



ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ Է
ԵՊԲՀ ԳԻՏԱԿՈՈՐԴԻՆԱՑԻՈՆ
ԽՈՐՀՐԴԻ ՆԻՍՏՈՒՄ,
ՆԱԽԱԳԱՀ՝ Կ.Գ.Դ., ՊՐՈՖԵՍՈՐ
Կ.Բ. ԵՆԿՈՅԱՆ

Արձանագրություն № _____ « ____ » _____ 2018 թ.

Բժշկական գիտությունների դոկտորիի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՊԼԱՆ-ԱՆՈՏԱՑԻԱ

Հայցորդ՝

Ռենատա Լևոնի Մարկոսյան

ԵՊԲՀ Էնդոկրինոլոգիայի ամբիոնի դոցենտ, բ.գ.թ.

Մուրացան Հ/Հ Էնդոկրինոլոգիական կլինիկայի բժիշկ

Թեզի վերնագիրը՝

Սեռի զարգացման խանգարումների կլինիկական

պոլիմորֆիզմը և մոլեկուլյար-գենետիկական

հետերոգենությունը

Գիտական խորհրդատու՝

Մոսկվայի Ի.Սեչենովի անվան Պետական Բժշկական

Համալսարանի Էնդոկրինոլոգիայի և դիաբետոլոգիայի

ամբիոնի պրոֆեսոր, բ.գ.դ. Վոլոդոգ Նատալյա Նիկիտիչնա

Մասնագիտական

ԺԴ. 00.03 «Ներքին հիվանդություններ»

դասիչը՝

Երևան-2018թ.



«Утверждено»
На заседании
Научно-Координационного
Совета ЕГМУ
Председатель совета
д.б.н., проф. К.Б.Енкоян

Протокол N _____ «_____» _____ 2018г

ПЛАН-АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

на тему:

“КЛИНИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА”

Научный консультант: профессор кафедры эндокринологии и диабетологии педиатрического факультета Первого Московского Государственного Медицинского университета им. И.М. Сеченова, зам директора НИИ Детской Эндокринологии ФГУ ЭНЦ, д.м.н., **Волеводз Н.Н.**

Докторант: к.м.н., доцент кафедры эндокринологии Ереванского Государственного Медицинского университета **Маркосян Р.Л.**

Шифр специальности:

14.00.03 – Внутренние болезни

“КЛИНИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА”

1. Введение

1.1. Актуальность исследования

Нарушение формирования пола (НФП) представляет собой гетерогенную группу генетических заболеваний, при котором существует несоответствие между генетическим, гонадным и анатомическим полом [1]. В основе развития клинических форм НФП лежат количественные или качественные аномалии половых хромосом, приводящие к нарушению формирования первичной половой закладки в полноценный тестикул или яичник [2]. Аномалии формирования пола занимают третье место в структуре пороков развития у человека и составляют 7,5% [3].

Новая классификация НФП, принятая в 2006 году в Чикаго, включает три основные группы заболеваний: НФП связанную с половой хромосомой, НФП с кариотипом 46,XX и 46,XY.

Группа пациентов с НФП гетерогенная и включает пациентов с гипоспадией (1:250 мальчиков), неопределенными гениталиями (1:4500 новорожденных), XX- и XY-инверсию пола (1:20000 новорожденных) [4]. Заболевания с нарушением половой дифференцировки могут выявляться в разные этапы жизненного цикла: начиная с неправильного строения как наружных, так и внутренних половых органов, дисгенетичными гонадами в период новорожденности, а также могут выявляться позднее, с задержкой пубертата, с выраженной вирилизацией или наличием гинекомастии. Данная группа пациентов страдает бесплодием, также у них часто развиваются злокачественные образования гонад, как яичников, так и тестикул.

Одной из наиболее частых причин рождения детей с неправильным строением наружных половых органов является врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), которая представляет собой группу заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, в основе которых лежит дефект одного из ферментов или транспортных белков, принимающих участие в биосинтезе кортизола в коре надпочечников [5]. Скрининговые программы, проводящиеся в различных странах

позволяют вовремя диагностировать данное заболевание, что помогает в правильном выборе пола и снижает смертность от надпочечниковой недостаточности.

Рождение в семье ребенка с неправильным строением как наружных, так и внутренних половых органов сопровождается серьезной психологической травмой и социальной проблемой, как для пациента, так и для других членов семьи. Часто невозможно раннее установление пола ребенка, что вызывает отрицательное отношение родителей [6], [7].

Этиологические факторы приводящие к рождению детей с неправильным строением половых органов изучены недостаточно. Исследование роли генетических факторов в этиологии различных форм нарушения детерминации пола, развития и функционирования репродуктивной системы у человека является приоритетной областью в эндокринологии и одним из наиболее активно развивающихся направлений современной генетики. Исследования последних лет выявили несколько генетических мутаций характерных для различных форм НФП [8],[9]. Однако, генетическая основа большинства случаев НФП, особенно связанных с нормальным набором хромосом, остается нерешенной. Данная работа, вероятно, принесет значительный прогресс в этом отношении, добавив к числу генов связанных с НФП. До настоящего времени нет стойких клинических и лабораторных данных используемых для дифференциальной диагностики различных форм НФП. Существенные пробелы в области диагностики и профилактики, так же недостаточное понимание генетических процессов участвующих в гонадном морфогенезе и половой дифференциации являются одной из нерешенных вопросов в этой области. Клинические наблюдения свидетельствуют о частом сочетании НФП с врожденными пороками развития, особенно сердца и глаз. Однако в мировой литературе описаны лишь единичные случаи, отсутствуют систематизированные данные.

Пациенты с нарушением развития органов половой системы нуждаются в оперативном лечении, гормональной терапии, психологической помощи. Помимо затрат на их лечение, реабилитацию и социальную адаптацию, у большинства пациентов с нарушением формирования пола прогноз в отношении репродуктивной функции остается неблагоприятным. Все вышеизложенное в свете современного видения проблемы определяет приоритетность представления нами плана диссертационной работы по изучению проблемы нарушений половой дифференцировки.

1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА И КРИТИКА ПРОТОТИПОВ

1. В. Аномалии половых хромосом при нарушениях формирования пола и репродукции человека. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва, 2015.[10]

Черных В. в своем исследовании на материале множества структурных перестроек хромосом X и Y человека показал, что локализация точек разрыва при цитогенетически идентифицируемых и микроструктурных перестройках гоносом в значительной мере обусловлены их микроструктурой, сформированной в результате эволюции и определяющей расположение “горячих” точек рекомбинации (псевдоаутосомные и X-Y гомологичные регионы) и локализацию точек разрыва при ее макро- и микроструктурных перестройках (Xp22.3, Xq21.2, Yp11.2 и Yq11.2), возникающих в мейозе. Однако у пациентов с XX-инверсией пола (синдрома 46,XX-мужчина и его цитогенетические варианты) были обнаружены необычный тип скрытого гоносомного мозаицизма по SRY+ хромосоме X, который может являться причиной фенотипической вариабельности у пациентов с SRY+ XX-тестикулярным и SRY+XX-овотестикулярным нарушением формирования пола. В данной работе не были проанализированы случаи SRY-XX негативные, не были установлены причины вариабельности клинических форм.

2. A. Bashamboo. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development.2017 doi.org/10.1111/cge.12932[11].

В исследовании Bashamboo был проведен экзом секвенс 120 пациентам с 46,XY гонадным дисгенезом и пациентам с 46,XX-SRY негативным НФП. Были выявлены ранее известные мутации *RSPO1*, *WT1*, *ARX*, *SRY*, *GATA4*, *FOG2*, *DMRT1*, *WNT4*, *MAP3K1*, *MAMLD1*, *LHCGR*, *HNAT*, *DHH*, *FGFR1*, *FANCM* and *NR5A1*. Также исследование выявило новые генетические факторы, не описанные ранее *IER3IP1*, *CHD7*, *FANCA*. Однако в 60% всех случаев НФП не удастся установить этиологию заболевания, не установлен также характер наследования. В исследовании не были проанализированы сочетание в данной когорте пациентов наличие стигм эмбриогенеза, врожденных пороков развития. Тем не менее, экзом секвенс является быстрым и эффективным методом для выявления ранее известных генетических факторов НФП, а также использование данного метода позволит идентифицировать новые генетические факторы, вовлеченные в формирование пола.

Научная новизна

Данное исследование имеет цель улучшить наше понимание сложного процесса дифференцировки пола. Мы ожидаем, что исследование в этом аспекте приведет к новым путям при изучении случаев пациентов с НФП с неясной этиологией. Кроме того, наш

подход обеспечит понимание генетических путей, лежащих в основе НФП, и предоставит диагностические меры для пациентов, что может привести к новым терапевтическим подходам.

1.3 Список литературы

1. A Hughes, C Houk, S F Ahmed, P A Lee. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child*. 2006 Jul; 91(7): 554–563.
2. Quinn A, Koopman P. The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):351-63.
3. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res*. 2012 Jan;20(1):215-38.
4. Thyen U, Lanz K, Holterhus P-M, Hiort O. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm Res*. 2006;66:195–203.
5. R.Markosyan, F.Ahmed. Sex Assignment In Conditions Affecting Sex Development. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017;9(Suppl 1):106-112
6. Jorge JC, Echeverrii C, Medina Y, Acevedo P. Male gender identity in an XX individual with congenital adrenal hyperplasia. *J Sex Med*. 2008; 5:122–131.
7. Peter A. Lee, and Christopher P. Houk, Review of Outcome Information in 46,XX Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Assigned/Reared Male: What Does It Say about Gender Assignment? Hindawi Publishing Corporation International Journal of Pediatric Endocrinology Volume 2010, Article ID 982025, 7 pages doi:10.1155/2010/982025.
8. Schonbucher V., Schweizer K., Rustige L., Schutzmann K., Brunner F., Richter-Appelt H. Sexual quality of life of individuals with 46, XY disorders of Sex development. *The Journal of Sexual Medicine*.2012,9;3154-3170.
9. Peter A Lee, Amy B Wisniewski, Laurence Baskin, Maria G Vogiatzi, Eric Vilain, Stephen M., Rosenthal, Christopher Houk. Advances in diagnosis and care of persons with DSD over the last decade. *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2014, 2014:19 <http://www.ijpeonline.com/content/2014/1/19>
10. Черных В. Аномалии половых хромосом при нарушениях формирования пола и репродукции человека. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва, 2015.
11. A. Bashamboo Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development.2017 doi.org/10.1111/cge.12932.

Цель настоящего исследования – идентификация новых генетических мутаций вовлеченных в детерминацию гонад с целью повышения эффективности дифференциальной диагностики, патогенетически обоснованной терапии, а также правильного выбора пола при нарушениях половой дифференцировки неясного генеза.

Задачи

1. Клинико-гормонально охарактеризовать когорту пациентов с НФП неясной этиологии включающих пациентов 46,XY НФП с полным либо парциальным гонадным дисгенезом и 46,XX НФП овотестис.

2. Установить фенотип-генотипическую корреляцию в зависимости от полученных генетических и лабораторных данных.

3. Сравнить диагностическую значимость различных гормональных показателей при проведении дифференциальной диагностики различных форм нарушений половой дифференцировки, а также идентифицировать маркеры улучшающие диагностику различных форм НФП.

4. Выявить наличие врожденных аномалий, в частности пороков развития сердечно-сосудистой системы и глаз, ассоциированных с нарушениями половой дифференцировки и установить возможность наличия связи.

5. Идентифицировать новые генетические мутации ответственные за НФП неясной этиологии, а также оценить характер наследования.

6. Клинико-гормонально охарактеризовать когорту пациентов с 46,XX НФП (ВДКН) вследствие дефицита 21-гидроксилазы.

7. Определить молекулярно-генетические особенности как классических, так и неклассических форм ВДКН в нашей популяции вследствие дефицита 21-гидроксилазы, оценить генотип-фенотипическую корреляцию, а также определить генетические дефекты, вызывающие тяжелые формы ВДКН.

3. Тип исследования

Клинико-лабораторное, эпидемиологическое, статистическое исследование.

4 Конкретные методики, объект планируемого исследования и планируемое количество наблюдений

Планируется провести углубленное клиническое, генетическое обследование пациентов с различными формами нарушения формирования пола, для чего

проанализировать сведения о больных, полученные в результате обследований, проведенных на базе университетской клиники «Мурацан», а также из карт мониторинга, оформленных педиатрами и эндокринологами по стандартной форме, разработанной в университетской клинике «Мурацан». Обследование планируется как минимум у 50 пациентов с различными формами нарушений половой дифференцировки, включающие 46,XY с частичным или полным гонадным дисгенезом, смешанным гонадным дисгенезом и пациентов с 46,XX инверсией пола, а также 150 пациентов с 46,XX включающую врожденную дисфункцию коры надпочечников.

1. Стандартное клиническое обследование с определением антропометрических показателей (рост, вес, расчет SDS роста, расчет ИМТ, оценка стадии полового развития согласно классификации Tanner JM (1962), оценка степени вирилизации, определение объема тестикул (мл) с помощью орхидометра Prader).
2. Углубленный семейный анамнез, антропометрические данные при рождении, оценка наличия сопутствующих заболеваний.
3. Биохимическое исследование с определением калия, натрия, глюкозы.
4. Гормональное исследование крови с определением уровня лютеинизирующего, фолликулостимулирующего гормонов, эстрадиола, тестостерона, 17-ОН прогестерона, дигидроэпиандростерон сульфата, дигидротестостерона, андростендиона, адренокортикотропного гормона, антимюллерова гормона, пролактина, инсулин подобного пептида3, ингибина В, пролактина, кортизола, бета ХГЧ, ренина.
5. В зависимости от вида НФП проба с гонадолиберинем, синактеном, хорионическим гонадотропином.
6. Исследование кариотипа у всех пациентов.
7. Эхокардиография
8. Осмотр офтальмолога
9. Генетический анализ на выявление мутаций CYP21.
- 10.** Полный экзом секвенс ((TruSeqv3) пациентов, родителей (трио).
- 11.** Параллельно с экзом секвенсом, сравнительная геномная гибридизация (CGH array) пациентов, родителей и сибсов.
12. Генетический анализ на выявление мутации SRY гена
13. В группе пациентов с ВДКН рентгенография кистей рук.
14. Сонография органов малого таза и яичек.

5.Соответствие работы утвержденной теме

Исследования будут проводиться на базе кафедры эндокринологии ЕГМУ им. М. Гераци, университетской больницы «Мурацан». Генетические исследования такие как определение кариотипа, мутации CYP21, SRY, лабораторные исследования будут проводится в “ ЦЕНТРЕ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ И ПЕРВИЧНОЙ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ”, Ереван, материально-техническая оснащенность которого позволяет провести весь спектр планируемых анализов и исследований. Для проведения полного экзом секвенса (TruSeqv3) и сравнительной геномной гибридизации (CGH array) ДНК пациентов, родителей и сибсов будут исследованы в университетской лаборатории биоинформатики Женевы (Department of Genetic Medicine & Development, University of Geneva Medical School).

Данное исследование будет проводиться в рамках совместной научной грантовой программы Genetics of Human Disorders of Sexual Development SCOPES 2014-2018: Joint Research Projects (SWISS NATIONAL SCIENCE FOUNDATION).

В работе будут участвовать сотрудники кафедры эндокринологии, доля соискателя составит 70-80%.

6.Список опубликованных работ.

1. R.Markosyan, F.Ahmed. Sex Assignment In Conditions Affecting Sex Development. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2017;9(Suppl 1):106-112
2. R.Markosyan. Age of Menarche and Related Factors. Endocrinol Metab Syndr 2017, Vol 6(5): 278.DOI: 10.4172/2161-1017.1000278
3. Р.Маркосян. Случай поздней диагностики неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников. Erebuni Medical Journal Issue 2/2016 Yerevan P.49-52
4. R.Markosyan. 46XX male syndrome. Hormone Research in Pediatrics. ESPE 2016, P2-431, p. 294.
5. R.Markosyan. Study of Genetics of Human Disorders of Sexual Development. SCOPES 2014-2018: Joint Research Projects. Hormone Research in Pediatrics. 2016, p. 294-295.
6. R.Markosyan, T. Sargsyan, H. Hayrapetyan. Genotype and phenotype characteristics of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. The first intervention study in Armenia. European Human Genetics Conference book. UK. 2015, Vol 23, Suppl. 1, p. 387
7. Р.Маркосян Синдром Шерешевского-Тернера, клиничко-антропометрическая характеристика пациентов. Сборник материалов конференции детских врачей Армении. Ереван, 2014, p. 75-77.

7.Календарный план

1	Обсуждение начальных источников	2017-2018
2	Обладание методами исследования	2017-2018
3	Набор материала исследования	2017-2019
4	Ввод данных исследования в компьютер	2018-2019
5	Публикация научных статей	2017-2020
6	Обработка полученных данных	2018-2019
7	Оформление работы	2019-2019
8	Апробация работы	2019-2020
9	Окончательная защита	2020

Исполнитель (докторант)

_____Маркосян Р.Л.

Научный консультант

_____Волеводз Н.Н.

«__»__2018г.

Телефон:+37460621530; +37494450469

e-mail: renatamarkosyan@mail.ru