



КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА 46,XY, ОБУСЛОВЛЕННЫМ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ NR5A1

© Н.Ю. Калинин^{1*}, А.А. Колодкина¹, Н.Ю. Райгородская², А.Н. Тюльпаков¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

²Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

Орфанный ядерный рецептор — стероидогенный фактор 1, кодируемый геном NR5A1, является одним из ключевых регуляторов стероидогенеза, формирования стероидных тканей и их регуляции гипоталамо-гипофизарной осью. Изначально считалось, что мутации в гене NR5A1 характеризуются сочетанной надпочечниковой и гонадной недостаточностью, но данный фенотип оказался редким проявлением дефекта NR5A1. В то же время нарушения функции NR5A1 — одна из частых причин изолированных форм нарушения формирования пола (НФП) 46,XY. Мы проанализировали распространенность мутаций в гене NR5A1 среди 310 российских пациентов с НФП 46,XY и выявили изменения в этом гене в 36 случаях (11,6%). Среди обнаруженных мутаций 15 ранее описаны не были. Нами не установлено наличие фенотип-генотипической корреляции даже в пределах одной семьи. Проведенная работа не выявила каких-либо клинических и гормональных маркеров, которые позволили бы заподозрить данный нозологический вариант НФП 46,XY до проведения молекулярно-генетического анализа. Для более объективных выводов необходимо продолжить наблюдение за данной группой пациентов, особенно при достижении ими периода пубертата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нарушение формирования пола, гипоспадия, стероидогенный фактор, NR5A1, дисгенезия гонад.

CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH 46,XY DSD DUE TO NR5A1 GENE MUTATIONS

© Natalia Yu. Kalinchenko^{1*}, Anna A. Kolodkina¹, Nadezda Yu. Raygorodskaya², Anatoly N. Tiulpakov¹

¹Endocrinology Reserch Centre, Moscow, Russia

²Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) is a nuclear receptor that regulates multiple genes involved in adrenal and gonadal development, steroidogenesis, and the reproductive axis. Human mutations in SF1 were initially found in patients with severe gonadal dysgenesis and primary adrenal failure. However, more recent case reports have suggested that heterozygous mutations in SF1 may also be found in patients with 46,XY partial gonadal dysgenesis and underandrogenization but normal adrenal function. We have analyzed the gene encoding SF1 (NR5A1) in a cohort of 310 Russian patients with 46,XY disorders of sex development (DSD). Heterozygous SF1 variants were found in 36 out of 310 (11.6%) of cases, among them 15 were not previously described. We have not found any phenotype-genotype correlations and any clinical and laboratory markers that would allow to suspect this type of before conducting molecular genetic analysis.

KEYWORDS: SF1; steroidogenic factor 1; gonadal dysgenesis; disorders of sex development; hypospadias; NR5A1.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нарушение формирования пола (НФП) — состояние, связанное с клинико-биохимическим проявлением несоответствия между генетическим, гонадным и/или фенотипическим полом [1]. Частота встречаемости классических вариантов НФП 46,XY приблизительно 1:20 000, однако, если учитывать проксимальные формы гипоспадии и двусторонний крипторхизм как варианты НФП, распространенность данной патологии возрастает до 1:300–500 новорожденных [2]. Принимая во внимание клиническую важность правильной постановки диагноза и психологические аспекты, связанные с выбором пола ребенка, ведущую роль в уточнении генеза заболевания отводят молекулярно-генетическим методам как наиболее точным, решающим в выборе тактики ведения

пациента с НФП 46,XY. Однако несмотря на то, что уже описано более 400 генов, так или иначе вовлеченных в процесс дифференцировки пола, до настоящего времени лишь в 50–60% случаев НФП 46,XY устанавливается генетическая причина заболевания.

Среди генов, регулирующих формирование пола, одну из ключевых ролей занимает NR5A1, кодирующий одноименный белок.

NR5A1 (стероидогенный фактор 1, SF1) — это регуляторный белок, относящийся к группе орфанных ядерных рецепторов [3].

С момента открытия NR5A1 в 1992 г. его биологическое значение остается не до конца изученным. Изначально функция NR5A1 была определена как регулятор экспрессии ферментов стероидогенеза в стероидогенных тканях, однако позже было показано, что белок необходим

для дифференцировки ткани надпочечников и гонад, а также закладки вентромедиального ядра гипоталамуса и гонадотрофов в гипофизе [4].

Первые клинические случаи, ассоциированные с мутациями в гене *NR5A1*, описаны среди пациентов с НФП 46,XY и первичной хронической надпочечниковой недостаточностью (ПХНН) [5], но оказалось, что надпочечниковая недостаточность развивается в единичных случаях, тогда как большая часть пациентов имеют изолированное нарушение закладки и функции гонад при отсутствии надпочечниковой недостаточности [6].

С накоплением клинического опыта и доступности генетических исследований рядом зарубежных авторов было показано, что гетерозиготные замены в *NR5A1* составляют до 10–20% всех форм НФП 46,XY без ПХНН, т.е. являются второй из основных причин возникновения НФП 46,XY после мутаций в гене рецептора к андрогенам [6, 7, 8].

Фенотипические проявления НФП 46,XY при дефектах *NR5A1* характеризуются значительной вариабельностью: от женского строения наружных половых органов (НПО) с незначительной гипертрофией клитора и отсутствием пальпируемых гонад до мошоночной формы гипоспадии и отсутствия крипторхизма. Дериваты мюллеровых протоков как маркеры дисгенезии гонад могут обнаруживаться в разной степени развития, но не являются облигатными. Более того, несмотря на то, что данное заболевание относится к группе дисгенезий гонад, у некоторых пациентов с мужским паспортным полом в период пубертата отмечается спонтанная маскулинизация [9, 10, 11], которая не всегда коррелирует со степенью нарушения строения НПО.

Все сказанное выше подчеркивает сложности диагностики и ведения пациентов с данным вариантом НФП 46,XY.

ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ

В данной статье нами обобщены клиничко-лабораторные характеристики 36 российских пациентов с НФП 46,XY и доказанными мутациями в гене *NR5A1*.

Информированное согласие было получено от всех обследованных пациентов; если возраст обследованных не достиг 15 лет, информированное согласие было подписано законным представителем в соответствии с протоколом исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включались пациенты с НФП при кариотипе 46,XY. НФП определялось как несоответствие хромосомного пола фенотипическому полу. Оценка неправильного строения половых органов осуществлялась по шкале Прадера. Из исследования исключались пациенты, у которых имелось сочетание НФП 46,XY с синдромальной патологией.

Пациентам проводилось комплексное обследование, включающее: оценку строения наружных половых органов по Прадеру, ультразвуковое исследование малого таза, паховых каналов, органов мошонки, исследование гормонального статуса — лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тестосте-

рон, эстрадиол (Э2). У части пациентов исследовался уровень антимюллерова гормона (АМГ), проводилась проба с хорионическим гонадотропином.

Молекулярно-генетический анализ проводился в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным методом (набор Pure Link, Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies, США). Для молекулярно-генетического анализа применялся метод NGS. Использовалась разработанная в отделении наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России панель праймеров для мультиплексной ПЦР и секвенирования с применением технологии Ion Ampliseq™ Custom DNA Panel (Life Technologies, США). Панель праймеров «Нарушения формирования пола» охватывает кодирующие области следующих генов: *AKR1C2*, *AKR1C4*, *AMH*, *AMHR2*, *AR*, *ARX*, *ATRX*, *CBX2*, *CYB5A*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *DHCR7*, *DHH*, *EMX2*, *ESR2*, *FGD1*, *FGF9*, *FGFR2*, *FKBP4*, *FOXF2*, *FOXL2*, *HOXA13*, *HSD17B3*, *HSD3B2*, *ICK*, *LHCGR*, *LHX1*, *LHX9*, *MAMLD1*, *MAP3K1*, *MID1*, *NROB1*, *NR5A1*, *POR*, *PTGDS*, *SOX9*, *SRD5A2*, *SRY*, *STAR*, *SUPT3H*, *TSPYL1*, *WNT4*, *WT1*, *ZFPM2*. Подготовка библиотек проводилась в соответствии с рекомендациями производителей. Секвенирование осуществлялось на полупроводниковом секвенаторе PGM (Ion Torrent, Thermo Scientific, США) или Illumina MiSeq (Illumina, США). Биоинформатическая обработка результатов секвенирования проводилась с помощью программных модулей Torrent Suite 4.2.1 (Ion Torrent, Life Technologies, США) или Genome Analysis ToolKit (GATK) ver. 4.1.2.0 (Broad Institute, Cambridge, MA, USA). Для аннотирования вариантов нуклеотидной последовательности использовался пакет программ ANNOVAR ver. 2018Apr16. После анализа полученных данных проводилось подтверждение полученных мутаций на секвенаторе Genetic Analyzer Model 3130 (Life Technologies, США). Оценка патогенности вариантов нуклеотидной последовательности проводилась согласно международным и российским рекомендациям [12, 13]. Нумерация кодирующей последовательности гена *NR5A1* дана по референсу NM_004959.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование были включены 310 пациентов с НФП 46,XY за период с 2015 по 2019 гг. По результатам проведенных молекулярно-генетических исследований гетерозиготные нуклеотидные замены в гене *NR5A1* были выявлены у 36 пациентов, что составило 11,6% от общего числа пациентов с НФП 46,XY. Среди 36 человек было 2 семьи с двумя сибсами с НФП 46,XY. Ни у одного пациента с НФП 46,XY не было выявлено биаллельных мутаций в гене *NR5A1*.

Из 36 пациентов 19 при рождении были зарегистрированы в женском паспортном поле (ЖПП), 17 — в мужском (МПП). Среди пациентов, зарегистрированных в ЖПП, у 4 отмечалось правильное женское строение НПО, и сомнений в выборе пола не возникало. У 7 отмечались умеренная гипертрофия клитора (длина до 1,5 см) и невыраженная складчатость больших половых губ, в которых пальпировались с одной или обеих сторон гонады (степень вирилизации Прадер 2). У 7 отмечались более

Таблица 1. Строение наружных половых органов по шкале Прадер.

Строение НПО пол паспортный	Женские/ Прадер 1	Прадер 2	Прадер 3	Прадер 4
женский	4	7	7	1
мужской	0	0	11	6

выраженная гипертрофия клитора (длина до 2,5 см), формирование головки, сужение входа во влагалище, мошонкообразные половые губы с пальпируемыми в них с одной или обеих сторон гонадами (Прадер 3). Аналогичное строение НПО отмечалось и у 10 пациентов, зарегистрированных в МПП. У 6 мальчиков отмечалась мошоночная форма гипоспадии с узким отверстием у основания полового члена (Прадер 4). Строение НПО Прадер 4 было у одного ребенка, зарегистрированного в ЖПП.

Две из 4 пациенток с правильным женским строением НПО при рождении были обследованы в 2 и 4 года в связи с паховыми грыжами, содержимым которых оказались гонады. Две обратились впервые в возрасте 12 и 14 лет в связи с увеличением клитора, низким тембром голоса, ростом волос на теле по мужскому типу, отсутствием развития молочных желез.

Как видно из представленных данных, большая часть пациентов имели нарушения строения НПО, характеризовавшиеся как «неопределенное» строение (Прадер 3). Интересно, что при одинаково неправильном строении НПО в данной группе распределение пациентов по паспортному полу было примерно одинаковым: 8 с ЖПП и 10 с МПП. Если пациент был зарегистрирован в ЖПП, то фенотипически строение НПО характеризовалось гипертрофией клитора, чаще со сформированной головкой, умеренно развитыми кавернозными телами, наличием единого отверстия уrogenитального синуса, высокой задней спайкой, при этом нередко в больших мошонкообразных половых губах пальпировались гонады. Если пациент был зарегистрирован в МПП, то фенотип характеризовался как промежуточная форма гипоспадии с недоразвитием полового члена, одно- или двусторонним крипторхизмом.

Среди лиц, зарегистрированных в МПП, 5 человек достигли возраста пубертата (13–18 лет, Таннер 3–5) на момент обследования. У всех отмечено спонтанное правильное половое созревание, адекватное развитие вторичных половых признаков (случай семейной формы дефицита NR5A1 со спонтанным пубертатом описан нами ранее [11]). По данным проведенного гормонального обследования уровень ФСГ составил 8,0–14 Ед/л (медиана 9,1; норма 0,7–11,1), уровень ЛГ 5,32–8,1 Ед/л (медиана 5,5; норма 1,3–9,6), уровень тестостерона варьировал от 11 нмоль/л до 26,6 нмоль/л, причем его уровень обратно коррелировал с возрастом пациентов. Клинико-гормональные характеристики представлены в таблице 2.

32 ребенка были обследованы в течение первого года жизни в связи с неправильным строением наружных половых органов. Из них у 12 детей в возрасте 1–12 меся-

цев проводились гормональные исследования: у 8 пациентов отмечено повышение уровня ФСГ от 5 до 14 Ед/л, медиана – 7,2 Ед/л (норма до 1 года жизни <3,3 Ед/л), при этом уровень АМГ у них не превышал 18 нг/мл, у остальных 4 детей с нормальным значением ФСГ уровень АМГ был значительно выше (40–60 нг/мл), что свидетельствует о разной степени нарушения функции клеток Сертоли [14]. Несмотря на снижение уровня АМГ, характерного для данной когорты пациентов, среди 19 пациенток с ЖПП только у 4 были выявлены дериваты мюллеровых протоков (ДМП), причем две из них имели правильный женский фенотип, и по данным УЗИ у них лоцировалась нормально развитая матка, что позже подтверждено при проведении лапароскопии. У 2 пациенток, несмотря на отсутствие ДМП по данным УЗИ, были обнаружены недоразвитые ДМП при проведении диагностической лапароскопии. Среди пациентов с МПП у 3 по данным УЗИ лоцировалось дополнительное тяжистое образование за мочевым пузырем. Однако здесь важно учитывать, что у пациентов с МПП прицельно ультразвуковое исследование малого таза не всегда проводится, и его чувствительность для обнаружения недоразвитых ДМП достаточно низкая.

Уровень ЛГ у всех 12 детей, обследованных в возрасте до 1 года, определялся в пределах нормальных значений (0,2–4,2 Ед/л), что косвенно отражает сохранность стероидогенеза в яичках в постнатальном периоде. Проба с хорионическим гонадотропином была проведена 8 детям в возрасте до 1 года жизни, подъем тестостерона составил от 4,6 до 33 нмоль/л, что также свидетельствует об относительной сохранности функции клеток Лейдига (см. табл. 2).

В период новорожденности и при дальнейшем наблюдении признаков надпочечниковой недостаточности в обследованной группе пациентов отмечено не было. Лишь в одном случае у пациентки с правильным женским фенотипом при рождении отмечена клиническая картина надпочечниковой недостаточности, подтвержденная лабораторно [15]. В течение 4 лет ребенок находился на заместительной терапии глюко- и минералокортикоидами. В возрасте 4 лет терапия была полностью отменена, и на пробе с Синактеном-Депо данных за надпочечниковую недостаточность получено не было. Подробное описание клинического случая редкого сочетания НФП и надпочечниковой недостаточности у пациента с гетерозиготной мутацией описано нами в статье [15].

12 пациенткам с ЖПП в разном возрасте было проведено удаление гонад. Результат гистологического исследования удаленных гонад был доступен у 5 пациентов: во всех случаях отмечалось слабое развитие интерстициальных клеток, в строме очаговый фиброз, гнездное

Таблица 2. Фенотипические, гормональные и молекулярно-генетические характеристики пациентов.

	ПП	Возраст	Фенотип Prader	ДМП	Положение гонад	ФСГ/ЛГ	Т нмоль/л /после пробы с ХГ	АМГ нг/мл	Генетика	Патогенность*
1	ж	4 мес	III			10.6/2.2	1.3/7.59	12	c.del1273_1278	
2	ж	11 мес	III	нет	нет	14/	10.6	13.7	c.1152_1153ins	П (PP4, PM2, PVS1)
3	ж	1 год	III	рудимент	ЛГ-МТ, ППК	6.72/0.21	0.36	17.6	c.671C>T:p.P224L	ВП (PS4, PM2, PP2, PP4)
4	ж	4 года	Ж	есть					c.104G>A:p.G35D	
5	ж	13 лет	II	рудимент					c.1025C>T:p.S342L	ВП (PS4, PM2, PP2, PP4)
6	ж	13 лет	II		БГ				c.1003A>C:p.T335P	ВП (PS4, PM2, PP2, PP4)
7	ж	3 мес	II	нет	ПК	3.93/1.22	1.3/13.3	41	c.848G>T:p.C283F	П (PS4, PM2, PM5, PP2, PP4)
8	ж	16 лет	II	нет	ПК	34/27.7	15.7		c.937C>T:p.R313C	
9	ж	1 г. 4 мес	III	нет	БГ	0.87/0.2	0.1	20	c.1033C>A	
10	ж	10 мес	II	нет	ПК	3.6/1.5	0.22/24	40	c.70C>G:p.H24D	
11	ж	1 г. 5 мес	III	нет	ППК, ЛГ-мошонка	10.5/2.16	0.5/4.51		c.37T>C:p.C13R	
12	ж	15 лет	Ж		ПБК, ЛПК	85/43	9.5		c.72C>G:p.H24Q	П (PS4, PM2, PM5, PP2, PP4)
13	ж	5 лет	III	нет	ПК				c.251G>A p.R84H	
14	ж	4 мес	Ж	есть	БГ	7.0/0.5	3.17/4.89		c.102+1G>T	
15	ж	10 лет	II	нет	ПК	5.54/0.3	/7.45	8.45	c.106T>C:p.F36L	ВП (PS4, PM2, PP2, PP4)
16	ж	нет инф.	Ж						c.245-1G>T	
17	ж	нет инф.	III						c.848G>A:p.C283Y	П (PS4, PM2, PM5, PP2, PP4)
18	ж	10 лет	II	нет		10.3/3.2	10		c.732_733ins	П (PP4, PM2, PVS1)
19	ж > м	1,5 мес	IV		ПК	7,2/4,2	3,1/10	18	c.11391G>T	
20	м	2 мес	IV			5,03/1,69	4,0/7,8		c.244G>A:p.E81K	П (PS4, PM2, PM5, PP2, PP4)
21	м	1 мес	III	нет	в мошонке	18,6/1.0	0,8	18.5	c.721C>T:p.R241W	ВП (PS4, PM2, PP2, PP4)
22	м	4 г.	IV			1,64/0,1	0,09		c.C75A:p.Y25X	П (PP4, PM2, PVS1)
23	м	5 мес	IV		ППК, ЛГ-мошонка	5,0/2,2	5,6/33	44	c.937C>T:p.R313C	
24	м	1 мес	III		ПК		4,3		c.937C>T:p.R313C	
25	м	13 лет	III	нет	ППК, ЛГ-мошонка	14,4/5,32	15,9		c.T377A;p.M126K	П (PS4, PM2, PM5, PP2, PP4)
26	м	4 мес	IV		в мошонке	7,2/4,2	2,63		c.C86T;p.T29M	
27	м	10 лет	III	нет	ПК	1,7/0,2	0,26	31	c.591C>A:p.Y197X	П (PP4, PM2, PVS1)
28	м	1 г. 2 мес	III	нет	ПК	2,4/0,48	0,5/14		c.C909G;p.S303R	
29	м	15 лет	III	нет	ЛПК, ПГ-в мошонке	9,1/8,1	26,2	42	c.G938A;p.R313H	
30	м	18 лет	III	нет	ПК	8/5,5	18,3	0,6	c.251G>A;p.R84H	
31	м	12 мес	III	нет		1,1/0,2	0,2		c.1289G>A:p.S430N	
32	м	11 лет	III			2,64/0,19	0,27		c.962G>T:p.G321V	
33	м	5 мес	IV		ПК	2,3/0,2	0,03/4,6	60.4	c.251G>A;p.R84H	
34	м	18 лет	IV	нет	ППК, ЛГ-мошонка	9,6/6,9	11/20,8		c.951delC;p.H317QfsX17	
35	м	16 лет	III	нет	ПК	8/5,5	15,4		c.951delC;p.H317QfsX17	
36	м	нет инф.	III						c.990G>A;p.E330E	П (PM2 PVS1 PP4)

Примечания: Т – тестостерон; ЛГ – левая гонада; ПГ – правая гонада; МТ – малый таз; ЛПК – левосторонний паховый крипторхизм; ППК – правосторонний паховый крипторхизм; БГ – большая губа; * – патогенность определена для впервые выявленных вариантных изменений: П – патогенная мутация, ВП – вероятно патогенная, в скобках указаны коэффициенты (PP, PM и др.) для расчета патогенности [12, 13]; ж > м – смена пола с женского на мужской; АМГ >28 нг/мл – норма для мальчиков до 1 года [23].

скопление клеток Лейдига, наличие в разном количестве клеток Сертоли. Ни в одном случае не описывалось стрекое или овотестикулярное строение гонад.

Смена с женского на мужской пол была проведена в одном случае после проведения комплексного обследования и проведения врачебного консилиума. У ребенка при рождении отмечалось строение наружных половых органов ближе к мужскому (Прадер 4), расположение яичек в нижней трети паховых каналов, при обследовании в возрасте 1,5 мес выявлены нормальные уровни гонадотропинов, при проведении пробы с хорионическим гонадотропином подъем тестостерона составил 15 нмоль/л, что свидетельствовало о сохранности стероидогенеза в гонадах. С учетом вышеизложенного и согласия родителей была рекомендована смена пола.

Характеристика мутаций в гене *NR5A1*

У 36 пациентов был выявлен 31 вариант в гене *NR5A1*, 15 из которых ранее описаны не были.

Известная ранее мутация p.R313C была обнаружена у 3 неродственных пациентов, фенотип которых значительно варьировал от умеренной гипертрофии клитора (Прадер 2) до хорошо сформированной мошонки с мошоночной формой гипоспадии (Прадер 4). Одна пациентка с ЖПП и нарушением строения НПО Prader 2 была впервые обследована в возрасте 12 лет по поводу прогрессирующей вирилизации. Два пациента с данной мутацией имели НПО Прадер 3–4 и зарегистрированы в МПП, на момент написания статьи они еще не достигли возраста полового созревания, что не позволяет оценить сохранность функции яичек. У одного пациента выявлена мутация в том же кодоне (p.R313H), описанная ранее. Несмотря на значительное нарушение строения НПО (при рождении Прадер 3), в периоде пубертата у него отмечено спонтанное половое созревание с адекватной маскулинизацией, увеличением размеров полового члена, при этом уровень гонадотропинов в 15 лет незначительно превышал верхнюю границу нормы, а уровень тестостерона соответствовал возрасту при объеме тестикул на нижней границе возрастной нормы (10–12 мл).

Значительная фенотипическая вариабельность также отмечена у трех больных с ранее описанной мутацией p.R84H: у 2 пациенток с ЖПП строение НПО соответствовало Прадер 3, что сочеталось с расположением гонад в паховом канале, и у 1 пациента с МПП имела место степень Прадер 4 без крипторхизма. Два сибса, зарегистрированные в МПП, при одной и той же известной мутации p.H317QfsX17 имели различную степень нарушения строения НПО: Прадер 3 и Прадер 4. У обоих отмечено самостоятельное спонтанное половое созревание. На момент обследования (16 и 18 лет) у обоих уровень гонадотропинов, как и в вышеописанном случае, умеренно превышал верхнюю границу нормы, при низко-нормальном значении уровня тестостерона размер яичек соответствовал нижней границе нормы (см. табл. 2).

Среди впервые выявленных вариантов изменений в гене *NR1A1* два приводят к образованию стоп-кодона – p.Y197X и p.Y25X, два к сдвигу рамки считывания — p.N385fs и p.L245fs, что не позволяет сомневаться в их патогенности

Среди ранее неописанных вариантных изменений 5 миссенс-мутаций (p.C283Y, p.C283F, p.H24Q, p.M126K,

p.E81K) и 1 синонимичная замена, затрагивающая сайт сплайсинга (E330E), были оценены как патогенные, а 5 других — как вероятно патогенные.

Фенотипические, гормональные и молекулярно-генетические данные пациентов даны в таблице 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стероидогенный фактор I является ключевым регулятором стероидогенеза и дифференцировки гонад. Впервые он был идентифицирован в 1992 г. [3] как транскрипционный фактор с тканеспецифической экспрессией, который распознает высококонсервативный регуляторный мотив в проксимальной промоторной области генов, кодирующих стероидные P450-гидроксилазы. Позже в исследованиях *in vitro* с адренортикальными клетками было показано, что NR5A1 также стимулирует экспрессию рецептора к АКТГ (MCR2) и всех, а не только цитохром-P450-зависимых ферментов стероидогенеза [16].

Неожиданным открытием оказалась роль NR5A1 в закладке и дифференцировке надпочечников и гонад. Так, у новорожденных *NR5A1*^{-/-} мышей с кариотипом XY наряду с инверсией мужского пола на женский и наличием ДМП отсутствовали гонады и надпочечники. Также благодаря данной модели выяснилось, что, помимо агенезии гонад и надпочечников, у мышей отмечались признаки первичного нарушения гонадотропной функции и агенезия вентромедиальных ядер гипоталамуса [16]. Изучая данный феномен, Halvorson и соавт. показали, что *NR5A1* также регулирует экспрессию β-субъединицы ЛГ и рецептора гонадотропин-рилизинг-гормона [17]. Таким образом, к настоящему времени установлена роль NR5A1 в формировании, дифференцировке и функционировании гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и гонадной систем.

Белок NR5A1 состоит из 461 аминокислот и кодируется геном *NR5A1*, который располагается на длинном плече 9 хромосомы (9q33). Ген состоит из 7 экзонов, из которых 6 являются кодирующими. В строении *NR5A1* выделяют несколько ключевых доменов: A-box — ДНК-связывающий домен с двумя цинковыми пальцами, отвечающий за специфичность связывания, менее консервативная hinge (шарнирная) область, лиганд-связывающая область и два домена, отвечающие за активацию функции NR5A1: AF1 и AF2. До сих пор остается неизвестным, что является регулятором транскрипции самого гена *NR5A1*. В настоящее время имеются два основных гена-кандидата, *WT1* и *CBX2*, но прямых подтверждений данного взаимодействия пока не получено.

Учитывая данные, полученные на мышах, изначально проводился поиск мутаций в гене *NR5A1* среди пациентов, имевших сочетание дисгенезии гонад 46,XY с надпочечниковой недостаточностью. Но данный фенотип оказался редким. В литературе встречается лишь несколько описаний случаев НФП 46,XY с женским фенотипом, наличием ДМП, дисгенезией гонад в сочетании с первичной надпочечниковой недостаточностью, обусловленных мутацией в гене *NR5A1* [5, 8, 15]. Одним из возможных объяснений редкости данного фенотипа может быть то, что мутации, возникающие в критических участках гена, приводят к агенезии надпочечников, по аналогии с мышинной моделью, что несовместимо с жизнью.

В 2004 г. ряд независимых групп описали гетерозиготные мутации в гене *NR5A1* как причину изолированного нарушения формирования пола 46,XY, без нарушения функции надпочечников [6, 18], свидетельствующие о наличии гаплонедостаточности при мутациях в гене *NR5A1*.

В дальнейшем было показано, что гетерозиготные мутации в *NR5A1* являются частыми причинами (до 20%) НФП 46,XY без ПХНН [2, 7, 8].

К настоящему времени описано более 190 мутаций в гене *NR5A1*, которые распределены относительно равномерно по всему гену [19]. При проведении фенотип-генотипического анализа оказалось, что фенотип пациентов с дефектами *NR5A1* вариабелен и может проявляться различной степенью нарушения строения НПО — от правильного женского строения до правильного мужского [7, 8, 19]. С учетом такого разнообразия Fabbri-Scallet и соавт. определили 10 фенотипов при мутациях в гене *NR5A1*, которые включают весь спектр состояний, ассоциированных с нарушениями в данном гене: чистая дисгенезия гонад ± надпочечниковая недостаточность (НН), смешанная дисгенезия гонад ± НН, овотестикулярное НФП, 46,XX-тестикулярное НФП, изолированная НН, синдром исчезнувших яичек, синдром поликистозных яичников, мужское бесплодие [19].

Помимо вариабельности фенотипических проявлений при одной и той же мутации у неродственных пациентов, различные клинические проявления встречаются и в одной семье. Philibert и соавт. описали пациента с гипоплазией яичек и микропенисом с гетерозиготной мутацией (p.V355M) в гене *NR5A1*, выявленной при анализе 24 пациентов с анорхизмом. Однако у его брата-близнеца, носителя аналогичной мутации, никаких отклонений при рождении не отмечалось, и в период пубертата половое развитие соответствовало норме [20]. Данный случай свидетельствует о наличии дополнительных неизвестных факторов, влияющих на экспрессию мутантного аллеля и, соответственно, предопределяющих вариабельность фенотипа.

С учетом такой полиморфности клинической картины нам представилось интересным проанализировать частоту встречаемости, фенотипические особенности и тактику ведения пациентов с мутациями в гене *NR5A1* среди когорты российских пациентов с НФП 46,XY. Как видно из представленных нами данных, частота распространенности патологических замен в гене *NR5A1* в нашей группе составила 11,6% от общего числа пациентов с НФП 46,XY, что сопоставимо с зарубежными данными.

По распределению выбора паспортного пола ребенка при рождении основным критерием было внешнее строение НПО. Так, в группе с нарушением строения НПО Прадер 2 все пациенты зарегистрированы в ЖПП, в группе с Прадер 4, все, кроме одного пациента, — в МПП, тогда как среди группы пациентов с Прадер 3 примерно одинаковое количество пациентов с ЖПП и МПП, что говорит о субъективности выбора пола.

Проведенные в нашей когорте обследования детям в период мини-пубертата показали относительную взаимосвязь между уровнем ФСГ, АМГ и степенью нарушения строения НПО. Так, среди детей с повышенным ФСГ уровень АМГ был ниже, и строение НПО у них было ближе к женскому. У всех обследованных детей отсутствовали характерные для «классических вариантов» дисгенезий

гонад высокие уровни гонадотропинов в этот период. Необычной для «классических вариантов» ДГ является и положительная проба с хорионическим гонадотропном, более того, у двух пациентов ответ был более 20 нмоль/л (гиперергический ответ), что более характерно для нарушения чувствительности к андрогенам. Таким образом, исследование гормонального фона в данной возрастной группе не позволяет заподозрить нарушения в *NR5A1*, но может указывать на сохранность стероидогенной функции клеток Лейдига, что, в свою очередь, может помочь в выборе паспортного пола ребенка.

Интересные данные получены по пациентам, достигшим полового созревания. У всех 5 пациентов с МПП, независимо от степени нарушения строения НПО при рождении, отмечено спонтанное половое развитие с удовлетворительным развитием вторичных половых признаков. Несмотря на малочисленность данной группы, интересно отметить, что на стадиях пубертата 3–4 (пациенты 13, 15 и 16 лет) уровень тестостерона соответствует стадии полового созревания, но к 18 годам он не достигает средних значений стадии 5 по Таннеру. При этом уровни гонадотропинов у пациентов оставались на верхней границе или чуть выше нормы. Это позволяет предполагать наличие сочетанного первичного и вторичного гипогонадизма, что можно объяснить важностью правильного функционирования *NR5A1* как на уровне гонад, так и на уровне гипофиза. Важным наблюдением является развитие вирилизации у 3 пациентов с ЖПП с интактными гонадами в период полового созревания. У 2 из них (по 1 пациентке информация отсутствует) уровень тестостерона на момент обследования достигал нормальных значений для мальчиков данного возраста. Это свидетельствует о сохранности (восстановлении) стероидогенеза в клетках Лейдига несмотря на значительные нарушения строения НПО при рождении (Прадер 1–2), что важно учитывать при выборе пола воспитания ребенка. Одним из возможных объяснений может быть то, что после рождения происходит смена фетальных клеток Лейдига на клетки «взрослого» типа, которые являются другой клеточной популяцией [21]. На мышиных моделях было показано, что «взрослый» тип клеток Лейдига менее зависит от регуляторного влияния *NR5A1*, так как в них повышается экспрессия гена *NR5A2*, печеночного гомолога рецептора *NR5A1*, частично компенсирующего его функцию [22]. Единичные случаи спонтанной маскулинизации у фенотипических девушек с мутациями в гене *NR5A1* описаны и рядом зарубежных авторов [9, 10]. Adachi и соавт. также привели анализ литературных данных гистологического материала удаленных гонад у таких девушек, так как риск малигнизации гонад при дисгенезии гонад 46,XY значительно выше, чем при других формах НФП [10]. В 8 случаях из 9 отмечалась выраженная гиперплазия клеток Лейдига на фоне гипоплазии герминативных клеток. Ни в одном случае не описывались признаки малигнизации. Однако Cool и соавт. описали 2 пациентов с удалением гонад в период пубертата, у одного из которых был выявлен рак *in situ* [9]. Среди наших пациентов при воспитании в ЖПП удаление гонад производилось в большинстве случаев в раннем возрасте, и ни в одном гистологическом описании данных за малигнизацию получено не было. Среди 3 пациенток с вирилизацией в период пубертата также

не было гистологически выявлено признаков малигнизации. Таким образом, в настоящее время не накоплено достаточно материала для объективной оценки риска малигнизации гонад у данной группы пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой частоте мутаций в гене *NR5A1* среди данной группы пациентов и отсутствии каких-либо фенотипических, биохимических маркеров, позволяющих предположить этиологию заболевания до проведения молекулярно-генетического анализа. Для более объективных выводов необходимо продолжить наблюдение за данной группой пациентов, особенно при достижении ими пубертата.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Публикация настоящей работы поддержана благотворительным фондом филантропии КАФ, программа «Альфа-Эндо».

Согласие пациента. Информированное согласие было получено от всех обследованных пациентов; если возраст обследованных не достиг 15 лет, информированное согласие было подписано законным представителем.

Участие авторов. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Калинин Н.Ю., Тюльпак А.Н. Новая классификация заболеваний, связанных с нарушением формирования пола. Обсуждение международного консенсуса по пересмотру терминологии и классификации гермафродитизма // *Вестник репродуктивного здоровья*. — 2008. — №3-4. — С. 48–51. [Kalinchenko NY, Tyulpakov AN. Novaya klassifikatsiya zabolevaniy, svyazannykh s narusheniyem formirovaniya pola. Obsuzhdeniye mezhdunarodnogo konsensusa po peresmotru terminologii i klassifikatsii germafroditizma. *Bulletin of reproductive health*. 2008;(3-4):48–51. (In Russ.)].
2. Lee PA, Nordenström A, Houk CP, et al. Global disorders of sex development update since 2006: perceptions, approach and care. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(3):158–180. doi: 10.1159/000442975.
3. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Mol Endocrinol*. 1992;6(8):1249–1258. doi: 10.1210/mend.6.8.1406703.
4. Horn F, Windle J, Barnhart, Mellon PL. Tissue-Specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein KM hormone alpha-subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol Cell Biol*. 1992;12(5):2143–2153. doi: 10.1128/mcb.12.5.2143.
5. Achermann JC, Ito M, Ito M, et al. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes xy sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*. 1999;22(2):125–126. doi: 10.1038/9629.
6. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1767–1772. doi: 10.1210/jc.2003-031240.
7. Kohler B, Lin L, Mazen I, et al. The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, Nr5a1, Ad4bp) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(2):237–242. doi: 10.1530/Eje-09-0067.
8. Malikova J, Camats N, Fernández-Cancio M, et al. Human NR5A1/SF-1 mutations show decreased activity on BDNF (brain-derived neurotrophic factor), an important regulator of energy balance: testing impact of novel SF-1 mutations beyond steroidogenesis. *PLoS One*. 2014;9(8):e104838. doi: 10.1371/journal.pone.0104838.
9. Cools M, Hoebeke P, Wolffenbuttel KP, et al. Pubertal androgenization and gonadal histology in two 46,XY adolescents with NR5A1 mutations and predominantly female phenotype at birth. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(2):341–349. doi: 10.1530/EJE-11-0392.
10. Adachi M, Hasegawa T, Tanaka Y, et al. Spontaneous virilization around puberty in NR5A1-Related 46,XY sex reversal: additional case and a literature review. *Endocr J*. 2018;65(12):1187–1192. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0218.
11. Калинин Н.Ю., Аносова Т.А., Иоутси В.А., Тюльпак А.Н. Дефект стероидогенного фактора 1 (SF1) как причина нарушения формирования пола 46 XY (первое описание в отечественной литературе) // *Проблемы эндокринологии*. — 2016. — Т.62. — №1. — С. 55–59. [Kalinchenko NY, Anosova TA, Ioutsi VA, Tyulpakov AN. The first clinical presentation of disorders of sex development 46 XY due to mutation in steroidogenic factor 1 (SF1) in Russian literature. *Problemy endokrinologii*. 2016;62(1):55–59. (In Russ.)]. doi: 10.14341/probl201662155-59.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
13. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // *Медицинская генетика*. — 2019. — Т.18. — №2. — С. 3–23. [Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, et al. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallelnogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2). *Medical Genetics*. 2019;18(2):3–23. (In Russ.)]. doi: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
14. Josso N, Rey RA, Picard JY. Anti-Müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:674105. doi: 10.1155/2013/674105.
15. Orekhova A, Kalinchenko N, Morozov I, et al. A novel mutation in the critical p-box residue of steroidogenic factor-1 presenting with XY sex reversal and transient adrenal failure. *Horm Res Paediatr*. 2018;89(6):450–454. doi: 10.1159/000481776.
16. Parker, Keith L, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*. 1997;18(3):361–377. doi: 10.1210/edrv.18.3.0301.
17. Halvorson LM, Kaiser UB, Chin WW. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6645–6650. doi: 10.1074/jbc.271.12.6645.
18. Hasegawa T, Fukami M, Sato N, et al. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(12):5930–5935. doi: 10.1210/jc.2004-0935.
19. Fabbri-Scallet H, de Sousa LM, Maciel-Guerra AT, et al. Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. *Hum Mutat*. 2020;41(1):58–68. doi: 10.1002/humu.23916.
20. Philibert P, Zenaty D, Lin L, et al. Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys D with bilateral anorchia: a french collaborative study. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3255–3261. doi: 10.1093/humrep/dem278.
21. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal leydig cell – differentiation, function and regulation. *Int J Androl*. 2006;29(1):90–95. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x.
22. Yazawa T, Inanoka Y, Mizutani T, et al. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology*. 2009;150:3885–3893. doi: 10.1210/en.2008-1310.
23. Ahmed SF, Rodie M. Investigation and initial management of ambiguous genitalia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(2):197–218. doi: 10.1016/j.beem.2009.12.001.

Рукопись получена: 28.05.2020. Одобрена к публикации: 29.06.2020. Опубликовано online: 10.08.2020.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

***Калинченко Наталья Юрьевна**, к.м.н. [**Natalia Yu. Kalinchenko**, MD, PhD,] адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2000-7694>; eLibrary SPIN: 6727-9653; e-mail: kalinnat@rambler.ru

Анна Александровна Колодкина, к.м.н. [Anna A. Kolodkina, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7736-5372>;
SPIN-код: 6705-6630; e-mail: anna_kolodkina@mail.ru

Надежда Юрьевна Райгородская, д.м.н. [Nadezda Y. Raygorodskaya, MD, PhD];
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0361-5329> SPIN-код: 4227-4358; e-mail: nraygorodskaya@gmail.com

Анатолий Николаевич Тюльпаков, д.м.н. [Anatoly N. Tiulpakov, MD, PhD] Russia];
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8500-4841>; SPIN-код: 8396-1798; e-mail: anatolytiulpakov@gmail.com

ЦИТИРОВАТЬ:

Калинченко Н.Ю., Колодкина А.А., Райгородская Н.Ю., Тюльпаков А.Н. Клинические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с нарушением формирования пола 46,XY, обусловленным мутациями в гене *NR5A1* // Проблемы эндокринологии. — 2020. — Т. 66. — №3. — С.62–69. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12445>

TO CITE THIS ARTICLE:

Kalinchenko NY, Kolodkina AA, Tiulpakov AN. Clinical and molecular characteristics of patients with 46,XY DSD due to *NR5A1* gene mutations. *Problems of Endocrinology*. 2020;66(3):62–69. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12445>