

КУДРЯШОВА

Елена Константиновна

КЛИНИЧЕСКИЕ, НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА

14.01.02 – эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Никитина Ирина Леоровна

доктор медицинских наук, доцент

Костарева Анна Александровна

кандидат медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент **Никитина Ирина Леоровна**

Научный руководитель: кандидат медицинских наук, **Костарева Анна Александровна**

Официальные оппоненты:

Скородок Юлия Леонидовна, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра детских болезней имени И.М. Воронцова факультета послевузовского и дополнительного профессионального образования, доцент

Цикунов Сергей Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», лаборатория психофизиологии эмоций физиологического отдела имени И.П.Павлова, заведующий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «13» декабря 2020 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.054.03 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, www.almazovcentre.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, пос. Солнечное, ул. Средняя, д.6, www.almazovcentre.ru).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.054.03
кандидат медицинских наук

Леонова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Понимание механизмов нарушений формирования пола (НФП) и принятие максимально корректных решений в оказании помощи остается сложной и не окончательно решенной проблемой научно-практической эндокринологии, требующей участия многопрофильной группы специалистов (Ahmed FA et al, 2015, Lee PA et al, 2016, Nordenström A et al, 2016, 2019; Петеркова В.А и соавт, 2018, Карева М.А. и соавт, 2018, Никитина И.Л. и соавт., 2020). Это связано со многими факторами, в первую очередь, с сущностью собственно понятия «пола человека». К настоящему моменту хорошо известно, что это понятие многосоставное и включает, как минимум, генетический, гонадный, гормональный, фенотипический и психологический пол, несоответствие которых, происходящее на разных этапах эмбриогенеза, ведет к развитию нарушений половой дифференцировки, или НФП. Особенности диагностики и лечения при НФП связаны с тем, что данное расстройство ассоциировано не только с медицинскими, но и с социальными и психологическими проблемами, связанными с адаптацией растущих пациентов в обществе с точки зрения их гендерной роли и способности к репродукции (Касаткина Э.П. и соавт., 1998, Swaab DF, 2010).

Наука о поле может быть отнесена к числу относительно «молодых» с точки зрения временного периода и интенсивно развивающихся с точки зрения активности проводимых исследований и проспективного клинического наблюдения корректности применяемой тактики в отношении пациентов с НФП. Согласно существующей в настоящее время концепции, основная роль в формировании пола человека принадлежит 2-м основным факторам: генетическому, заключающемуся в адекватной трансляционной активности соответствующих генов аутосом и половых хромосом, и гормональному, заключающемуся в количестве и действии андрогенов на этапах пренатального развития плода. При этом действие обоих факторов разобщено во времени по отношению к формированию анатомического и психологического пола (Dimond M, 1997, Swaab DF, 2004, Swaab DF, Garcia-Falueras A, 2010). Таким образом, ключевыми аспектами являются уточнение этиологии конкретного варианта НФП и прогнозирование характера половой дифференцировки мозга, определяющей половую идентификацию взрослеющих пациентов (Ahmed FA et al, 2015, Lee PA et al, 2016, Nordenström A et al, 2016, 2019, Hiort O et al, 2019).

С практической точки зрения наиболее значимым вопросом является планирование своевременной и максимально корректной тактики оказания помощи каждому пациенту с НФП, суть которой состоит в правильном принятии решения выбора паспортного пола пациента, при котором прогнозируется наиболее комфортное его развитие и последующая взрослая жизнь в отношении сексуальной активности, возможной репродукции, психологического комфорта и самоидентификации, соматического здоровья и прочего. Подобные решения в отношении многих вариантов НФП до настоящего времени продолжают составлять определенную трудность. Исследования основных факторов, определяющих пренатальную дифференцировку пола, а именно молекулярно-генетических основ вариантов НФП, а также уточнение механизмов влияния андрогенов на половую дифференцировку мозга, с последующим анализом в ассоциации с клиническими фенотипами пациентов с НФП, могут стать основой выработки предикторов и закономерностей, важных для индивидуализации терапевтической тактики при данной патологии (Окулов А.Б., 2016, Тюльпаков А.Н., Калинин Н.Ю. и соавт., 2016, Vilain E, 2016, Болотова Н.В. и соавт., 2016, 2018, 2019). Комплексное изучение психологического пола пациентов с НФП, включающее половую самоидентификацию, полоролевое поведение и особенности личности, имеет значение и актуальность. Расширение возможностей генетической диагностики и применение технологии секвенирования нового поколения (NGS) позволяет верифицировать нозологическую форму заболевания, скорректировать дальнейшую тактику ведения пациента и, основываясь на результатах генетического тестирования и углубленного понимания механизмов развития заболевания,

разработать принципы персонифицированного оказания медицинской помощи (Buonocore F et al., 2016, Vilain E, 2016, Eggers S et al., 2016, Hiort O et al, 2019).

Степень разработанности темы исследования

В структуре заболеваний эндокринной системы НФП можно отнести к относительно редким и активно изучаемым расстройствам. Систематические исследования патологии, связанной с нарушением дифференцировки пола, были начаты значительно позже по сравнению с другими врожденными заболеваниями эндокринной и репродуктивной систем, а первый международный консенсус был принят в 2005 г. (Чикаго, США). Начало изучения генетических причин НФП стартовало с последнего десятилетия XX века и было представлено секвенированием отдельных генов. Однако в течение последнего десятилетия, в связи с внедрением технологий секвенирования нового поколения NGS больших панелей генов, а также экзомного и полногеномного секвенирования понимание генетических причин НФП значительно расширяется. В научной литературе представлены результаты отдельных исследований в мире, свидетельствующие о значительном спектре генетических причин пренатальных нарушений дифференцировки пола, а также о важности сопоставления их с клиническим фенотипом НФП у пациентов (Buonocore F et al., 2016, Vilain E, 2016, Eggers S et al., 2016, Тюльпаков А.Н., 2016, Hiort O et al, 2019). Исследования в этом направлении остаются немногочисленными и актуальными.

Одним из ключевых вопросов является поиск предикции раннего прогноза психологического пола для более корректного присвоения паспортного пола в раннем возрасте. В течении последних десятилетий произошла принципиальная смена концепции половой дифференцировки мозга (J Money, 1973, Dimond M, 1997, 2013), обосновавшая ее врожденный характер и необратимость, а также роль в формировании этих процессов генетических факторов и пренатального действия андрогенов. Однако, уточнение и детализация механизмов нейроэндокринных и генетически детерминированных процессов, лежащих в основе психологического пола, продолжают изучаться и представлять высокий исследовательский интерес.

Отечественные исследования, направленные на изучение молекулярно-генетических, нейроэндокринных и психологических основ НФП, являются немногочисленными и сохраняют высокую актуальность.

Таким образом, проведение трансляционного исследования, включающего комплексную оценку влияния пренатальной гиперандрогемии, индуцированной в эксперименте, наряду с изучением молекулярно-генетических причин НФП с использованием секвенирования нового поколения, в сопоставлении полученных результатов с клиническим фенотипом и психологическими особенностями личности имеет актуальность и значимость для разработки персонифицированных подходов в оказании помощи пациентам с нарушениями дифференцировки пола и в целом повышения ее качества.

Цель исследования

Изучение клинических, нейроэндокринных, молекулярно-генетических и психологических аспектов нарушений формирования пола для оптимизации персонифицированного подхода к диагностике и лечению данной группы заболеваний.

Задачи исследования

1. На модели потомства женского пола пренатально гиперандрогенизированных самок крыс изучить влияние избытка тестостерона на профиль моноаминовых нейромедиаторов в ассоциированных с половым диморфизмом отделах центральной нервной системы и сопоставить с плазменным уровнем тестостерона и кисспептина.

2. Дать клиническую характеристику пациентов с нарушением формирования пола в соответствии с выявленной структурой нозологических вариантов.
3. Охарактеризовать структуру генетических вариантов у пациентов с нарушением формирования пола и сопоставить с индивидуальными особенностями клинического фенотипа.
4. Проанализировать особенности психологического пола у пациентов с нарушением формирования пола путем комплексной оценки половой самоидентификации, полоролевого поведения и личностного эмоционального профиля.
5. На основании установленных взаимосвязей генетического, фенотипического и психологического пола оптимизировать рекомендации персонализированного подхода в оказании помощи при нарушениях формирования пола.

Научная новизна исследования

В диссертационном исследовании получены новые данные о комплексной характеристике нарушений дифференцировки пола, как группы патологии с несоответствием генетического, анатомического и психологического пола. Впервые установлено, что гиперандрогения как на ранних, так и на поздних сроках внутриутробного развития, созданная в эксперименте, оказывает как прямое, так и опосредованное влияние на формирование потомства женского пола. Установлены разнонаправленные изменения моноаминовых нейромедиаторов, участвующих в контроле и формировании половой идентификации и поведения. Данные изменения представлены повышением уровня норэпинефрина и снижением серотонина, в анатомических структурах головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, миндалевидный комплекс), при введении тестостерона на поздних сроках гестации. У потомства впервые на экспериментальном материале при андрогенизации на поздних сроках гестации, показано повышение содержания киспептина в крови, изменение киспептинового сигналинга и ассоциированная с этим активация гонадной оси.

Получены новые данные о частоте генетической верификации вариантов нарушений формирования пола в соответствии с критериями Консенсуса рекомендаций Американской коллегии по медицинской генетике (ACMG), а также особенностях клинических фенотипов при установленном генотипе. Впервые описаны генетические варианты ряда генов с незарегистрированной частотой, участвующих в пренатальной дифференцировке пола. Приоритетны описания вариантов более, чем в одном гене, в ассоциации с клиническим фенотипом. Впервые описаны некоторые синдромальные проявления при идентификации мутаций генов, ранее описанных лишь при генитальной патологии.

Получены новые данные оценки психологического пола. Установлено, что половая самоидентификация полностью совпадает с генетическим полом в группе врожденной гиперплазии коры надпочечников (ВГКН) и является полностью противоположной генетическому полу при других вариантах нарушений формирования пола. Полоролевое поведение и особенности личности пациентов с нарушением формирования пола являются сопоставимыми с популяционными показателями для соответствующего пола, однако следует учитывать влияние нейрогормональных воздействий, так как наиболее выраженные различия в этой области были выявлены при формах нарушения формирования пола, сопровождающихся избытком андрогенов либо полной к ним нечувствительностью.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Описаны новые клинические, в том числе синдромальные, проявления, ассоциированные с мутациями в генах, участвующих в дифференцировке пола.

Установлена значимость молекулярно-генетического обследования при ряде вариантов НФП с использованием в качестве «первой линии» метода секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), без предшествующей идентификации генетических вариантов в отдельных генах. Описаны семейные формы НФП и значимость обследования для

генетического консультирования с прогнозом ранней диагностики патологии, ассоциированной с большей свободой в решении вопросов присвоения пола воспитания (паспортного пола). Дано обоснование как можно более ранней диагностике НФП с установлением нозологического варианта. Обоснована необходимость комплексного обследования при НФП, включая генетическое, на основании которого оценивается прогноз полового развития, решается паспортный пол и проводится консультирование семьи.

Дана характеристика полоролевого поведения и некоторых особенностей личности и поведения при вариантах НФП, в основе которых лежит избыток андрогенов либо полная к ним нечувствительность, что при наличии показаний может быть подвергнуто психологической коррекции.

Методология и методы исследования

Работа проведена в дизайне ретроспективного и проспективного клинко-экспериментального исследования. Работа состоит из клинического и экспериментального разделов. В целях получения требуемой научной информации использовались клинические, лабораторные, молекулярно-генетические методы, а также статистическая обработка полученных данных.

Исследование выполнено в ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ (генеральный директор академик РАН Е.В. Шляхто). Клинический раздел основан на анализе результатов обследования 70 пациентов с нарушением формирования пола. Экспериментальный раздел включил изучение результатов обследования потомства женского пола 59 особей самок крыс линии Wistar с экспериментально индуцированной пренатальной гиперандрогемией.

До включения в клиническую часть исследования всеми участниками или их законными представителями были даны письменные добровольные информированные согласия.

Проведение и дизайн клинической и экспериментальной частей диссертационной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Теоретической основой послужили публикации отечественных и зарубежных авторов. При проведении данного диссертационного исследования были использованы корректные и современные методы обработки информации и статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

- 1.** Экспериментально индуцированная на ранних и поздних сроках гестации гиперандрогемия оказывает прямое тератогенное и опосредованное, представленное разнонаправленными изменениями моноаминовых нейромедиаторов в структурах центральной нервной системы, имеющих отношение к регуляции половой дифференцировки мозга (повышение норэпинефрина и снижение серотонина), влияние на развитие потомства женского пола. Наиболее выраженные следствия пренатальной гиперандрогенизации, как в динамике изменений нейромедиаторов центральной нервной системы, так и в отношении периферического уровня кисспептинов в крови, происходят при избытке тестостерона на более поздних сроках гестации.
- 2.** При клиническом фенотипе нарушения формирования пола методом секвенирования нового поколения каузативные генетические варианты идентифицированы в 39% случаев, из них 43% замен представлено ранее неописанными вариантами в генах, участвующих в процессах пренатальной дифференцировки пола, в моногенном или олигогенном вариантах. Выявление генетических вариантов, ассоциированных с семейными формами нарушений половой дифференцировки, обосновывает целесообразность персонифицированного генетического консультирования и сопровождения ядерных семей.
- 3.** Половая самоидентификация имеет разнонаправленные тенденции в зависимости от варианта нарушения формирования пола, полностью совпадая с генетическим полом в группе

врожденной гиперплазии коры надпочечников и являясь полностью противоположной генетическому полу при других вариантах нарушений половой дифференцировки исследованной группы пациентов. Полоролевое поведение и особенности личности пациентов с нарушением формирования пола являются сопоставимыми с популяционными показателями для соответствующего пола, что свидетельствует о большей значимости генетического тестирования при решении вопросов установления пола воспитания пациента.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

По данным, полученным в ходе подготовки диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 2 работы – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки, 1 статья в зарубежном журнале.

Результаты исследования доложены на I Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (Санкт-Петербург, 2014); на VII Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2015); на Всероссийской конференции с международным участием «Командный подход в современной эндокринологии» (Санкт-Петербург, 2016); на Конгрессе с международным участием «Здоровые дети-будущее страны» (Санкт-Петербург, 2017); на XII междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы урологии и гинекологии» с симпозиумами «Проблемные вопросы бесплодного брака» и «Командный подход в оказании помощи при нарушениях полового развития и дифференцировки пола у детей и взрослых» (Санкт-Петербург, 2017).

Структура и объем работы

Структура диссертационной работы включает в себя оглавление, введение, обзор литературы, три главы собственных данных, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы.

Диссертационная работа изложена на 171 странице машинописного текста, иллюстрирована 24 рисунками и 20 таблицами. Список использованной литературы содержит 219 источников, 41 отечественный и 178 зарубежный.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследование включало клиническую и экспериментальную части.

Экспериментальное исследование

Исследование проведено на 59 половозрелых самках лабораторных крыс линии Wistar. Была создана модель экспериментально индуцированной гиперандрогемии на различных сроках беременности.

Экспериментальная модель гиперандрогемии создавалась путем введения беременным самкам на 11 и 18 сутки гестации, внутрибрюшинно, инъекции тестостерона в дозе 30 мг/кг. Беременным самкам крыс контрольной группы вводили в эти же сроки стерильный апиригенный физиологический раствор (0,01 мл/г 0,9% NaCl внутрибрюшинно).

Полученное потомство было оценено по соматическому статусу и наличию врожденных аномалий, мертворождению. Полученное потомство женского пола в возрасте 4 мес., что соответствует достижению половой зрелости, явилось объектом дальнейшего изучения.

Проводилось определение концентрации нейромедиаторов – производных моноаминов (норэпинефрин и серотонин) в трех ассоциированных с половым диморфизмом структурах ЦНС – гипоталамусе, гиппокампе и миндалевидном комплексе. В крови определяли уровень тестостерона и кисспептина. В запланированные в соответствии с дизайном (рисунок 1) исследования сроки были забраны материалы для эксперимента (головной мозг, кровь).

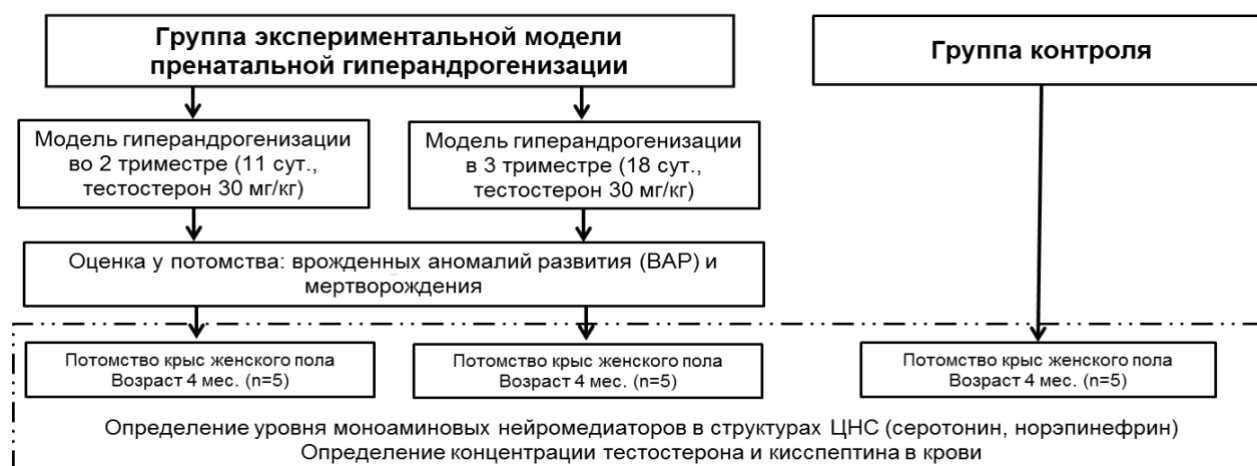


Рисунок 1 – Дизайн экспериментальной части исследования

Концентрацию норэпинефрина и серотонина в структурах мозга определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на "Beckman System Gold" с электрохимическим детектором LC-4С. В исследованиях использовали структуры, участвующие в реализации гендер-ассоциированных поведенческих реакций - гиппокамп, миндалевидный комплекс и гипоталамус, которые были выделены при -20°C и хранились в жидком азоте до хроматографического анализа. Идентификацию и чистоту хроматографических пиков, а также их количественную оценку осуществляли по отношению к пикам, полученным от внешних стандартов. Стандарты для контроля определяемых медиаторов и их метаболитов вводили в систему в начале и в конце работы хроматографа.

Определение кисспептина в крови крыс проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа Synergy 2 (BioTek USA) с использованием набора Elisa kit (CSB-E1343r Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For the quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1)). Концентрация тестостерона в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием набора ElisaKit (CSB-E05100r Test Enzyme-linked Immunosorbent AssayKit For the quantitative determination of rat testosterone concentrations, China).

Клиническое исследование

В исследование было включено 70 пациентов с различными вариантами нарушения формирования пола. Возрастной диапазон пациентов составил 1 мес. - 35 лет.

Критерии включения в исследование пациентов: соответствие критериям диагноза нарушения формирования пола.

Критерием исключения было несогласие пациента или его законного представителя на участие в исследовании.

Данные формирования групп представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика когорты пациентов

Нозологический вариант	Количество пациентов (n)	Паспортный пол	
		мужской	женский
ВГКН	42	-	42
НФП — нарушение биосинтеза тестостерона (CYP17A1; 17-альфа-гидроксилазная недостаточность)	1	-	1
Синдром резистентности к андрогенам	5	-	5
Дисгенезия гонад	8	2	6
Проксимальные формы гипоспадии	12	11	1
Овотестикулярная форма НФП	1	1	-
46, XX тестикулярное НФП, (синдром де ля Шапель)	1	1	-

Всем пациентам с НФП проведено клинико-лабораторное обследование в соответствии с протоколом для верификации диагноза. Молекулярно-генетическое обследование проведено в 100% случаев. Проведено психологическое тестирование, оценка самоидентификации, оценка личностных характеристик 43 пациентов в возрасте старше 8 лет.

Проведен ретроспективный анализ анамнестических данных, полученных в беседе с пациентами и их родителями, а также при анализе предоставленной медицинской документации. Проведен первичный клинический осмотр с оценкой соматического статуса по стандартной схеме клинического обследования.

Гормональное обследование проводилось методом РИА (радиоиммунологический анализ) и ИФА (иммуноферментный анализ). Определение уровня лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминисцентным методом на анализаторе "Cobas E 411" (Roche, Швейцария).

Инструментальное обследование включало ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза, брюшной полости и забрюшинного пространства, рентгенологическое исследование, по показаниям - диагностическую лапароскопию, магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Цитогенетическое исследование проводилось на микроскопе LEICA DM LS, оборудованного объективами FLUOTAR 20x/0,40 и 100x/1,30-0,60, автоматической фотонасадкой, цветной камерой Leica DFC 320, блоком светофильтров для флуорохромов FITC и DAPI. Для получения видеоизображения использовали программное обеспечение Leica DFC Twain. Для анализа видеоизображения использовали программное обеспечение Adobe Photoshop 7.0. Препараты использовали после окрашивания флуорохромом Hoechst 33258. QFH окрашивание препаратов метафазных хромосом QFH/AcD-окрашивание проводили по стандартной методике.

Молекулярно-генетическое исследование было выполнено методом секвенирования нового поколения (NGS), на приборе MiSeq (платформа Illumina). Для данного исследования была разработана панель генов HaloPlex (Agilent), включающая в себя кодирующие области 80 генов-кандидатов, ассоциированных с развитием нарушений формирования пола, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями (таблица 2). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Genome Aggregation Database (gnomAD). Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM (<https://omim.org>) и литературные данные.

Таблица 2 - Перечень генов, включенных в панель исследования (всего - 80 генов)

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, RSP01, SEMA3A, SOX3, SOX9, SPRY4, SRD5A2, SRY, STAR, TAC3, TACR3, WDR11, WNT4, ZFPM2, ZNRF3.

Оценка психологического пола пациента проводилась по трем составляющим: половая самоидентификация, полоролевое поведение и личностные характеристики пациента. Определение половой самоидентификации проводилось путем опроса пациента о его половой принадлежности.

Полоролевое поведение оценивалось с помощью опросника С. Бем (Bem Sex Role Inventory, BSRI, 1974), в варианте адаптированном, валидизированном И.С. Клециной в 2003 году для использования в Российской Федерации. Результаты оценивались путем определения

основного индекса (IS) согласно интерпретации к опроснику, при $IS < -1$ говорят о маскулинном типе полоролевого поведения, при $IS > 1$ – о фемининном, в случае $IS > -1 < 1$ – об андрогинном типе полоролевого поведения.

С целью оценки психологического статуса пациентов с нарушениями формирования пола нами был использован многофакторный личностный опросник Кеттелла. Адаптированный валидизированный русскоязычный вариант опросника разработан Э. М. Александровской и И. Н. Гильяшевой (1995). Полученные ответы с помощью интерпретации к опроснику переводятся в «сырые» баллы и далее с помощью таблиц конвертируются в станы. Анализ факторов производится в станах (стандартных единицах измерения).

Методы статистического анализа

Статистический анализ экспериментальной части проводился с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 для Windows. Выборки были проверены по гипотезам о нормальном распределении с использованием показателей асимметрии и эксцесса. Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Для сравнения пар показателей в группах опыта и контроля применяли непараметрический метод рангового сравнения – вычисление критерия Манна-Уитни. При анализе данных клинической части исследования использовалась описательная и аналитическая статистика. Статистический анализ клинической части проводился с использованием пакета программ Jamovi для IOS. При анализе данных использовался непараметрический критерий Kruskal-Wallis с попарными межгрупповыми посттестами Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner.

Соблюдение этических требований

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. До включения в исследование у всех участников клинического исследования было получено письменное информированное согласие.

Результаты исследования

Исследование включило экспериментальный и клинический этапы, на каждом из которых были последовательно изучены основные регуляторы половой дифференцировки. Оценка влияния пренатального действия андрогенов на механизмы половой дифференцировки мозга проводилась на экспериментальном материале путем индукции гиперандрогенемии на разных сроках гестации у беременных самок крыс с последующим изучением нейромедиаторного сигналинга у потомства женского пола.

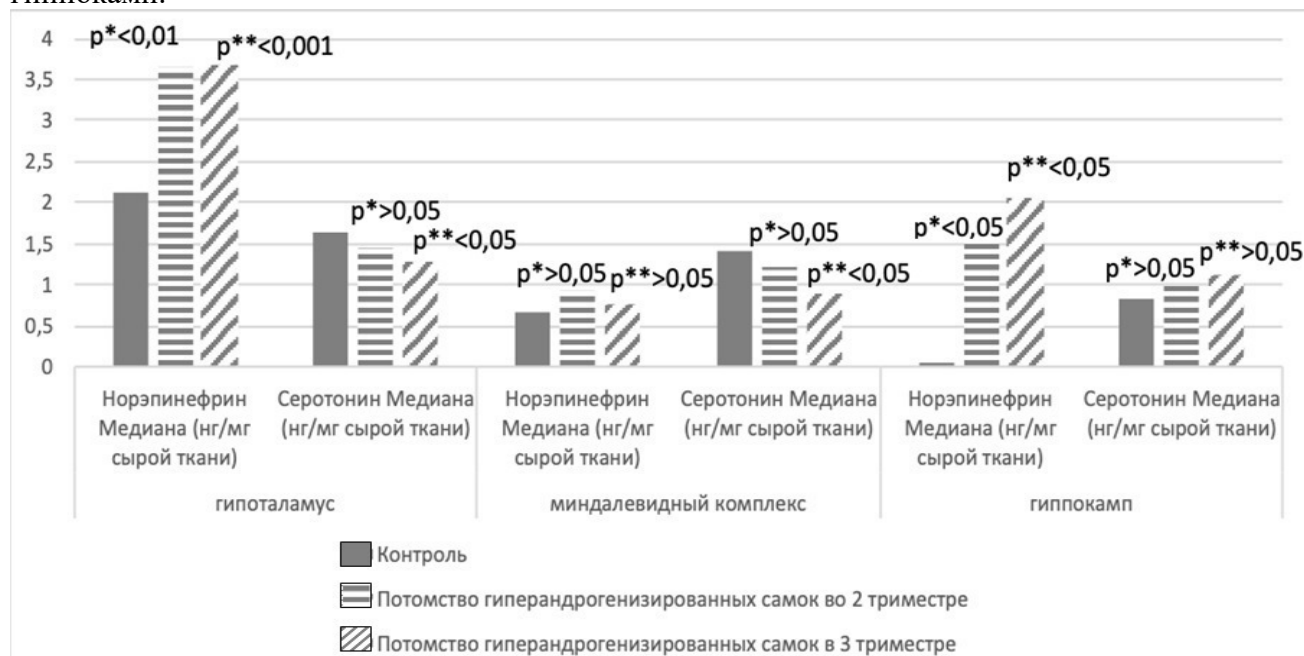
Роль генетических факторов оценивалась в ассоциации с клиническим и психологическим фенотипом на клиническом этапе исследования путем комплексного обследования пациентов с НФП.

Экспериментальное исследование

Полученное при разрешении беременности потомство было оценено по соматическому статусу и наличию врожденных аномалий, мертворождению. Было установлено, что при андрогенизации на более ранних сроках гестации значительно чаще имели место врожденные пороки развития хвостов и задних лапок (перетяжки, укорочение, фокомелия), а также был более высокий процент мертворождения – 18,9%, тогда как аналогичный показатель в группе при андрогенизации на поздних сроках составил всего 6%. Сделано заключение о прямом тератогенном влиянии на потомство фармакологических доз тестостерона при введении его на ранних сроках гестации.

На следующем этапе было отобрано потомство женского пола. В этой группе проводилась количественная оценка и корреляции уровней нейромедиаторов ЦНС – производных моноаминов (норэпинефрина и серотонина) (рисунок 2), а также кисспептина в ассоциации со сроком пренатальной андрогенизации.

Анализ уровня норэпинефрина и серотонина проводился в трех, ассоциированных с половым диморфизмом, структурах головного мозга: гипоталамус, миндалевидный комплекс, гиппокамп.



Примечание: p^* - сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p^{**} - сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем. Статистический анализ данных проводился методами однофакторного дисперсионного анализа, непараметрического анализа, сравнение медиан (Me) с использованием W-критерия Вилкоксона. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Рисунок 2 – Уровень моноаминовых нейромедиаторов (серотонин, норэпинефрин) в структурах головного мозга

Анализ динамики уровня норэпинефрина свидетельствовал о сонаправленных результатах в ядрах гипоталамуса и гиппокампа, в которых, независимо от срока гиперандрогенизации, содержание норэпинефрина было значимо выше по сравнению с группой контроля: соответственно медианы (Me) 3,642 нг/мл и 2,132 нг/мл в контроле, $p < 0,001$ во 2 триместре; 3,685 нг/мл и 2,132 нг/мл, $p < 0,001$ в контроле в 3 триместре в гипоталамусе; 1,517 нг/мл и 0,068 нг/мл в контроле, $p < 0,05$ во 2-м триместре; 2,068 нг/мл и 0,068 нг/мл в контроле, $p < 0,05$ в 3-м триместре в гиппокампе. В миндалевидном комплексе, вне зависимости от сроков гиперандрогенизации, изменений уровня норэпинефрина в сравнении с группой контроля выявлено не было. Сделано общее заключение о том, что вне зависимости от сроков воздействия фактор пренатальной гиперандрогенизации оказывал значимое влияние на повышение концентрации норэпинефрина в структурах гиппокампа и гипоталамуса, не влияя на изменение уровня данного нейромедиатора в структурах миндалевидного комплекса.

Динамика изменений серотонина была не столь однонаправленна. В гипоталамусе отмечалось статистически значимое снижение концентрации серотонина при гиперандрогенизации в 3-м триместре (1,294 нг/мл против 1,637 нг/мл в контроле, $p < 0,05$). В миндалевидном комплексе обнаружено статистически значимое снижение уровня серотонина также в группе андрогенизации на поздних сроках гестации (медианы, соответственно, 1,428 нг/мл в контроле и 0,885 нг/мл в группе андрогенизации в 3-м триместре, $p < 0,05$). В гиппокампе значимых изменений уровня серотонина во всех исследуемых группах установлено не было.

Проведен сравнительный анализ уровней тестостерона и кисспептина в крови потомства женского пола, рожденных в условиях пренатальной гиперандрогенизации. Значимых различий

в уровне тестостерона в крови потомства самок крыс, андрогенизированных на разных сроках гестации, по сравнению с контролем выявлено не было.

Уровень кисспептина статистически значимо возрастал при гиперандрогенизации на более поздних сроках гестации. Медиана кисспептина 4-месячных крыс андрогенизированных в 3-м триместре, была достоверно выше по сравнению с контролем — 0,64 нг/мл и 0,31 нг/мл соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, наиболее значимые изменения нейромедиаторного сигналинга в структурах головного мозга, ответственных за половую дифференцировку, выявлены при пренатальной андрогенизации на более поздних сроках. В ходе эксперимента установлено повышение уровня норэпинефрина, который может опосредовать влияние андрогенов на половую дифференцировку мозга (ПДМ). Данная ситуация, по мнению ряда исследователей, может быть ассоциирована с маскулинизацией поведения у особей женского пола. Также увеличение концентрации норэпинефрина может проявляться изменением полового поведения в виде агрессивности, гиперсексуальности и жестокости. Изменения уровня другого нейромедиатора серотонина были также выявлены при андрогенизации на поздних сроках и заключались в снижении его концентрации по сравнению с контрольной группой. Ранее ассоциация низкого уровня серотонина была описана во взаимосвязи с инверсией половой ориентации.

Сделано общее заключение, что избыток тестостерона на ранних сроках гестации оказывает тератогенное действие на потомство. Разнонаправленные изменения нейромедиаторного сигналинга, возникшие на фоне пренатальной гиперандрогенизации на поздних сроках гестации, опосредованно могут приводить к инверсиям половой дифференцировки и полового поведения. Пренатальная гиперандрогенизация ассоциирована с повышением уровня кисспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию кисспептинового сигналинга и ассоциированную с этим активацию гонадной оси.

Клиническое исследование

В клинический раздел исследования было включено 70 пациентов с НФП, из которых 60% имели диагноз ВГКН кариотипом 46, XX, остальные — другие варианты НФП, в подавляющем большинстве с кариотипом 46, XY. Всем пациентам проведено эндокринологическое обследование в соответствии с протоколом с целью установления нозологического варианта НФП. Молекулярно-генетическое обследование также было проведено всем пациентам с НФП: при ВГКН — секвенирование одного гена *CYP21A2* по Сенгеру, при других вариантах НФП — секвенирование методом NGS. Среди пациентов с ВГКН все имели классическую форму со значимой степенью пренатальной вирилизации - по шкале Prader III-IV; 45% - простую вирильную, 55% - сольтерную форму. У всех обследованных пациентов идентифицированы патологические варианты в гене *CYP21A2*: 33% - I2spl, 21% - R356W, 17% - I172N, 28% - P30L. Данная группа пациентов была достаточно полно обследована с точки зрения молекулярной генетики в рамках клинического протокола обследования, поэтому представляла больший интерес для проведения комплексной оценки психологического пола.

Пациенты, не относящиеся к ВГКН, были представлены группой в количестве 28 человек. Распределение по структуре нозологических вариантов: 43% - пациенты с проксимальными формами гипоспадии (12 человек), 28,5% - пациенты с дисгенезией гонад (8 человек), 18% - пациенты с вариантами синдрома резистентности к андрогенам (4 человека с полной формой, 1 с неполной формой), 3,5% - пациент с нарушением биосинтеза тестостерона (17-альфа-гидроксилазная недостаточность) (1 человек), 3,5% - пациент с овотестикулярной формой НФП (1 человек), 3,5% - пациент с 46, XX тестикулярным НФП синдром де ля Шапель (1 человек). Все пациенты с гипоспадией были зарегистрированы в мужском паспортном поле, большинство пациентов с дисгенезией гонад имели женский паспортный пол, все пациенты с резистентностью к андрогенам, нарушением биосинтеза тестостерона были зарегистрированы

в женском паспортном поле, пациенты с овотестикулярным НФП и синдромом де ля Шапель — в мужском паспортном поле. Клинический фенотип был представлен разной степенью выраженности бисексуального строения наружных половых органов либо правильным строением последних соответственно полу, противоположному генетическому; пациенты, достигшие подросткового возраста, имели нарушения пубертата — его задержку либо старт по гетеросексуальному типу.

Результаты проведенного генетического обследования методом NGS с использованием панели генов, ассоциированных с НФП, показали, что варианты в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП и расцененные, как каузативные, были выявлены в 39% случаев (у 11 пациентов), причем 43% из них отнесены к ранее неописанным нуклеотидным заменам. Результаты представлены на рисунках 3а и 3б.

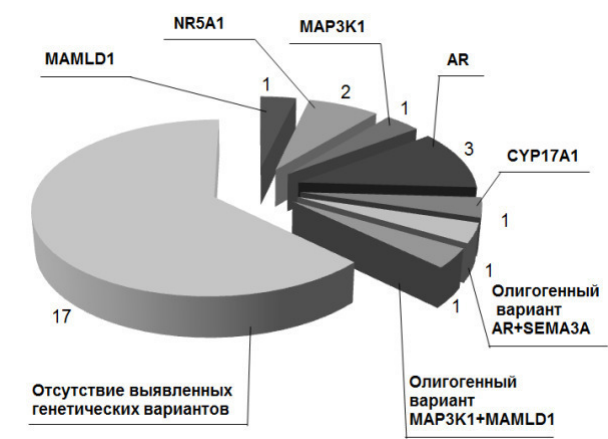


Рисунок 3а – Структура выявленных генетических вариантов методом NGS

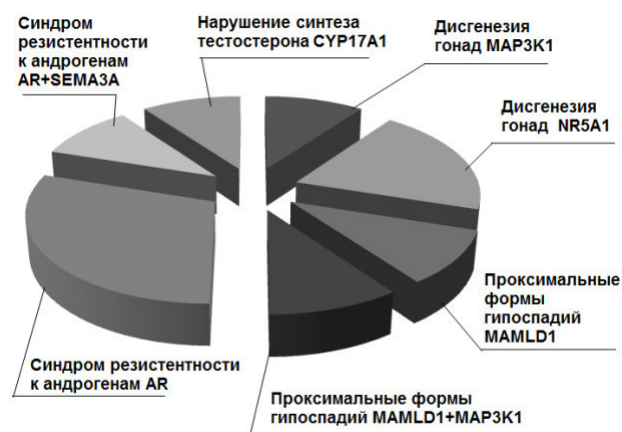


Рисунок 3б – Ассоциация нозологических форм с выявленными генетическими вариантами

Структура отнесенных к данной группе вариантов была представлена мутациями в гене стероидогенного фактора *NR5A1* (*SF1*) у 2 пациентов, в гене *MAP3K1* у 3 пациентов, в гене андрогенового рецептора *AR* у 4 пациентов, в гене *CYP17A1* у 1 пациента, в гене *MAMLD1* у 2 пациентов, в гене *SEMA3A* у 1 пациента. Большинство пациентов имели в качестве каузативного патологический вариант в 1 гене, однако у двоих были выявлены по 2 гена, которые можно было расценивать, как значимые для патологии полового развития, т. е. был констатирован олигогенный генез НФП.

У большинства пациентов замены найдены в гетерозиготном состоянии в генах, ранее описанных, как каузативные при НФП с аутосомно-доминантным и X-сцепленным типом наследования, и только у одного пациента замена обнаружена в гомозиготном состоянии, в гене с аутосомно-рецессивным вариантом НФП. В 18% (2 семьи) подтвержден семейный вариант НФП с выявлением подобной мутации у одного из родителей (рисунок 4).

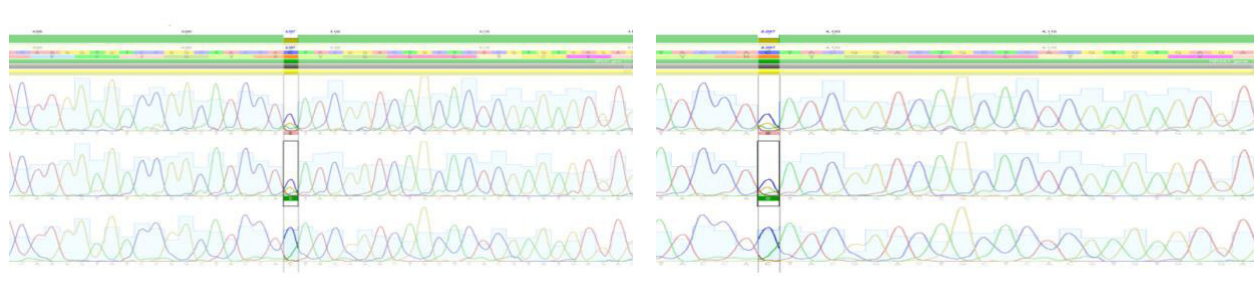


Рисунок 4 – Семейные случаи с мутацией в гене *NR5A1* (2 семьи)

Анализ ассоциаций клинического фенотипа с выявленными генетическими вариантами показал следующее.

При наличии каузативных вариантов в гене *MAP3K1* у двух пациентов с кариотипом 46, XY клинический фенотип характеризовался полной дисгенезией гонад, гипергонадотропным гипогонадизмом. У одного пациента с выявленным вариантом в гене *MAP3K1* также был обнаружен вариант в гене *MAMLD1*, что расценено, как олигогенный вариант НФП, при этом клиническая картина была представлена проксимальной гипоспадией - мошоночной формой, что подтверждает клиническую гетерогенность и дополняет имеющиеся данные о клиническом фенотипе при сочетании мутаций двух этих генов, каждый из которых имеет отношение к НФП.

В случае выявления каузативного варианта в гене *MAMLD1* у пациента в клиническом фенотипе имел место синдромальный вариант, который был представлен НФП с кариотипом 46, XY (гипоспадия и абдоминальный крипторхизм) в сочетании с ВАР мочевого системы, представленной ренальной дисплазией с ранней манифестацией хронической болезни почек в первой декаде жизни.

При наличии каузативных вариантов в гене *AR* клиническая картина у трех пациентов была единообразна и представлена полной формой синдрома резистентности к андрогенам. У одного пациента каузативный вариант гена *AR* сочетался с мутацией гена *SEMA3A*. В клинической картине пациента ведущим являлся синдром нарушения формирования пола с очень низкой степенью маскулинизации и низкой чувствительностью к андрогенам, что легло в основу решения смены пола данному пациенту. Выявление ранее описанного варианта в гене *SEMA3A*, который по имеющимся данным ассоциирован с развитием гипогонадотропного гипогонадизма, имеет лишь исследовательское значение, так как у данного пациента в связи со сменой пола в перспективе будет планироваться заместительная гормональная терапия в соответствии с выбранным полом.

Клиническая картина при каузативном варианте в гене *CYP17A1* характеризовалась классической картиной НФП с женским анатомическим строением наружных гениталий и развитием синдрома тяжелой артериальной гипертензии.

У двух пациентов имели место семейные формы НФП, обусловленные заменами в гене *NR5A1*. Клинический фенотип пациентов характеризовался выраженной недостаточностью маскулинизации, что легло в основу присвоения женского пола обеим пациенткам. Однако оба пациента имели сохранную функцию гонад, и у одного из пациентов в возрасте пубертата, имела место спонтанная вирилизация. Данные наблюдения позволяют предположить, что при условии своевременной диагностики генетического варианта НФП и сохранения пациентам паспортного пола в соответствии с генетическим, они могли бы иметь перспективы развития в мужском поле с сохранением репродуктивной функции.

Таким образом, определяя значение молекулярно-генетического обследования в сопоставлении с клиническими фенотипами пациентов в проведенном нами исследовании, было сделано следующее заключение. Информация о генетических причинах НФП улучшила понимание причин, лежащих в основе НФП в обследованной группе пациентов, и, при своевременной диагностике, могла бы позволить прогнозировать такие тяжелые коморбидности, как хроническая болезнь почек с быстрой прогрессией в первой декаде жизни, резистентная к терапии артериальная гипертензия. Результаты своевременно проведенного молекулярно-генетического анализа могли обусловить присвоение паспортного пола, соответствующего генетическому, и сохранить прогноз репродукции части пациентов с НФП.

При установлении семейных форм НФП полученная информация явилась основой генетического консультирования выявленных «ядерных» семей с прогнозированием степени риска манифеста НФП среди кровных родственников. Более того, установленные в ходе исследования в 28% случаев замены в нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с аутосомно-рецессивными вариантами НФП в гетерозиготном состоянии, не расцененные, как причинные для данных пациентов, могут иметь значение для прогнозирования рисков врожденной патологии другого потомства в этих семьях, что

необходимо принимать во внимание при генетическом консультировании. Олигогенные варианты, представленные у 18% среди генетически подтвержденных форм НФП, требуют дальнейшего анализа и наблюдения. Клинический фенотип в одном из случаев был более приближен к ранее описанным в научной литературе проявлениям при мутации в гене *MAMLD1*. Во втором случае при олигогенном варианте выявление мутации в гене, ранее описанном в ассоциации и гипогонадотропным гипогонадизмом, могло бы иметь значения для прогноза полового развития пациента при условии сохранения ему паспортного пола, соответствующего генетическому. Выявление ранее в 43% случаев неописанных патогенных вариантов в генах, ассоциированных с процессами дифференцировки пола, расширили существующие генетические базы вариантов, ассоциированных с нарушением дифференцировки пола.

Оценка психологического пола пациентов с нарушением формирования пола

Оценка психологического пола пациента проводилась по трем составляющим: половая самоидентификация, полоролевое поведение и личностные характеристики пациента.

Первым этапом данного раздела выполняемой работы явилось определение половой самоидентификации пациента путем проведения опроса и сопоставление ее с генетическим полом (рисунок 5).

При оценке половой самоидентификации в обследованной группе пациентов были получены результаты, свидетельствующие о полном совпадении с генетическим полом в группе ВГКН – все пациентки с кариотипом 46, XX имели женскую самоидентификацию, в то время, как остальные пациенты с НФП имели самоидентификацию, противоположную их генетическому полу. Это были пациентки с дисгенезией гонад и кариотипом 46, XY, пациентка с нарушением биосинтеза тестостерона и кариотипом 46, XY, пациентки с синдромом полной резистентности к андрогенам и кариотипом 46, XY, а также пациент с синдромом «XX-мужчины», или де ла Шапель, с кариотипом 46, XX. Пациенты с проксимальной формой гипоспадии и овотестикулярным НФП были младенцами и не включены в исследование.

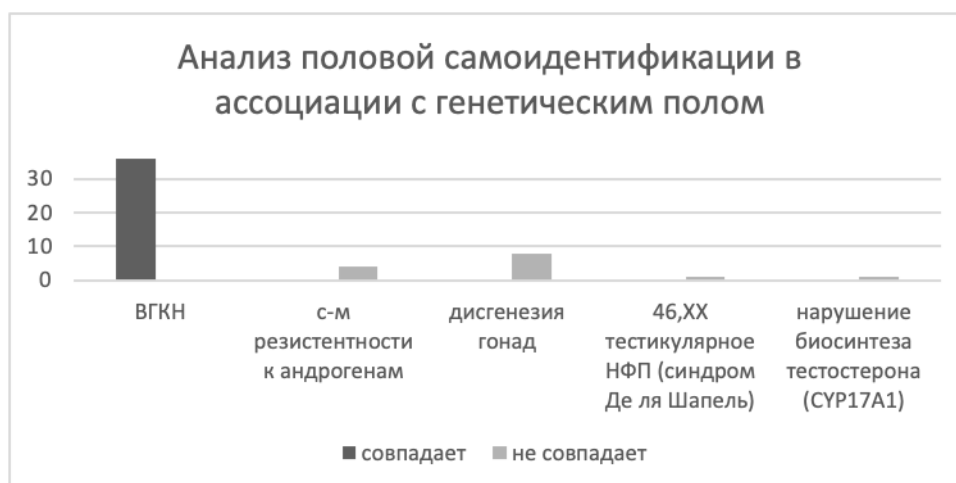


Рисунок 5 - Оценка половой самоидентификации в ассоциации с генетическим полом

Следующим этапом данного раздела исследования явилась оценка полоролевого поведения пациентов с НФП старше 8 лет.

В обследованных группах пациентов с НФП, за исключением ВГКН, полоролевое поведение соответствовало андрогинному типу, о чем свидетельствовали значения медианы показателя IS: при синдроме резистентности к андрогенам - 0,69, при дисгенезии гонад - 0,115. У большинства пациентов с ВГКН (86%) данный показатель составил -0,46, что также соответствовало андрогинному типу полоролевого поведения. Однако у 14% пациентов из

группы ВГКН по результатам тестирования был выявлен маскулинный тип полоролевого поведения.

На следующем этапе был проведен сравнительный анализа по шкале «маскулинность-фемининность» среди исследуемых групп пациентов с НФП (таблица 3).

Таблица 3 - Сравнительный анализ по шкале «маскулинность-фемининность» в различных группах НФП в целом

Показатель (шкала)	χ^2	df	p	ε^2
Маскулинность- фемининность	11.1	2	0,004	0.264
Примечание: односторонний непараметрический анализ ANOVA проведен с использованием критерия Kruskal-Wallis. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.				

С учетом наличия достоверных различий в группах в целом, было проведено изучение полоролевого поведения внутри группы с андрогинным типом полоролевого поведения среди пациентов с разными нозологическими вариантами НФП. Для оценки был осуществлен сравнительный попарный анализ в группах пациентов с ВГКН, синдромом резистентности к андрогенам и гонадным дисгенезом. Результаты представлены на рисунке 6.

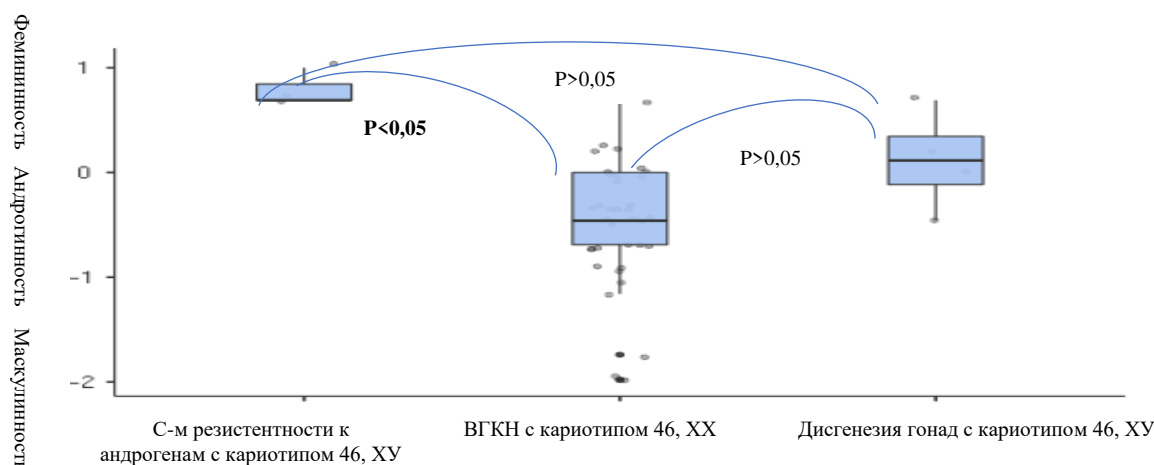


Рисунок 6 - Сравнительный анализ по индексу IS между группами НФП при андрогинном типе полоролевого поведения

Сравнение проводилось между группами ВГКН, синдрома резистентности к андрогенам и дисгенезией гонад. Количественные значения основного индекса (IS) не выходили за пределы референсных значений, характерных для андрогинного типа полоролевого поведения, однако его значения были значимо выше в группе синдрома резистентности к андрогенам и значимо ниже в группе ВГКН по сравнению с пациентами с резистентностью к андрогенам ($p = 0,014$). Полученные результаты свидетельствовали о тенденции к фемининному типу полоролевого поведения в группе синдрома резистентности к андрогенам и более маскулинном типе поведения в группе ВГКН. Таким образом, наиболее значимые различия по полоролевому поведению были найдены в группах сравнения «ВГКН- синдром резистентности к андрогенам».

Следующим этапом данного исследования явилось изучение личностных характеристик пациентов с НФП. Для этого использовался многофакторный личностный опросник Кеттелла, адаптированный для разных возрастных групп.

С целью установления особенностей личности при разных вариантах НФП был проведен сравнительный анализ личностных характеристик в группах пациентов с НФП в целом (таблица 4).

Таблица 4– Сравнительный анализ по шкалам личностных характеристик среди групп пациентов с НФП в целом

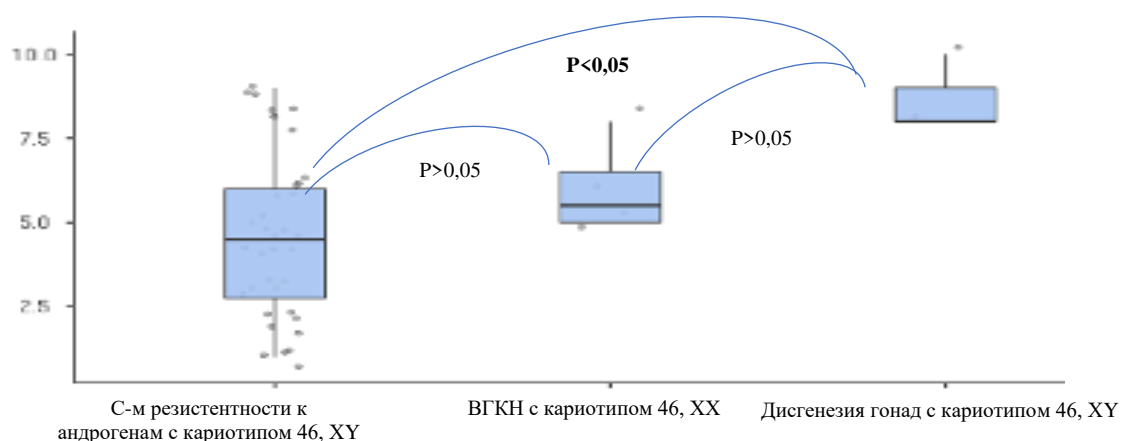
Показатель (шкала)	χ^2	df	p	ε^2
замкнутость-общительность	6.90	2	0.032	0.1644
конкретное-абстрактное мышление	4.88	2	0.087	0.1163
эмоциональная нестабильность-стабильность	8.81	2	0.012	0.2098
покорность-доминантность	4.40	2	0.111	0.1048
рассудительность-безрассудство	4.88	2	0.087	0.1162
низкая- высокая нормативность поведения	4.09	2	0.129	0.0974
робость-смелость	4.22	2	0.121	0.1004
жесткость-чувствительность	8.08	2	0.018	0.1923
доверчивость-подозрительность	7.45	2	0.024	0.1773
практичность-мечтательность	6.44	2	0.040	0.1534
прямолинейность-дипломатичность	6.82	2	0.033	0.1623
спокойствие-тревожность	3.54	2	0.171	0.0842
консерватизм-радикализм	4.09	2	0.129	0.0974
конформизм-нонконформизм	3.54	2	0.171	0.0842
низкий- высокий самоконтроль	4.18	2	0.124	0.0995
расслабленность-напряженность	5.53	2	0.063	0.1316

Примечание: односторонний непараметрический анализ ANOVA проведен с использованием критерия Kruskal-Wallis. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Анализ полученных результатов свидетельствовал о наличии достоверных различий между исследуемыми группами НФП по таким показателям, как: «замкнутость-общительность» ($p=0,032$); «эмоциональная нестабильность-стабильность» ($p=0,012$); «жесткость-чувствительность» ($p=0,018$); «доверчивость-подозрительность» ($p=0,024$); «практичность-мечтательность» ($p=0,040$); «прямолинейность-дипломатичность» ($p=0,033$).

При проведении внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкалам «эмоциональная нестабильность-стабильность» и «практичность-мечтательность» достоверных различий между группами пациентов выявлено не было.

Достоверные отличия по показателю «замкнутость-общительность» были выявлены в группе сравнения ВГКН – синдром резистентности к андрогенам ($p=0,05$) (рисунок 7).

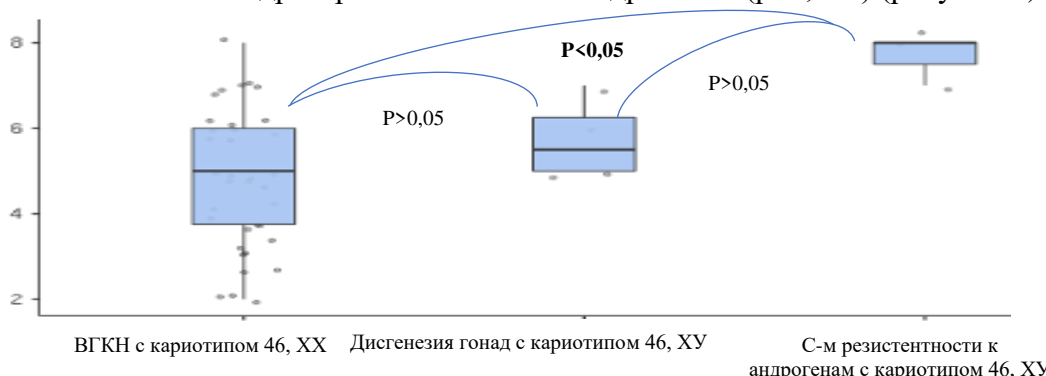


Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Рисунок 7 - Сравнительный анализ по шкале «замкнутость-общительность» среди групп пациентов с НФП

Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН. Согласно интерпретации к тесту, личностные характеристики пациентов с нечувствительностью к андрогенам характеризуются добродушием, интересом к людям, непринужденностью, эмоциональной восприимчивостью. В случае низких показателей, установленных у пациентов с ВГКН, личностные характеристики представлены осторожностью в выражении чувств, малой экспрессивностью, скрытностью, обособленностью.

Достоверные отличия по показателю «жесткость-чувствительность» были выявлены в группе сравнения ВГКН – синдром резистентности к андрогенам ($p=0,022$) (рисунок 8).



Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Рисунок 8 - Сравнительный анализ по шкале «жесткость - чувствительность» среди групп пациентов с НФП

Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН. Согласно интерпретации к тесту, личностные характеристики пациентов с нечувствительностью к андрогенам характеризуются чувственностью, впечатлительностью, артистичностью, женственностью и склонностью к сочувствию. В случае низких показателей, установленных у пациентов с ВГКН, личностные характеристики представлены осторожностью в выражении чувств, малой экспрессивностью, скрытностью, обособленностью.

Достоверные различия между группами были выявлены между ВГКН и синдромом резистентности к андрогенам ($p=0,026$) (рисунок 9).

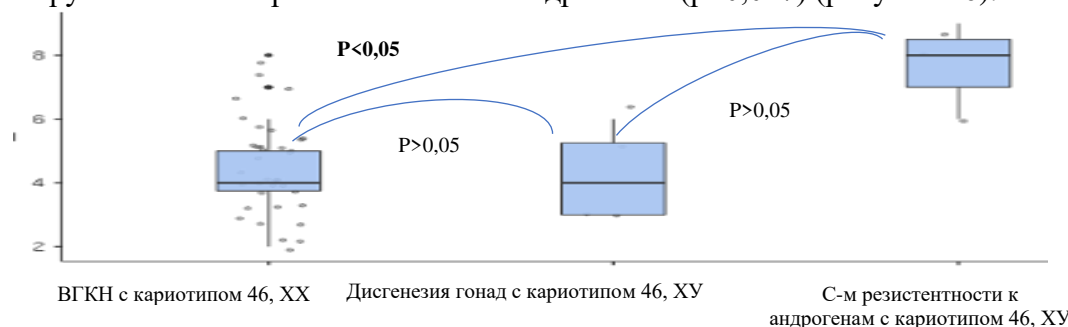


Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Рисунок 9 – Сравнительный анализ по шкале «доверчивость-подозрительность» среди групп пациентов с НФП

Различия были представлены более высокими - показателями оценок при ВГКН и более низкими - в группе синдрома резистентности к андрогенам. Согласно интерпретации к тесту, личностные характеристики пациентов с нечувствительностью к андрогенам характеризуются добродушием, открытостью, терпимостью. В случае высоких показателей, установленных у пациентов с ВГКН, личностные характеристики представлены настороженностью по отношению к людям, эгоцентризмом, раздражительностью.

Достоверные различия по показателю «прямолинейность-дипломатичность» были выявлены в группах ВГКН и резистентности к андрогенам ($p=0,027$) (рисунок 10).



Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Рисунок 10- Сравнительный анализ по шкале «прямолинейность-дипломатичность» среди групп пациентов с НФП

Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН. Согласно интерпретации к тесту, личностные характеристики пациентов с нечувствительностью к андрогенам характеризуются изысканностью, дипломатичностью, проницательностью. В случае низких показателей, установленных у пациентов с ВГКН, личностные характеристики представлены прямолинейностью, бестактностью, простотой. Так же, как и при оценке полоролевого поведения, при анализе личностных характеристик достоверные различия были установлены в паре групп «ВГКН- синдром резистентности к андрогенам».

Таким образом, основываясь на полученных результатах данной части проведенного нами исследования, было сделано заключение, что половая самоидентификация индивидуума не всегда совпадает с генетическим полом, при этом полоролевое поведение у большинства пациентов с НФП представлено андрогинным типом, что сопоставимо с таковым у большинства лиц в популяции, не имеющих отклонений в развитии пола, и поэтому оценка его не является определяющей в идентификации психологического пола. Учитывая, что все значимые различия в поведенческих и личностных чертах были выявлены между группой ВГКН, сопровождающейся избытком андрогенов, и группой резистентности к андрогенам,

возникающей вследствие отсутствия действия этой группы гормонов, можно предположить определенную роль в их формировании нейрогормональных воздействий, опосредованных пренатальным влиянием тестостерона на дофаминергические и серотонинергические механизмы моноаминового сигналинга в соответствующих отделах ЦНС, что было показано в первой части нашего исследования на модели потомства гиперандогенизированных самок крыс.

Однако, как показало исследование, данные особенности полоролевого поведения и особенностей личности не были ассоциированы с гендерной дисфорией и не определяли половую самоидентификацию, прогноз которой в существенно большей степени мог быть обусловлен своевременным и корректным молекулярно-генетическим исследованием с последующим сопоставлением с презентацией клинических симптомов.

На основании полученных в ходе исследования результатов разработан алгоритм персонафицированной тактики в отношении пациентов с НФП (рисунок 11).

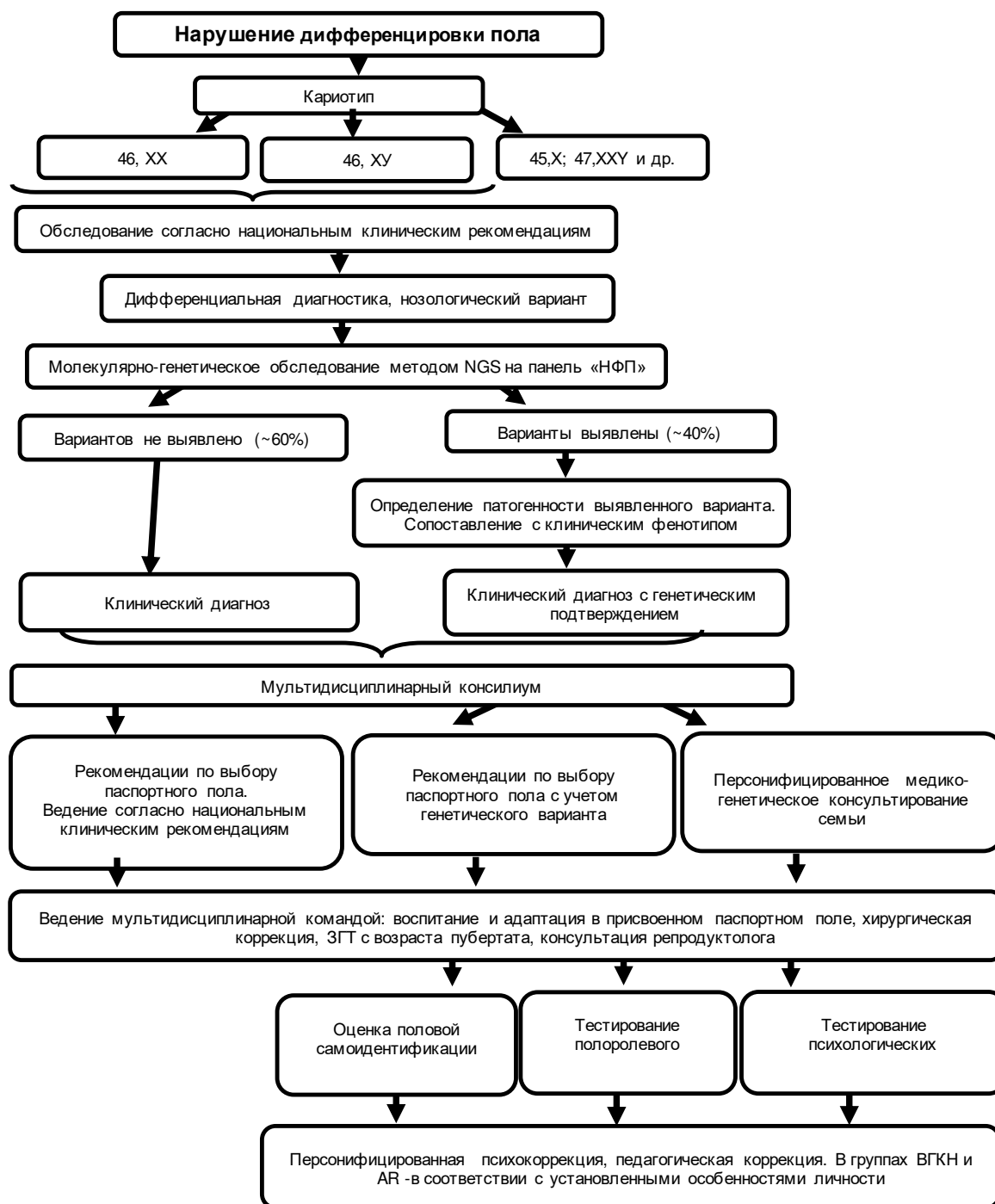


Рисунок 11 - Алгоритм персонафицированной помощи при НФП

Выводы

1. Последствия пренатальной гиперандрогенизации для потомства женского пола в эксперименте были представлены прямым тератогенным эффектом с 3-х кратным повышением мертворождаемости и развитием врожденных аномалий развития при андрогенизации на ранних, ассоциированных с эмбриогенезом, сроках пренатального развития. Разнонаправленные изменения нейромедиаторного сигналинга (повышение норэпинефрина и снижение серотонина), возникшие на фоне пренатальной гиперандрогенизации на поздних сроках гестации, опосредованно могут приводить к инверсиям половой дифференцировки и полового поведения.
2. Пренатальная гиперандрогенизация не ведет к повышению уровня тестостерона крови потомства женского пола, но ассоциирована с повышением уровня киспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию киспептинового сигналинга и ассоциированную с этим активацию гонадной оси.
3. Структура нозологических вариантов нарушений формирования пола в исследованной группе представлена 60 % - врожденная гиперплазия коры надпочечников, 11,5% - полная дисгенезия гонад, 17% - проксимальные формы гипоспадии, 7% - синдром резистентности к андрогенам, 1,5% - нарушение биосинтеза тестостерона, 1,5% - овотестикулярное нарушение формирования пола и 1,5% - 46, XX, тестикулярное нарушение формирования пола – синдром де ля Шапель.
4. Генетические варианты, расцененные как каузативные, методом секвенирования нового поколения идентифицированы в 39 % случаев от числа обследованных, из них 43% замен относятся к ранее не описанным вариантам в генах, участвующих в дифференцировке пола. В сопоставлении с клиническим фенотипом наибольшую патогенетическую значимость имели замены в генах *AR*, *NR5A1*, *MAP3K1*, *MAMLD1*. Моногенный генез нарушений формирования пола имели 82% пациентов, олигогенный генез - 18%.
5. Клинический фенотип у части пациентов с выявленными ранее не описанными генетическими вариантами имел также ранее не описанные клинические симптомы. Так, при замене в гене *MAMLD1*, ранее описанного в ассоциации с гипоспадией, имел место вариант нарушения половой дифференцировки с регистрацией в женском поле, сопровождавшийся тяжелой ренальной дисплазией и прогрессией в хроническую почечную недостаточность в первой декаде жизни.
6. Половая самоидентификация в исследованной группе совпадает с генотипом при врожденной гиперплазии коры надпочечников и является противоположной генотипу при синдроме резистентности к андрогенам, тестикулярном нарушении формирования пола с кариотипом 46,XX, дисгенезии гонад и нарушении биосинтеза тестостерона (редкая форма врожденной гиперплазии коры надпочечников в следствии 17-альфа гидроксилазной недостаточности). Оценка полоролевого поведения не имеет значимых отличий от популяционных референсных данных, в пределах которых достоверно чаще имела место маскулинность в группе врожденной гиперплазии коры надпочечников по сравнению с группой синдрома резистентности к андрогенам. Наиболее выраженные различия при оценке личностных и поведенческих характеристик выявлены при формах нарушений половой дифференцировки, сопровождающихся избытком андрогенов либо полной к ним нечувствительностью.
7. Тактика оказания помощи пациентам с нарушением формирования пола, включая вопросы присвоения паспортного пола, должна быть персонифицированной и в значительной степени базироваться на результатах генетического тестирования.

Практические рекомендации

1. Рекомендуется обучение врачей педиатров, неонатологов и врачей общей практики ключевым аспектам диагностики нарушений половой дифференцировки, для чего целесообразно включить в программы непрерывного медицинского образования данный раздел.

Наиболее критическими возрастными периодами для своевременного выявления и оказания специализированной помощи являются период новорожденности и младенчества, а также период старта пубертата.

2. При клиническом подтверждении нарушения формирования пола, за исключением группы врожденной гиперплазии коры надпочечников и некоторых других этиологически понятных нозологических вариантов, целесообразно проведение молекулярно-генетического обследования методом NGS или секвенирования экзома без предварительной идентификации отдельных генов, считавшихся ранее наиболее частыми причинами данной патологии.

3. Пациентам с «крайними» в отношении избытка/отсутствия пренатального действия андрогенов формами нарушения формирования пола (врожденная гиперплазия коры надпочечников с кариотипом 46, XX и полная резистентность к андрогенам с кариотипом 46, XY) рекомендуется своевременная психологическая коррекция отдельных характеристик личности с учетом прогноза их формирования в соответствии с описанными в данном исследовании.

4. Рекомендуется проведение медико-генетического консультирования семей с выявленными в качестве каузативных вариантов в генах, ассоциированных с нарушениями формирования пола. Целесообразно принимать во внимание случайно выявленные варианты с низкой популяционной частотой в других генах, не имеющих отношения к половой дифференцировке, для предикции вероятности реализации врожденной патологии с рецессивным типом наследования среди членов данной семьи.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Роль генетических, гормональных и внешнесредовых факторов в процессах половой дифференцировки мозга/ Е.К. Кудряшова, А.С. Масель, И.И. Нагорная [и др.]// Артериальная гипертензия. - 2015.-Т.21, №1.-С.40-47.
2. Кудряшова, Е.К. Эволюция взглядов на половую идентичность/ Е.К. Кудряшова, А.С. Масель, И.Л. Никитина// Лечащий врач. – 2016. - №3. – С.20
3. Роль молекулярной генетики в персонификации оказания помощи при нарушениях формирования пола у детей/ И.Л. Никитина, Е.К. Кудряшова, Р.Т. Батрутдинов [и др.]// Лечащий врач. – 2017. - №10. – С.70.
4. Изменения уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс в эксперименте/ И.Л. Никитина, Е.К. Кудряшова, А.С. Масель [и др.]// Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2017. – Т.61, №1. – С.4-12.
5. Next-generation DNA sequencing in an appropriate sex assignment: case report of two phenotypically similar patients with 46, XY disorder of sex development// I. Nikitina, E. Kudryashova, R. Batrutdinov [et al.]// European Journal of Medical Case Reports. - 2019. - Т.3, № 2. - С. 68-73.
6. К вопросу о своевременной диагностике нарушений формирования пола/ И.Л. Никитина, Е.К. Кудряшова, А.М. Тодиева [и др.]// Лечащий врач. – 2020. - №3. – С.17-21

Список сокращений и условных обозначений

ВГКН – врожденная гиперплазия коры надпочечников
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ЛГ – лютеинизирующий гормон
 НФП – нарушения формирования пола
 ПДМ – половая дифференцировка мозга
 ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
 ACMG – American college of medical genetics and genomics
 KISS1R – рецептор кисспептина
 Me - медиана
 NGS – next-generation sequencing
 OMIM – online inheritance in man