

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский  
исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

*На правах рукописи*

КУДРЯШОВА Елена Константиновна

**КЛИНИЧЕСКИЕ, НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА**

14.01.02 – эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Никитина Ирина Леоровна,  
доктор медицинских наук, доцент  
Костарева Анна Александровна,  
кандидат медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Введение .....	3
Глава 1. Обзор литературы .....	13
1.1 Физиология половой дифференцировки .....	13
1.2 Нарушения формирования пола .....	16
1.3 Современные представления о половой дифференцировке мозга .....	21
1.4 Современные подходы к оказанию помощи при нарушениях формирования пола .....	27
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	31
2.1 Дизайн клинической части исследования .....	32
2.2 Дизайн экспериментальной части исследования .....	39
2.3 Методы статистического анализа .....	44
Глава 3. Изучение влияния пренатально индуцированной гиперандрогенемии на половое развитие потомства (экспериментальная модель) .....	45
Глава 4. Клиническая характеристика пациентов с нарушением формирования пола в ассоциации с генотипом .....	56
Глава 5. Психологические аспекты нарушений формирования пола .....	107
Глава 6. Обсуждение результатов .....	123
Выводы .....	146
Практические рекомендации .....	148
Список сокращений и условных обозначений .....	149
Список литературы .....	150

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [26, 29, 97, 126, 218]. 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. В свою очередь разногласие этих составляющих в разные периоды эмбриогенеза приводит к развитию нарушений формирования пола. Особенности диагностики и лечения при нарушениях формирования пола 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 [206].

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 нарушением формирования пола. 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 [107, 121, 205]. Таким образом, ключевыми аспектами являются уточнение этиологии конкретного варианта нарушения формирования пола и прогнозирование характера половой дифференцировки мозга, определяющей половую идентификацию взрослеющих пациентов [203, 126].

С практической точки зрения наиболее значимым вопросом является планирование своевременной и максимально корректной тактики оказания помощи каждому пациенту с нарушением половой дифференцировки, 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 нарушений формирования пола до настоящего времени продолжают составлять определенную трудность. Исследования основных факторов, определяющих пренатальную дифференцировку пола, а именно молекулярно-генетических основ вариантов нарушений полового развития, а также уточнение механизмов половой дифференцировки головного мозга под действием андрогенов, с последующим анализом в ассоциации с клиническими фенотипами пациентов, могут стать основой выработки предикторов и закономерностей, важных для индивидуализации терапевтической тактики при данной патологии [6, 7, 17, 18, 32, 217]. Комплексное изучение психологического пола пациентов с нарушениями формирования пола, 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 персонализированного оказания медицинской помощи [79, 111, 189, 217].

## **Степень разработанности темы исследования**

В структуре заболеваний эндокринной системы нарушения формирования пола 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 нарушений половой дифференцировки 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 нарушений формирования пола значительно расширяется [208]. 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 пациентов [18, 79, 111, 217]. 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 течение последних десятилетий произошло принципиальное изменение представлений о механизмах половой дифференцировки структур головного мозга [107, 166, 199], обосновавшее их 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 нарушений формирования пола, 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 нарушений формирования пола с использованием секвенирования нового поколения, в сопоставлении полученных результатов с клиническим фенотипом и психологическими особенностями личности имеет актуальность и значимость для разработки персонализированных 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 персонализированного 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 ксипептина.
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 гиперандрогенемия 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 кинспептина в крови, изменение кинспептинового 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**

Диссертационная работа проводилась в дизайне ретроспективного и проспективного исследования, и представлена экспериментальной и клинической частями. Для получения необходимой научной информации были применены следующие методы: клинический, лабораторный, молекулярно-генетический, а также статистический анализ полученных данных.

Исследование выполнено в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ (генеральный директор академик РАН Е. В. Шляхто). Клиническая часть основана на анализе результатов осмотра и обследования выборки из 70 пациентов с нарушением формирования пола. Экспериментальная часть основана на анализе результатов обследования потомства женского пола 59 особей самок крыс линии Wistar с пренатальной гиперандрогемией на разных сроках гестации.

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.

В теоритическую основу диссертационного исследования легли данные по нарушению формирования пола, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе. Результаты полученные в ходе выполнения работы были обработаны с использованием современных методов статистического анализа.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Экспериментально индуцированная на ранних и поздних сроках гестации гиперандрогения 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).

Достоверность результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального и клинического материала, использованием современных методов молекулярно-генетического, биохимического, инструментального исследования с последующим применением корректных методов статистического анализа.

### **Личное участие автора в проведении исследования**

Подготовка, определение основной цели, разработка дизайна исследования и все этапы научной работы осуществлены лично автором. Проведен анализ литературы по теме диссертации, анализ проведенного молекулярно-генетического исследования, полученные данные сформированы в электронные базы и проведен статистический анализ результатов исследования. Автором лично разработан дизайн и выполнены все этапы лабораторной части исследования (уход за животными, создание модели пренатальной гиперандрогенизации, получение препаратов и дальнейший хроматографический и иммуноферментный анализ).

### **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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Разделение членов общества на мужчин и женщин, базирующееся на половых признаках, сформировалось исторически. Внешняя простота этих отличий опиралась на фенотипические признаки, а именно: морфологические особенности наружных половых органов у новорожденных детей, развитие вторичных половых признаков у подростков и особенности моделей полоролевого поведения в социуме. В настоящее время понятие пола многосоставное и включает генетический, гонадный, гормональный, фенотипический и психологический пол. В свою очередь разногласие этих составляющих в разные периоды эмбриогенеза приводит к развитию нарушений формирования пола (НФП).

### 1. Физиология половой дифференцировки

Гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось является главным регулятором половой дифференцировки анатомических структур (формирования гонад, наружных и внутренних гениталий и др.) и их физиологических взаимодействий путем лиганд-рецепторных взаимоотношений [10, 11, 181].

Пол субъекта — это сложное понятие, определяющееся взаимным соответствием генетического, гонадного, фенотипического и психологического пола.

Процессы анатомического формирования пола происходят на ранних этапах эмбриогенеза (до 14 недели внутриутробного развития), в то время как половая дифференцировка мозга происходит позже, во второй половине беременности, и в соответствии с современными представлениями является необратимой [121].

Анатомическое формирование пола основано на координированных процессах реализации генетического, гонадного и фенотипического пола [103, 159, 160, 190, 192]. Анатомическая дифференцировка пола это процесс формирования

бипотенциальной гонады и предшественников внутренних и наружных гениталий, без гендерных различий. Начиная с 7 недели эмбриогенеза происходит экспрессия специфических генов с реализацией информации о дифференцировке бипотенциальной гонады в тестикул или яичник. При наличии в кариотипе У-хромосомы в процесс включается каскад генетических механизмов, инициируемый действием гена SRY [43, 127, 149, 180]. Данный процесс завершается дифференциацией гонад в яичко (формирование гонадного пола) [82, 83, 84, 218].

В процессе половой дифференцировки при генетически мужском поле значимую роль играет также гормональная активность, а именно, тестостерон, который вырабатывается клетками Лейдига и ускоряет рост вольфовых протоков, и антимюллеров гормон (АМГ), который вырабатывается клетками Сертоли и обуславливает обратное развитие мюллеровых протоков. В случае отсутствия АМГ развиваются производные мюллеровых протоков: матка, фаллопиевы трубы и верхняя треть влагалища. У плодов генетически женского пола данный процесс не имеет большого значения, потому что гормональная активность яичников не является необходимой для дифференцировки внутренних гениталий.

Процесс формирования наружных гениталий обусловлен маскулинизацией полового бугорка, за счёт превращения тестостерона в активный метаболит дигидротестостерон с помощью фермента 5-альфа-редуктазы. Так же для формирования тестикул необходимо нормальное функционирование рецепторов к андрогенам в тканях-мишенях. В случае плодов женского пола маскулинизация под действием дигидротестостерона не происходит. Дифференцировка мюллеровых протоков в структуры женских половых органов происходит в условиях отсутствия влияний андрогенов и АМГ. Таким образом, в конце первого триместра беременности формируется фенотипический пол.

Таким образом, как недостаток андрогенов у плодов генетически мужского пола, так и избыток андрогенов у плодов генетически женского пола может приводить к

нарушению формирования наружных гениталий по неопределенному типу с недостатком маскулинизации у одних и вирилизацией у других.

Молекулярно-генетические механизмы половой дифференцировки активно продолжают изучаться. В 1990 году впервые был описан ген *SRY* (Yq) как главный участник дифференцировки бипотенциальной гонады в тестикулы. При дальнейшем изучении были определены гены-синергисты *SRY*, такие как *SF1(NR5A1)* (9 p), *DHH* (12 p) и гены-антагонисты: *DAX1* (X q), *WNT1* (1q) [45, 46, 47, 49, 61, 75, 141, 171, 178, 197, 202, 210].

В настоящее время активно обсуждается участие таких генов, как *MAP3K1*, *MAMLD1*, *SOX3* и других генов-кандидатов, участвующих в половой дифференцировке [50, 73, 112, 116, 142, 170, 194, 196, 198]. С учетом того, что часть генов локализуется на ауосомах, они могут контролировать не только половую дифференцировку, но и функционирование органов и систем, возможно развитие состояний НФП в сочетании с другими патологическими состояниями организма. Таким образом, в публикациях появляются описания случаев НФП в сочетании с гипоплазией надпочечников, опухолью Вильямса, аномалиями мочевого системы, мультифасцикулярной нейродисплазией и прочее [125, 177, 179].

Значительные материальные затраты на выполнение лабораторных молекулярно-генетических исследований при диагностическом поиске у пациентов с НФП определяют этапность в проведении обследований. Например, в первую очередь рекомендуется осуществлять FISH-зондовую диагностику для исключения делеции в гене *SRY*, в отсутствии которой далее целесообразно проводить секвенирование генов *SRY*, *SF1*, *DHH*; и в заключении провести секвенирование генов *DAX1* и *WNT4* [53, 87, 123].

Последние года в научной литературе широко обсуждаются новые мутации генов, выявляемые у пациентов с нарушениями пола, уточняется характер их наследования и возможности пренатальной диагностики.

## 1.2. Нарушения формирования пола

Высокопроизводительные технологии секвенирования оказывают существенное влияние на понимание генетической основы редких заболеваний человека, включая НФП. Исследование НФП человека постепенно выявляет тонкие различия в генетике системы, определяющей пол. Эта пластичность пути, определяющего пол, очевидна в различии фенотипов у человека при мутациях одного и того же гена, в различных механизмах регуляции генов человека и, наконец, в разных и неожиданных репродуктивных фенотипах, наблюдаемых при мутациях в хорошо изученных генах, определяющих пол [28, 29, 76, 77, 78].

Нарушения полового развития определяются, как врожденные состояния с дискордантным развитием хромосомного, гонадного, фенотипического и психологического пола.

В настоящее время, согласно современной классификации, НФП разделяются на три группы: хромосомные НФП, НФП с кариотипом 46, XY и НФП с кариотипом 46, XX. Номенклатура претерпела изменения, и в настоящее время ушел термин «гермафродитизм» в связи с возможностью усугубления психологической травмы в семье.

Характеризуя группу хромосомных НФП, следует отметить, что они в основном представлены числовыми аномалиями половых хромосом и мозаицизмом по половым хромосомам. К хромосомным НФП относятся 45, X – синдром Шерешевского-Тернера, 47, XXY – синдром Клайнфельтера, 45,X/46,XY – смешанная овотестикулярная форма НФП и истинный химеризм 46,XX / 46,XY.

Характеризуя группу НФП с кариотипом 46, XY, следует выделить по этиопатогенезу следующие группы: НФП связанные с дисгенезией гонад, НФП с нарушением биосинтеза тестостерона и с нарушением его действия и НФП, ассоциированные с дефектами рецепторов к ЛГ и АМГ.



НФП с кариотипом 46, XY включают в себя аномальную дифференцировку тестикул, недостаточную маскулинизацию, преимущественно из-за нарушений синтеза и действия андрогенов. Аномалии развития тестикул могут проявляться как полной дисгенезией гонад, так и частичной дисгенезией гонад [74, 216].

Полная дисгенезия гонад с кариотипом 46, XY характеризуется полностью женскими наружными гениталиями, хорошо развитыми мюллеровыми структурами и гонадой, состоящей из фиброзной ткани, тогда как частичная дисгенезия гонад с кариотипом 46, XY характеризуется частичным развитием яичка, представленностью вольфовых и мюллеровых протоков и различной степенью маскулинизации наружных половых органов. Вариант регрессии тестикул в эмбриональном периоде также можно рассматривать как часть клинического спектра 46, XY дисгенезии гонад [24, 25, 27, 120].

Лица с 46, XY НФП обычно имеют неопределенное строение внешних и внутренних гениталий. Ткань гонады отсутствует с одной или обеих сторон [23, 25, 27, 54]. В публикации A. Bignon-Lauber et al. (2009) было сообщено, что пациенты с 46, XY НФП имеют неполное развитие тестикул с потерей гонадного материала на ранних сроках до завершения их окончательной дифференцировки [18, 182]. Этот факт говорит о том, что мы имеем дело с континуумом фенотипов, а не с четко различимыми и не связанными между собой категориями атипичной дифференцировки тестикул. В исследовании C. Le Caignes et al. (2003) также было показано, что в некоторых семьях с семейным вариантом 46, XY НФП фенотип пациентов может варьировать от женского с полной или частичной дисгенезией гонад, до мужского фенотипа с изолированной гипоспадией и/или крипторхизмом [1, 35].

Другие формы 46, XY НФП представляют собой нарушения синтеза или действия андрогенов. Эта группа патологий включает в себя дефекты биосинтеза андрогенов, таких, как дефицит 17-гидроксистероиддегидрогеназы (*HSD17B*), дефицит 5 $\alpha$  редуктазы (*SRD5A3*) и мутации гена *StAR* [55, 56]. Дефекты в действии

андрогенов включают полную или частичную нечувствительность к андрогенам, связанную с мутациями в андрогеновом рецепторе (*AR*).

В случае сочетания гипогонадотропного гипогонадизма с аносмией, гипоосмией у 60% пациентов это состояние ассоциировано с синдромом Каллмана. Такая комбинация фенотипов объясняется общим эмбриональным происхождением и путями развития гонадотропин рилизинг-гормона и обонятельных нейронов. В своем исследовании, посвященном генетике гипогонадизма, M. Marino et al. (2014) сообщает о более чем 20 генах, являющихся причинными в отношении развития центрального гипогонадотропного гипогонадизма [85]. Рецессивные мутации гена рецептора лютеинизирующего гормона (*LHCGR*) приводят к гипоплазии или аплазии клеток Лейдига [151]. Однако, при раннем дебюте недостаток тестостерона из-за нарушения стимуляционной функции приводит к тому, что анатомическая дифференцировка пола тоже нарушается.

Характеризуя группу НФП с кариотипом 46, XX выделяют группы, обусловленные дисгенезией гонад и избыточным количеством андрогенов.

НФП с кариотипом 46, XX включают в себя состояния, характеризующиеся вирилизацией из-за избытка андрогенов, и в подавляющем большинстве случаев 46, XX НФП связаны с врожденной гиперплазией надпочечников (ВГКН) [161]. По данным W. Arlt et al. (2007), наиболее распространенная форма ВГКН обусловлена дефицитом 21-гидроксилазы, которая вызвана мутациями в гене 21-гидроксилазы (*CYP21A2*) и составляет 90–95% всех случаев [67].

Наиболее редкими формами являются тестикулярная и овотестикулярная формы 46, XX НФП. Лица с тестикулярной формой 46, XX НФП — это мужчины с гипоплазированными тестикулами, азооспермией [38, 100] и нормальным мужским фенотипом.

Овотестикулярная форма 46, XX НФП подразумевает наличие тестикулярной и овариальной ткани в структуре внутренних гениталий [31, 90]. Наружные гениталии, как правило, неоднозначны или сформированы по женскому типу, причем степень

маскулинизации широко коррелирует с количеством присутствующей ткани яичка. Как при тестикулярной форме 46, XX НФП, так и при овотестикулярной форме гистологическое исследование гонад показывает отчетливые структуры канальцев в ткани, подобной яичку, и наличие фолликулов в ткани, подобной яичнику, в случае овотестис [21].

В исследовании J.M. Hutson et al. (2014) описано большое количество ассоциаций врожденных мальформаций с НФП, включая экстрофию клоаки, синдром Робинова, синдром Денис-Дреш, синдром Фрейзера, синдром Аарскога-Скотта, синдром подколенного птеригиума, синдром Секкеля, аплазию мюллеровых протоков, микроделеционные синдромы и многие другие [156, 157].

В настоящее время имеются очень ограниченные данные о точной заболеваемости НФП. Данная ситуация отражает как редкость некоторых из этих состояний, так и проблему достижения точного клинического диагноза. По оценкам L. Sax (2002) и U. Thyen et al. (2006), частота встречаемости новорожденных, имеющих неопределенное строение гениталий, при которых может возникнуть проблема определения пола, составляет 1: 4500–5500 родов [114, 196].

По данным U. Thyen et al. (2006) и R.J. Auchus et al. (2010) более 50% всех случаев НФП с неопределенным строением гениталий обусловлены либо ВГКН, либо 46, XY-смешанной дисгенезией гонад, вызванной мозаицизмом 45, X / 46, XY [70, 114]. Согласно данным P.A. Lee et al. (2016) заболеваемость 46, XY НФП составляет 1: 20000 родов, и 46, XY дисгенезией гонад около 1: 100000 родов [126]. В 2002 году L. Sax сообщил, что тестикулярная и овотестикулярная форма НФП встречаются с частотой 1: 100 000 рождений [196]. Частые аномалии развития наружных половых органов могут встречаться у 1 из 300 новорожденных [185]. К ним относятся крипторхизм или аномалии открытия мочеиспускательного канала на половом члене (гипоспадии). Однако большая часть опубликованных данных о заболеваемости НФП основана на популяционных исследованиях, проведенных в отдельных странах. Таким образом, распространенность НФП во всем мире неясна.

В 2006 году U. Thyen et al. опубликовали результаты большого популяционного эпидемиологического исследования, проведенного в Германии, согласно которым, частота неопределенного строения гениталий у детей не немецкого происхождения была в 4 раза выше по сравнению с общей популяцией [114]. Этот факт они объясняли увеличением аутосомно-рецессивных форм НФП из-за более высокого показателя кровного родства в мигрирующих популяциях.

M.A. Abdullah et al. (1991) и I. Mazen et al. (2008) в своих исследованиях также подтверждают гипотезу о том, что в обществе с более высоким уровнем кровного родства наблюдается более высокий уровень НФП. Так, заболеваемость НФП в Саудовской Аравии оценивается в 1: 2500 живорождений, в то время как в Египте она оценивается в 1: 3000 живорождений, что превышает сообщаемую частоту 1: 4500–1: 5500 в европейских странах [60, 106].

Другим препятствием в определении распространенности НФП является отсутствие точного или даже какого-либо диагноза. В одном из исследований U. Thyen почти половина детей не имела окончательного диагноза в возрасте до 6 месяцев исключая те случаи, когда биохимический профиль указывал на конкретную ошибку в стероидогенезе [114]. А в исследовании E.S. Tobias et al. (2014) было сообщено, что конкретное молекулярно-генетическое подтверждение диагноза установлено примерно в 20% случаев НФП, и только в 50% случаев у лиц с 46, XY НФП был установлен точный клинический диагноз [214].

Таким образом, в мире на сегодняшний день начаты и продолжаются исследования причин, включая молекулярно-генетические, нарушений половой дифференцировки. Полученные данные в исследованиях значительно расширили понимание генетических механизмов НФП, однако более чем в половине случаев генетические исследования не дают результата. И даже при установленной причине НФП одни и те же генетические варианты не всегда ассоциированы с однозначным фенотипом. Эта ситуация обуславливает актуальность продолжения изучения генетики пола.

Учитывая, что на ранних сроках эмбрионального развития плод имеет недифференцированные первичные гонады, являющиеся предшественниками как женских, так и мужских гениталий, любые возможные нарушения половой дифференцировки способны реализоваться в различных клинических вариантах НФП, при которых определение половой принадлежности является сложной клинической задачей, ставящей перед врачом трудную дилемму, состоящую в принятии решения о присвоении гражданского пола, развитие в котором будет наиболее комфортным для пациента.

### **1.3 Современные представления о половой дифференцировке мозга**

Анатомическую половую дифференцировку невозможно рассматривать отдельно от психологического статуса человека. В случае нарушения анатомического формирования пола возникает явная необходимость дать прогноз психологического пола, который должен соответствовать выбранному анатомическому. У пациентов с несоответствием психологического пола чаще наблюдается психоэмоциональный дискомфорт. Таким образом, определение паспортного пола должно осуществляться в достаточно раннем возрасте, что требует понимания механизмов формирования половой дифференцировки мозга [30].

Процесс половой дифференцировки мозга (ПДМ) происходит внутриутробно, преимущественно во второй половине беременности под действием андрогенов, генетических и эпигенетических влияний [59, 66, 88, 146, 195]. Ввиду того, что процессы анатомической дифференцировки и половой дифференцировки мозга происходят в разное время, не исключено, что факторы, влияющие на эти два процесса, различны [80, 81, 195]. Однако при неоднозначности анатомического пола при рождении степень маскулинизации наружных половых органов может не коррелировать со степенью маскулинизации головного мозга. Гуморальные влияния на процесс необратимой структурной и функциональной нейрональной организации

в структурах базальных ядер таламической области в рамках половой дифференцировки мозга осуществляются посредством, как андрогенов самого плода, так и трансплацентарно поступающих из крови матери [150].

В 2005 году S. Henningsson et al. опубликовали статью, в которой была показана важность прямого действия тестостерона на процесс ПДМ [200, 201]. Во время беременности и в перинатальный период выделяют два периода, в которые наблюдаются диморфные пики секреции тестостерона, оказывающие влияние на ПДМ. А в период старта пубертата происходит гормональная активация нейрональных сетей, сформированных ранее в онтогенезе [20, 137].

Также в исследовании A. Galani et al. (2008), посвященном изучению заболеваний, обусловленных нарушением биосинтеза андрогенов, находит подтверждение теории ПДМ под действием тестостерона, на примере синдрома нечувствительности к андрогенам, развивающегося при наличии мутации в гене андрогенового рецептора (*AR*, Xq11–12) [63].

A.B. Wisniewski et al. (2000) в своих исследованиях также отмечает, что при таком состоянии, как синдром нечувствительности к андрогенам, генетический пол — 46, XY - нормальный мужской, правильное строение внутренних гениталий и ненарушенный биосинтез андрогенов, а фенотипический и психологический пол — женский. Таким образом, генетически нормальные женщины (46, XX) и женщины с синдромом резистентности к андрогенам (46, XY) психологически ассоциируют себя с женским полом, и не отмечают гендерной дисфории [94].

Противоположная ситуация складывается в отношении новорожденных детей с генетически мужским полом (46, XY), но с дефицитом 5 $\alpha$ - редуктазы или 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы-3, при которых ошибочно присваивается женский паспортный пол, в то время как на момент старта пубертата на фоне адекватной выработки тестостерона нарастают признаки маскулинизации.

Согласно данным исследований H.F.L. Meyer-Bahlburg (2011), V. Pasterski et al. (2014) и R. Markosyan et al. (2017), именно в этой группе патологий до 60% пациентов

претерпевают смену пола в мужской [145, 158, 162]. Вероятнее всего это происходит из-за пренатального влияния тестостерона в период эмбриогенеза.

В настоящее время остаются малоизученными факторы, влияющие на половую дифференцировку мозга. В 2002 году в исследовании F.L. Coolidge et al. была представлена информация о таких факторах, как действие гормонов, генетические, эпигенетические механизмы и влияние лекарственных препаратов. Изучение генетических механизмов влияния на ПДМ осуществлялось в близнецовых исследованиях [64, 98].

Ряд авторов, E.K. Bentz et al. (2008) и L. Hare et al. (2009) также опубликовали данные в пользу наследственных факторов об ассоциации полиморфизмов генов эстрогеновых рецепторов, длины повторов в гене андрогенового рецептора и полиморфизма гена ароматазы с увеличенным риском нарушений ПДМ [48, 64, 200].

Таким образом, было доказано, что прямое действие андрогенов оказывает существенное влияние на ПДМ пренатально на формирующийся мужской мозг и его отсутствие, если мозг женский. Помимо генетических и гормональных механизмов, к аномальной половой дифференцирован мозга могут приводить лекарственные препараты, принимаемые матерью во время беременности, так называемые дизрапторы [69].

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что в подавляющем количестве публикаций решающая роль в половой дифференцировке мозга отводится половым гормонам, однако, наиболее вероятно, что гормональные и генетические пути переплетены и зависят друг от друга [102].

Согласно современной концепции половой дифференцировки мозга, высокие внутриутробные концентрации андрогенов, преимущественно во второй половине беременности, обуславливают формирование гендерной идентичности и особенностей полового поведения.

ПДМ обуславливает дальнейшее психосексуальное поведение [186]. Как правило, под психологическим половым развитием принято понимать следующее:

«гендерная самоидентификация», «гендерная роль», «сексуальная ориентация». У лиц с нарушением формирования пола нередко возникает гендерная дисфория, чувство недовольства своей половой принадлежностью. Таким образом, главной целью при определении тактики ведения пациента с НФП является наиболее корректное и своевременное определение паспортного пола для того, чтобы избежать развития гендерной дисфории.

Как было сказано ранее, ключевая роль в процессах ПДМ отводится пренатальной андрогенизации, ряду генов, которые продолжают активно изучаться, нейромедиаторным взаимодействиям, обеспечивающим интеграцию вегетативных и эндокринных компонентов половой функции, и сигналинговым системам, в частности лиганд-рецепторной системе KISS/KISS1R. Анатомические структуры, играющие значимую роль в регуляции половой дифференцировки мозга путем нейромедиаторного сигналинга — это гиппокамп, гипоталамус и миндалевидный комплекс. Сексуальная диморфность данных структур выражается в различной толщине структур и количестве нейронов у мужчин и женщин [3, 4, 20, 41]. Трансляция информации в структурах ЦНС опосредована изменением концентрации нейромедиаторов под действием гормонов, а также транмиттеров, в частности кисспептина. Так, анализируя полученные результаты, P.J. Fitzgerald (2008) предположил, что гомо- и бисексуальная половая ориентация сопровождается выраженной активностью норадренергической и сниженной серотонинергической систем [118].

Lin T.W. et al. (2013) подчеркивали, что наличие тестостерона, инициирующего рост уровня окиси азота, являлось необходимым условием для реализации дофаминергической секреции в медиальных преоптических ядрах гипоталамуса. При этом исследователи отметили, что взаимные изменения дофаминовой и серотониновой секреции в различных областях головного мозга способствовали как повышению сексуальной активности, так и появлению сексуальной удовлетворенности [153]. Однако, несмотря на достаточно активное исследование



изменений уровней нейромедиаторов – производных моноаминов, сохраняются открытыми ряд вопросов, касающихся нейрофизиологических основ формирования полового поведения, самоидентификации и сексуальной роли индивидуума. В последние годы интенсивно изучается роль лиганд-рецепторной системы кисспептина в вышеназванных процессах, а также характер взаимодействий последних с нейромедиаторами ЦНС и половыми гормонами [140, 211]. Но изменение уровня моноаминовых нейромедиаторов в различных структурах головного мозга не может объяснить все аспекты в вопросах формирования полового поведения, сексуальной роли и самоидентификации.

Результаты последних исследований в вопросах старта пубертата определяют доминирующую роль эпигенетического регулирования активности ряда генов, контролирующих синаптическую медиаторную систему возбуждения/торможения в цепях кисспептиновых нейронов и связанных с ними нейронов KNDy (кисспептин, нейрокинин В, динорфин), совместно влияющих на ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса [51, 154, 174, 219]. Наиболее изученные группы генов: Polycombgroup (PcG), функциональное назначение - транскрипционные ингибиторы, и Trithoraxgroup (TrxG) -транскрипционные активаторы, которые подвержены эпигенетическому регулированию путем гиперметилирования ДНК, деацетилирования гистонов, не кодируемых микроРНК и др. [188].

Характер эпигенетического контроля определяет включение или выключение влияния генов на продукцию кисспептина в секреторных нейронах. Кисспептин совместно с медиаторами нейронов системы KNDy изменяют активность трансинаптической передачи, что, в свою очередь, меняет секрецию гипоталамическими ядрами преоптической области ГнРГ [174, 219]. Исследования, проведенные в начале 2000-х годов, исходно рассматривали подавление опухолевого роста под влиянием системы кисспептина. Но установление механизмов изменения секреции ГнРГ в результате регуляции синаптической передачи посредством лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R значительно расширило

представление о физиологических и патологических процессах репродуктивной системы. Ген, кодирующий кисспептин (*KISS1*), составляющий системы *KISS/KISS1R*, расположен на длинном плече 1-й хромосомы (1q32). Синтезируемый гидрофобный белок, являющийся продуктом транскрипционной активности, состоит из 145 аминокислотных остатков, которые расщепляются под действием протеолитических энзимов до пептидов с низкой молекулярной массой (10, 13, 14, 54-кисспептины), но не теряющих своей биоактивности *KISS1R* — это G-протеиновый рецептор 54 (*GPR54*). Его лигандом является кисспептин. Картирование представленности рецептора в головном мозге отмечается в разных отделах, но доминирующее количество выявлено в гипоталамусе, его аркуатных и перивентрикулярных ядрах. Несмотря на ведущую роль системы кисспептинов в регуляции выработки ГнРГ, только совместная и синхронная активация экспрессии генов системы *KISS/KISS1R* и системы *KNDy* обеспечивает качественное взаимодействие, как между нейронами, так и между глиальными клетками и нейронами [37, 42, 154, 174].

Последние данные, раскрывающие механизмы эпигенетического и нейромедиаторного регулирования старта и прогрессии полового созревания, значительно наполнили понимание этого процесса. Однако, остаётся ещё много вопросов, требующих дальнейших исследований.

Интегративное и разноуровневое взаимодействие эндокринной и нервной систем, сохраняя актуальность и значительный интерес исследователей, является фундаментом составляющих при формировании пола [113]. Ведущей научной концепцией второй половины 19-го века в изучении разнопланового функционирования головного мозга являлась физиология нейрогуморальных систем организма, способствовавшая развитию психонейроэндокринологии.

По степени значимости гормонам отдавалось промежуточное положение между ферментами и нейромедиаторами, которые непосредственно выполняли поддержание обменного гомеостаза и синаптическую передачу. Качественные и количественные

изменения продукции, как гормонов, так и нейромедиаторов способны вызвать выраженные клинические и психологические проявления.

Нарушение половой дифференцировки мозга – частный случай этих изменений. Лиганд-рецепторная система кисспептинов, включающая ген *KISS1*, рецептор *KISS1R* и, собственно, кисспептины, — это регуляторы, имеющие отношение к половой дифференцировке мозга.

Современные исследования активно накапливают данные о значении лиганд-рецепторной системы кисспептина, особенностях взаимодействия с половыми гормонами и нейромедиаторами. Безусловно, новые знания в области психонейроэндокринологии половой дифференцировки головного мозга с установлением диагностически значимых корреляций уровней биохимических маркеров позволят своевременно уточнять нозологический вариант НФП, а, следовательно, своевременно оказывать помощь при НФП [36].

Однако, следует подчеркнуть, что, несмотря на значительный прогресс в понимании инициации и прогрессии пубертата как процесса, регулируемого эпигенетическими и нейротрансмиссивными механизмами [175], остается достаточно большой спектр проблем, требующих продолжения исследовательского поиска.

#### **1.4 Современные подходы к оказанию помощи при нарушениях формирования пола**

В 2006 году состоялась встреча специалистов профессиональных сообществ в области детской эндокринологии: Европейское общество детской эндокринологии (ESPE) и педиатрическое эндокринное общество Лоусона Уилкинса (LWPES) [15, 97, 135, 136]. Результатом этой встречи стал Чикагский консенсус по диагностике и лечению НФП. Цель консенсуса состояла в том, чтобы предложить специалистам четко определенные руководящие принципы диагностики и лечения таких

патологических состояний, как нарушения формирования пола. В Консенсусе была представлена современная и всеобъемлющая структура диагнозов с пересмотром устаревшей номенклатуры [86, 87]. Эндокринологи, хирурги, генетики, психологи и члены общественных организаций, представляющие интересы пациентов, составили документ, в котором изложили основные «идеальные» принципы ведения таких пациентов. В этом Консенсусе должное внимание уделено как диагностическому поиску, хирургическому лечению, заместительной гормональной терапии, так и психосоциальной помощи, и адаптации [89, 91, 93, 96, 101]. Таким образом, оказание помощи пациентам с НФП является сложным, многосоставным процессом.

В настоящее время тема нарушений половой дифференцировки относится к активно изучаемой сфере, накопленные данные регулярно пересматриваются и дополняются. Во многих странах разрабатываются локальные рекомендации по диагностике и лечению пациентов с НФП.

Однако, очевидно, что существуют основные принципы ведения этой группы пациентов, на которые опираются специалисты всего мира.

Пересмотр номенклатуры был обусловлен необходимостью формирования единообразной классификации, которая должна отражать и генетический пол пациента, и вариабельность фенотипических проявлений. В настоящее время из номенклатуры исключен термин «гермафродитизм» в связи с возможностью усугубления психологической травмы в семье.

Одной из основных рекомендаций, существующих в настоящее время, в отношении пациентов с НФП является обследование, наблюдение и лечение пациентов в крупных медицинских центрах с возможностью участия мультидисциплинарной группы специалистов: эндокринологов, педиатров, урологов, хирургов, генетиков и психологов [128, 131, 215]. Также, не менее важной рекомендацией является необходимость, при возможности, воздерживаться от присвоения паспортного пола до момента окончания диагностического поиска и постановки диагноза мультидисциплинарной командой [130].

Вопрос хирургической коррекции при НФП является дискуссионным. Подходы к хирургическому вмешательству до настоящего времени не являются согласованными. В настоящее время, не существует единого мнения среди специалистов по оперативным вмешательствам, существует группа сторонников моратория на раннее вмешательство, поскольку результаты хирургии могут не удовлетворить повзрослевшего пациента. Однако, тем не менее, общепринятым в качестве Консенсуса принципом является то, что хирургическое вмешательство при НФП должно осуществляться командой специально подготовленных хирургов. Во всех случаях оно должно быть акцентировано на функциональном результате, а не на косметическом эффекте [212, 213], и решение в отношении каждого пациента должно приниматься индивидуально в зависимости от конкретного нозологического варианта и экстренности вмешательства.

С течением времени несколько претерпевали изменения рекомендации по психологическому поведению, что нашло отражение в Консенсусах последних лет, в которых большое внимание уделено не только медицинским, но и парамедицинским аспектам, касающихся психологии и социальной адаптации в обществе и семье, комфортности жизни пациента. Психосоциальная помощь должна быть неотъемлемой частью тактики ведения пациентов с НФП для создания позитивной адаптации для пациента [134]. Общение с пациентами и их семьями должно быть максимально открытым, семья должна участвовать в принятии решений о выборе пола ребенка. Должны соблюдаться конфиденциальность и уважение пациента и его семьи [193]. Общение с семьей пациента требует необходимости объяснения возможностей психосоциальной адаптации в обществе, формирование полноценности пациента как личности в будущем [187].

На современном этапе, четко определена необходимость психологической поддержки. Таким образом, диагностика и хирургическое вмешательство не являются единственной целью лечения. В раннем неонатальном периоде при НФП, как правило, принимаются критические решения, включая решение о выборе паспортного пола и

сроках, а при необходимости и хирургическое вмешательство. Родители чрезвычайно уязвимы на этом этапе, поэтому могут проявлять повышенное беспокойство и отчаяние. Ситуация может усугубляться нестабильностью семейных отношений. В этом случае психологическая поддержка должна выходить за рамки консультирования по психосоциальным аспектам при НФП и для корректной выработки стратегии дальнейшего ведения должна быть направлена на улучшение связи взаимоотношений между семьей и медицинским персоналом [14, 16, 44, 122].

Общими принципами диагностики НФП являются своевременное кариотипирование, ультразвуковое исследование органов малого таза, гормональное обследование: тестостерон, 17-ОН прогестерон, АМГ, ФСГ, ЛГ, подбор функциональных проб, компьютерная или магнитно-резонансная томография по показаниям и молекулярно-генетическое исследование [109, 110, 143]. На принятие решения по вопросу о присвоении паспортного пола влияет большое количество факторов: хромосомный набор, строение наружных гениталий, возможность хирургической коррекции, этнические и религиозные особенности семьи и многие другие [68, 115].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методологической основой диссертационного исследования явились принципы и правила доказательной медицины. Работа проведена в дизайне ретроспективного и проспективного трансляционного экспериментально- клинического исследования. Работа состоит из клинического и экспериментального разделов. В целях получения требуемой научной информации использовались клинические, лабораторные методы, а также статистическая обработка полученных данных.

Исследование выполнено на клинических базах и на базе института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ (генеральный директор, академик Е.В. Шляхто). Клинический раздел основан на анализе результатов обследования 70 пациентов с подтвержденным диагнозом НФП. Экспериментальный раздел включил изучение результатов обследования 59 особей самок крыс линии Wistar с экспериментально индуцированной пренатальной гиперандрогенизацией.

При проведении исследования соблюдались требования Национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» по ГОСТу Р 52379-2005, были использованы современные методы обработки информации и статистического анализа. 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 пациентов (их родителей) было получено письменное информированное согласие.

## 2.1. Дизайн клинической части исследования

### Материалы исследования

В исследование были включены пациенты с фенотипом НФП, соответствующие следующим критериям включения и критериям исключения.

Критерии включения в исследование пациентов: соответствие критериям диагноза нарушения формирования пола [15, 97].

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

Проведено наблюдательное исследование выборки пациентов с подтвержденным диагнозом НФП с использованием ретроспективно и проспективно полученной информации.

В исследование было включено 70 пациентов с различными вариантами нарушения формирования пола. Возрастной диапазон пациентов составил 1 мес. -35 лет. Группа пациентов с ВГКН составила 42 человека, группа пациентов с другими вариантами НФП – 28 человек.

Всем пациентам с НФП проведено подробное 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 возрастом старше 8 лет. Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Дизайн клинической части исследования

Группа	Количество пациентов	Клинико-лабораторное обследование	Молекулярно-генетическое обследование	Психологическое тестирование (возраст старше 8 лет)
ВГКН	42	42	42	36
Другие формы НФП	28	28	28	7



## **Методы исследования**

Клиническое обследование пациентов включало сбор анамнеза жизни, анамнеза заболевания, семейного анамнеза. Всем пациентам проводился общий клинический осмотр с антропометрией.

Проведен анализ преморбидного фона, перенесенных экстрагенитальных и гинекологических заболеваний. Проанализированы особенности менструальной, сексуальной и репродуктивной функций. Проведен анализ влияния возможных тератогенных факторов: возраст, наличие профессиональных вредностей у родителей, наследственность, приём лекарственных препаратов матерью во время беременности.

Стадия полового развития и средний возраст появления вторичных половых признаков оценивались согласно классификации Tanner, степень вирилизации оценивалась по шкале Prader. Характер менструальной функции (возраст менархе, регулярность, продолжительность цикла) оценивался путем интервьюирования девушек и по данным «менструального календаря». Диагноз олигоменореи устанавливался, если межменструальный промежуток превышал 35 дней. Первичная аменорея диагностировалась при отсутствии менархе в возрасте старше 15 лет, вторичная аменорея - в случае отсутствия менструаций в течение 3 месяцев и более от момента последней менструации.

### **Лабораторно-инструментальное обследование**

В рамках лабораторного обследования всем пациентам проведено биохимическое, гормональное и иммунологическое исследование крови. Необходимое 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).

Стандартное 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/АсD-окрашивание проводили по стандартной методике [40].

Молекулярно-генетическое исследование было выполнено на приборе MiSeq (Illumina) методом секвенирования нового поколения (NGS), который позволяет с точностью определить нуклеотидную последовательность ДНК целевых регионов генов. 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).

Таблица 2 - Перечень генов, включенных в панель исследования

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.
---

Панель HaloPlex для целевого обогащения таргетных последовательностей дает возможность секвенирования всех генов одновременно для образцов ДНК пациентов в одном экономически эффективном запуске платформы NGS. Библиотеки генов были подготовлены с использованием набора для обогащения мишеней HaloPlex Custom Panel (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) согласно протоколу производителя «HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Sequencing». Секвенирование образцов было проведено на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq v3 (600 циклов) методом *парно-концевого чтения* (2\*300 п.о.) со средним покрытием не менее 20-100х.

Обработка данных секвенирования проведена с использованием алгоритма, включающего в себя выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (GRCh37/hg19) (BWA-MEM-0.7.1); 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), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Genome Aggregation Database (gnomAD); варианты с максимальной частотой 0,01% в нескольких базах данных нормальных популяций и глубоко интронные варианты были отфильтрованы. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных Online inheritance in man (OMIM) и литературные данные. Варианты в генах, ассоциированных с развитием нарушений полового развития, были признаны клинически значимыми и верифицированы методом секвенирования Сэнгеру у пациентов и их родителей.

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура, представленная на сайте <http://www.HGVs.org/varnomen>. Все идентифицированные генетические варианты были классифицированы в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG), согласно которым учитывались патогенные, вероятно патогенные и неопределенного значения варианты нуклеотидной последовательности (мутации) (не учитывались вероятно доброкачественные варианты).

Ограничения методики - метод не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.н., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения цис-, транс-положения пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

### **Психологическое тестирование**

Изучались следующие характеристики психологического пола: половая самоидентификация, полоролевое поведение и личностные характеристики.

Изучение психологических особенностей у пациентов с различными вариантами нарушений формирования пола проводилось в следующих группах: пациенты с ВГКН, группа пациентов с синдромом резистентности к андрогенам и группа пациентов с гонадным дисгенезом. В группы обследования были включены 43 пациента в возрасте старше 8 лет.

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) [72], в варианте адаптированном, валидизированном И.С. Клециной в 2003 году для использования в Российской Федерации [34].

Полоролевой опросник Сандры Бем «Маскулинность - фемининность» - методика, которая позволяет оценить степень выраженности маскулинных и фемининных черт характера самого пациента, объективно определить гендерные характеристики личности. Участникам анкетирования необходимо оценить себя по каждой предлагаемой характеристике. По данной методике возможно заключение по четырем типам полоролевого поведения: маскулинное, фемининное, андрогинное, недифференцированное. Оценка проводится с использованием анкеты, полученные ответы с помощью ключа к тесту переводятся в баллы.

Интерпретация к тесту: 1 балл за ответ «да» при совпадении с ключом. Вычисление показателей «фемининности» и «маскулинности» производится по следующим формулам:

$$F = \text{сумма баллов по фемининности} : 20 \quad (1)$$

где F – показатель фемининности

$$M = \text{сумма баллов по маскулинности} : 20 \quad (2)$$

где M – показатель маскулинности

Далее вычисляется основной индекс (IS) по формуле:

$$IS = (F - M) \times 2,322 \quad (3)$$

где IS – основной индекс

F – показатель фемининности

M – показатель маскулинности

Согласно значению основного индекса (IS) выделяют следующие типы полоролевого поведения:

- Андрогинный тип полоролевого поведения (при IS от -1 до 1)
- Маскулинный тип полоролевого поведения (при IS менее -1)
- Фемининный тип полоролевого поведения (при IS более 1)

Комментарий: Андрогинный тип полоролевого поведения является наиболее типичным для популяции и черты его должны в норме присутствовать как у лиц мужского, так и у женского пола. Маскулинный тип полоролевого поведения свидетельствует об акценте на характерные для мужского пола особенности, а фемининный тип, наоборот, имеет акценты, которые сдвигаются больше в женский тип.

С целью оценки психологического статуса пациентов с нарушениями формирования пола нами был использован многофакторный личностный опросник Кеттелла. Это методика, позволяющая оценить личностные черты, свойства, отражающие относительно устойчивые способы взаимодействия человека с окружающим миром и самим собой. Выявляются эмоциональные, коммуникативные, интеллектуальные свойства, а также свойства саморегуляции, обобщающие информацию человека о самом себе.

Адаптированный валидизированный русскоязычный вариант опросника разработан Э. М. Александровской и И. Н. Гильяшевой (1995) [2].

Анкета предусматривает возрастную градацию: детский вариант, подростковый вариант и взрослый вариант. Количество вопросов в опроснике для детей - 120; для подростков - 142; для взрослых – 187.

Испытуемым предлагается ответить на вопросы с вариантами ответов «или/или», указав наиболее подходящий для опрашиваемого человека ответ. Ряд вопросов предусматривает выбор между тремя предлагаемыми ответами. Оценка проводится с использованием анкеты. Полученные ответы с помощью интерпретации к тесту переводятся в «сырые» баллы и далее с помощью таблиц конвертируются в

стены. Анализ факторов производится в стенах (стандартных единицах измерения). При этом положительному полюсу фактора соответствуют значения 7 – 10 стенов, отрицательному 1 – 4 стена. Так, крайние значения – показатели существенного отклонения от обычного проявления данного качества и встречаются редко, а значения 5 – 6 стенов говорят о соответствии данного качества большинству людей того же пола и возраста, что и у испытуемого.

## **2.2 Дизайн экспериментальной части исследования**

### **Материалы исследования**

Экспериментальный раздел включил 59 особей самок крыс линии Wistar и их потомство. При проведении данного исследования соблюдались требования Национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» по ГОСТу Р 52379-2005, были использованы современные методы обработки информации и статистического анализа. На всех этапах экспериментальной работы были соблюдены рекомендации о гуманном отношении к лабораторным животным: «Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств» (1984г); «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985г); «Правила лабораторной практики в РФ» (приказ МЗ РФ от 2003 г No267). Диссертационное исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

### **Характеристика исследуемых групп**

Опыты выполнены на 59 половозрелых самках крыс линии Wistar, выращенных в условиях вивария. Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Экспериментальная часть исследования проведена на базе ИЭМ под руководством профессора А.А. Байрамова.

В настоящем исследовании у самок крыс линии Wistar создавали модель экспериментально индуцированной гиперандрогемии в течение беременности на различных сроках. Экспериментальная модель гиперандрогемии во время беременности создавалась путем введения беременным самкам на 11 и 18 сутки гестации внутривбрюшинно инъекции тестостерона в дозе 30 мг/кг. Беременным самки интактных крыс вводили в эти же сроки стерильный апиrogenный физиологический раствор (0.01 мл/г 0.9% NaCl внутривбрюшинно).

Полученное потомство явилось объектом дальнейшего изучения. Полученное при разрешении беременности потомство было оценено по соматическому статусу и наличию врожденных аномалий, мертворождению. На следующем этапе было отобрано потомство женского пола. Все экспериментальные животные были разделены на 3 группы. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Группы экспериментальных животных

№ группы	Название группы	Возраст крыс, месяц	Срок андрогенизации	Количество особей, n
1	Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во 2 триместре	4	11 суток (2 триместр)	5
2	Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации в 3 триместре	4	18 суток (3 триместр)	5
3	Самки, рожденные в условиях физиологически протекающей беременности (контроль)	4		5

Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека было следующим: крысы 4-месячного возраста – период половой зрелости. 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 ксипептина. В



запланированные в соответствии с дизайном исследования сроки были забраны материалы для эксперимента (головной мозг, кровь). Данные отражены в таблице 4.

Таблица 4 – Экспериментальный материал и сроки забора

Материал	Группы		
	Контроль	Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во втором триместре	Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во третьем триместре
	Возраст забора материала		
кровь	4 мес.	4 мес.	4 мес.
головной мозг	4 мес.	4 мес.	4 мес.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1 и в таблице 5.



Рисунок 1 - Дизайн экспериментальной части исследования

Таблица 5 – Дизайн экспериментальной части исследования

Группа	Возраст, месяц	Определение уровня ксипептина и тестостерона в крови	Определение концентрации норэпинефрина и серотонина в структурах головного мозга		
			гипоталамус	гиппокамп	миндалевидный комплекс
Контроль	4	+	+	+	+
Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во втором триместре	4	+	+	+	+
Самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации в третьем триместре	4	+	+	+	+

Критерии исключения: любые отклонения от стандартов линии Wistar- по весу, возрасту и видимые признаки.

### Лабораторные методы исследования

Концентрацию норэпинефрина и серотонина в структурах мозга определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на "Beckman System Gold" с электрохимическим детектором LC-4C. В исследованиях использовали структуры, участвующие в реализации поведенческих реакций - гиппокамп, миндалевидный комплекс, гипоталамус, которые были выделены при  $-20^{\circ}\text{C}$  и хранились в жидком азоте до хроматографического анализа.

Выделенные структуры мозга гомогенизировали в охлажденной 0,1 N хлорной кислоте, центрифугировали при 14000 g в течение 7 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ .

Каждая структура из мозга крыс хранилась в отдельной 0,2 mL пробирке. После взвешивания переносилась в 0,5 mL пробирку, где гомогенизировали в течение 45- 60 секунд на ледяной подложке с помощью микрогомогенизатора с наконечником из стальной проволоки. Далее, гомогенат центрифугировали в этой же пробирке в

микроцентрифуге (Bachman, Германия). Слой супернатанта фильтровали через 0,20-мм Millipore фильтр. Часть супернатанта в объеме 20 мкл вводили в систему HPLC-ED. Аналитическое время пробега пробы в хроматографической колонке составляло 18 минут в изократическом режиме при скорости 1.0 мл/мин. 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.

Концентрации кисспептина в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием ElisaKit набора (CSB-E1343r TestEnzyme-linked Immunosorbent AssayKit For the quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1), China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

Концентрация тестостерона в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием ElisaKit набора (CSB-E05100r Test Enzyme-linked Immunosorbent AssayKit For the quantitative determination of rat testosterone concentrations, China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 25,6 нг/мл, 6,4 нг/мл, 2 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,13 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

В ходе подготовки и проведения эксперимента были соблюдены принципы гуманного отношения к лабораторным животным в соответствии с «Руководящими методическими материалами по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств» (1984), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)

и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267).

### **2.3 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.

### **ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕНАТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРАНДРОГЕНЕМИИ НА ПОЛОВОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМСТВА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ)**

В соответствии с современными представлениями о половой дифференцировке пренатальное влияние и количество андрогенов играют ключевую роль как в процессе анатомической, в первой половине беременности, так и психологической, во второй половине беременности, дифференцировки пола. Поскольку искусственно индуцированную модель гиперандрогенемии для изучения действия андрогенов на ЦНС не представляется возможным создать на клиническом материале, она была реализована на экспериментальных животных.

Целью экспериментального раздела исследования было изучение основных факторов, которые являются наиболее значимыми в формировании различных составляющих пола человека.

Опыты выполнены на 59 половозрелых самках крыс линии Wistar, выращенных в условиях вивария. В настоящем исследовании у самок крыс линии Wistar создавали модель экспериментально индуцированной гиперандрогенемии в течение беременности на различных сроках. Экспериментальная модель гиперандрогенемии во время беременности создавалась путем введения беременным самкам на 11 и 18 сутки гестации внутривбрюшинно инъекции тестостерона в дозе 30 мг/кг. Беременным самкам интактных крыс вводили в эти же сроки стерильный апиригенный физиологический раствор (0.01 мл/г 0.9% NaCl внутривбрюшинно). Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека было следующим. Крысы 4-месячного возраста – завершившееся половое созревание у человека.

Исследуемое потомство участвовало в биохимическом исследовании концентрации нейромедиаторов (норэпинефрина и серотонина) в структурах мозга методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также в определении плазменных уровней тестостерона и кисспептина.

Изучены нейромедиаторные регуляторы (норэпинефрин и серотонин), которые были описаны как модулирующие половую дифференцировку мозга. Структуры головного мозга, а именно, миндалевидный комплекс, гиппокамп и гипоталамус, в которых определялся уровень нейромедиаторов, имеют непосредственное отношение к половому развитию, и в процессе эволюции их роль увеличивалась и изменялась.

Кроме того, учитывая, что лиганд-рецепторная система KISS/KISS1R в настоящее время рассматривается как один из ключевых регуляторов полового созревания, поддержания репродуктивной функции и половой дифференцировки мозга, представило интерес определение активности этой системы.

Таким образом, созданная нами модель пренатальной гиперандрогенизации, направленная на изучение нейромедиаторного профиля в структурах ЦНС и уровня кисспептина и тестостерона в плазме крови, позволила изучить нейропептидную регуляцию половой дифференцировки мозга.

В процессе исследования потомство было получено от гиперандрогенизированных самок на разных сроках гестации. В ходе осмотра полученного потомства у крыс, рожденных от гиперандрогенизированных самок во втором триместре, отмечаются врожденные пороки развития хвостов и задних лапок (перетяжки, укорочение, фокомелия). Так же среди потомства, полученного от самок с гиперандрогемией во 2 триместре, отмечается более высокий процент мертворождения (18,9%), в сравнении с потомством, полученным от самок с гиперандрогемией в 3 триместре, где аналогичный показатель составляет всего 6% (рисунок 2).

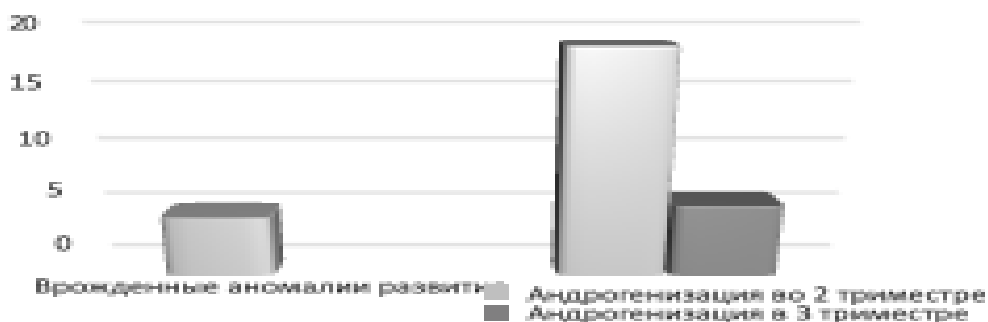


Рисунок 2 – Врожденные аномалии развития и мертворождения среди потомства пренатально гиперандрогенизированных самок крыс

### Анализ уровня нейромедиаторов в структурах центральной нервной системы

В качестве изучаемых структур были выбраны гипоталамус, миндалевидный комплекс и гиппокамп. Были определены уровни нейромедиаторов: норэпинефрина и серотонина в данных структурах головного мозга у половозрелых особей крыс, рожденных в условиях пренатальной гиперандрогенизации и у интактных крыс. Полученные данные были проанализированы и сделаны выводы.

Абсолютные значения концентраций норэпинефрина и серотонина в гипоталамусе представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Абсолютные значения концентраций норэпинефрина и серотонина в гипоталамусе

Нейромедиатор	Показатель	Потомство андрогенизированных во 2 триместре крыс (n=10)	Потомство андрогенизированных в 3 триместре крыс (n=10)	Контроль (n=10)	p
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,432	1,294	1,637	P* > 0,05 P** < 0,05
	Дисперсия	0,236	0,033	0,004	
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	3,642	3,685	2,132	P* < 0,001 P** < 0,01
	Дисперсия	0,471	0,383	0,020	

Примечание: p\* - сравнение группы андрогенизированных в 2 триместре с контролем; P\*\* - сравнение группы андрогенизированных в 2 триместре с контролем; достоверный уровень значимости различий при p < 0, 05.

При анализе уровня моноаминовых нейромедиаторов в ядрах гипоталамуса были получены данные о достоверном повышении концентрации норэпинефрина в исследуемых группах в сравнении с интактными особями, в то время как изменение концентрации серотонина происходило лишь в группе с пренатальной гиперандрогенизацией в 3 триместре. Так в экспериментальной группе (2триместр) медиана (Me) концентрации норэпинефрина составила 3,642 нг/мл, а в экспериментальной группе (3 триместр) - 3,685 нг/мл, что достоверно выше, чем в группах контроля, где аналогичный показатель составил 2,132 нг/мл ( $p < 0,001$ ). Иные результаты были получены в отношении концентрации серотонина в ядрах гипоталамуса. Экспериментальная модель пренатальной гиперандрогенизации во 2 триместре не оказала достоверного влияния на концентрацию серотонина у самок крыс в сравнении с контролем, где медиана (Me) соответственно составила 1,432 нг/мл и 1,637 нг/мл ( $p > 0,05$ ). Однако более поздняя андрогенизация в 3 триместре привела к снижению концентрации серотонина и составила 1,294 нг/мл при уровне серотонина в контрольной группе 1,637 нг/мл ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, был сделан вывод о значимом влиянии факта пренатальной андрогенизации на концентрацию норэпинефрина в ядрах гипоталамуса в сторону увеличения данного показателя и на снижение концентрации серотонина, но лишь при поздних сроках андрогенизации.

Абсолютные значения концентраций норэпинефрина и серотонина в миндалевидном комплексе представлены в таблице 7.



Таблица 7 - Абсолютные значения концентраций норэпинефрина и серотонина в миндалевидном комплексе

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n=10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n=10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n=10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,674	0,920	0,781	p*>0,05 p***>0,05
	Дисперсия	0,005	1,757	1,789	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,428	1,221	0,885	p*>0,05 p***<0,05
	Дисперсия	0,002	0,090	0,111	

Примечание: p\* - сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p\*\* - сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем; достоверный уровень значимости различий при p < 0,05.

При анализе уровня нейромедиаторов в структурах миндалевидного комплекса были получены данные об отсутствии достоверного изменения концентраций норэпинефрина и серотонина в сравнении с интактными особями. Так в экспериментальной группе (2 триместр) медиана (Me) концентрации норэпинефрина составила 0,920 нг/мл, а в экспериментальной группе (3 триместр) - 0,781 нг/мл, в сравнении с группой контроля, где аналогичный показатель составил 0,674 нг/мл ( $p > 0,05$ ). Экспериментальная модель пренатальной гиперандрогенизации во 2 триместре не оказала достоверного влияния на концентрацию серотонина у самок крыс в сравнении с контролем, где медиана (Me) соответственно составила 1,221 нг/мл и 1,428 нг/мл. В то же время факт более поздней андрогенизации в 3 триместре привела к снижению концентрации серотонина и составила 0,885 нг/мл при уровне его в контрольной группе 1,428 нг/мл ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, был сделан вывод о том, что вне зависимости от сроков гиперандрогенизации влияния на уровень норэпинефрина при сравнении с группой контроля выявлено не было. В отношении серотонина было подтверждено

достоверное снижение концентрации только в экспериментальной модели в 3 триместре.

Абсолютные значения концентраций нейромедиаторов в гиппокампе представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Абсолютные значения концентраций норэпинефрина и серотонина в гиппокампе

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n=10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n=10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n=10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,068	1,517	2,068	p* < 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,001	1,486	0,985	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,837	0,989	1,121	p* > 0,05 p** > 0,05
	Дисперсия	0,001	0,036	0,043	
Примечание: p* - сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p** - сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем; достоверный уровень значимости различий при p < 0,05.					

При анализе концентрации норэпинефрина в гиппокампе в условиях пренатальной гиперандрогенизации во 2 и 3 триместрах было выявлено достоверное повышение его уровня в сравнении с контролем (медиана (Me) соответственно 1,517 нг/мл и 0,068 нг/мл (p < 0,05) во 2 триместре и 2,068 нг/мл и 0,068 нг/мл (p < 0,05) в 3 триместре).

В отношении серотонина подобных изменений не было, уровень его вполне был сопоставим с группой контроля (медиана (Me) соответственно 0,989 нг/мл и 0,837 нг/мл (p > 0,05) во 2 триместре и 1,121 нг/мл и 0,837 нг/мл (p > 0,05) в 3 триместре.

Таким образом, при проведении исследования в структурах гиппокампа были отмечены значимые влияния гиперандрогенизации на разных сроках гестации на

повышение уровня норэпинефрина и отсутствие таковых влияний на концентрацию серотонина.

### **Заключение по первой части эксперимента**

Анализируя существующие данные, следует отметить, что в ряде исследований при введении в неонатальном периоде жизни ингибиторов синтеза серотонина констатировано уменьшение частоты маунтинга и изменение поведенческих реакций у самцов крыс по женскому типу [19].

Маскулинизация поведенческих реакций у самок, наоборот, отмечалась при введении ингибиторов моноаминоксидазы и, как следствие, ассоциирована с высокими концентрациями серотонина и катехоламина [19].

Подводя итог данной части экспериментального исследования, следует отметить, что изучение уровня моноаминовых нейромедиаторов проводилось в структурах головного мозга, ассоциированных с половым диморфизмом.

По данному разделу сделано заключение о том, что вне зависимости от сроков воздействия пренатальная гиперандрогенизация оказывает значимое влияние на повышение концентрации норэпинефрина в гиппокампе и гипоталамусе и не влияет на уровень данного нейромедиатора в миндалевидном комплексе.

Изменения уровня серотонина были выявлены в случае гиперандрогенизации на поздних сроках и заключались в снижении его концентрации в гипоталамусе и миндалевидном комплексе.

Таким образом, наиболее значимые изменения нейромедиаторного сигналинга в структурах головного мозга, ответственных за половую дифференцировку, выявлены при пренатальной андрогенизации на поздних сроках гестации.

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 в взаимосвязи с инверсией половой ориентации.

### Анализ уровня тестостерона в плазме крови

Как было показано ранее, ключевая роль в дифференцировке пола отводится действию тестостерона. В ходе исследования был определен уровень тестостерона плазмы крови интактных крыс и у крыс, рожденных в условиях пренатальной андрогенизации. Полученные данные были проанализированы, сделаны заключения. Абсолютные значения концентрации тестостерона в плазме крови самок крыс различных групп представлены в таблице 9.

Таблица 9— Концентрация тестостерона в плазме крови

Группы	Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл)					Ме	W-критерий*	P
Контроль 4 мес. (n = 5)	3,02	5,13	4,67	5,22	6,47	5,13	** 0,31 *** 0,94 ****0,94	**>0,05 ***>0,05 ****>0,05
2 триместр 4 мес. (n = 5)	6,40	6,75	3,01	5,69	4,61	5,69		
3 триместр 4 мес. (n = 5)	5,04	2,99	1,63	3,97	7,46	3,97		
Примечание. * W-критерий — критерий Вилкоксона; ** — сравнение «контроль 4 мес. — 2 триместр 4 мес.»; ***— сравнение «контроль 4 мес. — 3 триместр 4 мес.»; **** — сравнение «2 триместр 4 мес. — 3 триместр 4 мес.». Достоверный уровень значимости различий при p < 0,05.								

При проведении анализа уровня тестостерона в крови самок крыс не было выявлено достоверных изменений в уровне тестостерона в сравнении с группой

контроля. Так, при гиперандрогенизации во 2 триместре медиана концентрации тестостерона в плазме самок составила 5,69 нг/мл против 5,13 нг/мл в контроле ( $p > 0,05$ ). При анализе концентраций тестостерона самок, рожденных в условиях пренатальной гиперандрогенизации в 3-м триместре, медиана исследуемой группы и контроля составили 3,97 нг/мл и 5,13 нг/мл соответственно ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, в ходе исследования у самок крыс, рожденных в условиях пренатальной андрогенизации, вне зависимости от срока гестации, не было выявлено достоверных изменений в плазменных концентрациях уровня тестостерона.

### **Анализ уровня кисспептина в плазме крови**

Как было установлено в исследованиях ряда авторов, лиганд-рецепторная система Kiss/Kiss1 участвует не только в запуске центральных механизмов полового развития и поддержания его активности, но и в регуляции основ половой дифференцировки мозга. В данном фрагменте исследования был изучен уровень кисспептина в биологической среде крови.

В ранее проведенных исследованиях было показано, что кисспептин, который был изучен в настоящее время, как регулятор старта полового развития и центрального запуска гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, находится в разнонаправленных взаимоотношениях с тестостероном в плазме крови.

Для оценки системы кисспептина был определен уровень кисспептина плазмы крови интактных крыс и крыс, рожденных в условиях пренатальной андрогенизации в различные возрастные периоды и стадии полового созревания. Абсолютные значения концентрации кисспептина в плазме крови самок крыс различных групп представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Концентрация кисспептина в плазме крови

Группы	Концентрация кисспептина в плазме (нг/мл)					Me	W-критерий *	P
Контроль 4 мес. (n = 5)	0,39	0,29	0,23	0,31	0,41	0,31		
2 триместр 4 мес. (n = 5)	0,99	0,27	0,35	0,93	0,67	0,67	**1,36 *** 2,6 **** 0,1	**>0,05 *** <0,01 ****>0,05
3 триместр 4 мес. (n = 5)	0,64	0,44	0,75	0,86	0,51	0,64		
Примечание. * W-критерий — критерий Вилкоксона; ** — сравнение «контроль 4 мес. — 2 триместр 4 мес.»; *** — сравнение «контроль 4 мес. — 3 триместр 4 мес.»; **** — сравнение «2 триместр 4 мес. — 3 триместр 4 мес.». Достоверный уровень значимости различий при $p < 0,05$ .								

При анализе плазменных концентраций кисспептина был выявлен ряд изменений. В группе потомства крыс с андрогенизацией во 2 триместре медиана уровня кисспептина составила 0,67 нг/мл в возрасте 4 месяца, в то время как контроль для этого же возраста составил 0,31 нг/мл. Данные изменения не закономерны и разнонаправлены. В случае потомства, андрогенизированного в 3 триместре, медиана кисспептина 4-х месячных крыс по сравнению с контролем составила - 0,64 нг/мл и 0,31 нг/мл соответственно ( $p < 0,05$ ). Таким образом, был сделан вывод, что пренатальная андрогенизация оказывает значимое влияние на концентрацию кисспептина в крови лишь в третьем триместре.

### Заключение по второй части эксперимента

По данному разделу было сделано заключение о том, что пренатальная гиперандрогенизация оказывает не прямое действие на потомство и значимо не влияет на плазменные концентрации тестостерона. При этом пренатальная андрогенизация вследствие опосредованного воздействия тестостерона приводит к значимому увеличению концентрации кисспептина. В исследованиях ряда авторов активно обсуждается роль лиганд-рецепторной системы KISS/KISS1R не только в процессах

полового созревания и поддержания репродуктивной функции, но и в регуляции половой дифференцировки мозга. Повышение уровня кинспептина стимулирует активацию целого каскада глия-нейрональных связей, которые через сигнальные молекулы и нейропептиды передают сигналы на гипоталамические ядра и меняют взаимосвязь многих нейротрансмиттеров, участвующих в формировании половой дифференцировки мозга.

Основываясь на современной концепции половой дифференцировки мозга, предполагающей одним из основных детерминирующих факторов - дифференцирующее действие тестостерона именно во второй половине гестации, т.е. на более поздних по отношению к анатомической дифференцировке пола сроках, следует подчеркнуть, что практически все значимые изменения в сравнении с контрольной группой потомства интактных крыс были выявлены именно в группе с андрогенизацией на поздних сроках гестации, что, в связи с этим, может рассматриваться как обоснование нейрогуморальных основ нарушений формирования психологического пола. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кинспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

## ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА В АССОЦИИИ С ГЕНОТИПОМ

Основной целью исследования, в целом, явилось комплексное изучение проблемы нарушений формирования пола с точки зрения нейроэндокринологии, клинического фенотипа, генетических основ и психологических аспектов.

В настоящее время неоспоримым является факт влияния и количества андрогенов на пренатальном этапе на половую дифференцировку человека.

Пренатальный период развития является основополагающим с точки зрения эмбриогенеза в общем, и формирования пола, в частности. Результаты многочисленных исследований убедительно показали превалирующую роль в дифференцировке пола уровня андрогенов пренатально и наличия информации с определенных генов, причем поиск последних находится в зоне исследовательского интереса.

Активное изучение генетики пола получило свое развитие с 90-х годов прошлого века, однако исследования последних лет, улучшение технических возможностей, внедрение молекулярно-генетической методики секвенирования нового поколения, позволяющее включать в исследование одновременно большое количество генов, которые могут играть роль в нарушениях половой дифференцировки, существенно расширили наше представление о роли генетики [71].

Изначально гены, локализующиеся на половых хромосомах, находились в поле пристального внимания, однако впоследствии довольно быстро стало очевидным, что гены аутосом, являясь синергистами/антагонистами генов, локализованных на половых хромосомах, также участвуют в половой дифференцировке, и таким образом, стало очевидным, что именно совокупность трансляционной информации этих генов



реализует эффекты, которые клинически выражаются в правильном формировании пола у новорожденного ребенка.

В клинический раздел исследования было включено 70 пациентов из разных регионов РФ, проходивших обследование на базах ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». У всех пациентов были проведены стандартное клиническое, лабораторное и инструментальное обследование.

Проведено обследование 70 пациентов с различными вариантами нарушений формирования пола. Молекулярно-генетическое обследование проведено в 100% случаев. Структура по нозологическим вариантам представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Структура нозологических вариантов у пациентов с НФП

Нозологический вариант	Количество пациентов	% от общего количества пациентов
ВГКН (21 – гидроксилазная недостаточность)	42	60%
Вариант НФП с проксимальной формой гипоспадии	12	17 %
Дисгенезия гонад с кариотипом 46, ХУ	8	11,5 %
Синдром полной и парциальной резистентности к андрогенам	5	7 %
Нарушение биосинтеза андрогенов (СYP17A1, ВГКН: 17-альфа-гидроксилазная недостаточность)	1	1,5 %
46, XX, тестикулярное НФП, (синдром де ля Шапель)	1	1,5 %
Овотестикулярное НФП	1	1,5 %

Как следует из таблицы, большинство пациентов, как и в других когортных исследованиях пациентов с НФП, составила группа ВГКН (42 человека).

В настоящее исследование были включены пациенты с ВГКН с женским хромосомным набором - кариотипом 46, XX. Все пациенты, которым был установлен диагноз ВГКН:21-гидроксилазная недостаточность, были обследованы по клиническим показаниям. У всех обследованных пациентов идентифицированы

патологические варианты в гене *CYP21A2*: 34% - I2spl, 22% - R356W, 17% - I172N, 28% - P30L.

Клиническая картина у всех была представлена классической формой ВГКН: 45 % пациентов имели простую вирильную форму, 55% - сольтерющую форму, с клиническими признаками пренатальной вирилизации по шкале Prader III-IV. В 100% случаев проведена хирургическая пластика наружных гениталий. Данная группа пациентов была достаточно полно обследована с точки зрения молекулярной генетики в рамках клинического протокола обследования, поэтому представляла больший интерес с точки зрения комплексной оценки психологического пола.

Пациенты, не относящиеся к группе ВГКН, были обозначены большой группой – другие варианты НФП. Количество пациентов в данной группе – 28 человек. Представлена она следующей структурой: 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 -синдромом де ля Шапель (1 человек).

В данной группе пациентов обследование было проведено в соответствии с клиническим протоколом, диагноз был выставлен в соответствии с существующей международной классификацией. Данная группа представила интерес не только с точки зрения их психологического пола, но и с точки зрения молекулярно-генетического анализа, и именно в этой группе проведен анализ методом NGS на панель «Нарушения формирования пола», включавший в себя 80 генов, ассоциированных с разными нозологическими вариантами нарушений половой дифференцировки.

Клиническая характеристика пациентов, обследованных методом NGS, представлена в таблице 12.

Таблица 12 –Характеристика пациентов, обследованных методом NGS

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
1	1985	НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады представлены рубцовыми тяжами(streak) Генитальный пол: наружные гениталии развиты правильно по женскому типу; внутренние гениталии – гипоплазированная матка с трубами Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>MAP3K1</i> (600982)	<i>MAP3K1</i> chr5:56178269, rs754640057, NM_005921.1: c.T3242A;p.Met1081Lys в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,004999% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
2	2016	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в мошонке Генитальный пол: наружные гениталии - мошоночная гипоспадия, расщепление мошонки Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>MAP3K1</i> (600982)       <i>MAMLD1</i> (300120)	<i>MAP3K1</i> chr5:56177906, rs763146065, NM_005921:c.G2879A: p.Gly960Asp в гетерозиготном состоянии  <i>MAMLD1</i> chrX:149638811, rs782039491, NM_005491.4:c.A966C :p.Gln322His в гемизиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,0008023% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных  Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,01208% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
3	2006	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в малом тазу гонады не визуализируются Генитальный пол: наружные гениталии сформированы неопределенно, гипоплазированная мошонка, микропенис 1 см, деформированный за счет мошоночной гипоспадии, урогенитальный синус; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют; Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует; Паспортный пол: дважды смена пола- с рождения женский, далее мужской, и женский Психологический пол: женский	<i>MAMLD1</i> (300120)	<i>MAMLD1</i> chrX:149639353, rs367735248, NM_001177465.3:c.С1433A:p.Ala478Glu в гемизиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,003282% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
4	1982	НФП с кариотипом 46, XY, нарушение биосинтеза тестостерона (ВГКН в следствии 17-гидроксилазной недостаточности)	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в наружных отделах паховых каналов. Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу, атрезия влагалища; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад низкая Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>CYP17A1</i> (609300)	<i>CYP17A1</i> chr10:102832577, rs104894139, c.1073G>A:p.Arg358Gln в гомозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,001592% Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
5	2000	НФП с кариотипом 46, XY, синдром резистентности к андрогенам	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в малом тазу у входа в паховый канал Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу, наружное отверстие уретры смещено к преддверию влагалища, слепо заканчивающегося; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>AR</i> (313700)	<i>AR</i> chrX:66941694, NM_000044: exon6:c.C2338T;p.Arg780Trp в гемизиготном состоянии	Ранее описанный вариант Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания
6	1991	НФП с кариотипом 46, XY, синдром резистентности к андрогенам	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в малом тазу Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу, влагалище слепо заканчивается; внутренние гениталии – дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>AR</i> (313700)	<i>AR</i> chrX:66766549, NM_000044:c.A1561T;p.lys521Ter в гемизиготном состоянии	Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: патогенный вариант и является причиной заболевания.

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
7	1998	НФП с кариотипом 46, XY, синдром резистентности к андрогенам	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в паховых каналах Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу; внутренние гениталии – дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>AR</i> (313700)	<i>AR</i> ChrX:66905958, NM_000044.6:c.G1875T:p.Met625Ile в гемизиготном состоянии  <i>AR</i> ChrX:66905959, rs1569305860, NM_000044.6:c.A1876T:p.Thr626Ser в гемизиготном состоянии	Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания  Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0.0005486% Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания
8	2003	НФП с кариотипом 46, XY, дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: левая гонада у наружного края пахового канала, правая в малом тазу Генитальный пол: наружные гениталии - смешанное строение с урогенитальным синусом, вирилизация в пубертате (кавернозные тела 3,5 см); внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена; Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>NR5A1</i> (184757)	<i>NR5A1</i> Chr9:127265603, NM_004959.3:c.C72G:p.His24Gln в гетерозиготном состоянии	Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
9	2015	НФП с кариотипом 46, XY, синдром резистентности к андрогенам	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонада справа в мошонке, слева по ходу пахового канала Генитальный пол: наружные гениталии - неопределенное строение, мошонка частично расщеплена, уrogenитальный синус, половой член практически не сформирован, головка отсутствует; внутренние гениталии – дериватов мюллеровых протоков нет; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: смена: мужской, далее женский Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>SEMA3A</i> (603961)  <i>AR</i> (313700)  <i>PTF1A</i> (607194)	<i>SEMA3A</i> chr7:83636785, NM_006080.2:c.A1024G:p.Met342Val в гетерозиготном состоянии  <i>AR</i> chrX:66942818, NM_000044:c.G2599C:p.Val867Leu в гемизиготном состоянии  <i>PTF1A</i> chr10:23482123,NM_178161.2:c.G664T:p.Asp222Tyr в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,0004247% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных  Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: патогенный вариант и является причиной заболевания.  Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
10	2015	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в расщепленной мошонке Генитальный пол: наружные гениталии - мошоночная гипоспадия, микропенис; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков не обнаружено; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	–	–

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
11	2012	НФП с кариотипом 46, XY, дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в паховых каналах Генитальный пол: наружные гениталии - близко к женскому полу, частичное сращение промежностного шва, уrogenитальный синус, кавернозные тела значительно гипоплазированы; внутренние гениталии -дериватов мюллеровых протоков нет; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: женский Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>NR5A1</i> (184757)  <i>CEP41</i> (610523)	<i>NR5A1</i> chr9:127245206, NM_004959.3:c.1216_1217 delCT:p.Leu406fs в гетерозиготном состоянии  <i>CEP41</i> chr 7: 130056759, NM_018718.2: c.145+1G>T в гетерозиготном состоянии	Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания  Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: патогенный вариант и является причиной заболевания.
12	2001	НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады представлены рубцовыми тяжами (streak) Генитальный пол: наружные гениталии: сформированы правильно по женскому типу; внутренние гениталии -дериваты мюллеровых протоков (гипоплазированная матка с трубами); Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	<i>MAP3K1</i> (600982)  <i>CEP41</i> (610523)	<i>MAP3K1</i> chr5:56152500, NM_005921.2:c.A556G:p.A rg186Gly в гетерозиготном состоянии  <i>CEP41</i> chr7: 130040551, NM_018718.2:c.G754A:p.G ly252Arg в гетерозиготном состоянии	Ранее не описанный вариант. Частота GnomAD отсутствует Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных  Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,01899 %. Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных



№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
13	2018	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады в мошонке Генитальный пол: наружные гениталии - гипоплазия мошонки, наружное отверстие уретры у корня микропениса; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—
14	2015	НФП с кариотипом 46, XY, овотестикулярное НФП	Генетический пол: мужской Гонадный пол: овотестис Генитальный пол: наружные гениталии- неопределенное строение, мошоночная гипоспадия, урогенитальный синус, расщепление мошонки в нижней трети; внутренние гениталии - рудимент матки Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
15	2014	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в расщепленной мошонке Генитальный пол: наружные гениталии неопределенного строения, мошонка расщеплена, гипоплазирована, микропенис, гипоплазия кавернозных тел, мошоночная гипоспадия; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>CHD7</i> (608892)	<i>CHD7</i>  chr8:61693942, rs377139749, NM_017780.3:c.2053_2058dup GCAAAAp.Lys686_Thr687ins AlaLys в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,006232 %. Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
16	2016	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в паховых каналах Генитальный пол: наружные гениталии- мошонка гипоплазирована, расщеплена, микропенис; мошоночная гипоспадия; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>BBS4</i> (600374)	<i>BBS4</i>  chr15:73028219-73028221, rs759315856, NM_033028:exon14:c.1160_1162delAGA:p.387_388del в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,004887 %. Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (ОМIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
17	2018	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: левое яичко в мошонке, правое в паховом канале Генитальный пол: наружные гениталии недостаточно маскулинизированы, мошоночная гипоспадия с отверстием уретры у корня члена, микропенис, агенезия правой половины мошонки; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	–	–
18	2000	НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады представлены рубцовыми тяжами (streak) Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу; внутренние гениталии - маточные трубы с фибриями, матка гипоплазирована Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует (гонадэктомия, заместительная гормональная терапия) Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	Вариантов не выявлено	–	–

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
19	1996	НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады представлены рубцовыми тяжами (streak) Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу; внутренние гениталии - гипоплазированная матка с трубами Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует (гонадэктомия, заместительная гормональная терапия) Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	Вариантов не выявлено	—	—
20	2014	НФП с кариотипом 46, XY, синдром резистентности к андрогенам	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в паховых каналах Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по женскому типу; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков нет; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: женский Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
21	2015	НФП с кариотипом 46, XY, дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: правая гонада-под печенью, левая гонада- фиксирована на маточной трубе Генитальный пол: наружные гениталии сформированы правильно по мужскому типу; внутренние гениталии - гипоплазированная матка Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—
22	2000	НФП с кариотипом 46, XX, тестикулярное НФП (синдром Де ля Шапель)	Генетический пол: женский Гонадный пол: гонады отсутствуют Генитальный пол: наружные гениталии сформированы по мужскому типу; внутренние гениталии - простата гипоплазирована Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует (заместительная гормональная терапия тестостероном) Паспортный пол: мужской Психологический пол: мужской	Вариантов не выявлено	—	—

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
23	1990	НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад	Генетический пол: мужской Гонадный пол: гонады представлены рубцовыми тяжами (streak) Генитальный пол: наружные гениталии по женскому типу; внутренние гениталии - гипоплазированная матка с трубами Гормональный пол: функциональная активность гонад отсутствует (гонадэктомия, заместительная гормональная терапия) Паспортный пол: женский Психологический пол: женский	Вариантов не выявлено	—	—
24	2018	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в мошонке с обеих сторон Генитальный пол: наружные гениталии по смешанному типу, мошонка расщеплена, промежностная форма гипоспадии, микропенис; внутренние гениталии: дериваты мюллеровых протоков отсутствуют Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
25	2017	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: яички в мошонке с обеих сторон Генитальный пол: наружные гениталии - мошонка частично расщеплена, мошоночная форма гипоспадии; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>DUSP6</i> (602748)          <i>IL17RD</i> (606807)	<i>DUSP6</i> chr12:89744637, rs 143946794, NM_001946.4:c.A566G:p.Asn189Ser в гетерозиготном состоянии          <i>IL17RD</i> chr3:57136522, rs 139956045, NM_017563.5:c.C964T:p.Arg322Cys в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,02016 % Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных          Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,004894 %. Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
26	2017	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: двусторонняя паховая ретенция яичек Генитальный пол: наружные гениталии-мошоночная гипоспадия, расщепление мошонки, половой член утоплен в кожной складке; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют; Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—

№	Год рождения	Диагноз	Компоненты пола	Ген (OMIM)	Нуклеотидная замена	Биоинформационный анализ выявленного варианта*
27	2018	46, XY/46, XX Хромосомное НФП. Мошоночная гипоспадия, абдоминальный крипторхизм слева	Генетический пол: половой мозаицизм Гонадный пол: справа гонада в паховом канале, слева гонада не определяется Генитальный пол: наружные гениталии недостаточно маскулинизированы, мошоночная гипоспадия с отверстием уретры у корня полового члена, расщепление крайней плоти; внутренние гениталии - дериваты мюллеровых протоков отсутствуют Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	Вариантов не выявлено	—	—
28	2017	НФП с кариотипом 46, XY, проксимальная форма гипоспадии	Генетический пол: мужской Гонадный пол: правое яичко в мошонке, левое в паховой области Генитальный пол: наружные гениталии - аплазия мошонки, искривление полового члена; внутренние гениталии - дериватов мюллеровых протоков нет Гормональный пол: функциональная активность гонад сохранена Паспортный пол: мужской Психологический пол: невозможно оценить в силу раннего возраста	<i>AKRIC4</i> (600451)	<i>AKRIC4</i> rs149782162, chr10:5238878, NM_001818.4:c.G48A:p.Met 16Ile в гетерозиготном состоянии	Ранее описанный вариант. Частота GnomAD 0,0006128% Критерии ACMG: вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных
*Биоинформационный анализ проводился с использованием баз национального центра биотехнологической информации						



Все выявленные варианты при NGS подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Биоинформационный анализ проведен с использованием проектов «1000 геномов», ESP6500 и Genome Aggregation Database (gnomAD), оценка клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных ClinVar и критерии ACMG.

Результаты проведенного генетического обследования методом NGS с использованием панели генов, ассоциированных с НФП, показали следующее. Всего выявлено 22 генетических варианта у 15 пациентов, что составляет 53% от числа обследованных. У 11 пациентов (39 %) выявленные варианты с частотой менее 0,01% в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП, с учетом наличия клинического фенотипа НФП, были расценены, как каузативные, из них 43 % нуклеотидных замен отнесены к ранее неописанным. Структура выявленных генетических вариантов методом NGS и ассоциация нозологических форм с выявленными генетическими вариантами представлена на рисунках 3а и 3б.

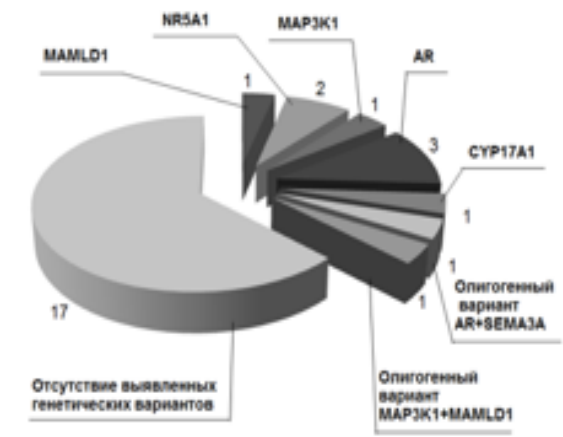


Рисунок 3а – Структура выявленных генетических вариантов методом NGS

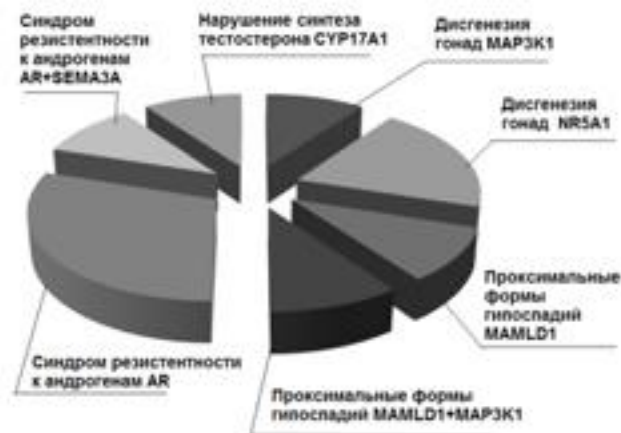


Рисунок 3б – Ассоциация нозологических форм с выявленными генетическими вариантами

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.

Заключение о патогенности выявленных вариантов основывалось на сопоставлении клинических данных пациентов с имеющимися данными о возможных фенотипах при нуклеотидных заменах в генах, ассоциированных с НФП, а также частоте встречаемости выявленных нуклеотидных замен с применением классификации ACMG.

В группе пациентов с НФП и подтвержденным генетическим вариантом 2 имели варианты более чем в одном гене (олигогенный генез НФП), при этом оба варианта могли быть расценены как вероятно патогенные в сопоставлении с имеющимися данными генетических баз, с учетом их низкой популяционной частотой встречаемости и фактом наличия нуклеотидных замен в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП. В одном случае сочетание вариантов в генах *AR* и *SEMA3A*, в другом случае – *MAP3K1* и *MAMLD1*, что составило 18 % от числа обследованных с выявленными вариантами. Также в двух случаях подтвержден семейный вариант НФП.

Представило интерес проведение анализа выявленных вариантов по типу наследования. 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.

Также в ходе исследования данной панелью NGS в 28% случаев от общего числа обследованных были установлены замены в нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с аутосомно-рецессивными вариантами НФП в гетерозиготном состоянии: данная группа не была расценена как причинная ввиду гетерозиготного состояния нуклеотидной замены. Но данный факт имеет крайне важное значение при планировании медико-генетического консультирования.

Для более расширенной характеристики ассоциаций клинического фенотипа с выявленными генетическими вариантами ниже дано более подробное описание пациентов с мутациями в генах, признанных вероятно патогенными. Описание представлено по группам ассоциации с выявленными вариантами.

### **Клиническая характеристика пациентов с вариантами в гене *MAP3K1***

В нашем исследовании было выявлено 2 пациента с вариантами в гене *MAP3K1*. Пациент К.

Поводом к первоначальному обследованию было обращение в связи с первичной аменореей в возрасте 15 лет. Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: 46, XY – мужской кариотип. Клинически пациентка имела женский фенотип. Наружные гениталии сформированы правильно по женскому типу, клитор нормальных размеров, малые половые губы гипоплазированы, увеличение промежностного шва, вход во влагалище узкий. Внутренние гениталии: гипоплазия матки. Дисгенезия гонад. Гормональное обследование: ЛГ 48,3 мМЕ/мл, ФСГ 49,5 мМЕ/мл, эстрадиол <5,0 пг/мл, тестостерон 0,57 нмоль/л, пролактин 5,17 нг/мл. Визуализация органов малого таза (УЗИ, МРТ): гипоплазия матки и агенезия гонад.

В данном клиническом случае был выставлен нозологический вариант: НФП с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад (синдром Свайера). Гипергонадотропный гипогонадизм.

Молекулярно-генетическое обследование методом секвенирования нового поколения (платформа Illumina MiSeq): выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене *MAP3K1* (Chr5:56178269,rs754640057, NM\_005921.2: с.Т3242А:р.Мет1081Лис) в гетерозиготном состоянии (рисунок 4). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0.00004999 (0,004999%), что является низкой популяционной частотой. Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

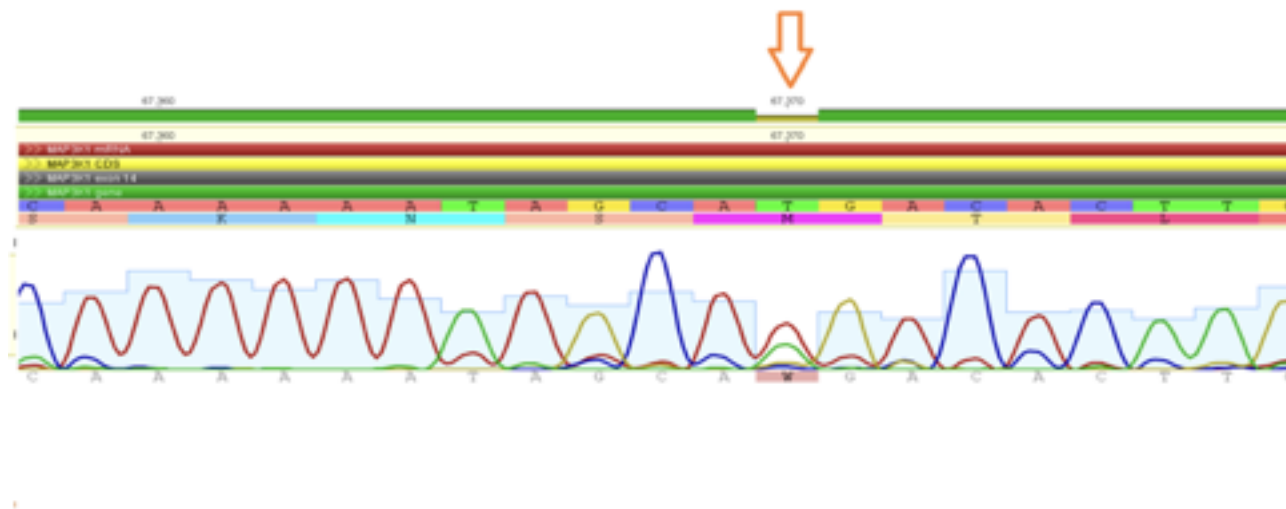


Рисунок 4 – Молекулярно-генетическое исследование гена *MAP3K1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее описанный вариант в гене, описанном в ассоциации с НФП, с низкой популяционной частотой. Учитывая наличие клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

Тактика: учитывая генетически подтвержденный нозологический вариант, женский паспортный пол, самоидентификацию в женском поле, отсутствие

функциональной активности гонад и высокий онкологический риск (наличие Y-хромосомы в кариотипе), была проведена гонадэктомия с последующим назначением заместительной гормональной терапии в соответствии с женским полом.

#### Пациент Б.

Обследование пациента было инициировано в возрасте 17 лет в связи с отсутствием старта пубертата и первичной аменореей. Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: 46, XY – мужской кариотип. Наружные половые органы сформированы правильно по женскому типу. Внутренние гениталии: фрагментированные маточные трубы с неравномерной атрофией слизистой, гипоплазированная матка. Дисгенетичные гонады билатерально. Гормональное обследование: ФСГ 116 мМЕ/мл, ЛГ - 34,3, мМЕ/мл, эстрадиол <5 пг/мл, тестостерон 1,27 нмоль/л – гипергонадотропный гипогонадизм. При визуализации органов малого таза (УЗИ, МРТ, диагностическая лапароскопия) выявлены дериваты мюллеровых протоков: гипоплазированная матка с трубами, дисгенетичные гонады.

В этом клиническом случае выставлен диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, полная дисгенезия гонад (синдром Свайера). Гипергонадотропный гипогонадизм.

При проведении молекулярно-генетического исследования в образце ДНК выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене MAP3K1 (Chr5:56152500, NM\_005921.2:c.A556G:p.Arg186Gly) в гетерозиготном состоянии (рисунок 5). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов" и GnomAD.

Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

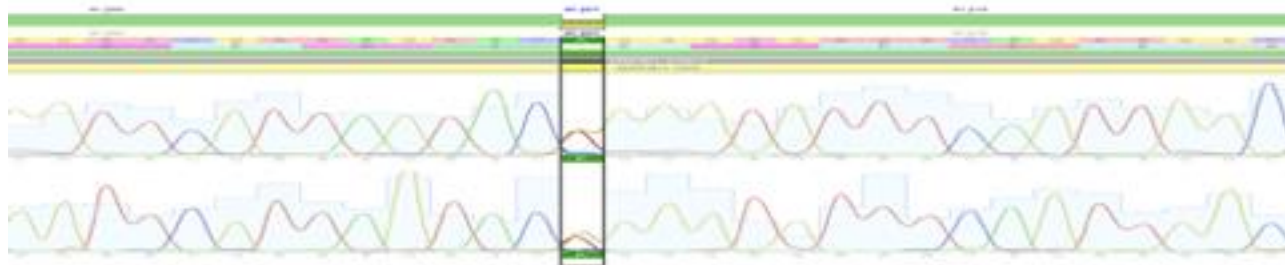


Рисунок 5 - Молекулярно-генетическое исследование гена *MAP3K1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Также выявлен вариант нуклеотидной последовательности в гене *CEP41* (chr7:130040551, rs201834429, NM\_018718.2:c.G754A:p.Gly252Arg) в гетерозиготном состоянии (рисунок 6). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0.0001899 (0,001899%). Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

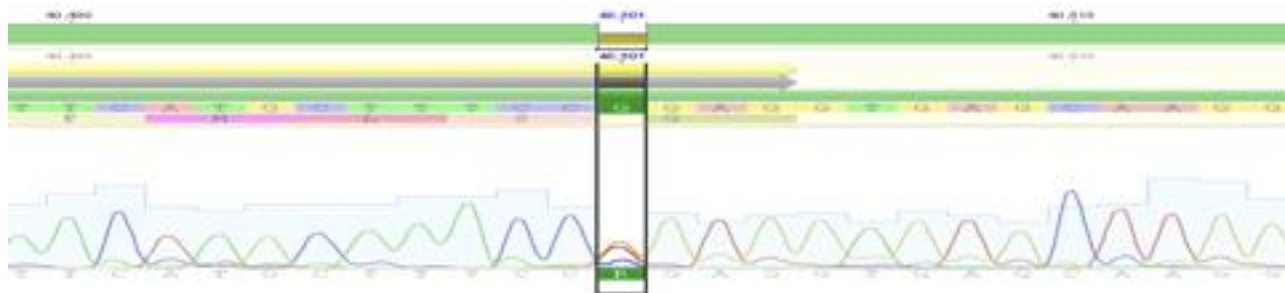


Рисунок 6 - Молекулярно-генетическое исследование гена *CEP41*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

В данном клиническом случае были выявлены варианты в двух генах, ранее описанных в ассоциации с нарушениями половой дифференцировки.

Таким образом, выявлен ранее не описанный вариант в гене *MAP3K1*, описанном в ассоциации с НФП, с отсутствующей популяционной частотой. Учитывая наличие клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен, как каузативный по отношению к патологии пола.

Находки в гене *CEP41* ассоциированы с развитием синдрома Жубера (OMIM 614464), наследуемого по аутосомно-рецессивному типу. Таким образом, учитывая гетерозиготное состояние выявленного варианта, отсутствие соответствующей клинической картины синдрома Жубера позволило сделать вывод о клинической незначимости варианта в отношении половой дифференцировки. Однако, что немаловажно, выявленный вариант необходимо учитывать при планировании медико-генетического консультирования семьи.

Тактика: учитывая генетически подтвержденный нозологический вариант, женский паспортный пол, самоидентификацию в женском поле, отсутствие функциональной активности гонад и высокий онкологический риск (наличие Y – хромосомы в кариотипе), была проведена гонадэктомия с последующим назначением заместительной гормональной терапии в соответствии с женским полом.

**Заключение по случаям.** При анализе генетических баз данных получена информация, что при наличии патогенных вариантов в гене *MAP3K1* происходит развитие такого состояния как 46, XY инверсия пола, тип 6 (OMIM 613762) с аутосомно-доминантным типом наследования, характеризующегося вариабельностью клинических проявлений от гипоспадии до полного гонадного дисгенеза.

Ген *MAP3K1* кодирует митоген-активированную протеинкиназу киназы киназы-1. Значимая роль MAPK-сигнального пути описана в процессах клеточной дифференцировки и пролиферации [26, 152, 169]. MAPK-сигнальный путь играет важную роль в внутриутробном развитии яичек [163]. Варианты в гене *MAP3K1* были впервые описаны в 2010 году в двух больших семьях с 46, XY НФП и аутосомно-

доминантным типом наследования, а также в 2 из 11 спорадических случаев 46, XY гонадного дисгенеза. В больших семьях, о которых сообщалось, были фенотипические проявления, начиная от полного дисгенеза гонад, иногда с гонадобластомой, до гипоспадии и микропениса с крипторхизмом [168, 169]. Недавние исследования показывают, что *MAP3K1* является одним из наиболее часто мутирующих генов при 46, XY НФП. Опубликованные данные свидетельствуют о высокой частоте встречаемости патогенных вариантов гена *MAP3K1* среди лиц с НФП у 13–18% пациентов [152]. Функциональные исследования вариантов *MAP3K1* продемонстрировали усиление функциональных эффектов, вызывающих повышенное фосфорилирование, что приводит к снижению экспрессии *SOX9*, важного для развития яичка, и повышенной экспрессии  $\beta$ -катенина. Эти изменения экспрессии геном имитируют сигнальный путь в развитии яичников и, таким образом, приводят к аномальному развитию яичек [169].

Обсуждая полученные данные в нашем исследовании, у обоих пациентов с кариотипом 46, XY с идентифицированным вариантом в гене *MAP3K1* клинический фенотип характеризовался полным гонадным дисгенезом. У одного из пациентов установленный генетический вариант характеризовался ранее не описанной заменой NM\_005921.2:c.A556G:p.Arg186Gly, что в целом может рассматриваться как новый вклад в расширение генетической базы мутаций гена *MAP3K1*. Фенотипически у пациентки с данной заменой был подтвержден синдром полного гонадного дисгенеза с женским фенотипом.

### **Клиническая характеристика пациентов с вариантами в гене *MAMLD1***

В ходе нашего клинического исследования было выявлен 1 пациент с вариантом в гене *MAMLD1* в моногенном варианте, а также 1 пациент с сочетанием варианта в данном гене с мутацией в другом гене. Сначала приводится описание пациента с моногенным вариантом.



Пациент П.

Начало обследования относится к раннему возрасту в связи с множественными врожденными пороками развития: ВПС: ОАП, гипоплазия правой почки, неопределенное строение наружных гениталий. Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: 46, XY – мужской кариотип, воспитывался в мужском паспортном поле. Фенотипически: неопределенное строение наружных гениталий, гипоплазия и расщепление мошонки, промежностная гипоспадия, двусторонний крипторхизм. Внутренние гениталии отсутствуют. При обследовании в стационаре была проведена 3-х дневная стимуляционная проба с ХГЧ. Ввиду отрицательного ответа на стимуляцию было принято решение о смене мужского паспортного пола на женский.

В возрасте 8 лет поступила в федеральный стационар для пластики наружных гениталий. На момент обследования имели место неопределенность строения наружных гениталий, самоидентификация была в женском поле и значимые нарушения со стороны мочевой системы: синдром ренальной дисплазии с выраженной хронической болезнью почек, ХПН IV (артериальная гипертензия, нарушение азотвыделительной функции, снижение скорости клубочковой фильтрации, повышение уровня креатинина, анемия, гиперкалиемия, гиперхолестеринемия). Гормональное обследование: ФСГ 0,1 мМЕ/мл, ЛГ 0,1 мМЕ/мл, эстрадиол 5 пг/мл, тестостерон 0,09 нмоль/л. Визуализация органов малого таза (УЗИ, МРТ): отсутствие мюллеровых структур и отсутствие визуализации гонад.

В данном клиническом случае был сформулирован диагноз – ВАР мочеполовой системы: НФП с кариотипом 46, XY. Синдром ренальной дисплазии, ХБП, ХПН IV.

Молекулярно-генетическое исследование выявило вариант нуклеотидной последовательности в гене *MAMLD1* (chrX:149639353, rs367735248, NM\_001177465.3:c.C1433A:p.Ala478Glu) в гемизиготном состоянии (рисунок 7). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0.00003282 (0,003282%). Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь

отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

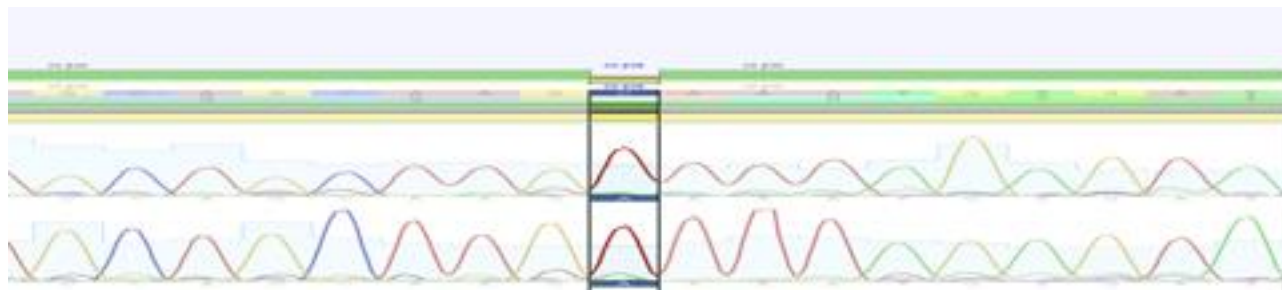


Рисунок 7- Молекулярно-генетическое исследование гена *MAMLD1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее описанный вариант в гене *MAMLD1*, описанном в ассоциации с НФП, с низкой популяционной частотой. Учитывая наличие клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

В дальнейшей тактике ведения пациента оставлен женский пол, проведение пластики наружных гениталий отложено, учитывая значимость нарушения функции почек. Рекомендовано нефро-урологическое обследование с подготовкой к проведению хирургической пластики наружных гениталий, назначением заместительной гормональной терапии по достижении возраста спонтанного пубертата.

**Заключение по случаю.** По международным базам данных имеется информация о следующих клинических состояниях при вариантах в гене *MAMLD1*: гипоспадия, тип 2, X-сцепленный тип наследования. В 2006 году Фуками и соавт. опубликовали клинические случаи, ассоциированные с мутациями *MAMLD1*. Во всех

клинических случаях был нормальный мужской кариотип и отсутствовали экстрагенитальные особенности, за исключением низкого роста в 6 случаях, умственной отсталости в 3 случаях и множественных врожденных аномалий в 2 случаях [99].

В нашем исследовании у пациента с вариантом в гене *MAMLD1* в клиническом фенотипе имел место синдромальный вариант, который был представлен НФП с кариотипом 46, XY (гипоспадия и абдоминальный крипторхизм) в сочетании с ВАР мочевого пузыря, представленной ренальной дисплазией с ранней манифестацией хронической болезнью почек в первой декаде жизни. Таким образом, при установлении вариантов в гене *MAMLD1* у пациентов с НФП следует рекомендовать активный поиск врожденных аномалий развития, в том числе мочевого пузыря, ранняя прогрессия нарушений которой может стать определяющей в тактике ведения пациента.

Второй пациент с олигогенным вариантом, включая замену в гене *MAMLD1*, будет описан ниже, в соответствующем разделе.

### **Клиническая характеристика пациентов с вариантами в гене *NR5A1***

В проведенном нами исследовании выявлено 2 пациента с вариантами в гене *NR5A1*.

Пациент С.

Обследование пациентки было инициировано в возрасте 15 лет в связи со стартом пубертата по гетеросексуальному типу с признаками быстро прогрессирующей вирилизации (увеличение клитора, опущение одного яичка, снижение тембра голоса). Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: 46, XY – мужской кариотип. Наружные половые органы: вирилизация клитора, наружное отверстие уретры расположено низко, вход во влагалище резко сужен. Обращало на себя внимание отсутствие вторичных половых признаков, барифония.

Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков (матка, трубы) не обнаружено. Гормональное обследование: ФСГ 82,1 мМЕ/мл, ЛГ 43,8 мМЕ/мл, эстрадиол <5 пг/мл, тестостерон 9,35 нмоль/л, ГСПС 29,49 нмоль/л, что соответствует гипергонадотропному гипогонадизму на фоне повышенного уровня андрогенов. Визуализация органов малого таза (УЗИ, МРТ): обнаружены недосформированные эктопированные мужские внутренние половые органы: шейка мочевого пузыря открывается в уретру, которая проходит, вероятно, в составе плохо развитого губчатого тела. Визуализируются два гипоплазированных пещеристых тела, головка полового члена достоверно не визуализируется. Позади уретры имеются недосформированные семенные пузырьки. На внутренней поверхности семенных пузырьков имеются две овальной формы структуры размерами 21x9x14 и 14x7x17 мм - простата. На уровне поверхностного кольца пахового канала слева визуализируется яичко с придатком, размерами 15x16x30 мм без признаков патологических изменений в их структуре. Семенные канатики недосформированы, больше правый. Правое яичко достоверно не определяется.

В процессе дифференциальной диагностики исключены опухолевый генез, дефекты стероидогенеза тестостерона со спонтанной вирилизацией в пубертате.

При проведении молекулярно-генетического исследования выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене NR5A1 (Chr9:127265603, NM\_004959.3:c.C72G:p.His24Gln), в гетерозиготном состоянии (рисунок 8). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов" и Gnom AD. Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как вероятно патогенный и является возможной причиной заболевания.

Был сформулирован клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, дисгенезия гонад. Гипергонадотропный гипогонадизм.

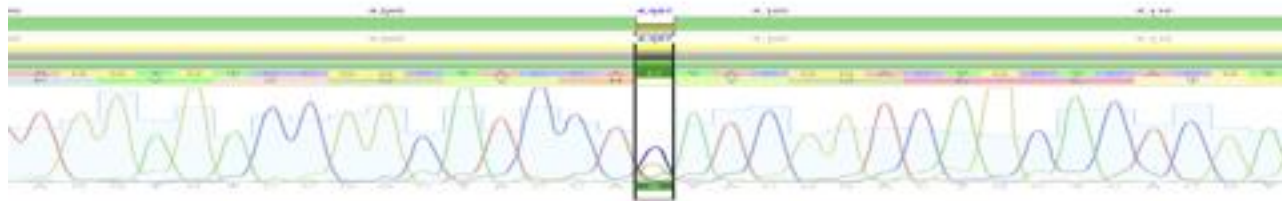


Рисунок 8- Молекулярно-генетическое исследование гена *NR5A1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее не описанный вариант в гене *NR5A1*, описанном в ассоциации с НФП, с отсутствующей популяционной частотой. Учитывая наличие клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

Также, учитывая имеющиеся литературные данные (Harrison S.M. et al.) о высокой частоте семейного характера патогенных вариантов в гене *NR5A1*, был проведён семейный анализ секвенированием по Сэнгеру (рисунок 9).

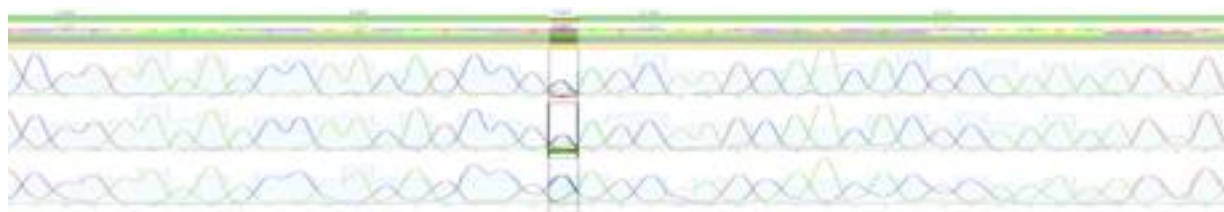


Рисунок 9 - Семейный анализ гена *NR5A1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Выявленный ранее вариант в гене *NR5A1* также был обнаружен у матери пробанда. В клиническом фенотипе матери – гипергонадотропный гипогонадизм с манифестом в послеродовом периоде.

Тактика: в связи с быстро прогрессирующей вирилизацией в отношении данного пациента время для принятия решения было ограничено. Ключевым вопросом являлось принятие решения в отношении паспортного пола у пациента с мужским генотипом и функционально активными гонадами. Проведено обследование у психиатра-сексолога, в ходе которого половая самоидентификация расценена категорически в женском поле. Пациентка подросткового возраста имела половую самоидентификацию в соответствии с женским полом, что выразилось в принятом ею решении сохранить паспортный пол. В связи с прогрессирующей вирилизацией была проведена гонадэктомия с последующим назначением заместительной гормональной терапии эстрогенами.

Обсуждая полученные данные, следует отметить, что у пациента с кариотипом 46, XY с вероятно патогенным вариантом в гене *NR5A1* клинический фенотип характеризовался гонадным дисгенезом, диагностированным в возрасте спонтанного пубертата, который стартовал в соответствии с генетическим полом и вызвал быстро прогрессирующие симптомы вирилизации. Проведенное обследование семьи позволило установить семейный вариант данной генетической патологии.

Пациент Г.

Обследование инициировано в возрасте 5 лет, поводом к обращению было обнаружение тестикула во время операции по поводу предполагаемой паховой грыжи. Самоидентификация в женском поле. Наружные гениталии: недостаточная маскулинизация, слабо развитые кавернозные тела, урогенитальный синус и сращение промежности почти до основания кавернозных тел. Ранее описанные изменения со

стороны наружных гениталий расценивались как вариант синехий у девочки допубертатного возраста.

Генетический пол: мужской – кариотип 46, XY. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков не обнаружено. Пальпаторно по ходу паховых каналов образования размерами 1,5\*1,5 см, безболезненные, малоподвижные. Гормональное обследование: ФСГ 87,6 мМЕ/мл, ЛГ 46,8 мМЕ/мл, тестостерон 0,15 нмоль/л, эстрадиол < 5 пг/мл, АМГ 12.45 нг/мл. Проведена 3-х дневная стимуляционная проба с ХГЧ (5000 ЕД/м<sup>2</sup> на курс), которая расценена как положительная (повышение тестостерона до 3,24 нмоль/л).

Визуализационные методы (УЗИ, МРТ органов малого таза): дериваты мюллеровых протоков (матка, трубы) не обнаружены, в паховом канале справа определяется гипозоогенное однородное образование с четкими ровными контурами размерами 12,2x5,5x10 мм, в левом паховом канале такое же образование размерами 12,4x8,5x10,2 мм (тестикулы).

Сформулирован клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, дисгенезия гонад. Гипергонадотропный гипогонадизм.

При проведении молекулярно-генетического исследования выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене NR5A1 (chr9:127245206-127245207, NM\_004959.3: c.1216\_1217delCT:p.Leu406fs), приводящий к сдвигу рамки считывания (рисунок 10). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов", Gnom AD. Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как вероятно патогенный и является возможной причиной заболевания.

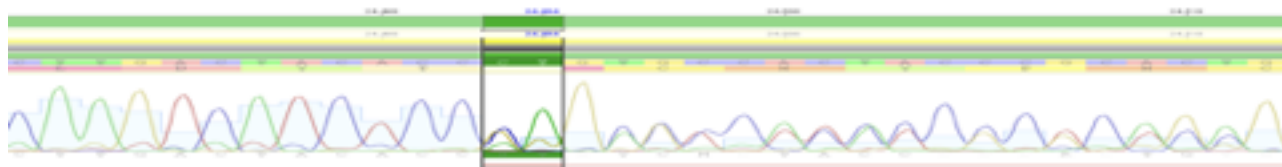


Рисунок 10 - Молекулярно-генетическое исследование гена *NR5A1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Также выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене *CEP41* (chr 7: 130056759, NM\_018718.2: c.145+1G>T), в гетерозиготном состоянии (рисунок 11).

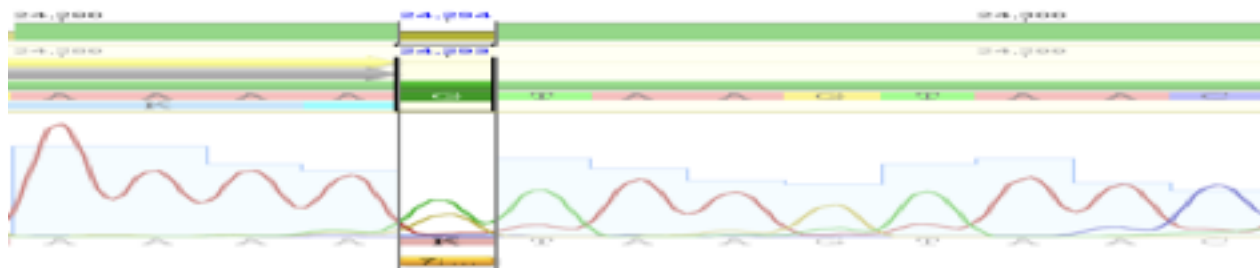


Рисунок 11 - Молекулярно-генетическое исследование гена *CEP41*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее не описанный вариант в гене *NR5A1*, описанном в ассоциации с НФП, с отсутствующей популяционной частотой. Учитывая наличие клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.



Помимо этого, выявленный вариант в гене *CEP41* в гетерозиготном состоянии, ранее описанный в ассоциации с аутосомно-рецессивной патологией – синдром Жубера, отсутствие соответствующей клинической картины позволило сделать вывод о клинической незначимости варианта в отношении половой дифференцировки. Однако, что немало важно, выявленный вариант необходимо учитывать при планировании медико-генетического консультирования семьи.

Проведен семейный анализ выявленных вариантов методом секвенирования по Сэнгеру. У отца был выявлен вариант нуклеотидной последовательности в гене *NR5A1*, идентичный ранее обнаруженному у пробанда. В клиническом фенотипе отца – нарушение сперматогенеза с манифестацией в зрелом возрасте, от дальнейшего обследования отказался. Вариант в гене *CEP41* – мутация *de novo*.

Тактика: как в предыдущем случае, наиболее важным оказался вопрос о паспортном поле воспитания пациентки с мужским кариотипом и перспективой функциональной сохранности гонад. Было установлено, что на момент обследования у пациентки уже была сформирована стойкая самоидентификация в женском поле. Учитывая этот факт и решение родителей, консилиумом специалистов, включавшим психиатра-сексолога, было принято решение о сохранении женского паспортного пола с последующим планированием феминизирующей пластики наружных гениталий, двусторонней резекцией гонад и заместительной гормональной терапией эстрогенами в возрасте пубертата.

**Заключение по случаям.** По имеющимся данным в существующих генетических базах данных клиническая картина при наличии патогенных вариантов в гене *NR5A1*, как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии, представляет собой крайне полиморфный фенотип. Стероидогенный фактор 1 (*NR5A1*, *SF1*, *Ad4BP*) является регулятором транскрипции генов, участвующих в развитии и функционировании надпочечников и гонад. Мутации в *NR5A1* являются одними из наиболее часто определяемых генетических причин нарушений развития гонад и связаны с широким фенотипическим спектром. У 46, XY лиц фенотипы, связанные с

*NR5A1*, могут варьировать от инверсии пола до олиго / азооспермии, а у 46, XX индивидуумов - от 46, XX овотестикулярного и тестикулярного НФП до первичной недостаточности яичников. Описаны случаи нарушения формирования пола с кариотипом 46, XY, характеризующееся дисгенезией гонад в сочетании с первичной надпочечниковой недостаточностью [152]. Однако также описаны клинические проявления дефекта фактора *SF1*, проявляющиеся нарушением половой дифференцировки без признаков надпочечниковой недостаточности [119, 133]. Мутации в ДНК-связывающем домене гена *NR5A1* характеризуются тенденцией фенотипических проявлений ближе к фемининному. L. Lin и соавторы предположили, что в отличие от мутаций в ДНК-связывающем домене гетерозиготные мутации в лиганд-связывающем домене *SF1* проявляются более «мягким» фенотипом и могут быть причиной гипоспадии (особенно тяжелых форм) без явных признаков тяжелого тестикулярного дисгенеза и надпочечниковой недостаточности [133]. Четкая корреляция генотип-фенотип не наблюдается у пациентов с мутациями *NR5A1*, что позволяет предположить, что генетические модификаторы, такие, как патогенные варианты в других генах, определяющих развитие гонад, могут вносить вклад в фенотипическую экспрессию.

Обсуждая полученные нами данные, у обоих пациентов имели место семейные формы НФП. У обоих пациентов были выявлены ранее неописанные замены 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, которого мы наблюдали в возрасте пубертата, имела место спонтанная вирилизация. Данные наблюдения позволяют предположить, что при условии своевременной диагностики генетического варианта НФП и оставления пациентов в мужском поле, они могли бы иметь перспективы развития в поле, соответствующем генетическому с сохранением репродуктивной функции.

## Клиническая характеристика пациентов с вариантами в гене *AR*

В ходе нашего исследования у четырех пациентов были выявлены варианты в гене рецептора андрогена *AR*: у троих в моногенном варианте, у одного – в олигогенном.

### Пациент 3.

Клиническое обследование пациентки было инициировано в возрасте 16 лет в связи с отсутствием старта пубертата. Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: мужской, кариотип – 46, XY. Наружные гениталии сформированы правильно по женскому типу, вторичные половые признаки отсутствуют. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков не обнаружено. В паховой области пальпировались образования мягко-эластической консистенции, диаметром 2,5 см. Гормональное обследование пациентки: ФСГ 2,1 мМЕ/мл, ЛГ 4,7 мМЕ/мл, тестостерон 7,38 нмоль/л, эстрадиол 18,9 пг/мл.

Визуализационные методы исследования органов малого таза (УЗИ, МРТ, диагностическая лапароскопия): дериватов мюллеровых протоков (матка, яичники) не обнаружено, четко визуализируются хорошо развитые семенные канатики с двух сторон, идущие в паховые каналы. В паховых областях с двух сторон выявлены яички, размерами 2,0\*1,5\*1,0 см, с отчетливо выраженными придатками и гидатидами, элементы семенных канатиков сформированы правильно.

Сформулирован диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, синдром полной резистентности к андрогенам.

В ходе молекулярно-генетического исследования обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в гене *AR* (ChrX:66941694, NM\_000044:c.C2338T:p. Arg780Trp) в гемизиготном состоянии (рисунок 12). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов". Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как вероятно патогенный и является возможной причиной заболевания.

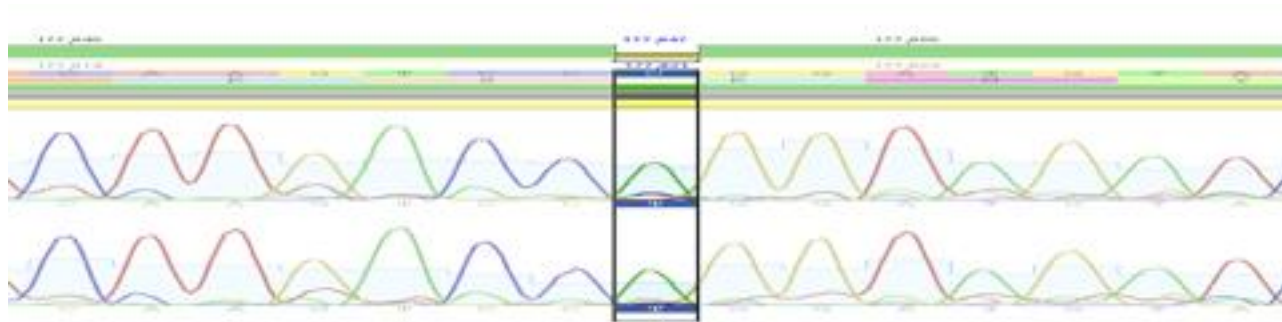


Рисунок 12 –Молекулярно-генетическое исследование гена *AR*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее описанный вариант в гене *AR*, известном в ассоциации с НФП (синдром резистентности к андрогенам), с отсутствующей популяционной частотой. Учитывая наличие соответствующего клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

В дальнейшем пациентке с информированного согласия законных представителей (родителей) проведена двусторонняя орхэктомия. При таком варианте НФП перспективы воспитания целесообразны исключительно в женском паспортном поле. Сопровождение пациентов с синдромом резистентности к андрогенам подразумевает заместительную гормональную терапию препаратами эстрогенов, которая была назначена пациентке.

Пациент М.

Первичное обследование пациентки было инициировано в возрасте 15 лет в связи с отсутствием признаков старта пубертата. Проведено цитогенетическое исследование с целью установления генетического пола: 46, XY – мужской кариотип. В связи с личными обстоятельствами от дальнейшего обследования семья отказалась. Повторно обследование по поводу первичной аменореи инициировано лишь в возрасте 26 лет. Самоидентификация в женском поле. Наружные половые органы

сформированы правильно, по женскому типу. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков не обнаружено, яички в малом тазу. Результаты гормонального обследования: ФСГ 9,6 мМЕ/мл, ЛГ 12 мМЕ/мл, тестостерон 14 нмоль/л, эстрадиол 53 пг/мл. Визуализационные методы (УЗИ, МРТ, диагностическая лапароскопия): дериваты мюллеровых протоков (матка трубы) не визуализируются, справа определяется гонада 2,2\*2,3см, слева гонада размерами 2,5\*2,2 см.

Клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, синдром полной резистентности к андрогенам.

При проведении молекулярно-генетического исследования выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене AR (ChrX:66766549, NM\_000044.6:c.A1563T:p.Lys521Ter) в гемизиготном состоянии, приводящий к образованию сайта преждевременной терминации трансляции (рисунок 13). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов" и GnomAD. Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как патогенный и является причиной заболевания.

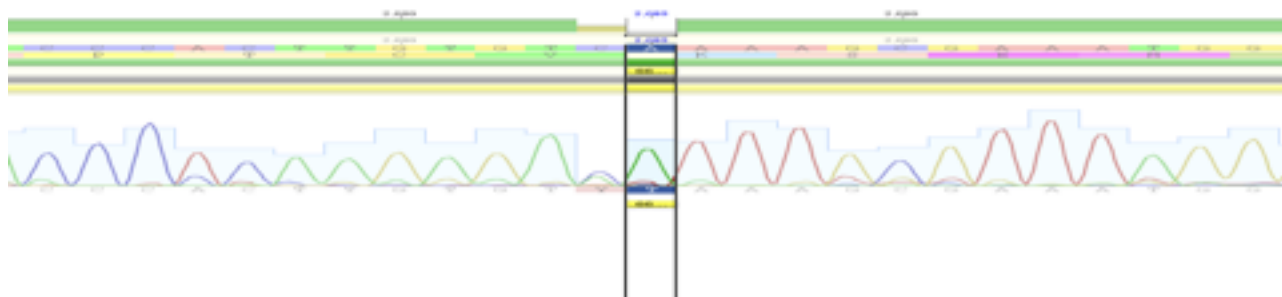


Рисунок 13 – Молекулярно-генетическое исследование гена *AR*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлен ранее не описанный вариант в гене *AR*, известном в ассоциации с НФП (синдром резистентности к андрогенам), с отсутствующей популяционной частотой. Учитывая наличие соответствующего клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

В дальнейшей тактике принято решение о проведении двусторонней орхэктомии, с инициацией заместительной гормональной терапии.

#### Пациент В.

Клиническое обследование пациентки было инициировано в возрасте 16 лет в связи с отсутствием старта пубертата. Самоидентификация пациентки соответствовала женскому полу. Генетический пол: мужской, кариотип 46, XY. Наружные гениталии сформированы правильно по женскому типу, вторичные половые признаки отсутствуют. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков не обнаружено. В паховой области пальпировались образования мягко-эластической консистенции, диаметром 2,2 см. Гормональное обследование пациентки: ФСГ 5,2 мМЕ/мл, ЛГ 4,5 мМЕ/мл, тестостерон 8,38 нмоль/л, эстрадиол 17,8 пг/мл. Визуализационные методы исследования органов малого таза (УЗИ, МРТ): дериватов мюллеровых протоков (матка, яичники) не обнаружено, гонады в паховых каналах.

Сформулирован диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, синдром полной резистентности к андрогенам.

При проведении молекулярно-генетического исследования обнаружен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене *AR* (ChrX:66905958, NM\_000044.6:c.G1875T:p.Met625Ile) и вариант нуклеотидной последовательности в гене *AR* (ChrX:66905959, rs1569305860, NM\_000044.6:c.A1876T:p.Thr626Ser) в гемизиготном состоянии (частота варианта в контрольной выборке GnomAD

0.0005486%). Данные варианты в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматриваются как вероятно патогенные и являются возможной причиной заболевания.

Таким образом, идентифицировано два варианта в гене *AR*, ассоциированном с развитием синдрома резистентности к андрогенам. Один из выявленных вариантов ранее описан и имеет низкую популяционную частоту, второй вариант ранее не был описан и не имеет популяционной частоты. Учитывая наличие соответствующего клинического фенотипа, данные варианты в нашем исследовании расценены как каузативные по отношению к патологии пола.

В дальнейшем пациентке проведена двусторонняя орхэктомия и инициирована заместительная гормональная терапия эстрогенами.

**Заключение по случаям.** По имеющимся данным генетических баз данных известно, что дефекты функции андрогеновых рецепторов вызывают нарушения формирования пола, при котором анатомическое формирование пола и дальнейшее развитие реализуется по женскому типу, несмотря на наличие двусторонних тестикул и концентраций тестостерона в сыворотке в пределах нормы или выше обычных показателей для мужчин [39, 95, 183]. Ген, кодирующий рецептор андрогена (*AR*), альтернативно известный как рецептор дигидротестостерона, расположен на X-хромосоме. Впервые в 1994 году Patterson et al. описали базу данных мутаций гена *AR*, которая включала 114 уникальных мутаций. Gottlieb et al. (1996) описали последнюю версию своей базы данных *AR*-мутаций, представленную 239 пациентами с синдромом нечувствительности к андрогенам (OMIM 300068) или раком простаты (OMIM 176807), и 155 различными мутациями гена *AR*. В дальнейшем база данных регулярно пополнялась различными исследователями.

В проведенном нами исследовании при варианте полной резистентности к андрогенам с кариотипом 46, XY фенотип всех пациентов соответствовал женскому полу, психологический пол также был женским, всем пациентам была инициирована заместительная гормональная терапия в соответствии с женским полом. С точки

зрения молекулярной генетики два пациента характеризовались наличием ранее описанных мутаций в гене *AR*, у одного пациента – сочетанием двух вариантов гена *AR*, один из которых ранее не описан, что, несомненно, может пополнить имеющуюся базу мутаций гена *AR*.

Характеристика пациента с НФП и олигогенным вариантом мутаций будет представлена ниже.

### **Клиническая характеристика пациента с вариантом в гене *CYP17A1* (нарушение биосинтеза тестостерона)**

В ходе нашего клинического исследования был выявлен 1 пациент с вариантом в гене *CYP17A1*, являющимся одним из ферментов биосинтеза тестостерона в надпочечниках и гонадах.

Пациент У.

Первичное обследование было инициировано в возрасте 15 лет в связи с отсутствием признаков полового созревания. Самоидентификация в женском поле. Генетический пол: мужской, кариотип 46, XY. В ходе обследования был сформулирован клинический диагноз: синдром резистентности к андрогенам. Эпизодически получала заместительную гормональную терапию препаратами эстрогенов. Повторное подробное обследование в условиях эндокринологического отделения проведено лишь в возрасте 31 года. Поводом к обращению была стойкая артериальная гипертензия, резистентная к гипотензивной терапии по стандартным схемам. Наружные гениталии сформированы правильно по женскому типу. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков не обнаружено, тестикулы в наружных отделах паховых каналов, с четкими ровными контурами, размерами 1,5\*1,4\*2,5 см справа и 1,4\*1,4\*2,3 слева. Гормональное обследование: ФСГ 67,1 мМЕ/мл; ЛГ 37,7 мМЕ/мл; тестостерон 0,1 нмоль/л; ДГЭА 0,6 мкмоль/л, 17 ОПГ 5,7 нмоль/л, кортизол



134 нмоль/л, альдостерон 422.74 пг/мл, ренин 0.81 пг/мл, кортизон 1,0 нг/мл, кортизол 2,5 нг/мл, кортикостерон 69,3 нг/мл, 11-дегидрокортикостерон 9,1 нг/мл, 11-дезоксикортизол 1,0 нг/мл, стойкая гипокалиемия. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определена стероидная панель: кортизон <1,0 нг/мл (норма 10-25 нг/л), кортизол 2,5 нг/мл (45 – 140 нг/мл), кортикостерон 69,3 нг/мл (< 3 нг/мл), 11- дегидрокортикостерон 9,1 нг/мл (< 3 нг/мл), 11-дезоксикортикостерон 1,1 нг/мл (< 3 нг/мл), 18-гидрокортикостерон < 1 нг/мл (< 1 нг/мл), 11 – дезоксикортизол <1,0 нг/мл (< 2 нг/мл). Обращало внимание наличие сниженного уровня общего тестостерона 0,1 нмоль/л, кортизола и кортизона наряду с повышенным уровнем предшественников стероидогенеза, снижением ренина. По анализу панели стероидогенеза в совокупности с гипергонадотропным гипогонадизмом у пациентки с кариотипом 46, XY и клиническими симптомами резистентной артериальной гипертензии был заподозрен вариант НФП вследствие нарушения биосинтеза тестостерона из-за дефицита фермента 17-альфа гидроксилазы (мутация в гене *CYP17A1*, один из редких вариантов ВГКН). Данный синдром по клиническому фенотипу имеет большое сходство с НФП вследствие резистентности к андрогенам, однако, в отличие от последнего, не сопровождается низким уровнем тестостерона и клиникой первичного гиперальдостеронизма. Пациентка была дообследована, включая проведение молекулярно-генетического анализа. При КТ органов брюшной полости обнаружена гиперплазия левого надпочечника. Визуализационные методы исследования органов малого таза (УЗИ, МРТ): дериватов мюллеровых протоков (матка, трубы) не обнаружено, тестикулы в наружных отделах паховых каналов, с четкими ровными контурами, размерами 1,5\*1,4\*2,5 см справа и 1,4\*1,4\*2,3 слева.

При проведении молекулярно-генетического исследования обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в гене *CYP17A1* (chr10:104592334, rs104894139, NM\_000102.4:c.G1073A;p.Arg358Gln) в гомозиготном состоянии. Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0.00001592 (0,001592%). Данный вариант в

соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вероятно патогенный вариант и является возможной причиной заболевания.

Таким образом, выявлен ранее описанный вариант в гене *CYP17A1*, известном в ассоциации с НФП (редкая форма ВГКН: синдром дефицита 17-альфа-гидроксилазы), с низкой популяционной частотой и в гомозиготном состоянии. Учитывая наличие соответствующего клинического фенотипа, данный вариант в нашем исследовании расценен как каузативный по отношению к патологии пола.

Выставлен клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY. Нарушение биосинтеза андрогенов – мутация в гене *CYP17A1* (дефицит фермента 17-альфа-гидроксилазы).

Дальнейшая тактика скорректирована в соответствии с нозологическим вариантом: терапия глюкокортикоидами, оперативное вмешательство по удалению гонад с дальнейшей гормональной заместительной терапией эстрогенами. На фоне приема дексаметазона в дозе 0,5 – 0,25 мг/сутки синдром артериальной гипертензии был полностью купирован.

**Заключение по случаю.** При анализе генетических баз данных получена информация, что ген *CYP17* кодирует фермент 17-альфа-гидроксилазу, также называемую 17-альфа-монооксигеназой, которая опосредует активность как 17-альфа-гидроксилазы, так и 17,20-лиазы. Эти ферменты позволяют надпочечникам и гонадам синтезировать как 17-альфа-гидроксилированные глюкокортикоиды (через активность 17-альфа-гидроксилазы), так и половые стероиды (через активность 17,20-лиазы) [48, 62, 92]. При недостаточности 17-альфа-гидроксилазы формируется избыточный синтез дезоксикортикостерона в надпочечниках и дефицит половых стероидов в гонадах, что может проявляться в клинике первичным гипогонадизмом, НФП с кариотипом 46, XY в сочетании с артериальной гипертензией [155]. Следует отметить, что клиническая картина при дефиците 17-альфа-гидроксилазы часто может быть схожа с таковой при синдроме тестикулярной феминизации, что зачастую приводит к неверным диагнозам.

В проведенном нами исследовании полученные данные свидетельствовали об идентификации ранее описанного варианта в гене *CYP17A1*, который относится к нарушению стероидогенеза в надпочечниках и гонадах. Фенотип пациента характеризовался классической картиной НФП с женским анатомическим строением наружных гениталий и развитием синдрома артериальной гипертензии. В представленном клиническом случае ошибочное установление диагноза синдрома резистентности к андрогенам привело к поздней диагностике артериальной гипертензии, персистенции вторичных электролитных нарушений и развитию остеопенического синдрома вследствие длительно некомпенсированного гипогонадизма. Данный клинический случай свидетельствует о важности проведения дифференциальной диагностики варианта НФП с подтверждением диагноза генетическими методами, что позволило бы на более ранних этапах предотвратить коморбидность.

### **Клиническая характеристика пациентов с олигоценными вариантами**

В ходе проведенного нами клинического исследования было выявлено два пациента с вариантами более чем в одном гене, ассоциированном с НФП.

Пациент К.

Обследование пациента инициировано при рождении в связи с неопределенным строением наружных гениталий. Самоидентификацию оценить невозможно в силу возраста пациента. Генетический пол: мужской, кариотип 46,XY. Наружные гениталии сформированы неопределенно: мошонка частично расщеплена, урогенитальный синус, половой член практически не сформирован, головка отсутствует. Внутренние половые органы: дериваты мюллеровых протоков отсутствуют. Справа в мошонке пальпируется гонада, слева идентичное образование по ходу пахового канала. Результаты гормонального обследования: ФСГ 0,9 мМЕ/мл; ЛГ 1,1 мМЕ/мл; тестостерон 3,54 нмоль/л; эстрадиол 48 пг/мл. Проведен 3-х дневный стимуляционный

тест с ХГЧ в возрасте минипубертата: стимуляционный пик тестостерона с 3,54 до 20,19 нмоль/л, дигидротестостерон возрос с 301 до 385 пг/мл. Клинически: реакция в последующей 3-х недельной пробе с ХГЧ на рост тестостерона крайне низкая – практически отсутствовало увеличение кавернозных тел полового члена. Подобный низкий ответ был констатирован впоследствии на тест-терапию препаратом дигидротестостерона, наносимого в виде геля на область наружных гениталий. При визуализации органов малого таза (УЗИ, МРТ) констатировано отсутствие дериватов мюллеровых протоков в малом тазу, в паховых каналах справа и слева образования, по структуре и форме идентичные яичку.

При проведении молекулярно-генетического исследования обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в гене *SEMA3A* (Chr7:83636785, rs769957117, NM\_006080.3:c.A1024G:p.Met342Val) в гетерозиготном состоянии (рисунок 14). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0,000004247 (0,0004247%). Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

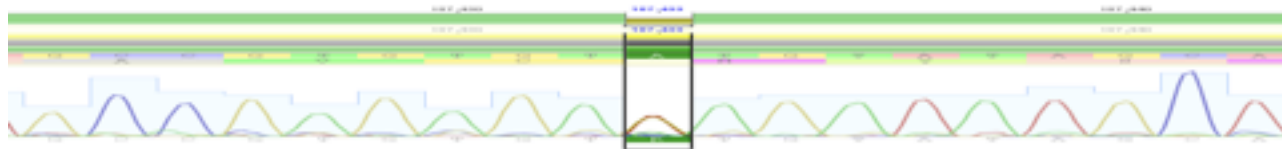


Рисунок 14 – Молекулярно-генетическое исследование гена *SEMA3A*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Также обнаружен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в гене *AR* (ChrX:66942818, NM\_000044.6:c.G2599C:p.Val867Leu) в гемизиготном состоянии (рисунок 15). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках "1000 геномов" и

GnomAD. Данный вариант в соответствии с критериями ACMG 2015 рассматривается как патогенный и является причиной заболевания.

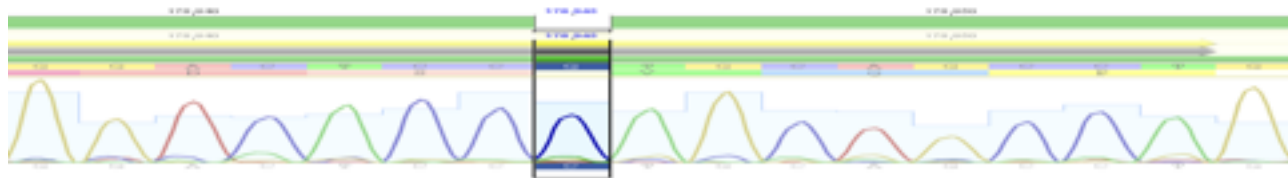


Рисунок 15 – Молекулярно-генетическое исследование гена *AR*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY. Синдром частичной резистентности к андрогенам.

Таким образом, у пациента были выявлены 2 мутации генов, ответственных за половую дифференцировку и половое развитие. Одним из них явился ранее не описанный вариант в гене *AR*, ответственном за развитие синдрома резистентности к андрогенам, с отсутствующей популяционной частотой. Идентификация варианта в данном гене определила основные тактические действия, описанные ниже. Однако также был выявлен ранее описанный вариант в гене *SEMA3A*, также известном в ассоциации с НФП (гипогонадотропный гипогонадизм) с низкой популяционной частотой. С учетом наличия клинической картины, соответствующей синдрому частичной резистентности к андрогенам, вариант в гене *AR* был расценен как каузативный по отношению к патологии пола у обследуемого пациента. Что касается варианта, выявленного в гене *SEMA3A*, то также возможна интерпретация его, как вероятно причинного, но оценить его вклад в клинический фенотип с точки зрения присоединения гипогонадотропного гипогонадизма возможно было бы лишь в возрасте спонтанного пубертата при активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и исследовании уровней гонадотропинов. Однако в данном клиническом случае в связи с идентификацией варианта в гене *AR*, что определяет прогноз

нечувствительности к заместительной терапии андрогенами, было возможно принятие единственного решения, связанного со сменой паспортного пола ребенка на женский, что и было проведено консилиумом специалистов. В связи с этим в данном клиническом случае не представляется возможным отследить клинические проявления (гипогонадизм в возрасте пубертата) выявленного варианта в гене *SEMA3A*. Тем не менее, выявление сочетание двух вероятно каузативных вариантов в генах, ассоциированных с НФП, представляет, как научный, так и практический интерес, поскольку в случае возможности сохранения паспортного пола в соответствии с генетическим прогноз спонтанного пубертата (либо его отсутствия) играл бы важную роль.

**Заключение по случаю.** Выше были описаны варианты изолированной резистентности к андрогенам. В доступной нам литературе не было найдено клинических примеров с олигоценными вариантами замен в гене *AR* и *SEMA3A*. В данной клинической картине в раннем возрасте 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. Ранее неописанный генетический вариант гена *AR* характеризовался частичной резистентностью к андрогенам с очень низкой степенью маскулинизации. 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.

Пациент Б.

Обследование ребенка было инициировано в возрасте 10 месяцев по поводу гипоспадии. Оценить самоидентификацию невозможно в силу возраста пациента. Генетический пол: мужской, кариотип 46, XY. Наружные половые органы:

неправильное строение наружных половых органов - крайняя плоть расщеплена, меатус расположен на головке, половой член 2 см, искривлен на 90 градусов, мошонка расщеплена. Внутренние гениталии: дериватов мюллеровых протоков (матка, трубы) не обнаружено. Яички в мошонке. Результаты гормонального обследования: ФСГ 0,5 мМЕ/мл; ЛГ 0,1 мМЕ/мл; тестостерон <0,09 нмоль/л; эстрадиол <5,0 пг/мл; ДГЭА 2,4 мкг/дл; дигидротестостерон <6,0 пг/мл; кортизол 206,2 нмоль/л. Визуализационные методы исследования органов малого таза (УЗИ): дериваты мюллеровых протоков не визуализируются, размеры яичек соответствуют возрастной норме, эхопризнаки незаращенного влагалищного отростка брюшины.

Клинический диагноз: нарушение формирования пола с кариотипом 46, XY, мошоночная форма гипоспадии.

При проведении молекулярно-генетического исследования обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в гене *MAMLD1* (chrX:149638811, rs782039491, NM\_005491.4:c.A966C:p.Gln322His) в гемизиготном состоянии (рисунок 16). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD0.0001208 (0,01208%). Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

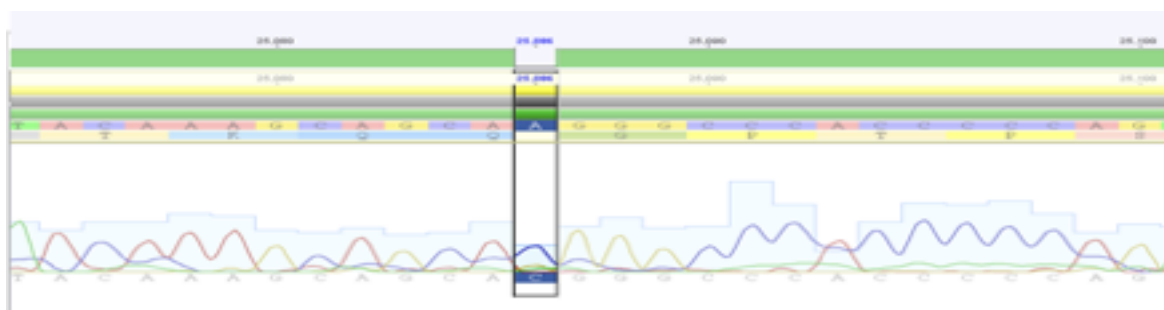


Рисунок 16 – Молекулярно-генетическое исследование гена *MAMLD1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Также обнаружен вариант нуклеотидной последовательности в гене *MAP3K1* (chr5:56177906, rs763146065, NM\_005921:c.G2879A:p.Gly960Asp) в гетерозиготном состоянии (рисунок 17). Частота варианта в контрольной выборке GnomAD 0,000008023 (0,0008023%). Данный вариант в соответствии с критериями ACMG следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

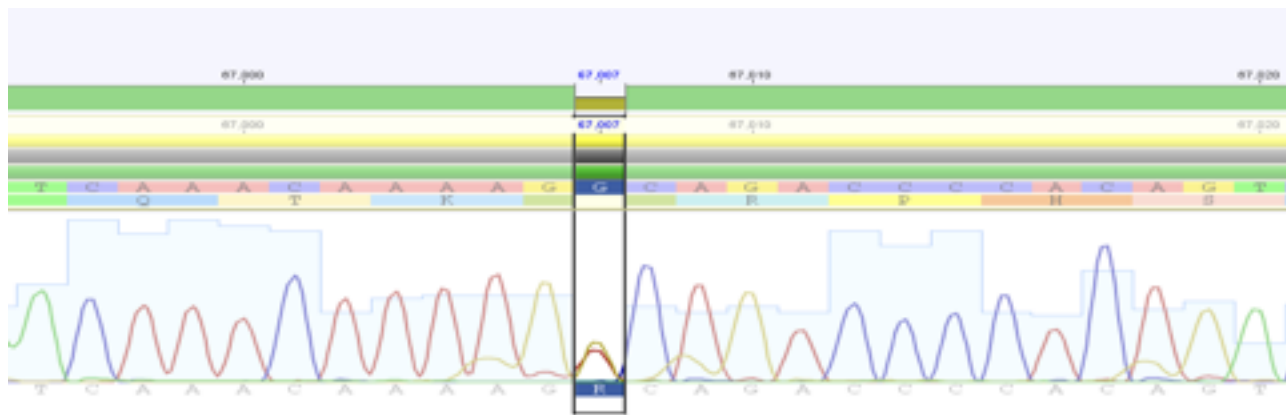


Рисунок 17 – Молекулярно-генетическое исследование гена *MAP3K1*

Примечание: на рисунке представлен фрагмент секвенирования гена с выявленным вариантом

Таким образом, выявлено сочетание двух вероятно каузативных вариантов в генах *MAMLD1* и *MAP3K1*. Оба выявленных варианта с низкой популяционной частотой. В этой ситуации крайне сложно оценить вклад каждого из выявленных вариантов в развитие клинической картины.

**Заключение по случаю.** Согласно имеющимся литературным данным, при наличии мутаций в гене *MAMLD1* возможно развитие X-сцепленной формы гипоспадии, а наличие мутаций в гене *MAP3K1* обуславливает НФП с кариотипом 46,



XY, с высокой вариабельностью проявлений – от легких форм гипоспадий до полной инверсии пола. В представленном клиническом случае установлено сочетание двух ранее описанных вариантов в генах *MAMLD1* и *MAP3K1*. По анализу литературных данных подобного сочетания вариантов найдено не было.

В описанном нами клиническом случае установлены замены в двух генах, ассоциированных с нарушением половой дифференцировки. Выше были представлены клинические случаи пациентов, которые имели моногенные варианты в каждом из этих генов. Клинический фенотип пациента с олигогенным вариантом был представлен 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.

### **Заключение по клинической части**

Подводя итог клинической части исследования, следует отметить, что при проведении молекулярно-генетического исследования в группе пациентов с нарушением формирования пола, отличных от ВГКН, в 39% случаев выявлены вероятно патогенные варианты, которые в ассоциации с клиническим фенотипом НФП следует расценивать причинными в развитии патологии пола. Из них 18 % случаев представлены семейными формами, в 43 % случаев выявлены ранее не описанные варианты. Другие, описанные ранее молекулярно-генетические варианты, были ассоциированы с одним из клинических фенотипов, которые были представлены в существующих генетических базах. 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.

При ретроспективном анализе анамнеза ряда описанных нами пациентов, очевидно, что своевременная молекулярно-генетическая диагностика могла бы позволить прогнозировать такие тяжелые коморбидности, как хроническая болезнь почек с быстрой прогрессией в первой декаде жизни, резистентная к терапии артериальная гипертензия. Результаты молекулярно-генетического анализа также могли быть приняты во внимание при присвоении паспортного пола, который мог бы соответствовать генетическому и сохранить прогноз репродукции при условии своевременной диагностики НФП.

До настоящего времени в рутинной практике сохраняется рекомендация при НФП с кариотипом 46, XY начинать молекулярно-генетический поиск с мутаций гена *SRY*. Учитывая тот факт, что у всех пациентов в нашем исследовании с данным вариантом НФП были установлены совершенно другие молекулярно-генетические причины, а секвенирование одного отдельно взятого гена ассоциировано с потерей времени в диагностике, по возможности целесообразно рекомендовать проведение обследования таким пациентам сразу панелью NGS с включением генов, найденных в нашем исследовании.

## **ГЛАВА 5. ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА**

В алгоритмах оказания помощи при нарушениях половой дифференцировки крайне важный аспект - правильная, корректная и своевременная оценка психологического пола, которая базируется на половой дифференцировке мозга.

Следующим шагом после установления клинического диагноза и определения нозологического варианта становится вопрос присвоения пола воспитания или гражданского пола, в котором пациент будет существовать всю дальнейшую жизнь. Принятие решения базируется на совокупности факторов, включающих возможности наиболее полноценной реализации в избранном поле, что предполагает не только эффективность хирургической и гормональной коррекции, но и соответствие психологическому полу, определяемому пренатальной половой дифференцировкой мозга. Если при части нозологических форм возможно достаточно определенно после уточнения варианта НФП прогнозировать психологический пол, то при других вариантах это может представлять определенную сложность. Однако ошибочное решение в присвоении пола, которое не будет соответствовать истинной половой дифференцировке мозга пациента, произошедшей пренатально, может привести не только к медицинским, но и к социальным последствиям. К ним относятся: гендерная дисфория, психологический дистресс не только пациента, но и всей семьи, нарушение социальной адаптации. Именно эти аспекты определили в различных международных рекомендациях последних лет для некоторых вариантов НФП, при которых достаточно сложно прогнозировать половую самоидентификацию, возможность отсрочить процесс до момента взросления и принятия решения самим пациентом [167, 191, 195].

В соответствии с обозначенным кругом проблем, оказание помощи пациентам с НФП должно быть адекватно спланировано, носить последовательный характер и

осуществляться мультидисциплинарной группой специалистов. Несмотря на полученные доказательства в отношении физиологических основ дифференцировки пола, социум, общепринятые нормы морали и нравственности в отдельных группах населения продолжают накладывать определенный отпечаток на вопросы присвоения пола в некоторых этнических группах, что не всегда позволяет действовать в соответствии с рекомендациями и отсрочить присвоение пола до высказывания мнения самим пациентом. Противоречие в этих процессах составляет одну из наиболее важных, значимых и сложных проблем, которая и заставляет продолжить исследование возможности поиска предикторов, маркеров ранней половой самоидентификации, которая основывается на половой дифференцировке мозга. Завершающая часть проведенного нами исследования посвящена изучению и поиску некоторых из них.

В настоящем разделе исследования была проведена оценка ряда параметров, характеризующих половую дифференцировку мозга.

В исследовании изучались следующие характеристики психологического пола: половая самоидентификация у тех пациентов, которые уже могли ее определить, полоролевое поведение и личностные характеристики.

Изучение психологических особенностей у пациентов с различными вариантами нарушений формирования пола проводилось в следующих группах: у пациентов с ВГКН, у группы пациентов с синдромом резистентности к андрогенам и у группы пациентов с гонадным дисгенезом. В группы обследования вошли пациенты, как школьного возраста, так и взрослые.

Первым этапом данного раздела выполняемой работы явилось определение половой самоидентификации пациента путем проведения опроса и сопоставление ее с генетическим полом (рисунок 18).

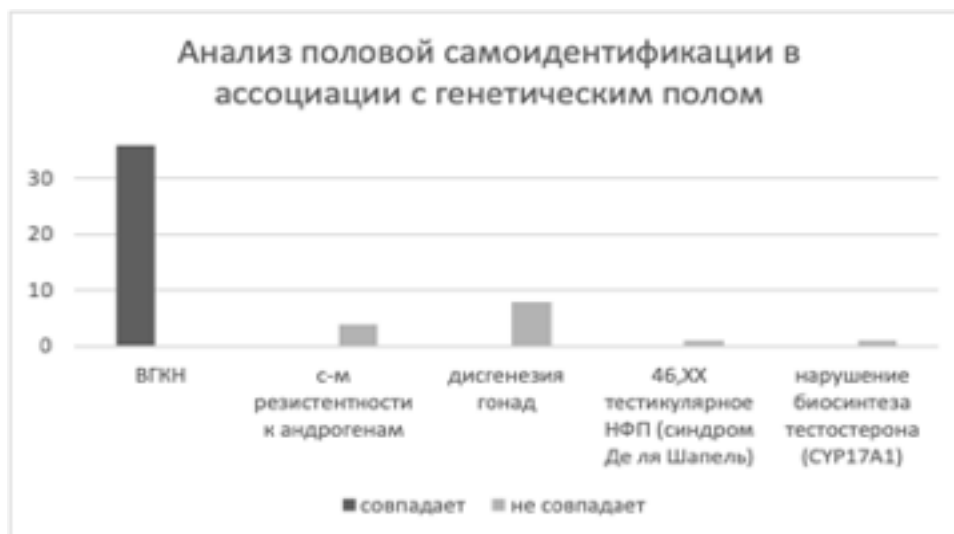


Рисунок 18 - Оценка половой самоидентификации в ассоциации с генетическим полом

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, имевшие женскую самоидентификацию, а также пациент с синдромом «XX-мужчины», или де ля Шапель, с кариотипом 46, XX, половая самоидентификация у которого была мужской. Пациенты с проксимальной формой гипоспадии и овотестикулярным НФП были младенцами и не включены в исследование.

Таким образом, в отношении половой самоидентификации были получены результаты, свидетельствующие о совпадении с генетическим полом при вариантах ВГКН и несовпадении при остальных исследованных формах НФП.

Вторым этапом данного раздела исследования явилась оценка полоролевого поведения пациентов с НФП старше 8 лет. Полоролевое поведение представляет собой

систему действий, ожидаемую от человека определенного пола, зависимость от социально-полового статуса (мужчина/женщина) и реализуемую согласно социально-половой роли и представлениям о себе как личности определенного пола [164].

Однако полоролевое поведение играет вспомогательную роль в характеристике пренатальной половой дифференцировки мозга и всего лишь отражает социальную роль и адаптацию индивидуума в существующем обществе. Особенностью современного этапа является все большая интерсексуальность вариантов полоролевого поведения лиц мужского и женского пола.

Для оценки полоролевого поведения использовался опросник С. Бем.

Как было указано выше, определялся основной индекс (IS). Так, при  $IS < -1$  говорят о маскулинном типе полоролевого поведения, при  $IS > 1$  – о фемининном, в случае  $IS > -1 < 1$  делается заключение об андрогинном типе полоролевого поведения. Результаты представлены в таблице 13 и на рисунке 19.

Таблица 13 – Значения основного индекса (IS) по результатам опросника С. Бем

Группа	Медиана значения IS	Значение $IS > 1$ (фемининный тип полоролевого поведения)	Значение $IS > -1 < 1$ (андрогинный тип полоролевого поведения)	Значение $IS < -1$ (маскулинный тип полоролевого поведения)
		%	%	%
ВГКН	-0,46	-	86%	14%
Синдром резистентности к андрогенам	0,69	-	100%	-
Дисгенезия гонад	0,115	-	100%	-

Таким образом, в группе пациентов с синдромом резистентности к андрогенам медиана показателя IS составила 0,69, что соответствует андрогинному типу поведения. В группе пациентов с гонадным дисгенезом IS составил 0,115, что также

соответствует андрогинному типу полоролевого поведения. В группе пациентов с ВГКН данный показатель составил -0,46.

В группе пациентов с ВГКН в 86% случаев полоролевое поведение так же соответствовало андрогинному типу, однако у 14% пациентов по результатам тестирования был выявлен маскулинный тип полоролевого поведения.

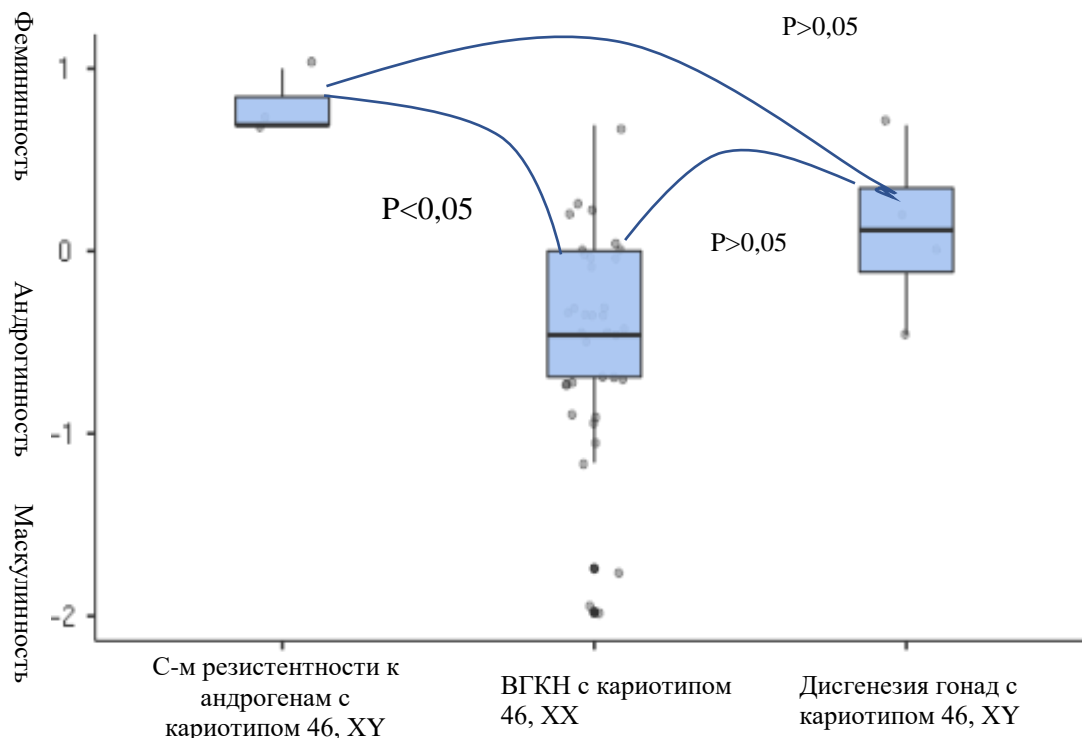


Рисунок 19 - Распределение значений основного индекса (IS) по опроснику С.Бем

Следующим этапом было проведение сравнительного анализа по шкале «маскулинность-фемининность» среди исследуемых групп пациентов с НФП. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Сравнительный анализ по шкале «маскулинность-фемининность» в различных группах НФП в целом

Показатель (шкала)	$\chi^2$	df	p	$\varepsilon^2$
маскулинность- фемининность	11.1	2	<b>0,004</b>	0.264

Примечание:  $\chi^2$ - расчетный критерий, df- число степеней свободы,  $\varepsilon^2$ - показатель выраженности эффекта. Односторонний непараметрический анализ ANOVA проведен с использованием критерия Kruskal-Wallis. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

С учетом наличия достоверных различий по Kruskal-Wallis, вызвало интерес изучение полоролевого поведения внутри группы с андрогинным типом полоролевого поведения, для оценки был проведен сравнительный попарный анализ в группах пациентов с ВГКН, синдромом резистентности к андрогенам и гонадным дисгенезом. Результаты представлены в таблице 15. Достоверные различия были выявлены между двумя группами: ВГКН и синдром резистентности к андрогенам.

Таблица 15 – Сравнительный анализ «маскулинность-фемининность» по индексу IS между группами НФП при андрогинном типе полоролевого поведения

Сравнение групп по показателю «маскулинность-фемининность»					
Нозологический вариант НФП	значения IS (медиана)	Нозологический вариант НФП	значения IS (медиана)	w	p
Синдром резистентности к андрогенам	0,690	ВГКН	- 0,460	3,98	<b>0,014</b>
Синдром резистентности к андрогенам	0,690	Дисгенезия гонад	0,115	2,59	0,159
ВГКН	- 0,460	Дисгенезия гонад	0,115	2,73	0,130
Примечание: сравнительный анализ медиан основного индекса (IS) по результатам опросника С. Бем. Индекс IS был представлен как положительными, так и отрицательными значениями. Сравнительный анализ проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. W – Значение критерия Манна-Уитни. Достоверный уровень различий при $p < 0,05$ .					

Сравнение проводилось между группами ВГКН, синдрома резистентности к андрогенам и дисгенезией гонад.

Достоверные различия были выявлены между двумя группами: ВГКН и синдром резистентности к андрогенам ( $p = 0,014$ ).

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 свидетельствуют о более фемининном типе 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».

Согласно современной концепции половой дифференцировки мозга, главная роль в различиях этих групп связано с количеством тестостерона во внутриутробном и постнатальном периодах.

Так, можно предположить, что при ВГКН внутриутробно вырабатывается большое количество андрогенов, влияющих не только на формирование наружных половых органов, проявляющееся разной степени выраженности вирилизацией, но и на структуры головного мозга, что выражается тенденцией к маскулинности при в целом не выходящем за пределы референсов полоролевого поведения, при этом сохраняя соответствующую генетическому полу самоидентификацию. Таким образом, полоролевое поведение не всегда совпадает с половой самоидентификацией пациентов и, следовательно, не должно являться определяющим в вопросах решения присвоения паспортного пола воспитания.

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

С целью установления особенностей личности при разных вариантах НФП нами был проведен сравнительный анализ личностных характеристик в группах пациентов с НФП в целом. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16– Сравнительный анализ по шкалам личностных характеристик среди групп пациентов с НФП в целом

Показатель (шкала)	$\chi^2$	df	p	$\varepsilon^2$
замкнутость-общительность	6.90	2	<b>0.032</b>	0.1644
конкретное-абстрактное мышление	4.88	2	0.087	0.1163
эмоциональная нестабильность-стабильность	8.81	2	<b>0.012</b>	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	<b>0.018</b>	0.1923
доверчивость-подозрительность	7.45	2	<b>0.024</b>	0.1773
практичность-мечтательность	6.44	2	<b>0.040</b>	0.1534
прямолинейность-дипломатичность	6.82	2	<b>0.033</b>	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:  $\chi^2$ - расчетный критерий, df- число степеней свободы,  $\varepsilon^2$ - показатель выраженности эффекта. Односторонний непараметрический анализ ANOVA проведен с использованием критерия Kruskal-Wallis. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

Дисперсионный непараметрический анализ свидетельствовал о наличии достоверных различий между исследуемыми группами НФП по таким факторам, 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» ( $p=0,033$ ).

Для уточнения характера полученных различий был проведен внутригрупповой попарный сравнительный анализ по каждой шкале.

При проведении внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкалам «эмоциональная нестабильность-стабильность» и «практичность-

мечтательность» достоверных различий между группами пациентов выявлено не было.

Шкала «замкнутость-общительность» (фактор А) призвана оценивать общительность человека и его способность устанавливать межличностные контакты. Так низкие оценки по этому фактору свидетельствуют о шизотимии - личностная особенность, характеризующаяся высоким личностным темпом, аналитическими способностями и сильным интрапсихическим напряжением, в то время как высокие баллы соответствуют аффектотимии – личностная особенность, характеризующаяся добросердечностью, открытостью, беспечностью.

Результаты внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкале «замкнутость-общительность» представлены в таблице 17 и на рисунке 20.

Таблица 17–Сравнительный анализ по шкале «замкнутость-общительность» среди групп пациентов с НФП

Сравнение групп по шкале «замкнутость-общительность»					
Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	w	p
Синдром резистентности к андрогенам	8	ВГКН	4,5	3,31	<b>0,05</b>
Синдром резистентности к андрогенам	8	Дисгенезия гонад	5,5	2,62	0,153
ВГКН	4,5	Дисгенезия гонад	5,5	1,77	0,423

Примечание: анализ проводился в соответствии с методикой многофакторного личностного опросника Кетелла. Анализ производится в стенах (стандартных единицах измерения). Сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. W – Значение критерия Манна-Уитни. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

В нашем исследовании достоверные отличия по этому показателю были выявлены в группе сравнения ВГКН – синдром резистентности к андрогенам ( $p=0,05$ ). Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН.

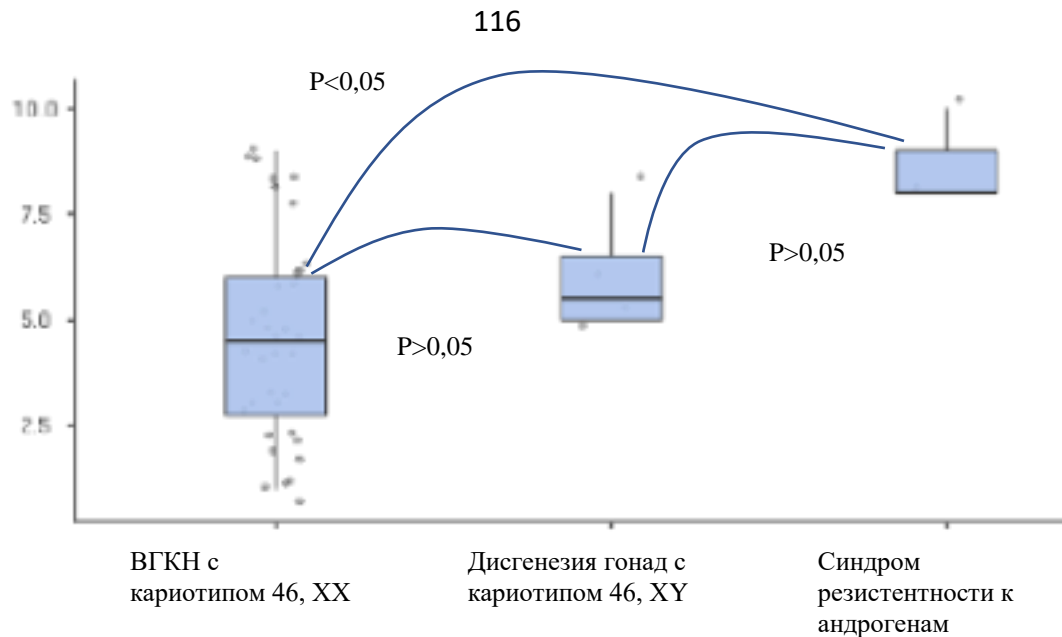


Рисунок 20 – Сравнительный анализ по шкале «замкнутость-общительность» среди групп пациентов с НФП

Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

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.

Шкала «жесткость-чувствительность» (фактор I) позволяет оценить разницу в культурном уровне и эстетической восприимчивости личности. Высокие оценки по критерию свидетельствуют о развитом воображении, романтичности, эмоциональности, а низкие оценки говорят о практичности, независимости, низкой эмоциональности, такие люди более склонны к невротическим расстройствам.

Результаты внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкале «жесткость-чувствительность» представлены в таблице 18 и на рисунке 21.

Таблица 18 – Сравнительный анализ по шкале «жесткость - чувствительность» среди групп пациентов с НФП

Сравнение групп по шкале «жесткость-чувствительность»					
Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	w	p
Синдром резистентности к андрогенам	8	ВГКН	5	3,74	<b>0,022</b>
Синдром резистентности к андрогенам	8	Дисгенезия гонад	5,5	2,83	0,113
ВГКН	5	Дисгенезия гонад	5,5	1,52	0,529

Примечание: анализ проводился в соответствии с методикой многофакторного личностного опросника Кетелла. Анализ производится в стенах (стандартных единицах измерения). Сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. W – Значение критерия Манна-Уитни. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

Так же, как и по предыдущему критерию, достоверные отличия по этому показателю были выявлены в группе сравнения ВГКН – синдром резистентности к андрогенам ( $p=0,022$ ). Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН.

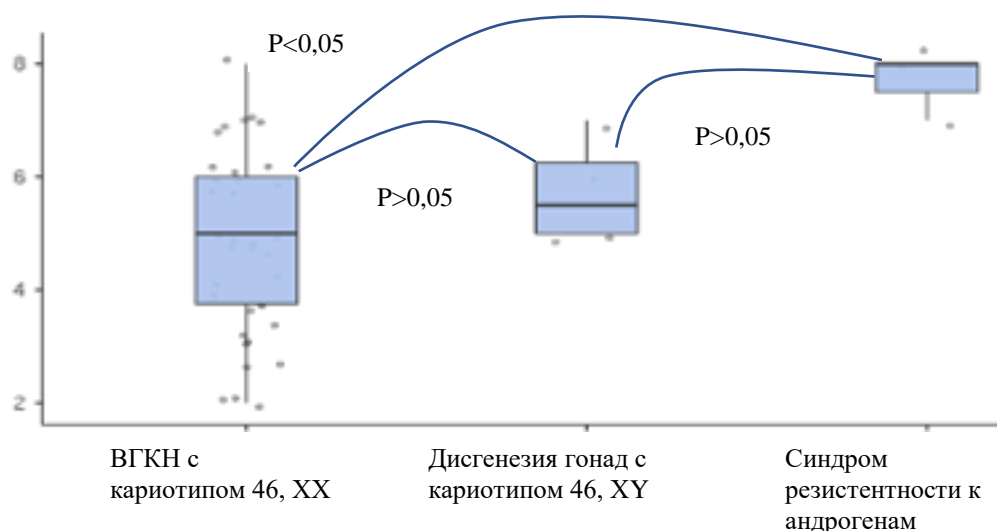


Рисунок 21 - Сравнительный анализ по шкале «жесткость - чувствительность» среди групп пациентов с НФП

Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

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.

Шкала «доверчивость-подозрительность» (фактор L) отражает эмоциональное отношение к окружающим. Так, низкие оценки по этому фактору свидетельствуют о добродушности, в то время как высокие баллы соответствуют эмоциональной напряженности. Результаты внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкале «доверчивость-подозрительность» представлены в таблице 19 и на рисунке 22. Таблица 19 – Сравнительный анализ по шкале «доверчивость-подозрительность» среди групп пациентов с НФП

Сравнение групп по шкале «доверчивость-подозрительность»					
Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	w	p
Синдром резистентности к андрогенам	2	ВГКН	5	-3,66	<b>0,026</b>
Синдром резистентности к андрогенам	2	Дисгенезия гонад	4,5	-3,06	0,078
ВГКН	5	Дисгенезия гонад	4,5	-1,13	0,703

Примечание: анализ проводился в соответствии с методикой многофакторного личностного опросника Кетелла. Анализ производится в стенах (стандартных единицах измерения). Сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. W – Значение критерия Манна-Уитни. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

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

более высокими - показателями оценок при ВГКН и более низкими - в группе синдрома резистентности к андрогенам.

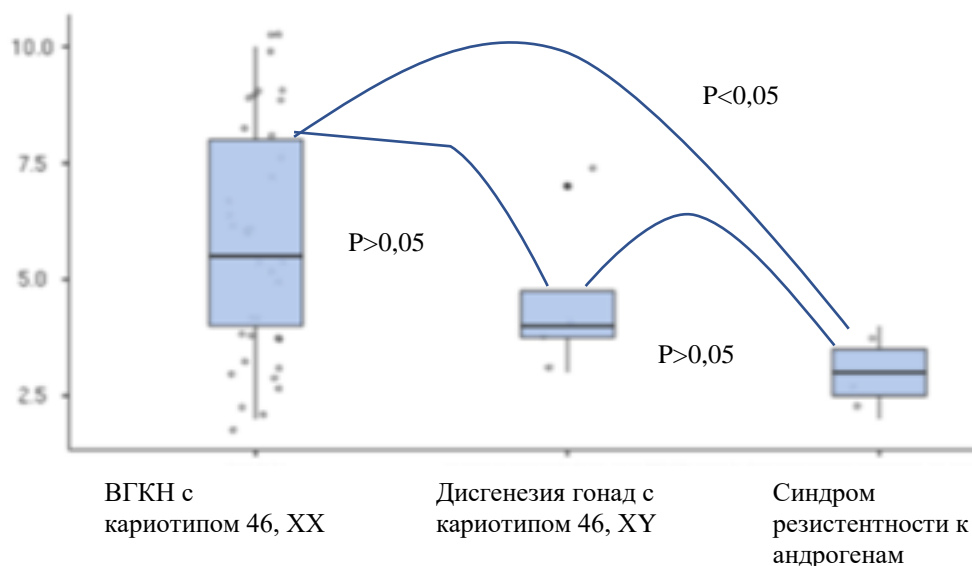


Рисунок 22 – Сравнительный анализ по шкале «доверчивость-подозрительность» среди групп пациентов с НФП

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

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.

Шкала «прямолинейность-дипломатичность» (фактор N) отражает отношение человека к окружающим и действительности. Результаты внутригруппового попарного сравнительного анализа по шкале «прямолинейность-дипломатичность» представлены в таблице 20 и на рисунке 23.

Таблица 20 – Сравнительный анализ по шкале «прямолинейность-дипломатичность» среди групп пациентов с НФП

Сравнение групп по шкале «прямолинейность-дипломатичность»					
Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	Нозологический вариант НФП	Стены (медиана)	w	p
Синдром резистентности к андрогенам	8	ВГКН	4	3,649	<b>0,027</b>
Синдром резистентности к андрогенам	8	Дисгенезия гонад	4	2,800	0,117
ВГКН	4	Дисгенезия гонад	4	-0,359	0,965

Примечание: анализ проводился в соответствии с методикой многофакторного личностного опросника Кетелла. Анализ производится в стенах (стандартных единицах измерения). Сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. W – Значение критерия Манна-Уитни. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

Достоверные различия были выявлены в группах ВГКН и резистентности к андрогенам ( $p=0,027$ ). Различия были представлены более высокими показателями оценок при синдроме резистентности к андрогенам и более низкими - в группе ВГКН.

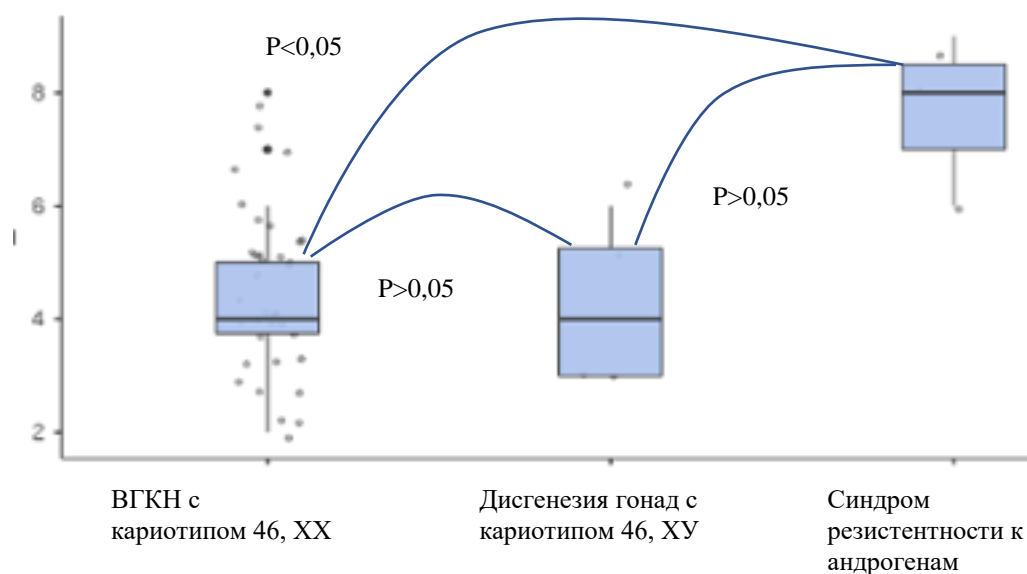


Рисунок 23 - Сравнительный анализ по шкале «прямолинейность-дипломатичность» среди групп пациентов с НФП



Примечание: сравнительный анализ медиан стенов проведен с использованием попарного межгруппового посттеста Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner. Достоверный уровень различий при  $p < 0,05$ .

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.

Также, как и при оценке полоролевого поведения, при анализе личностных характеристик достоверные различия были установлены в паре групп «ВГКН-синдром резистентности к андрогенам».

Обобщая полученные данные, сделано заключение о том, что статистически достоверные различия по шкалам личностных характеристик были выявлены только в группах сравнения «ВГКН-синдром резистентности к андрогенам». Эти данные сонаправлены с полученными ранее по полоролевому поведению, где также достоверные различия были выявлены между этими двумя группами.

Подводя итог этого раздела диссертационного исследования, сформирован вывод, что половая самоидентификация имеет разнонаправленные тенденции в зависимости от варианта НФП, полностью совпадая с генетическим полом в группе ВГКН и являясь полностью противоположной генетическому полу при других вариантах НФП исследованной группы пациентов. Полоролевое поведение пациентов с НФП в преобладающем количестве случаев соответствует андрогинному типу и является сопоставимым с общепопуляционными тенденциями. Однако только в группе пациентов с ВГКН в 14% случаев выявлены отклонения полоролевого поведения, которое соответствовало маскулинному типу. Внутри групп с андрогинным полоролевым поведением также были найдены значимые различия, которые установлены между пациентами с ВГКН и нечувствительностью к

андрогенам. Различия характеризовались тенденцией к более маскулинному типу поведения у пациентов с ВГКН, при этом сохраняя соответствующую генетическому полу самоидентификацию. Наибольшие различия в личностных характеристиках пациентов с НФП были выявлены в сравнении групп ВГКН и синдрома резистентности к андрогенам. Так, в случае ВГКН личность характеризовалась замкнутостью, жесткостью, прямолинейностью, подозрительностью. Для пациентов с синдромом резистентности к андрогенам напротив характерны общительность, чувствительность, дипломатичность, доверчивость.

Таким образом, основываясь на полученных результатах проведенного нами исследования, было сделано заключение, что половая самоидентификация индивидуума не всегда совпадает с генетическим полом. Полороловое поведение у большинства пациентов с НФП 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. Некоторые поведенческие и личностные характеристики могут формироваться под влиянием нейрогормональных воздействий, так как наиболее выраженные различия в этой области были выявлены при формах НФП, сопровождающихся либо избытком андрогенов, либо полной к ним нечувствительностью.

## ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Понимание механизмов и принятие максимально корректных решений в оказании помощи при нарушениях формирования пола (НФП) и половой дифференцировки остаются сложной и не окончательно решенной проблемой научно-практической эндокринологии. 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. Процессы дифференцировки пола запускаются с очень ранних этапов эмбрионального развития, формируя из первоначально бипотенциальных структур к концу 1-го – началу 2-го триместра жизни плода анатомическое строение и функциональный потенциал развития в соответствии с генетически запрограммированным полом. При патологическом сценарии вследствие разных причин на данном этапе эмбриогенеза возникает несоответствие составляющих пола (генетического, гонадного, фенотипического), что ведет к рождению ребенка с нарушением дифференцировки пола, или НФП. Отдельное место и важное значение в формировании пола человека отводится половой дифференцировке мозга, или психологическому полу, концепция понимания которого претерпела принципиальные перемены с 70-х годов прошлого столетия. До этого периода, согласно господствовавшей теории бихевиоризма, сторонником которой являлся J. Money, считалось, что при рождении ребенок не имеет определенной гендерной идентичности, и формирование ее происходит исключительно под влиянием социальных факторов внешней среды. Согласно утверждению J. Money, воспитание в присвоенном поле, независимо от генетического, с раннего возраста способно сформировать соответствующую половую самоидентификацию [165, 166]. Однако наблюдение ряда трагических событий, включая суицид, среди повзрослевших пациентов с присвоенном в соответствии с

данной теорией полом воспитания, или паспортным полом, показало ее ошибочность и заставило продолжить изучение основ формирования психологического пола. Таким образом, на смену предшествующей пришла современная концепция, согласно которой гендерная идентификация рассматривалась в неразрывной связи со многими биологическими факторами, в большинстве своем имеющими врожденный и наследственный характер. Автором современной концепции является профессор Milton Diamond, отстаивающий точку зрения о превалирующей роли биологических факторов над социальными в процессах формирования психологического пола и гендерной идентификации [107]. Исследования, проведенные впоследствии, значительно расширили понимание механизмов, лежащих в основе половой дифференцировки мозга. В настоящее время доказано, что основная роль в данном процессе принадлежит трансляционной активности ряда генов и действию андрогенов на этапах развития плода. Причем интересным является факт, что те же факторы (гены и андрогены) определяют процессы анатомической дифференцировки пола; однако временные периоды, важные для процессов анатомической и психологической дифференцировки пола, не совпадают. Так, процессы анатомической дифференцировки пола должны завершиться в первой половине периода гестации, а половая дифференцировка мозга происходит по второй ее половине. Данный факт свидетельствует о том, что оценка фенотипических особенностей полового развития, равно как и гормональной активности половых желез, не всегда позволяет прогнозировать особенности половой дифференцировки мозга и соответственно гендерной самоидентификации при взрослении пациента, что значительно затрудняет в ряде случаев принятие решений при планировании оказания помощи при НФП, так как многие тактические действия (хирургическая пластика, заместительная гормональная терапия и др.) определяются в соответствии с присвоенным полом воспитания, или паспортным полом, который должен быть выбран максимально корректно с учетом прогноза гендерной самоидентификации конкретного индивидуума [205, 207].

Таким образом, подводя итог современному состоянию рассматриваемой проблемы, следует отметить, что 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. 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 [33]. 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 [176].

Вышеперечисленное определило актуальность и дизайн проведенного нами исследования, имевшего основной целью изучение и сопоставление клинических,

нейроэндокринных, молекулярно-генетических и психологических параметров при нарушениях формирования пола для оптимизации персонифицированного подхода к диагностике и лечению данной группы заболеваний. Исследование включило экспериментальный и клинический этапы, на каждом из которых были последовательно изучены основные регуляторы половой дифференцировки, причем если роль генетических факторов оценивалась в ассоциации с клиническим и психологическим фенотипом на клиническом этапе исследования путем обследования пациентов с НФП, то оценить влияние пренатального действия андрогенов на механизмы половой дифференцировки мозга оказалось возможным исключительно на экспериментальном материале путем индукции гиперандрогенемии на разных сроках гестации у беременных самок крыс и последующего изучения нейромедиаторного сигналинга у потомства женского пола. Учитывая сложившееся в физиологии суждение о недостаточной информативности ассоциаций полового поведения животных и человека и вследствие этого невозможность трансполирования экспериментальных данных в этой области на человеческую популяцию, фокус исследовательского интереса экспериментального этапа нашей работы был направлен на изучение изменений нейрогуморального сигналинга в ЦНС и других биологических средах под влиянием прямого и опосредованного влияния избытка тестостерона. Экспериментальный этап проведен на 50 половозрелых самках крыс линии Wistar, выращенных в условиях вивария. Модель экспериментально индуцированной гиперандрогенемии была создана путем введения тестостерона на сроках гестации, соответствующих 2-му и 3-му триместрам. Полученное при разрешении беременности потомство было оценено по соматическому статусу и наличию врожденных аномалий, мертворождению с последующей выборкой потомства женского пола, исследование которого проводилось в возрасте 4-х месяцев (экстраполируя на стадии полового развития человека – полное его завершение).

В этой группе проводилась количественная оценка и корреляции уровней нейромедиаторов ЦНС – производных моноаминов (норэпинефрина, серотонина), а

также кисспептина в ассоциации с возрастом полового развития и сроком пренатальной андрогенизации. Полученные результаты свидетельствовали о прямом тератогенном влиянии фармакологических доз тестостерона, подтверждаемом повышением более чем в 3 раза (18,9% против 6%) уровня мертворождаемости и значительно большим числом врожденных аномалий при андрогенизации во 2-м триместре, т.е. на ранних сроках гестации.

Исследование профиля моноаминовых нейромедиаторов (норэпинефрина и серотонина) проведено в трех ассоциированных с половым диморфизмом структурах ЦНС –гипоталамусе, гиппокампе и миндалевидном комплексе. Каждая из названных структур играет определенную роль в иерархической системе управления половыми функциями организма, при этом гипоталамус имеет наиболее высокую плотность нейросекреторных ядер, секретирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГнРГ), кисспептины и другие биологически активные нейромедиаторы. Исследования последних десятилетий дают интересную научную информацию в отношении количественных изменений, топки секретирующих ядер моноаминовых нейромедиаторов в ассоциации с клиническими наблюдениями вариантов полового поведения, сексуальной самоидентификации и ориентации животных мужского и женского пола. Так, P.J. Fitzgerald (2008) на основании полученных результатов высказал гипотезу о том, что в основе гомосексуальной и бисексуальной половой ориентации имеет место сильная норадренергическая и слабая серотонинергическая системы [118]. Другими исследователями получены экспериментальные данные о том, что повышение уровня норэпинефрина, секретируемого медиальными ядрами преоптической зоны гипоталамуса, сопровождалось повышением сексуальной активности и возбуждения, в то время как высвобождение серотонина латеральными ядрами переднего гипоталамуса, напротив, снижало сексуальное влечение, так как ингибировались дофаминсекретирующие нейроны [173]. Lin T.W. и соавт. (2013) подчеркивали, что наличие тестостерона, инициирующего повышение уровня окиси азота, являлось необходимым условием для реализации дофаминергической секреции

в медиальных преоптических ядрах гипоталамуса. При этом исследователи отметили, что взаимные изменения дофаминовой и серотониновой секреции в различных областях головного мозга способствовали как повышению сексуальной активности, так и появлению сексуальной удовлетворенности [153]. Однако, несмотря на достаточно активное исследование изменений уровней нейромедиаторов – производных моноаминов, сохраняются открытыми ряд вопросов, касающихся нейрофизиологических основ формирования полового поведения, самоидентификации и сексуальной роли индивидуума. В последние годы интенсивно изучается роль лиганд-рецепторной системы кинспептина в вышеназванных процессах, а также характер взаимодействий последних с нейромедиаторами ЦНС и половыми гормонами [140, 211].

Полученные в ходе проведенного нами исследования результаты показали, что в структурах ЦНС, имеющих отношение к регуляции полового развития и половой дифференцировки мозга, нейромедиаторного сигналинга связаны с более поздним, имеющим место в 3-м триместре, периодом гиперандрогенизации. Так, установлено значимое повышение уровня нейромедиатора норэпинефрина, способного, по указанию ряда исследований, опосредовать влияние андрогенов на половую дифференцировку мозга и быть ассоциированным с маскулинизацией у особей женского пола. Избыток уровня дофамина и его производных, к которым относится норэпинефрин, влечет повышение агрессивности, жестокости, гиперсексуальности в половом поведении, независимо от гендерной принадлежности. Что касается профиля другого исследуемого нейромедиатора, серотонина, то выявленные изменения его уровня также были диагностированы в группах с более поздним периодом андрогенизации. Установленное нами снижение уровня серотонина у потомства женского пола, несомненно, способно также оказывать детерминирующее влияние на половое поведение и дифференцировку, так как существуют данные, свидетельствующие об ассоциациях низкого уровня этого нейромедиатора с инверсиями половой ориентации, в частности, гомосексуальности и бисексуальности.



Что касается изучения периферических гуморальных взаимодействий, то следует подчеркнуть, что отсутствие каких-либо изменений уровня тестостерона в крови самок крыс, андрогенизированных пренатально, свидетельствует об отсутствии прямого влияния тестостерона на изменение гормонального статуса.

Тем больший интерес представили полученные результаты в отношении динамики уровня кисспептина. Фактор андрогенизации на поздних сроках гестации привел к существенному возрастанию этого пептида в крови потомства, что опосредовано, учитывая предшествующие данные в отношении тестостерона, непрямым воздействием этого фактора на кисспептиновый сигналинг. Учитывая обсуждаемое в последние годы многообразное участие системы KISS-KISS1R в регуляции функциональной активности гонадной оси и детерминации полового поведения, можно гипотетически предположить неслучайность и взаимосвязанность однонаправленных событий, касающихся нейромедиаторного сигналинга в ЦНС (повышение дофаминовых производных, снижение серотонина) и повышение плазменного уровня кисспептина у особей женского пола, имевших пренатальную гиперандрогенизацию на поздних сроках гестации.

Основываясь на современной концепции половой дифференцировки мозга, предполагающей одним из основных детерминирующих факторов последней дифференцирующее действие тестостерона именно во второй половине гестации, т.е. на более поздних по отношению к анатомической дифференцировке пола сроках, следует подчеркнуть, что практически все значимые изменения в сравнении с контрольной группой потомства интактных крыс были выявлены именно в группе с андрогенизацией на поздних сроках гестации, что, в связи с этим, может рассматриваться как обоснование нейрогуморальных основ нарушений формирования психологического пола. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кисспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

Как было упомянуто выше, важная роль, как в физиологических, так и в патологических процессах дифференцировки пола принадлежит генетическому фактору. Среди генетических причин НФП различают хромосомные, при которых каузативную роль играют структурные или количественные аномалии хромосом, и генные, суть которых связана с мутациями ряда генов, трансляционная активность которых связана с регуляцией различных этапов анатомической и психологической дифференцировки пола. Изучение генетических причин НФП имеет относительно небольшой временной период и получило наиболее активное развитие в течение последних 10 — 15 лет [52]. В соответствии с технологическими возможностями методология молекулярно-генетического исследования претерпевала изменения от секвенирования нескольких отдельных генов до одномоментного секвенирования панели генов методом NGS или экзоза [117]. В научных публикациях последних лет, посвященных данной теме, прослеживаются убедительные рекомендации начинать генетическое исследование сразу с определения последовательности большого числа генов, разумеется, при наличии такой возможности. Так, E. Vilain (2016) в своем труде, посвященном анализу эффективности применения секвенирования нового поколения при НФП, подчеркивал значимость как кодирующих, так и некодирующих частей генома, обосновывая это достаточно невысокой выявляемостью генетических причин при данной патологии, требующей при некоторых вариантах проведения секвенирования полного экзоза. К числу наименее генетически изученных автор отнес овотестикулярные и синдромальные варианты НФП [217]. В ряде других публикаций также поддерживается идея секвенирования сразу больших панелей генов, и обосновывается важность установления генетических причин патологии пола [79, 105, 111, 209]. Так, Buonocore F. et al. (2016) подчеркивают, что при атипичном строении наружных гениталий пол ребенка только по клинической картине в ряде случаев установить не представляется возможным. Установление же генетических вариантов помогает уточнить нозологический вариант НФП, от которого часто зависит прогноз клинической презентации, функциональной активности гонад,

фертильности и онкологического риска. Также становится возможным рассчитать наследственный риск и осуществить генетическое консультирование «ядерных» семей [79].

Е. Vilain обращает внимание на наличие высокой фенотипической вариабельности у пациентов с известными вариантами в одном и том же гене, причины которой также не являются до конца ясными до настоящего момента [217]. При этом, несмотря на активное развитие молекулярных технологий, по данным разных авторов, установление генетических причин НФП до настоящего времени происходит в 40 — 50% случаев, при этом примерно у половины пациентов не удается выявить каузативный вариант. В качестве возможных причин приводятся недостаточный охват пациентов, ранее тестированных на 1-2 гена, методами диагностики с применением NGS, недостаточный спектр генов, включаемых в данную панель, роль трудно распознаваемых соматических мутаций в раннем эмбриогенезе, влияние эпигенетических и внешнесредовых факторов на раннее развитие гонад и др. [65, 79, 111, 184, 217].

Существование ряда нерешенных и неясных вопросов в области изучения молекулярно-генетических основ нарушения половой дифференцировки обусловило значимость следующего этапа нашего исследования, суть которого состояла в проведении генетического тестирования, в том числе методом секвенирования нового поколения (NGS), включавшего панель из 80 генов, описанных в ассоциации с НФП, с последующим критическим анализом причинной значимости выявленных вариантов и сопоставления с клинической презентацией патологии. Были включены 70 пациентов, из которых 60% имели диагноз ВГКН, остальные — другие варианты НФП, в подавляющем большинстве с кариотипом 46, XY. В последней группе были представлены разные варианты НФП — дисгенезия гонад, дефекты биосинтеза тестостерона, полная и парциальная нечувствительность к андрогенам, проксимальная гипоспадия, овотестикулярное НФП, синдром «XX-мужчины». Все пациенты были обследованы в условиях эндокринологического отделения по клиническим показаниям, с верификацией клинического диагноза.

Молекулярно-генетическое обследование также было проведено всем пациентам с НФП: при ВГКН — секвенирование одного гена *CYP21A2* по Сэнгеру, при других вариантах НФП — секвенирование методом NGS. Среди пациентов с ВГКН все имели классическую форму со значимой степенью пренатальной вирилизации; 45% - простую вирильную, 55 % - сольтерющую форму. У всех обследованных пациентов идентифицированы патологические варианты в гене *CYP21A2*: 34% - I2spl, 21% - R356W, 17% - I172N, 28% - P30L. Поскольку ВГКН является среди других вариантов НФП наиболее изученной с точки зрения генетических причин, то данная группа пациентов представила наибольший исследовательский интерес на следующем этапе работы, посвященном изучению психологического пола и половой дифференцировки мозга. При этом основной фокус на данном этапе был направлен на группу других вариантов НФП, в основном имеющих Y-хромосому в кариотипе. Количество пациентов в данной группе – 28 человек. Распределение по нозологическим вариантам было следующим: 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 – НФП -синдромом «XX-мужчины», или 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.

Молекулярно-генетическое обследование методом секвенирования нового поколения, проведенное у всех 28 пациентов, выявило ряд вариантов, анализ которых с оценкой каузативной значимости по отношению к рассматриваемой патологии проводился в соответствии с рекомендациями Американской коллегии по медицинской генетике и геномике и Ассоциации молекулярной патологии [204] с последующим биоинформационным анализом с использованием проектов «1000 геномов», ESP6500 и Genome Aggregation Database (GnomAD), оценкой клинической релевантности выявленных вариантов на основании базы данных ClinVar и критериев ACMG.

Полученные в ходе генетического исследования результаты показали следующее. Генетические варианты в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП и расцененные как потенциально каузативные были выявлены в 39% случаев, причем 43% из них отнесены к ранее неописанным нуклеотидным заменам. Обращаясь к опубликованным результатам подобных исследований, следует отметить, что Fan Y. et al. (2017) в группе пациентов с НФП установили причинные варианты в 28% случаев (у 9 человек из 32), при этом ранее неописанные составили 88%. При сравнении выявляемости методом NGS по сравнению с ранее проведенным в той же группе пациентов исследованием отдельных генов авторами отмечено возрастание с 10% до 28%, т. е. почти в 3 раза [105]. В другом исследовании, проведенном Dong Y. et al. (2016), причинные генетические варианты были найдены у 52% пациентов с НФП (у 11 человек из 21), что позволило у 38,1% подтвердить клинический диагноз [121]. В анализе количественно большей когорты пациентов (326 человек), проведенном Eggers S. et al. (2016), диагностически значимые варианты были идентифицированы у 43% пациентов с НФП [111]. Таким образом, полученные нами результаты генетического обследования показали в целом сопоставимую частоту выявленных мутаций в генах, ассоциированных с нарушением дифференцировки пола, у

пациентов, ранее необследованных методом секвенирования отдельных генов. При анализе полученных в ходе молекулярно-генетического обследования секвенированием нового поколения достаточная большая часть нуклеотидных замен была расценена, как не имеющая причинного влияния на патологию дифференцировки пола у пациента. Речь идет о полиморфизмах, а также идентифицированных вариантах в генах, не описанных в ассоциации с НФП, в гетерозиготном состоянии. Знания о последних, однако, могут иметь значение для семейного «генетического портрета», с точки зрения вероятности манифеста патологий у потомков при соответствующей комбинации рецессивных генов.

В соответствии с целью данного исследования к числу причинных были отнесены идентифицированные варианты, охарактеризованные, как каузативные, с учетом их низкой популяционной частоты встречаемости и факта наличия нуклеотидных замен в генах, ранее описанных в ассоциации с НФП по анализу имеющихся данных генетических баз и в сопоставлении с клиническим фенотипом у обследуемого пациента. Структура отнесенных к данной группе вариантов была представлена мутациями в гене стероидогенного фактора *NR5A1 (SF1)* у 2 пациентов, в гене *MAP3K1* у 2 пациентов, в гене андрогенового рецептора (*AR*) у 4 пациентов, в гене *CYP17A1* у 1 пациента, в гене *MAMLD1* у 2 пациентов. Большинство пациентов имели в качестве каузативного вариант в 1 гене, однако у двоих были выявлены по 2 гена, которые можно было расценивать как значимые для патологии полового развития. Ранее подобные находки были описаны в работах Eggers S. et al. (2016) с выдвижением гипотезы об олигогенном генезе ряда форм НФП [111]. Полученные нами данные согласуются с этим предположением, однако в одном из случаев требуют более длительного наблюдения за пациентом по достижении им возраста спонтанного пубертата, так как клиническая роль одного из идентифицированных вариантов в гене *SEMA3A* ассоциирована с гипогонадотропным гипогонадизмом.

Что касается типа наследования, то у большинства пациентов замены были выявлены в гетерозиготном состоянии в генах, ранее описанных, как каузативные при

НФП с аутосомно-доминантным и X-сцепленным типом наследования, и лишь у одного пациента замена обнаружена в гомозиготном состоянии, в гене с аутосомно-рецессивным вариантом НФП.

Основной целью генетического обследования при врожденной патологии является установление ассоциации выявленных мутаций с характером клинических проявлений, или фенотипом, для установления возможных закономерностей в презентации патологии и оптимизации принятия решений относительно терапевтической тактики и наследственного прогнозирования. Для группы патологии, сопровождающейся нарушениями половой дифференцировки, решение данных задач имеет первостепенное значение, так как при ряде нозологических вариантов, клинически имеющих очень схожие проявления, в раннем возрасте трудно прогнозировать функциональный потенциал половых желез, степень онкологического риска, равно как и половую самоидентификацию, и сексуальную ориентацию во взрослом возрасте. При этом знание генетически подтвержденного диагноза НФП может оказать реальную помощь в предикции вышеобозначенных проблем путем их прогнозирования на основании знаний сценария полового развития у подобных пациентов, описанных ранее. В проведенном нами исследовании ассоциации «генотип-фенотип» в группе пациентов с идентифицированными как каузативные, мутациями в генах панели НФП, носили следующий характер. У пациентов с дисгенезией гонад генетическое подтверждение было установлено в 50% случаев и представлено нуклеотидными заменами в генах *MAP3K1* и *NR5A1*, при этом первая характеризовалась клиническим фенотипом полного гонадного дисгенеза, или «46, XY - женщины», в то время как при второй клинический фенотип соответствовал парциальному гонадному дисгенезу со спонтанной функциональной активностью гонад и вирилизацией в возрасте позднего пубертата у одного из пациентов. Всего в исследовании мутация в гене *MAP3K1* была идентифицирована у троих пациентов, двое из которых имели описанный ниже фенотип полного гонадного дисгенеза, а третий, вероятно, в связи с олигогенным характером патологии (сочетание мутаций в

генах *MAP3K1* и *MAMLD1*), имел диагноз проксимальной гипоспадии. Изучение MAPK-сигнального пути, одним из компонентов которого является ген *MAP3K1*, кодирующий митоген-активированную протеинкиназу киназы киназы-1, в последние годы привлекает большой исследовательский интерес в аспекте участия дифференцирующего влияния на тестикулы.

В специальной литературе описан большой фенотипический полиморфизм НФП, ассоциированных с данным генетическим вариантом, которые были представлены, как дисгенезией гонад, так и сочетанием гипоспадии с крипторхизмом и микрогенитализмом, что согласуется с полученными в проведенном нами исследовании результатами. При этом у одного из наших пациентов с синдромом полного гонадного дисгенеза, имеющего женский паспортный пол и самоидентификацию, был идентифицирован ранее неописанный вариант нуклеотидной замены в гене *MAP3K1* chr5:56152500, NM\_005921.2:c.A556G:p.Arg186Gly в гетерозиготном состоянии. Что касается мутации гена *MAMLD1*, то зарегистрированные в генетических базах данных клинические проявления, ассоциированные с данным геном, в большинстве случаев представлены проксимальной гипоспадией, иногда в сочетании с крипторхизмом. Однако в одном из описаний группы пациентов с мутацией в этом гене дано редкое описание сочетания у 2 пациентов гипоспадии с множественными аномалиями развития. При этом остальные пациенты не имели экстрагенитальных проявлений. Описанный в нашем исследовании пациент с мутацией в гене *MAMLD1* имел значительную недостаточность маскулинизации наружных гениталий (микропенис, крипторхизм, проксимальную гипоспадию), вследствие чего дважды подвергся процедуре смены паспортного пола, при этом наличие тяжелого ВАР мочевого системы — ренальной дисплазии было недооценено у данного пациента, будучи, вероятно, «замаскированным» проблемой установления половой дифференцировки. Это привело к развитию тяжелой декомпенсированной почечной недостаточности в первой декаде жизни, которая была диагностирована при госпитализации в нашу



клинику с целью проведения хирургической пластики наружных гениталий. Сформулирована рекомендация, что при НФП с установленной в качестве каузативной мутации в гене *MAMLD1* в протокол обследования должен быть включен углубленный поиск экстрагенитальной врожденной патологии, включая аномалии мочевой системы, учитывая описанный случай с быстрым развитием функциональной декомпенсации.

Второй случай мутации в гене *MAMLD1* относился к описанным ранее и был выявлен у пациента с олигогенным типом наследования в сочетании с заменой в гене *MAP3K1* и был представлен проксимальной гипоспадией.

С практической точки зрения представляют значительный интерес клинические случаи с идентифицированными заменами в гене *NR5A1*. Данный ген кодирует стероидогенный фактор, являющийся регулятором развития и функциональной активности надпочечников и гонад. Мутации в *NR5A1* являются одними из наиболее часто определяемых генетических причин нарушений развития гонад и связаны с широким фенотипическим спектром клинических проявлений, включая гипогонадизм, бесплодие, НФП с гонадным дисгенезом, гипокортицизм и некоторые другие варианты. В проведенном нами исследовании было выявлено 2 пациента, у которых идентифицированы ранее неописанные нуклеотидные замены 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 (у матери в одном случае, с презентацией гипергонадотропного гипогонадизма с прогрессией в послеродовом периоде, и у отца во втором случае, 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 (в 15 лет) в соответствии с генетическим полом, что проявилось прогрессирующей вирилизацией и низведением одной гонады. Лабораторно определялся уровень тестостерона, соответствующий началу пубертата, но гистологическое исследование удаленных гонад показало дистрофические изменения канальцевых структур. 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 тестикула. Анализируя эти клинические случаи, следует подчеркнуть, что оба пациента имели нарушенное строение наружных гениталий с наличием урогенитального синуса, при этом второй пациент длительное время наблюдался специалистами по поводу предполагаемых синехий; при этом оба пациента имели функционально активные мужские гонады. Установление истинного диагноза в обоих случаях произошло в возрасте с уже сформировавшейся половой самоидентификацией, по крайней мере, у первого 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 неописанные замены в генах андрогенового рецептора *AR* у 3-х пациентов, мутация у четвертого имела описание в генетических базах данных с низкой популяционной

частотой. Клинический фенотип пациентов с синдромом полной резистентности к андрогенам был представлен полной формой у троих и парциальной формой у одного из пациентов, и во всех случаях генетическое подтверждение имело решающее значения, как для подтверждения нозологического варианта НФП, так и планирования терапевтической тактики, в том числе у одного из пациентов явилось основой принятия решения о смене паспортного пола (мужского на женский).

Важным в практическом аспекте явилось генетическое обследование с последующим установлением каузативного варианта в гене *CYP17A1* у пациента с НФП вследствие нарушения биосинтеза андрогенов. Клинический фенотип пациента был представлен фемининным строением наружных гениталий с отсутствием дериватов Мюллеровых протоков, гипергонадотропным гипогонадизмом у пациента с генотипом 46, XY. Данный симптомокомплекс привел к первоначально ошибочной диагностике НФП вследствие полной резистентности к андрогенам, старту тяжелой фармакорезистентной артериальной гипертензии в молодом возрасте, ставшей причиной поступления в кардиологическое отделение нашего Центра. Углубленное обследование позволило усомниться в ранее выставленном диагнозе, а результат генетического исследования подтвердил иную причину НФП, а именно нарушение биосинтеза андрогенов вследствие блока фермента 17-альфа гидроксилазы. Уточнение диагноза дало объяснение генеза гипертензии, а назначение терапии глюкокортикостероидами привело к полному купированию этого синдрома. Несомненно, уточнение диагноза в более раннем возрасте могло бы предотвратить столь тяжелое проявление болезни, как резистентная артериальная гипертензия, сохранявшаяся у пациентки в течение многих лет.

Таким образом, подводя итог значимости идентифицированных в данном исследовании каузативных генетических вариантов, следует подчеркнуть, что большинство из них имели решающее значение в установлении или подтверждении клинического диагноза НФП, на основании которого, зная патогенез нарушения дифференцировки пола, принимались тактические решения в отношении

персонифицированной тактики оказания помощи. В части случаев более раннее проведение такого исследования могло значительно повлиять и изменить тактику лечения пациентов. Описание новых мутаций в ассоциации с клиническими фенотипами расширит существующие генетические базы данных в части НФП. Наблюдения синдромальных ассоциаций при определенных генетически подтвержденных формах НФП повысит настороженность и расширит программы обследования. Наконец, сведения о наследственных формах НФП, ассоциированных, в первую очередь, с мутациями в гене *AR* и *NR5A1*, повысят уровень и качество генетического консультирования и своевременной диагностики НФП в «ядерных» семьях.

По результатам проведенного обследования была отмечена низкая выявляемость генетических причин при большинстве вариантов проксимальной гипоспадии. Также не нашли генетического подтверждения 50% случаев дисгенезии гонад, овотестикулярное НФП. Объясняя полученные данные, следует присоединиться к большинству авторов научных публикаций по данной теме об актуальности дальнейшего поиска новых аффертных в отношении пренатальной дифференцировки пола генов с расширением панелей NGS, проведением секвенирования экзома и др. При этом следует подчеркнуть, что ни у одного пациента с НФП из обследованной группы не были идентифицированы мутации гена *SRY*, считавшиеся наиболее частой причиной НФП, поиск которых до сих пор рекомендуется в качестве старта генетического обследования при НФП в рутинных протоколах генетического обследования при НФП. В этом отношении мы можем присоединиться к рекомендациям тех авторов, которые не рекомендуют проводить первоначально исследование 1-2 генов, а при подозрении на ряд вариантов НФП, исключая ВГКН, сразу стартовать с проведения секвенирования методом NGS или полноэкзомного секвенирования с целью сокращения затрат времени и финансов [79, 105, 209, 217].

Одним из наиболее сложных вопросов в понимании проблемы нарушений пола и особенно принятия решений об установлении пола воспитания, или паспортного пола, в каждом индивидуальном случае НФП является оценка психологического пола с формированием предиктивного прогноза наибольшей сексуальной комфортности пациента после достижения им возраста половой зрелости. В начале данного раздела были описаны последовательно менявшиеся концепции половой дифференцировки мозга, завершившиеся современным представлением об ее формировании пренатально и необратимо под воздействием гормональных (количество андрогенов) и генетических факторов. В нашей стране наука о поле начала развиваться со второй половины прошлого столетия, и ее развитие тесно связано с именами таких ученых и клиницистов, как И.В. Голубева, А.Б. Окулов, Э.П. Касаткина, В.А. Петеркова и многие другие. Несмотря на значительный прогресс в изучении психологии пола, до настоящего времени сохраняется актуальность исследований в данной области, так как в ней описаны наблюдения о том, что часть пациентов с НФП по достижении возраста половой зрелости испытывают половую дисфорию, часто завершающуюся решением о смене пола [32]. Мы считаем, что данный аспект при комплексном исследовании проблемы нарушений половой дифференцировки имеет важное значение, поэтому одной из задач нашего исследования стало изучение психологического пола в исследуемой группе пациентов. Методологически оценка психологического пола включает определение половой самоидентичности, полоролевого поведения и сексуальной ориентации у пациентов, достигших возраста половой зрелости. Дополнительно представляет интерес оценка некоторых особенностей личности и поведения у пациентов с различными вариантами НФП.

Идентичность личности в целом является одним из важнейших психосоциальных процессов и представляет собой ощущение своей целостности и непрерывности во времени, а также понимание, что другие люди также признают это. Идентичность характеризует именно то, что остается постоянным, несмотря на все изменения и развитие данного человека на протяжении его жизни. Начиная с возраста

1-1,5 года дети идентифицируют себя со своим именем, откликаются на него и называют им себя, а к трем годам начинают правильно использовать местоимение "Я", равно как и другие личные местоимения. Граница между Я и не-Я первоначально проходит по физическим границам собственного тела. Формирование половозрастной идентификации связано с развитием самосознания ребенка. В норме первичная половая идентичность формируется у детей в возрасте от полутора до трех лет, и в последующем формируется параллельно с ростом и взрослением ребенка [5]. Часто проявления половой идентичности могут оцениваться элементами формирующегося полоролевого поведения (выбор игрушек, игр, занятий, одежды, поведения и проч.). Однако полоролевое поведение не идентично самоидентификации и, как доказали исследования последних десятилетий, эти два процесса различаются принципиально, так как половая самоидентификация формируется пренатально, а полоролевое поведение приобретает под влиянием факторов внешней среды и играет небольшую роль в общей психологической дифференцировке пола [57, 58]. Отчетливое осознание половой самоидентификации формируется на протяжении периода взросления, поэтому оценку его мы проводили у пациентов, достигших школьного возраста.

При оценке половой самоидентичности 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 ля Шапель, с кариотипом 46, XX. Пациенты с проксимальной формой гипоспадии и овотестикулярным НФП были младенцами, и поэтому не включены в исследование.

Что касается следующей части исследования, в которой было оценено полоролевое поведение с использованием валидизированной методики С. Бем, то его

результаты показали отсутствие у большинства обследованных значимых отклонений от варианта, характерного для популяции мужского и женского пола в целом, в отсутствии НФП и получившего название андрогинного. Андрогинному варианту гендерной идентичности примерно в равной степени присущи в высокой степени и маскулинные, и фемининные качества, которые, в соответствии с теорией мультиполярной модели гендерной идентичности могут быть в равной степени представлены у лиц как мужского, так и женского пола [8]. Лишь у 14% пациенток с ВГКН полоролевое поведение было оценено, как маскулинное, при этом все они имели гендерную самоидентификацию в женском поле и не испытывали половой дисфории. Сравнительный анализ тенденций полоролевого поведения среди групп НФП с андрогинным типом показал статистически значимые различия между группой ВГКН и полной формой резистентности к андрогенам, причем представители первой имели параметры, пограничные с маскулинностью, а представители второй, напротив, были пограничны с фемининным вариантом полоролевого поведения. Между другими группами значимых различий установлено не было.

Изучение ассоциаций между типами полоролевого поведения, гендерной самоидентификации и характерологическими особенностями личности представляет большой исследовательский интерес. Нами было проведено обследование пациентов с НФП с использованием многофакторного личностного опросника Р. Кеттелла. Несмотря на то, что полоролевое поведение у большинства обследованных было идентично и различалось лишь наличием тенденций в группах ВГКН и резистентности к андрогенам, по личностным характеристикам именно между этими группами были выявлены значимые различия по 4-м шкалам. Так, «личностный портрет» пациенток женского пола с ВГКН характеризовался следующими особенностями: осторожностью, скрытностью, замкнутостью, низкой экспрессивностью, склонностью к раздражительности, эгоцентризм в сочетании с прямолинейностью и властностью. Напротив, «портрет» пациенток с резистентностью к андрогенам был представлен такими чертами, как добродушие,

эмоциональность, открытость в общении, впечатлительность, склонность к сопереживанию, терпимость, дипломатичность, проницательность. При этом гендерной дисфории ни у кого из обследованных пациентов выявлено не было.

Таким образом, основываясь на полученных результатах исследования, было сделано заключение, что половая самоидентификация индивидуума не всегда совпадает с генетическим полом, полоролевое поведение у большинства пациентов с НФП 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 персонифицированной тактики в отношении пациентов с НФП (рисунок 24).



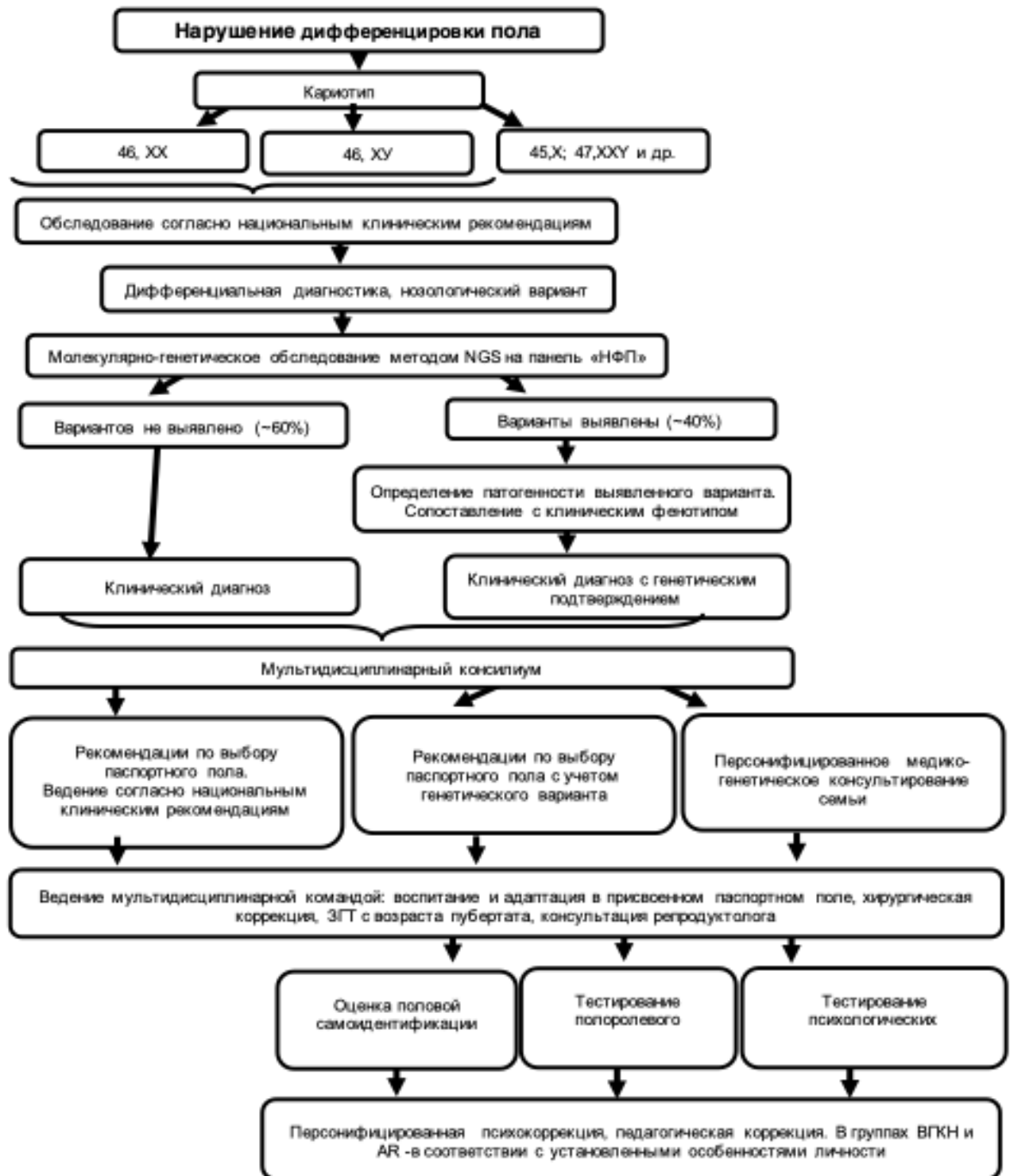


Рисунок 24 - Алгоритм персонализированной тактики в отношении пациентов с НФП

## 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 кинспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию кинспептинового 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 экзона 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АМГ – антимюллеров гормон
- ВАР – врожденные аномалии развития
- ВГКН – врожденная гиперплазия коры надпочечников
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- МРТ – магниторезонансная томография
- НФП – нарушения формирования пола
- НЭ - норэпинефрин
- ПДМ – половая дифференцировка мозга
- РИА – радиоиммунологический анализ
- С – серотонин
- Т – тестостерон
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
- ЦНС – центральная нервная система
- Э - эстрогены
- ACMG – American college of medical genetics and genomics
- AR – синдром резистентности к андрогенам
- IS – основной индекс
- KISS1R – рецептор кисспептина
- Me - медиана
- NGS – next-generation sequencing
- OMIM – online inheritance in man

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 46, XY gonadal dysgenesis: Evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred/C. Le Caignec, S. Baron, K. McElreavey [et al.] // Am J Med Genet. -2003.
2. Александровская, Э.М. Адаптированный модифицированный вариант детского личностного вопросника Р. Кеттелла: Методические рекомендации / Э.М. Александровская, И.Н. Гильяшева – М.: Изд-во МГУ, 1993.
3. Бабичев, В.Н. Нейроэндокринный эффект половых гормонов / В.Н. Бабичев // Успехи физиол. Наук. – 2005. - Т. 36, №1. - С. 54-67.
4. Байрамов, А.А. Андроген - зависимое влияние М-холинолитика метамизила на биоэлектрическую активность головного мозга / А.А. Байрамов, Н.Н. Кузнецова // Психофармакология и биологическая наркология. – 2006. - Т.6, №1-2. - С. 1197-2003.
5. Белопольская, Н.Л. Половозрастная идентификация. Методика исследования детского самосознания / Н.Л. Белопольская. - М.: Когито- Центр, 1998. - с.24.
6. Болотова, Н.В. Задержка полового развития мальчиков / Н.В. Болотова, Н.Ю. Райгородская // Проблемы эндокринологии. - 2009. - Т. 55, №5. - С. 19-23.
7. Болотова, Н.В. Психоэмоциональное состояние подростков с патологией репродуктивной системы / Н.В. Болотова, О.Л. Коновалова // Лечащий врач. - 2015. – Т. 1, №1. - С. 14.
8. Великанова, Л. П. Мультиполярный подход в типологии гендерной идентичности / Л.П. Великанова // Известия КГТУ. - 2008. - №13. - С.156- 160.
9. Гендерная идентичность основа ранней хирургической коррекции у детей с нарушением формирования пола / Н.Р. Акрамов, И.А. Акрамова, А.К. Закиров [и др .] // Вестник современной клинической медицины. – 2013. - №6. – приложение № 2.

10. Дедов, И.И. Половое развитие детей: норма и патология / И.И. Дедов, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова. - М.: Колорит студио, 2002. – 232 с.
11. Дедов, И.И. Руководство по детской эндокринологии / И.И. Дедов, Т.В. Семичева. - М.: Универсум Паблишинг, 2006. - 600 с.
12. Дерюгина, Л.А. Тактика детского уролога-андролога при осмотре новорожденного с нарушением формирования пола / Л.А. Дерюгина, Н.В. Болотова, Н.Ю. Райгородская // Урология. - 2019. - №6. - С.170-173.
13. Дефект стероидогенного фактора 1 (SF1) как причина нарушения формирования пола 46, XY (первое описание в отечественной литературе) / Н.Ю. Калинин, Т.А. Аносова, В.А. Иоутси [и др.], // Проблемы эндокринологии. - 2016.-Т.62, № 1.-С.55-59.
14. Исаев, Д.Н. Половое воспитание детей: медико-психологический аспект / Д.Н. Исаев, В.Е. Каган – Л.: Медицина, 1988.
15. Калинин, Н.Ю. Новая классификация заболеваний, связанных с нарушением формирования пола. Обсуждение международного консенсуса по пересмотру терминологии и классификации гермафродитизма / Н.Ю. Калинин, А.Н. Тюльпаков // Вестн. репродукт. здоровья. - 2008. - №12. - С. 48–51.
16. Кравцова, Н.А. Психологические аспекты нарушений половой дифференцировки у детей / Н.А. Кравцова, Ю.А. Кравцов, Ф.Ф. Антоненко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2005. - №3. - С. 61–63.
17. Критерии клинической диагностики и выбор лечебной тактики у пациентов с неопределенностью пола / Н.В. Болотова, Д.А. Морозов, Н.Ю. Райгородская [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2010. - Т. 6, №1.- С. 178–182.
18. Крипторхизм – проявление синдрома тестикулярной дисгенезии / О.Ю. Латышев, Т.Р. Лаврова, К.К. Мираков [и др.] // Вестник репродуктивного здоровья. - 2008.

19. Межполовые различия в эффектах эстрадиола на уровень моноаминов и их оборот в структурах мозга крыс Вистар / Ю.А. Андреева, К.О. Еремин , В.С. Кудрин [и др.] // Нейрохимия - 2002. - Т. 19, № 2. - С. 107 - 111.
20. Моренков, Э.Д. Нейроактивные стероиды и формирование полового диморфизма латеральной организации мозга / Э.Д. Моренков, Л.П. Петрова // Руководство по функциональной межполушарной асимметрии. — М.: Научный мир, 2009. - С. 207 - 253.
21. Морфофункциональная характеристика гонад у детей с различными вариантами нарушения формирования пола в период мини пубертата / Н.Ю. Райгородская, Н.В. Болотова, Д.А. Морозов [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2016. - Т. 95, № 1. - С. 46-50.
22. Мыслицкий, В.Ф. Половая дифференциация некоторых структур лимбической системы головного мозга крыс в онтогенезе: автореф. дис. доктора биол. наук / Мыслицкий Валентин Францевич. – М., 1990. – 32 с.
23. Нарушение формирования пола 45, Х/46, ХУ: клинико-лабораторная характеристика пациентов / О.Ю. Латышев, Е.С. Санникова, Л.Н. Самсонова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т.16, №3. – С.87-96.
24. Нарушения полового развития / ред. М. А. Жуковского - М.: Медицина, 1989. - 272 с.
25. Нарушения половой дифференцировки / Е.И. Марова, И.С. Яровая, Л.К. Дзеранова [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2003. - № 4. - С.41-43.
26. Нарушения формирования пола 46, ХУ, ассоциированное с мутациями в гене MAP3K1. Описание клинических случаев / И.В. Копылова, Е.С. Кузнецова, И.С. Чугунов [и др.] / Проблемы эндокринологии. - 2018. - Т. 64, № 1. - С. 45-49.
27. Нарушения формирования пола. Учебно-методическое пособие / И.И. Нагорная, Ю.Л. Скородок, Е.В. Плотникова [и др.] - Санкт-Петербург, 2019.



28. Никитина, И.Л. Детская эндокринология - научные достижения и перспективы развития / И.Л. Никитина // Артериальная гипертензия. - 2015.
29. Никитина, И.Л. 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.
30. Никитина, И.Л. Старт пубертата – известное и новое / И.Л. Никитина // Артериальная гипертензия. - 2013.
31. Овотестикулярное нарушение формирования пола у пациента с кариотипом 46, XY / Н.Ю. Райгородская, Н.В. Болотова, Д.А. Жарков [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2017. - № 3. - С.201-203.
32. Окулов А.Б. Становление педиатрической андрогинной экологии как специальности. – М.: Литерпра, 2016. – 112с.
33. Определение риска развития репродуктивных нарушений у мальчиков подросткового возраста / Е.Ю. Загарских, Л.И. Колесникова, Н.А. Курашова [и др.] // Репродуктивное здоровье детей и подростков. - 2013. - № 6. - С. 10- 16.
34. Практикум по гендерной психологии / ред. И.С. Клециной. – Спб.: Питер, 2003.
35. Ранняя коррекция гипоспадии у девочки с нарушением формирования пола / А.В. Аникиев, Н.Ю. Калинин, Е.А. Володько [и др.] // Урология. – 2019. - № 4. - С.91-94.
36. Резников, А.Г. Функциональная тератология нейроэндокринной системы: этиология, патогенез, профилактика / А.Г. Резников // Здоров'я України. – 2007. – № 22/1. – С. 19–21.
37. Сапронов, Н.С. Гонадолиберины / Н.С. Сапронов. - СПб.: Арт-экспресс, 2012. – 272 с.
38. Синдром Де Ля Шаппелля: клинико-лабораторная характеристика четырех пациентов / Е.С. Санникова, О.Ю. Латышев, Л.Н. Самсонова [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2017. - Т.63, №2. - С.124-126.

39. Соматические мутации в гене рецептора к андрогенам как причина возникновения синдрома резистентности к андрогенам / Н.Ю. Калинин, А.А. Колодкина, В.М. Петров [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2019.- №4. - С.268-272.
40. Цитогенетические методы. Медицинские лабораторные технологии / Т.В. Кузнецова, Ю.А. Логинова, О.Г. Чиряева [и др.]; ред. А. И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика, 1999.
41. Шишкина, И.В. Рецепторы к половым гормонам в гипоталамусе и их роль в половой дифференцировке мозга у крыс: автореф. дис. канд. биол. наук / Шишкина Ирина Владимировна. – М., 1984. – 23 с.
42. Ярмолинская, М.И. Значение Кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы / М.И. Ярмолинская, Н.Ф. Ганбарли, Э.К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. — 2016. — Т.65. — № 6. — С. 4-18.
43. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2 / J. Collignon, S. Sockanathan, A. Hacker [et al.] // Development. - 1996. - Vol.122. - P.509–520.
44. A Gender Assessment Team: experience with 250 patients over a period of 25 years / M. A. Parisi, L. A. Ramsdell, M. W. Burns [et al.] // Genetics in Medicine. - 2007. - Vol. 9, No6. - P.348–357.
45. A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis / P. Canto, F. Vilchis, D. Soderlund [et al.] // Molecular Human Reproduction. - 2005. - Vol.11. - P.833–836.
46. A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46, XY disorder of sex development / S. White, J. Hewitt, E. Turbitt [et al.] // Eur J Hum Genet. - 2012. - Vol.20, No3. - P.348–351.
47. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans / J.C. Achermann, M. Ito, P.C. Hindmarsh, J.L. Jameson // Nat Genet. - 1999. - No22. - P.125–126.

48. A polymorphism of the CYP17 gene related to sex steroid metabolism is associated with female-to-male but not male-to-female transsexualism / E.K. Bentz, L.A. Hefler, U. Kaufmann [et al.] // *FertilSteril.* - 2008.
49. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development / A. Bashamboo, P.A. Donohoue, E. Vilain [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2016. – Vol.25. - P.3446.
50. A SOX9 duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder / J.J. Cox, L. Willatt, T. Homfray [et al.] // *N Engl J Med.* - 2011. - Vol.364, No1. - P.91–93.
51. Abreu, A.P. Pubertal development and regulation / A.P. Abreu, U.B. Kaiser // *Lancet Diabetes Endocrinol.* - 2016. – Vol.4, No3. – P.254-264.
52. Achermann, J.C. Disorders of sex development: Effect of molecular diagnostics / J.C. Achermann, S. Domenice, T.A. Bachega // *Nat Rev Endocrinol.* – 2015. – No11. – P.478–488.
53. Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism / I.B. Barsoum, N.C. Bingham, K.L. Parker [et al.] // *Dev Biol.* - 2009. – Vol.329, No1. - P.96–103.
54. Ahmed, S.F. Investigation and initial management of ambiguous genitalia / S.F. Ahmed, M. Rodie // *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* – 2010. – Vol.24, No2. - P.197–218.
55. Ahmed, S.F. The genetics of male undermasculinization / S.F. Ahmed, I.A. Hughes // *ClinEndocrinol.* – 2002. – Vol.56. – P.1–10.
56. Ahmed, S.F. The testosterone: androstenedione ratio in male undermasculinization / S. Faisal Ahmed, A. Iqbal, I.A. Hughes // *ClinEndocrinol (Oxf).* - 2000. - Vol.53. - P.697.
57. Alexander, G.M. Sex differences in infants visual interest in toys / G.M. Alexander, T. Wilcox, R. Woods // *Arch Sex Behav.* - 2009. – Vol.38. - P.427-433.

58. Alexander, G.M. Sex differences in response to childrens toys in nonhuman primates / G.M. Alexander, M. Hines // *Evolution and Human Behavior.* – 2002. - Vol.23. – P.467-479.
59. Allis, D. *Epigenetics* / D. Allis, M. Caparros, T. Jenuwein, D. - New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
60. Ambiguous genitalia: Medical, socio-cultural and religious factors affecting management in Saudi Arabia / M.A. Abdullah, M. Katugampola, S. al-Habib [et al.] // *Ann Trop Paediatr.* - 1991. – Vol.11, No4. – P.343–348.
61. Analysis of DAX1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (NR5A1) in children and adults with primary adrenal failure: ten years' experience / L. Lin, W.-X. Gu, G. Ozisik [et al.] // *J. Clin. Endocr. Metab.* - 2006. - Vol.91. - P.3048-3054.
62. Andersson, S. Physiology and molecular genetics of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases / S. Andersson, N. Moghrabi // *Steroids.* - 1997. - Vol.62. - P.143.
63. Androgen insensitivity syndrome: Clinical features and molecular defects / A. Galani, S. Kitsiou-Tzeli, C. Sofokleous [et al.] // *Hormones.* - 2008.
64. Androgen Receptor Repeat Length Polymorphism Associated with Male-to- Female Transsexualism / L. Hare, P. Bernard, F.J. Sánchez [et al.] // *Biol Psychiatry.* - 2009.
65. Application of Next-generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics / M. Seifi, A. Ghasemi, S. Raeisi [et al.] // *Arch. Biol. Technol.* - 2017.
66. Arboleda, V.A. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation / V.A. Arboleda, D.E. Sandberg, E. Vilain // *Nat Rev Endocrinol.* - 2014. - Vol.10. – P.603–615.
67. Arlt, W. Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia /W. Arlt, N. Krone // *Horm Res.* - 2007.
68. Assessing sex assignment concordance with genotype and phenotype / D. Suresh, J. Crawford, M.E. Axelrad [et al.] // *Int J PediatrEndocrinol.* - 2013. - Vol.2013, No1. - P.7.

69. Association of prenatal phenobarbital and phenytoin exposure with genital anomalies and menstrual disorders / A.B. Dessens, P.T. Cohen-Kettenis, G.J. Mellenbergh [et al.] // *Teratology*. - 2001. - Vol.64. - P.181.
70. Auchus, R.J. 46, XX DSD: the masculinised female / R.J. Auchus, A.Y. Chang // *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab*. - 2010. – Vol.24, No2. - P.219–242.
71. Baxter, R.M. Translational genetics for diagnosis of human disorders of sex development / R.M. Baxter, E. Vilain // *Annu Rev Genomics Hum Genet*. - 2013. - Vol.14. – P.371–392.
72. Bem, S.L. *Bem Sex-Role Inventory* / S.L. Bem. - Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press, 1981.
73. Bergstrom, D.E. Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination / D.E. Bergstrom, M. Young, K.H. Albrecht // *Genesis*. - 2000. - Vol.28. - P.111–114.
74. Berra, M. Long-term health issues of women with XY karyotype / M. Berra, L.M. Liao, S.M. Creighton // *Maturitas*. - 2010. - Vol.65, No2. - P.172–178.
75. Biason-Lauber, A. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency / A. Biason-Lauber, E.J. Schoenle // *Am J Hum Genet*. - 2000. - Vol.67. - P.1563.
76. Biason-Lauber, A. Control of sex development / A. Biason-Lauber // *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab*. - 2010. - Vol.24, No2. - P.163–186.
77. Blecher, S.R. Genetics of sexual development: A new paradigm / S.R. Blecher, R.P. Erickson // *American Journal of Medical Genetics, Part A*. - 2007.
78. Brennan, J. One tissue two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development / J. Brennan, B. Capel // *Nat Rev Genet*. - 2004. - Vol.5. - P.509–521.
79. Buonocore, F. Human sex development: targeted technologies to improve diagnosis / F. Buonocore, J.C. Achermann // *Genome Biol*. - 2016.- Vol.17.- P.257.

80. Byne, W. Developmental endocrine influences on gender identity: implications for management of disorders of sex development / W. Byne // *Mt Sinai J Med.* - 2006. - Vol.73. - P.950–959.
81. Cahill, L. Why sex matters for neuroscience / L. Cahill // *Nat Rev Neurosci.* - 2006. - Vol.7. - P.477-484.
82. Camerino, G. Sex determination and sex reversal / G. Camerino, P. Parma, O. Radi // *Current Opinion in Genetics & Development.* - 2006. - Vol.16. - P.289– 292.
83. Capel, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway / B. Capel // *Annu Rev Physiol.* - 1998. - Vol.60. - P.497–523.
84. Cederroth, C.R. Genetic programs that regulate testicular and ovarian development / C.R. Cederroth, J.L. Pitetti, M.D. Papaioannou // *Mol Cell Endocrinol.* - 2007. - P.265–266.
85. Central hypogonadotropic hypogonadism: Genetic complexity of a complex disease / M. Marino, V. Moriondo, E. Vighi [et al.] // *Int J Endocrinol.* - 2014.
86. Changes over time in sex assignment for disorders of sex development / Z. Kolesinska, S.F. Ahmed, M. Niedziela [et al.] // *Pediatrics.* - 2014. - Vol.134, No3. - P.710–715.
87. Changing the nomenclature/taxonomy for intersex: A scientific and clinical rationale / A.D. Dreger, C. Chase, A. Sousa [et al.] // *J Pediatr Endocrinol Metab.* - 2005. - Vol.18. - P.729–733.
88. Cheikhelard, A. Potential determinant factors of sexual identity in ambiguous genitalia / A. Cheikhelard, C. Gapany, M. Catti // *J Pediatr Urol.* – 2005. - Vol.1. - P.383-388.
89. Clinical guidelines for the management of disorders of sex development in childhood / E. Anthony, A.B. Baratz, C. Boney [et al.] // *ConsortteManagDisord Sex Dev.* - 2006.
90. Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46, XX males and review of the literature / B. Ergun-Longmire, G. Vinci, L. Alonso [et al.] // *J Pediatr Endocrinol Metab.* - 2005.

91. Cohen-Bendahan, C.C. Prenatal sex hormone effects on child and adult sex-typed behavior: methods and findings / C.C. Cohen-Bendahan, C. van de Beek, S.A. Berenbaum // *NeurosciBiobehav Rev.* - 2005. - Vol.29. - P.353–384.
92. Cohen-Kettenis, P.T. Gender change in 46, XY persons with 5alpha-reductase-2 deficiency and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency / P.T. Cohen-Kettenis // *Arch Sex Behav.* - 2005. - Vol.34. - P.399-410.
93. Cohen-Kettenis, P.T. Psychosocial and psychosexual aspects of disorders of sex development / P.T. Cohen-Kettenis // *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* - 2010. - Vol.24, No2. - P.325–334.
94. Complete androgen insensitivity syndrome: Long-term medical, surgical, and psychosexual outcome / A.B. Wisniewski, C.J. Migeon, H.F.L. Meyer-Bahlburg [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2000.
95. Conn, J. Revealing the diagnosis of androgen insensitivity syndrome in adulthood / J. Conn, L. Gillam, G.S. Conway // *BMJ.* - 2005. - Vol.331. - P.628–630.
96. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society / P.E. Clayton, W.L. Miller, S.E. Oberfield [et al.] // *Horm Res.* - 2002. - Vol.58. - P.188–195.
97. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex / P.A. Lee, C.P. Houk, S.F. Ahmed [et al.] // *Pediatrics.* - 2006. - Vol.118. - P.488–500.
98. Coolidge, F.L. The heritability of gender identity disorder in a child and adolescent twin sample / F.L. Coolidge, L.L. Thede, S.E. Young // *Behav Genet.* - 2002.
99. CXorf6 is a causative gene for hypospadias / M. Fukami, Y. Wada, K. Miyabayashi [et al.] // *Nature Genet.* - 2006. - Vol.38. - P.1369-1371.
100. de la Chapelle, A. The etiology of maleness in XX men / A. de la Chapelle // *Human Genetics.* - 1981. - Vol.58. - P.105–116.

101. de Vries, A.L. Disorders of sex development and gender identity outcome in adolescence and adulthood: understanding gender identity development and its clinical implications / A.L. de Vries, T.A. Doreleijers, P.T. Cohen-Kettenis // *PediatrEndocrinol Rev.* - 2007. - Vol.4, No4. - P.343–351.
102. de Vries, G.J. Minireview: Sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation / G.J. de Vries // *Endocrinology.* - 2004. - Vol.145, No3. - P.1063–1068.
103. Délot, E.C. Genetics of Disorders of Sex Development. The DSD-TRN experience. / E.C. Délot, J.C. Papp, D.E. Sandberg // *EndocrinolMetabClin North Am.* - 2017. - Vol.46. - P.519–537.
104. Dessens, A.B. Gender dysphoria and gender change in chromosomal females with congenital adrenal hyperplasia / A.B. Dessens, F.M.E. Slijper, S.L.S. Drop // *Arch Sex Behav.* - 2005. - Vol.34. - P.389-397.
105. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development / Y. Fan, X. Zhang, L. Wang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. - Vol.7. - P.44536.
106. Differential diagnosis of disorders of sex development in Egypt / I. Mazen, O. Hiort, R. Bassiouny [et al.] // *Horm Res.* - 2008.
107. Dimond, M. Sex reassignment at birth. Long-term review and clinical implications / M. Dimond, K. Sigmundson // *Arch PediatrAdolesc Med.* - 1997. - Vol.151, No3. - P.298-304.
108. Direct comparison of the effects of intravenous Kisspeptin-10, Kisspeptin- 54 and GNRH on gonadotrophin secretion in healthy men / C.N. Jayasena, A. Abbara, S. Narayanaswamy [et al.] // *Hum Reprod.* - 2015. - Vol.30, No8. - P.1934-1941.
109. Disorders of sex development: a genetic study of patients in a multidisciplinary clinic / L. Laino, S. Majore, N. Preziosi [et al.] // *Endocr Connect.* - 2014. - Vol.3, No4. - P.180–192.



110. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management / A. Kyriakou, A. Lucas-Herald, R. McGowan [et al.] // *AdvGenom Gen.* - 2015. - Vol.5. - P.165–177.
111. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort / S. Eggers, S. Sadedin, J. van den Bergen [et al.] // *Genome Biol.* - 2016. - Vol.17. - P.243.
112. Disruption of a longdistance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development / S. Benko, C.T. Gordon, D. Mallet [et al.] // *J Med Genet.* - 2011. - Vol.48, No12. - P.825–830.
113. Dreyfus, C.F. Neurotransmitters and neurotrophins collaborate to influence brain development / C.F. Dreyfus // *PerspectDev Neurobiol* - 1998. - No5. - P.389–399.
114. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany / U. Thyen, K. Lanz, P.M. Holterhus [et al.] // *Horm Res.* - 2006.
115. Ethical principles and recommendations for the medical management of differences of sex development (DSD)/intersex in children and adolescents / C. Wiesemann, S. Ude-Koeller, G.H. Sinnecker [et al.] // *Eur J Pediatr.* - 2010. - Vol.169, No6. - P.671–679.
116. Excess DAX1 leads to XY ovotesticular disorder of sex development (DSD) in mice by inhibiting steroidogenic factor-1 (SF1) activation of the testis enhancer of SRY-box-9 (Sox9) / L.M. Ludbrook, P. Bernard, S. Bagheri-Fam [et al.] // *Endocrinology.* - 2012. - Vol.153. - P.1948–1958.
117. Exome Sequencing for the Diagnosis of 46, XY Disorders of Sex Development / R.M. Baxter, V.A. Arboleda, H. Lee [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2015. – Vol.100, No2. - P.333–344.
118. Fitzgerald, P.J. A neurotransmitter system theory of sexual orientation / P.J. Fitzgerald // *J Sex Med.* – 2008. - Vol.5. – P.746 - 748.

119. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46, XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency / B. Kohler, L. Lin, B. Ferraz-de-Souza [et al.] // *Hum. Mutat.* - 2008. - Vol.29. - P.59-64.
120. Frimberger, D. Ambiguous genitalia and intersex / D. Frimberger, J.P. Gearhart // *Urol Int.* - 2005. - Vol.75. - P.291–297.
121. Garcia-Falgueras, A. Sexual hormones and the Brain: An essential alliance for sexual identity and sexual orientation / A. Garcia-Falgueras, D.F. Swaab // *Endocr Dev.* - 2009. - Vol.17. - P.22-35.
122. Gender identity, gender assignment and reassignment in individuals with disorders of sex development: a major of dilemma / D. Fisher, J. Ristori, E. Fanni [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation.* - 2016. - Vol. 39, No11. - P.1207–1224.
123. Gene dosage of DAX-1, determining in sexual differentiation: Duplication of DAX-1 in two sisters with gonadal dysgenesis / M. García-Acero, M. Molina, O. Moreno [et al.] // *MolBiol Rep.* – 2019. – Vol.46. – P.2971–2978.
124. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development / S. Nef, O. Schaad, N.R. Stallings [et al.] // *Dev Biol.* - 2005. - Vol.287. - P.361–377.
125. Germline Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation leading to isolated genital malformation without Wilms tumor or nephropathy / B. Köhler, V. Schumacher, D. L'Allemand [et al.] // *J Pediatr.* - 2001. - Vol.138. - P.421– 424.
126. Global disorders of sex development update since 2006: Perceptions, approach and care / P.A. Lee, A. Nordenström, C.P. Houk [et al.] // *Horm Res Paediatr.* - 2016. - Vol.85. - P.158–180.
127. Global gene expression in the human fetal testis and Ovary / B. Houmard, C. Small, L. Yang [et al.] // *BiolReprod.* - 2009. - Vol.81. - P.438–443.
128. Gomez-Lobo, V. Multidisciplinary care for individuals with disorders of sex development / V. Gomez-Lobo // *CurrOpinObstet Gynecol.* - 2014. - Vol.26. - P.366–371.

129. Goy, R.W. Behavioral masculinization is independent of genital masculinization in prenatally androgenized female rhesus macaques / R.W. Goy, F.B. Bercovitch, M.C. McBair // *HormBehav.* - 1988. - Vol.22. - P.552–571.
130. Guerra-Junior, G. The role of the pediatrician in the management of children with genital ambiguities / G. Guerra-Junior, A.T. Maciel-Guerra // *J Pediatr.* – 2007. - Vol.83, No5. - P.184–191.
131. Health care professionals and intersex conditions / J. Frader, P. Alderson, A. Asch [et al.] // *Arch PediatrAdolesc Med.* - 2004. - Vol.158. - P.426–428.
132. Health-related quality of life in children with disorders of sex development (DSD) / M. Jürgensen, A. Lux, S.B. Wien [et al.] // *Eur J Pediatr.* - 2014. - Vol.173, No7. - P.893–903.
133. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46, XY disorders of sex development with normal adrenal function / L. Lin, P. Philibert, B. Ferraz-de-Souza [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2007. - Vol.92, No3. - P.991- 999.
134. Hines, M. Androgen and psychosexual development: core gender identity, sexual orientation and recalled childhood gender role behavior in women and men with congenital adrenal hyperplasia (CAH) / M. Hines, C. Brook, G.S. Conway // *J Sex Res.* - 2004. - Vol.41, No4. - P.75–81.
135. Houk, C.P. Summary of consensus statement on intersex disorders and their management / C.P. Houk, I.A. Hughes, S.F. Ahmed // *Pediatrics.* -2006. - Vol.118. - P.753–757.
136. Houk, C.P. Consensus statement on terminology and management: disorders of sex development / C.P. Houk, P.A. Lee // *Sex Dev.* - 2008. - Vol.2. - P.172–180.
137. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis / M. Blackless, A. Charuvastra, A. Derryck [et al.] // *Am J Hum Biol.* - 2000. – Vol.12. - P.151– 166.
138. Hughes, I.A. Disorders of sex development: A new definition and classification / I.A. Hughes // *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* - 2008. - Vol.22, No1. - P.119–134.

139. Hughes, I.A. Disorders of sexual differentiation / I.A. Hughes // *Horm Res Paediatr.* - 2007. - Vol.67, No1. - P.91–95.
140. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of the KISS1-derived peptide receptor GPR54 / N. de Roux, E. Genin, J.C. Carel [et al.] // *Proc Natl AcadSci USA.* - 2003. - Vol.100, No19. - P.10972-10976.
141. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46, XX Individuals with Testicular Tissues / M. Igarashi, K. Takasawa, A. Hakoda [et al.] // *Hum Mutat.* - 2017. - Vol.38. - P.39.
142. Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays / A. Aleman, L. Adrien, L. Lopez-Serra [et al.] // *Br J Cancer.* – 2008. – Vol.98. – P.466–473.
143. Imaging in intersex disorders / K. Biswas, A. Kapoor, A. K. Karak [et al.] // *J Pediatr Endo Met.* - 2004. - Vol.17, No6. - P.841–845.
144. Impact on bone of an estrogen receptor-alpha gene loss of function mutation / E.P. Smith, B. Specker, B. E. Bachrach [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2008. - Vol.93, No8. - P.3088–3096.
145. Increased Cross-Gender Identification Independent of Gender Role Behavior in Girls with Congenital Adrenal Hyperplasia: Results from a Standardized Assessment of 4- to 11-Year-Old Children / V. Pasterski, K.J. Zucker, P.C. Hindmarsh [et al.] // *Arch Sex Behav.* - 2014.
146. Josso, N. Professor Alfred Jost: The builder of modern sex differentiation / N. Josso // *Sex Dev.* - 2008.
147. Kisspeptin resets the hypothalamic GNRH clock in men / Y.M. Chan, J.P. Butler, N.E. Pinnell [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2011. - Vol.96, No6. -P.908-915.
148. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men / J.T. George, J.D. Veldhuis, A.K. Roseweir [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2011. - Vol.96, No8. - P.1228-1236.

149. Larney, C. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis- determining gene Sry / C. Larney, T.L. Bailey, P. Koopman // *Development*. – 2014. – Vol. 141, No 11. – P. 2195-2205.
150. Lauder, J.M. Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods / J.M. Lauder // *Prog Clin Biol Res*. - 1985. - Vol.163. - P.375-380.
151. Leydig-cell agenesis: a cause of male pseudohermaphroditism / F. Berthezène, M.G. Forest, J. A. Grimaud [et al.] // *N Engl J Med*. – 1976.
152. Lin, L. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development / L. Lin, J. C. Achermann // *Sex Dev*. - 2008. - Vol.2, No4–5. - P.200–209.
153. Lin, T.W. Exercise benefits brain function: the monoamine connection / T.W. Lin, Y.M. Kuo // *Brain Sci*. - 2013. - Vol.3. - P.39-53.
154. Lomniczi, A. The emerging role of epigenetics in the regulation of female puberty / A. Lomniczi, Sr. Ojeda // *Endocr Dev*. - 2016. - Vol.29. - P.1-16.
155. Male pseudohermaphroditism due to 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management / B.B. Mendonca, M. Inacio, I.J. Arnhold [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. - 2000. - Vol. 79. - P.299.
156. Malformation syndromes associated with disorders of sex development / J.M. Hutson, S.R. Grover, M. O'Connell [et al.] // *Nat Rev Endocrinol*. -2014. - Vol.10. - P.476–487.
157. Managing the risk of germ cell tumourigenesis in disorders of sex development patients / M. Cools, L.H. Looijenga, K.P. Wolffenbuttel [et al.] // *Endocr Dev*. - 2014. - Vol.27. - P.185–196.
158. Markosyan, R. Sex Assignment in Conditions Affecting Sex Development / R. Markosyan, S.F. Ahmed // *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. - 2017.

159. McCarrey, J.R. Mechanisms of genetic sex determination, gonadal sex-determination, and germ-cell development in animals / J.R. McCarrey, U.K. Abbott // *Adv Genet.* - 1979. - Vol.20. - P.217–290.
160. McClelland, K. Male sex determination: Insights into molecular mechanisms / K. McClelland, J. Bowles, P. Koopman // *Asian J Androl.* - 2012. - Vol.14. - P.164–171.
161. Merke, D.P. Congenital adrenal hyperplasia / D.P. Merke, S.R. Bornstein // *Lancet.* - 2005. - Vol.365, No9477. - P.2125–2136.
162. Meyer-Bahlburg, H.F.L. Gender monitoring and gender reassignment of children and adolescents with a somatic disorder of sex development / H.F.L. Meyer-Bahlburg // *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* - 2011. - Vol.20. - P.639-649.
163. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions / G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson [et al.] // *Endocr Rev.* - 2001. - Vol.22, No2. - P.153-183.
164. Molecular characterization of 6 unrelated Italian patients with 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency / F. Baldinotti, S. Majore, A. Fogli [et al.] // *Journal of Andrology.* - 2008.
165. Money, J. Ablatiopenic: normal male infant sex-reassigned as a girl / J. Money // *Arch Sex Behav.* - 1975. - Vol.4, No1. - P.65-71.
166. Money, J. Man and Women, Boy and Girl: The differentiation and dimorphism of gender identity from conception to maturity / J. Money, A.A. Erhardt // Johns Hopkins University Press, Baltimore. - 1972. - P.311.
167. Moore, C.L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis / C.L. Moore // *Ann N Y Acad Sci.* - 1992. - Vol.662. - P.160–177.
168. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias / Y. Wang, Q. Li, J. Xu [et al.] // *Eur J Hum Genet.* - 2004. - Vol.12. - P.706–712.
169. Mutations in MAP3K1 cause 46, XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination / A. Pearlman, J. Loke, C. Le Caignec [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* - 2010. - Vol.87. - P. 898-904.

170. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/beta- catenin signaling / J. Loke, A. Pearlman, O. Radi [et al.] // *Hum Mol Genet.* - 2014. - Vol.23. - P.1073–1083.
171. Mutations in WNT4 are not responsible for Mullerian duct abnormalities in Chinese women / X. Chang, Y. Qin, C. Xu [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online.* - 2012. - Vol.24. - P.630–633.
172. Narayanaswamy, S. Subcutaneous infusion of Kisspeptin-54 stimulates gonadotrophin release in women and the response correlates with basal oestradiol levels / S. Narayanaswamy, C.N. Jayasena, N. Ng // *ClinEndocrinol (Oxf).* - 2016. - Vol.84, No6. - P.939-945.
173. Neurobiology of sexual desire / S.W. Kim, C.H. Schenck, J.E. Grant [et al.] // *NeuroQuantology.* - 2013. - Vol.11, No2. - P.332-359.
174. New concepts on the control of the onset of puberty / S.R. Ojeda, A. Lomniczi, U. Sandau [et al.] // *Endocr Dev.* - 2010. - Vol.17. - P.44-51.
175. New evidence for neurotransmitter influences on brain development / P. Levitt, J.A. Harvey, E. Friedman [et al.] // *Trends Neurosci.* - 1997. - Vol.20. - P.269–274.
176. Novel associations in disorders of sex development: findings from the I- DSD Registry / K. Cox, J. Bryce, J. Jiang [et al.] // *J ClinEndocrinolMetab.* - 2014. - Vol.99, No2. - P.348–355.
177. Novel mutation of the sex-determining region on the Y chromosome in a 46, XY female patient with monolateral dysgerminoma: a case report / F. Battaglia, F. Plotti, M. Angelucci [et al.] // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* - 2013. – Vol.39. – P.442–445.
178. NR5A1 is a novel disease gene for 46, XX testicular and ovotesticular disorders of sex development / D. Baetens, H. Stoop, F. Peelman [et al.] // *Genet Med.* – 2017. - Vol.19. – P.367.
179. Ogata, T. MAMLD1 (CXorf6): a new gene involved in hypospadias / T. Ogata, J. Laporte, M. Fukami // *Horm Res.* - 2009. - Vol.71, No5. - P.245–252.

180. Ohnesorg, T. The genetics of disorders of sex development in humans / T. Ohnesorg, E. Vilain, A.H. Sinclair // *Sex Dev.* - 2014. - Vol.8, No5. - P.262– 272.
181. Ostrer, H. Disorders of sex development (DSDs): an update / H. Ostrer // *J ClinEndocrinolMetab.* - 2014. - Vol.99. - P.1503– 1509.
182. Ovaries and female phenotype in a girl with 46, XY karyotype and mutations in the CBX2 gene / A. Biason-Lauber, D. Konrad, M. Meyer [et al.] // *Am J Hum Genet.* - 2009. - Vol.84. -P.658.
183. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome / S.F. Ahmed, A. Cheng, L. Dovey [et al.] // *J ClinEndocrinolMetab.* – 2000. – Vol.85. - P.658– 665.
184. Piferrer, F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis / F. Piferrer // *Dev Dyn.* - 2013. - Vol.242. - P.360–370.
185. Population based nationwide study of hypospadias in Sweden, 1973 to 2009: incidence and risk factors / A.S. Nordenvall, L. Frisen, A. Nordenstrom [et al.] // *J Urol.* - 2014. - Vol.191. - P.783–789.
186. Psychosexual development in adolescents and adults with disorders of sex development – results from the German Clinical Evaluation Study / M. Jürgensen, E. Kleinemeier, A. Lux [et al.] // *J Sex Med.* - 2013. - Vol.10, No11. -P.2703–2714.
187. Quality of life of patients with 46, XX and 46, XY disorders of sex development / R.C. Amaral, M. Inacio, V.N. Brito [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2015. - Vol.82, No2. - P.274–279.
188. Qureshi, I.A. Genetic and epigenetic underpinnings of sex differences in the brain and in neurological and psychiatric disease susceptibility / I.A. Qureshi, M.F. Mehler // *Prog Brain Res.* - 2010. - Vol.186. - P.77–95.
189. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy / P. Parma, O. Radi, V. Vidal [et al.] // *Nat Genet.* - 2006. - Vol.38. - P .1304.
190. Rey, R. Embryology and endocrinology of genital development / R. Rey, J.Y. Picard // *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* - 1998. - Vol.12, No1. - P.17–33.



191. Rosenfeld, C.S. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not? / C.S. Rosenfeld // *Front Neurosci.* – 2017. – Vol. 16, No 11. – P. 1-632.
192. Saenger, P. Abnormal sex differentiation / P. Saenger // *J Pediatr.* - 1984. - Vol.104, No1. - P.1–17.
193. Sandberg, D.E. Psychological aspects of the treatment of patients with disorders of sex development / D.E. Sandberg, M. Gardner, P.T. Cohen-Kettenis // *Semin Reprod Med.* - 2012. - Vol.30, No5. - P.443–452.
194. Sarkar, A. The Sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate / A. Sarkar, K. Hochedlinger // *Cell Stem Cell.* - 2013. - Vol.12. - P.15–30.
195. Savic, I. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation / I. Savic, A. Garcia-Falgueras, D.F. Swaab // *Progress in Brain Research.* - 2010.
196. Sax, L. How common is intersex? A response to Anne Fausto-Sterling / L. Sax // *J Sex Res.* - 2002. - Vol.39. - P.174–178.
197. Schuijers, J. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and Rspodins / J. Schuijers, H. Clevers // *EMBO J.* - 2012. - Vol.31. - P.2685–2696.
198. Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46, XY DSD: identification and functional analysis of two new mutations / N. Kalfa, M. Fukami, P. Philibert [et al.] // *PLoS One.* - 2012. - Vol.7, No3.
199. Sex assignment for newborns with ambiguous genitalia and exposure to fetal testosterone: attitudes and practices of pediatric urologists / D.A. Diamond, J.P. Burns, C. Mitchell [et al.] // *J Pediatr.* - 2006. - Vol.148. - P.445–449.
200. Sex steroid-related genes and male-to-female transsexualism / S. Henningson, L. Westberg, S. Nilsson [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* - 2005.
201. Sex steroids and sexual desire in a man with a novel mutation of aromatase gene and hypogonadism / C. Carani, A.R. Granata, V. Rochira [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* - 2005. - Vol.30, No5. - P.413–417.

202. She, Z.Y. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development / Z.Y. She, W.X. Yang // *Semin Cell Dev Biol.* – 2017. – Vol. 63. – P. 13-22.
203. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015) / S.F. Ahmed, J.C. Achermann, W. Arlt [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2016. - Vol.84, No5. – P.771-788.
204. 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 / S. Richards, N. Aziz, S. Bale [et al.] // *Genetics in Medicine.* – 2015. - Vol.17, No5. - P.405-24.
205. Swaab, D.F. The human hypothalamic basis and clinical aspects. Part II / D.F. Swaab. – Amsterdam: Elsevier, 2004. - P.596.
206. Swaab, D.F. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation / D.F. Swaab, A. Garcia-Falueras // *Funct Neurol.* - 2009. - Vol.24, No1. - P.17-28.
207. Swaab, D.F. Sexual differentiation of the brain and behavior / D.F. Swaab // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* - 2007. - Vol.21, No3. - P.431–444.
208. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development / V.A. Arboleda, H. Lee, F.J. Sánchez [et al.] // *Clin Genet.* – 2013. – Vol.83. - P.35–43.
209. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development / Y. Dong, Y. Yi, H. Yao [et al.] // *Medical Genetics.* - 2016. - Vol.17. - P.23.
210. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46, XY and ovarian insufficiency in 46, XX individuals / M. Cancio, P.Andaluz, M. Janner [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* - 2012. - Vol.97. - P.1294–1306.

211. Tena-Sempere, M. Roles of kisspeptines in the control of hypothalamic- gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset / M. Tena-Sempere // *Pediatric Neuroendocrinology*. - 2010. - Vol.17. - P.52-62.
212. The surgical challenges of disorders of sex development (DSD) / D. Gorduza, I. Vidal, J. Birraux [et al.] // *Arch Esp Urol*. - 2010. - Vol.63. - P.495-504.
213. Timing of gonadectomy in adult women with complete androgen insensitivity syndrome (CAIS): patient preferences and clinical evidence / R. Deans, S.M. Creighton, L.M. Liao [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)*. - 2012. - Vol.76, No6. - P.894–898.
214. Tobias, E.S. Next generation sequencing for disorders of sex development / E.S. Tobias, K. McElreavey // *Endocr Dev*. - 2014. - Vol.27. - P.53–62.
215. Transdisciplinary management of patients with disorders of sexual development in Colombia. Limiting factors for appropriate management / N. Fernandez, O. Moreno, A. Rojas [et al.] // *Urol Colomb*. - 2017. - Vol.26. - P.164–168.
216. Understanding the genetic etiology in patients with XY DSD / S.F. Ahmed, A. Bashamboo, A. Lucas-Herald [et al.] // *Br Med Bull*. – 2013. – Vol.106. - P.67–89.
217. Vilain E. Use of Next Generation Sequencing in Clinical Practice: The Example of Disorders / Differences of Sex Development / E. Vilain // *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. - 2016. - Vol.8, No1. - P.1-17.
218. Wilhelm, D. Sex determination and gonadal development in mammals / D. Wilhelm, S. Palmer, P. Koopman // *Physiol Rev*. - 2007. - Vol.87, No1. - P.1– 28.
219. Willemsen, R.H. Normal variation in pubertal timing: genetic determinants in relation to growth and adiposity / R.H. Willemsen, D.B. Dunger // *Endocr Dev*. - 2016. - Vol.29. - P.17-35.