. Наряду с нарушением дифференцировки пола данный пациент страдал тяжелой врожденной аномалией мочевой системы – ренальной дисплазией, при которой быстро прогрессировала потеря функций почек. На момент первой встречи с данным пациентом у него развились артериальная гипертензия, тяжелая хроническая почечная недостаточность с нарушением азотовыделительной функции. К сожалению, данная патология не была своевременно диагностирована у больного при его поступлении в клинику для проведения хирургической пластики наружных гениталий, будучи, вероятно, маскируемой проблемами, связанными с нарушениями дифференцировки пола. В научной литературе в качестве наиболее частых генетических причин синдромальных форм НФП, ассоциированных с аномалиями мочевой системы, упоминаются мутации в гене *WT1*. Однако проведенное нами генетическое обследование выявило другой каузативный вариант в *MAMLD1*. На основании полученных данных была сделана рекомендация для форм НФП с идентификацией варианта в *MAMLD1* об обязательном внимательном обследовании органов мочевой системы с мониторированием функции почек с первой декады жизни пациентов.

https://doi.org/10.26442/26586630.2021.2.200903

**Рис. 12. Ткань дифференцированного яичка, гиперплазия клеток Лейдига и Сертоли, сперматогенез отсутствует. Окраска гематоксилин-эозином, х100.**

**Fig. 12. Differentiated testicular tissue, hyperplasia of Leydig and Sertoli cells, no spermatogenesis. Hematoxylin-eosin staining, ×100.**



Второй случай мутации в гене *MAMLD1* уже упомянут. Генетический вариант относился к описанным ранее, его выявили у пациента с олигогенным типом наследования в сочетании с заменой в *MAP3K1*, клинически представлен проксимальной формой гипоспадии.

Следующими среди генетических причин дисгенезии гонад в когорте пациентов были мутации в гене *NR5A1*. Он кодирует стероидогенный фактор, относящийся к транскрипционным регуляторам развития, дифференцировке половых желез и коры надпочечников. Мутации в данном гене относятся к часто определяемым генетическим причинам нарушения разделения пола и клинически имеют высокий полиморфизм презентаций. Среди последних наряду с симптомами НФП описаны первичный гипокортицизм, гипогонадизм, бесплодие, редко аспления.

В проведенном исследовании выявлены 2 пациента с НФП с идентифицированными не описанными ранее нуклеотидными заменами в гене стероидогенного фактора *NR5A1* (chr9:127245206, NM_004959.3:c.1216_1217delCT:p.Leu406fs и Chr9:127265603, NM_004959.3:c.C72G:p.His24Gln) в гетерозиготном состоянии.

Оба случая носили семейный характер , так как подобные замены были выявлены у одного из родителей (в 1-м случае – у матери, с презентацией гипергонадотропного гипогонадизма с прогрессией в послеродовом периоде, во 2-м – у отца, с неизвестными клиническими проявлениями в связи с отказом от обследования). Оба пациента имели мужской генотип 46, XY с клиническим фенотипом выраженной недостаточности маскулинизации наружных гениталий, приведшей к регистрации в женском паспортном поле при рождении. В одном из случаев имел место поздний старт пубертата (15 лет) в соответствии с генетическим полом, что проявилось прогрессирующей вирилизацией и спонтанным низведением одной гонады, что явилось серьезным психологическим стрессом для подростка, идентифицированного в женском поле. Лабораторно определялся уровень тестостерона, соответствующий началу пубертата, но гистологическое исследование удаленных гонад показало дистрофические изменения канальцевых структур (рис. 12). Второй случай характеризовался диагностикой в преддошкольном, т.е. допубертатном возрасте, случайно во время оперативного лечения по поводу предполагаемой двусторонней паховой грыжи с находкой в паховом канале тестикулы. Анализируя эти клинические случаи, следует отметить, что оба пациента имели нарушенное строение наружных гениталий с наличием урогенитального синуса, при этом 2-й пациент длительное время наблюдался специалистами по поводу предполагаемых синехий, однако пациенты имели функционально активные мужские гонады. Установление истинного диагноза в этих случаях произошло в возрасте с уже сформировавшейся половой самоидентификацией по крайней мере у 1-го пациента и отчетливо определенной гендерной социальной ролью пациентов с точки зрения их самих и родителей. Данный факт привел к принятию решения о сохранении женского пола воспитания в обоих случаях, при том что в данной клинической ситуации при условии своевременной диагностики наличие функционально активных гонад при условии их успешного низведения могло определить развитие пациентов в паспортном поле, соответствующем генетическому, т.е. мужском, в котором сохранился бы прогноз фертильности. Таким образом, своевременная клиническая диагностика с последующей идентификацией генетического варианта при мутациях в гене *NR5A1* имеет значение для принятия более корректных решений относительно регистрации пола воспитания, а также, учитывая наследственный характер, при генетическом консультировании планирования последующих беременностей в данной семье.

Среди прочих идентифицированных каузативных генов были выявлены ранее не описанные замены в генах *AR* у 3 пациентов, мутация у 4 имела описание в генетических базах данных с низкой популяционной частотой. Клинический фенотип пациентов с синдромом полной резистентности к андрогенам был представлен полной формой у 3-го и парциальной формой у 4-го больного, и во всех случаях генетическое подтверждение имело решающее значение как для подтверждения нозологического варианта НФП, так и планирования терапевтической тактики. У пациента с парциальной формой резистентности к андрогенам результаты генетического тестирования стали основой принятия решения о смене паспортного пола воспитания (мужского на женский), остальные пациенты, имевшие полную форму резистентности к андрогенам, имели женский пол воспитания с рождения.

Важным в практическом аспекте явилось генетическое обследование с последующим установлением каузативного варианта в гене *CYP17A1* у пациентки с НФП, кариотипом 46, XY вследствие нарушения биосинтеза андрогенов. Клинический фенотип был представлен феминным строением наружных гениталий с отсутствием дериватов мюллеровых протоков, гипергонадотропным гипогонадизмом. Данный симптомокомплекс привел к первоначально ошибочной диагностике НФП из-за полной резистентности к андрогенам. Во второй декаде жизни у пациентки развилась тяжелая фармакорезистентная артериальная гипертензия, по поводу которой она была госпитализирована в кардиологическое отделение ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Углубленное обследование заставило усомниться в ранее выставленном диагнозе, а результат генетического исследования подтвердил иную причину НФП,

а именно нарушение биосинтеза андрогенов вследствие блока фермента 17α-гидроксилазы, т.е. редкую форму врожденной гиперплазии коры надпочечников. Уточнение диагноза дало объяснение генеза гипертензии, причиной которой был первичный гиперальдостеронизм, а назначение терапии глюкокортикостероидами привело к полной нормализации артериального давления. Несомненно, уточнение диагноза в более раннем возрасте могло бы предотвратить такое тяжелое проявление болезни, как резистентная артериальная гипертензия, сохранявшаяся у пациентки в течение многих лет.

## Заключение

Подводя итог значимости проведенного исследования в когорте пациентов с нарушением половой дифференцировки, следует отметить, что в большинстве случаев выявление мутаций в генах, ассоциированных с НФП, имело решающее значение для установления или подтверждения клинического диагноза, на основании которого, зная патогенез нарушения дифференцировки пола, были приняты тактические решения в отношении персонифицированной тактики оказания помощи. В части случаев более раннее проведение такого исследования могло значительно повлиять на тактику лечения пациентов и ее изменить. Описание новых мутаций в ассоциации с клиническими фенотипами внесло вклад в существующие генетические базы данных в части патологии, связанной с нарушением дифференцировки пола. Описание наблюдений синдромальных ассоциаций в определенных генетически подтвержденных формах НФП имело целью повышение настороженности и расширение программ обследования при выявлении названных генетических вариантов. Наконец, сведения о наследственных формах НФП, ассоциированных в первую очередь с мутациями в *AR* и *NR5A1*, направлены на повышение уровня и качества генетического консультирования и своевременной диагностики НФП в ядерных семьях.

По результатам проведенного исследования отмечена низкая выявляемость генетических причин при большинстве вариантов проксимальной гипоспадии. Также не нашла генетического подтверждения 1/2 случаев дисгенезии гонад, овотестикулярное НФП. Объясняя полученные данные, исследователи присоединяются к мнению большинства авторов научных публикаций, в которых поднимается тема актуальности дальнейшего поиска новых аффектных в отношении пренатальной дифференцировки пола генов с расширением панелей NGS и проведением секвенирования экзома и др. [17, 18, 20, 21]. Для повышения уровня диагностики НФП и, что особенно важно, ее своевременности рекомендуется включать в программы обучения врачей-педиатров, неонатологов и врачей общей практики информацию о ключевых аспектах диагностики нарушений половой дифференцировки. Наиболее критическими возрастными периодами для своевременного выявления и оказания специализированной помощи являются период новорожденности и младенчества, а также период старта пубертата. Требуется длительное внимательное мониторирование всех аспектов жизни, соматического и психологического здоровья, социальной адаптации пациентов с НФП для создания максимально персонифицированных программ оказания помощи при данной патологии с привлечением мультидисциплинарных групп специалистов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Источники финансирования.** Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы на базе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова».

**Sources of financing.** The study was carried out within the framework of research work on the basis of the Almazov National Medical Research Centre.

**Согласие пациента.** Добровольное информированное согласие было получено от всех обследованных пациентов и/или их законных представителей (для детей младше 15 лет).

**Patient consent.** Voluntary informed consent was obtained from all examined patients and/or their legal representatives (for children under 15 years of age).

**Вклад авторов.** И.Л. Никитина: концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание основного текста статьи, редактирование текста рукописи; Е.К. Кудряшова: концепция и дизайн исследования, биоинформационный анализ генетических результатов, их описание; Л.Р. Саракаева: техническое редактирование текста рукописи, обработка материалов; А.А. Костарева: концепция и дизайн исследования, биоинформационный анализ генетических результатов.

**Authors' contributions.** I.L. Nikitina: concept and design of the study, analysis of the data obtained, writing the main text of the article, editing the text of the manuscript; E.K. Kudryashova: concept and design of the study, bioinformatics analysis of genetic results, their description; L.R. Sarakaeva: technical editing of the text of the manuscript, processing of materials; A.A. Kostareva: concept and design of the study, bioinformatic analysis of genetic results.

**Литература/References**

1. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006;118(2):488-500. DOI:10.1542/peds.2006-0738
2. Lee PA, Nordenström A, Houk CP, et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(3):158-80. DOI:10.1159/000442975
3. Kyriakou A, Lucas-Herald AK, McGowan R, et al. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Advances in Genomics and Genetics*. 2015;5:165-7. DOI:10.2147/AGG.S53226
4. Никитина И.Л. Старт пубертата – известное и новое. *Артериальная гипертензия*. 2013;19(3):227-36 [Nikitina IL. Start pubertata – izvestnoe i novoe. *Arterialnaia gipertenziia*. 2013;19(3):227-36 (in Russian)].
5. Swaab DF, Garcia-Falueras A. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol*. 2009;24(1):17-28.
6. Diamond M, Sigmundson HK. Sex reassignment at birth. Long-term review and clinical implications. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;151(3):298-304.
7. Fitzgerald PJ. A neurotransmitter system theory of sexual orientation. *J Sex Med*. 2008;5:746-8.
8. Kim SW, Schenck CH, Grant JE, et al. Neurobiology of sexual desire. *NeuroQuantology*. 2013;11(2):332-59.
9. Окулов А.Б. Становление педиатрической андрогеникологии как специальности. М.: Литерра, 2016 [Okulov AB. Formation of pediatric androgenicology as a specialty. Moscow: Literra, 2016 (in Russian)].

10. Hiort O, Cools M, Springer A, et al. Addressing gaps in care of people with conditions affecting sex development and maturation. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15:615-22. DOI:10.1038/s41574-019-0238-y
11. Jürgensen M, Rapp M, Döhnert U, et al. Assessing the health-related management of people with differences of sex development. *Endocrine.* 2021;71:675-80. DOI:10.1007/s12020-021-02627-y
12. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. DOI:10.1038/gim.2015.30
13. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ Accessed: 15.12.2020.
14. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). Available at: http://evs.gs.washington.edu/EVS/ Accessed: 20.03.2021.
15. Exome Aggregation Consortium (ExAC). Available at: https://www.bioSTARs.org/p/195085/ Accessed: 20.03.2021.
16. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Available at: http://www.omim.org/ Accessed: 16.03.2021.
17. Fan Y, Zhang X, Wang L, et al. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development. *Sci Rep.* 2017;7:44536. DOI:10.1038/srep44536
18. Dong Y, Yi Y, Yao H, et al. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development. *BMC Med Genet.* 2016;17:23. DOI:10.1186/s12881-016-0286-2
19. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016;17:243. DOI:10.1186/s13059-016-1105-y
20. Buonocore F, Achermann JC. Human sex development: targeted technologies to improve diagnosis. *Genome Biol.* 2016;17:257. DOI:10.1186/s13059-016-1128-4
21. Vilain E. Use of Next Generation Sequencing in Clinical Practice: The Example of Disorders/Differences of Sex Development. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2016;8(Suppl. 1):1-17.


**Статья поступила в редакцию / The article received:** 07.05.2021
**Статья принята к печати / The article approved for publication:** 12.07.2021

OMNIDOCTOR.RU