

Summary (Polish version)

Zgodnie z konsensusem osiągniętym w Chicago w 2005 r. zaburzenia rozwoju płci (ZRP) to każde wrodzone zaburzenie, w którym rozwój płci chromosomowej, gonadalnej lub fenotypowej jest nieprawidłowy. Sformułowanie nowej definicji wpłynęło na zrewidowanie dotychczasowej nomenklatury, co przede wszystkim poskutkowało jej ujednoczeniem oraz rezygnacją z określeń pejoratywnych takich jak obojnactwo, obojnactwo rzekome, czy odwrócenie płci. Według aktualnych wytycznych podział ZRP oparty jest o wynik badania kariotypu, stąd wyróżnia się ZRP z kariotypem 46,XY, z kariotypem 46,XX oraz ZRP związane z aberracjami chromosomów płci. Pacjenci z ZRP z kariotypem 46,XX to głównie pacjentki z wrodzonym przerostem nadnerczy. W przypadku pacjentów z ZRP związanymi z aberracjami chromosomów płci przyczyna zaistniałej choroby jest uzasadniona właśnie poprzez nieprawidłową liczbę lub strukturę chromosomów płciowych. Pacjenci z ZRP z kariotypem 46,XY stanowią najbardziej heterogenną grupę pacjentów, w której postawienie ostatecznego rozpoznania na poziomie molekularnym możliwe jest u mniej niż połowy przypadków.

Najtrudniejszym wyzwaniem w prowadzeniu pacjentów z ZRP jest decyzja o nadaniu płci. Stąd obowiązek ten powinien spoczywać na barkach zespołu wielodyscyplinarnego utworzonego z szeregu specjalistów, m. in.: endokrynologa dziecięcego, ginekologa dziecięcego, psychologa, chirurga, radiologa i genetyka klinicznego. Podczas podejmowania decyzji należy także wziąć pod uwagę opinię rodziców.

Rozwój płci jest złożonym procesem. Jego inicjacja rozpoczyna się z chwilą zapłodnienia. Obecność dwóch chromosomów X lub jednego chromosomu X i jednego Y determinuje tzw. płęć chromosomową. Kolejne etapy można podzielić na różnicowanie się bipotencjalnej gonady w kierunku jądra oraz rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych.

Z uwagi na patomechanizm wśród ZRP z kariotypem 46,XY można wyróżnić: zaburzenia rozwoju gonad, zaburzenia syntezy androgenów oraz zaburzenia działania androgenów.

W przypadku zaburzeń rozwoju gonad identyfikacja czynnika genetycznego jest procesem złożonym. Do tej pory poznano szereg genów, których ekspresja warunkuje prawidłowy rozwój zarówno bipotencjalnej gonady, jak i jej dalsze różnicowanie się w kierunku jądra. W wymiarze klinicznym zaburzenia rozwoju gonad dzieli się na całkowitą dysgenezę gonad oraz częściową dysgenezę gonad. W pierwszym przypadku, wobec obecności prawidłowych zewnętrznych narządów płciowych, pacjentki zgłaszają się dopiero w okresie pokwitania z powodu braku rozwoju piersi. Badanie usg potwierdza obecność macicy, a wysokie stężenie gonadotropin

wskazuje na pierwotną dysfunkcję gonad. Ryzyko nowotworzenia jest wysokie, stąd gonadektomia postulowana jest w momencie postawienia rozpoznania. Zespół częściowej dysgenezy gonad charakteryzuje się dużą różnorodnością kliniczną, w której stopień maskulinizacji zewnętrznych narządów płciowych oraz zaniku struktur müllerowskich zależy od stopnia zróżnicowania komórek Sertolego i Leydiga w dysgenetycznej gonadzie. Do tej grupy zaburzeń zalicza się także zespół regresji jąder, który rozpoznawany jest u chłopców z prawidłowym wyglądem wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych, ale u których doszło do zaniku jąder. Gonad nie udaje się uwidocznnić sonograficznie ani podczas rewizji chirurgicznej, a markery potwierdzające obecność komórek Sertolego, a więc tkanki jądrowej (AMH, inhibina B), są nieoznaczalne.

Zaburzenia syntezy androgenów są także heterogenną pod względem przyczyny genetycznej grupą ZRP. Charakterystyczny jest dla niej autosomalny recesywny sposób dziedziczenia, stąd częściej zaburzenia syntezy androgenów spotykane są u potomstwa spokrewnionych rodziców. Część enzymów biorących udział w syntezie androgenów jest wspólna zarówno dla jąder, jak i nadnerczy, dlatego z klinicznego punktu widzenia zaburzenia syntezy androgenów dzieli się na zaburzenia z towarzyszącą lub nie niewydolnością nadnerczy. Najczęstszym zaburzeniem jest niedobór 5α -reduktazy oraz niedobór dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej typu 3. W obu przypadkach stopień niepełnej maskulinizacji zewnętrznych narządów płciowych jest istotny, stąd często po urodzeniu nadawana jest płeć żeńska. W okresie pokwitania wskutek m. in. zwiększonej aktywności pozostałych izoenzymów dochodzi do istotnej wirylizacji, dlatego w przypadku ugruntowanej tożsamości żeńskiej należy wykonać gonadektomię przed okresem pokwitania.

Z punktu widzenia podłoża molekularnego podgrupa pacjentów z zaburzeniami działania androgenów jest najbardziej homogenną grupą, gdyż objawy wynikają z nieprawidłowej funkcji receptora dla androgenów. W zależności od stopnia jego uszkodzenia wyróżnia się zespół całkowitej niewrażliwości na androgeny oraz zespół częściowej niewrażliwości na androgeny. W związku z prawidłowym wyglądem zewnętrznych narządów płciowych pacjentki z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny najczęściej zgłaszają się do lekarza dopiero w okresie pokwitania z powodu pierwotnego braku miesiączki. Skąpe owłosienie łonowe, prawidłowy rozwój gruczołów piersiowych, ślepo zakończona pochwa, brak macicy w usg miednicy mniejszej, wysokie stężenie testosteronu, AMH oraz inhibiny B pozwalają postawić rozpoznanie. Diagnoza rzadziej stawiana jest w okresie niemowlęcym lub dzieciństwa, gdy przyczyną zgłoszenia się do lekarza jest obecność przepuklin pachwinowych zawierających gonady męskie. Decyzja o nadaniu płci nie następuje z trudnością, gdyż

identyfikacja płciowa jest zawsze żeńska. W świetle nowych doniesień ryzyko nowotworzenia w pozostawionych gonadach zdaje się być niewielkie, stąd aktualnie postuluje się ich usunięcie dopiero po okresie pokwitania. W przypadku zespołu częściowej niewrażliwości na androgeny obraz kliniczny jest dużo bardziej różnorodny. Najczęściej objawom niepełnej maskulinizacji (mikroprącie ze spodziectwem, z obecnym lub nie wnętrstwem) oraz braku struktur pochodzenia müllerowskiego towarzyszy prawidłowe stężenie testosteronu, AMH i inhibiny B. Wśród pacjentów z niskim stopniem zewnętrznej maskulinizacji decyzja o nadaniu płci jest już mniej jednoznaczna.

Celem pracy doktorskiej była identyfikacja podłoża molekularnego najmniej poznanej podgrupy pacjentów z ZRP, mianowicie ZRP z kariotypem 46,XY, przy użyciu technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. next generation sequencing). Na podstawie obrazu klinicznego zewnętrznych narządów płciowych, wyniku badań laboratoryjnych (w tym testu stymulacyjnego z β hCG, stężenia AMH oraz inhibiny B w surowicy krwi) oraz obrazu ultrasonograficznego wewnętrznych narządów płciowych każdemu pacjentowi zostało przypisane rozpoznanie: zaburzeń działania androgenów, zaburzeń rozwoju gonad, zaburzeń syntezy androgenów lub ZRP będących elementem zespołu wad. Wyniki powyżej analizy zostały porównane z rezultatami sekwencjonowania NGS celowanego panelu genów. Praca ta przedstawia możliwy proces diagnostyczny podłoża molekularnego pacjentów z ZRP z kariotypem 46,XY, którego celem jest powiązanie wyników badań laboratoryjnych oraz radiologicznych z sekwencjonowaniem NGS.

Do badania zakwalifikowano 35 pacjentów (33 probandów) z ZRP z kariotypem 46,XY, którzy byli hospitalizowani w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej. Rozpoznanie postawione było na podstawie obrazu klinicznego zewnętrznych narządów płciowych ocenionych przy pomocy skali oceny stopnia zewnętrznej maskulinizacji (EMS, ang. external masculinisation score). Spośród 35 pacjentów 21 (60%) miało nadaną płć męską, a 14 pacjentów (40%) miało nadaną płć żeńską.

Po szczegółowej analizie danych literaturowych oraz pochodzących z baz danych do analizy wyselekcjonowano panel 54 genów.

Do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej, mającej na celu wytypowanie przypuszczalnie patogennych wariantów, użyto filtrów częstości występowania rzadszego allelu $<1\%$ według bazy danych Exome Aggregation Consortium (ExAC) w oparciu o populację europejską oraz filtrów wpływu na funkcję kodującą (warianty powodujące przesunięcie ramki odczytu, zmiany sensu, nonsensowne, utraty kodonu STOP, delecję egzonu) oraz splicingową. Następnie uwzględniając kryteria zdefiniowane przez American College of Medical Genetics and

Genomics zidentyfikowane warianty zostały podzielone na trzy kategorie: wariantów patogennych (ang. pathogenic variants, PV), wariantów prawdopodobnie patogennych (ang. likely pathogenic variants, LPV) oraz wariantów o nieznanym znaczeniu (ang. variants of unknown significance, VUS). Przyjęto, że wyłącznie identyfikacja wariantu patogennego lub wariantu prawdopodobnie patogennego była równoznaczna z uzyskaniem ostatecznego rozpoznania na poziomie molekularnym.

Wśród grupy pacjentów z nadaną płcią męską pięciu chłopcom postawiono rozpoznanie zespołu regresji jader, trzech spełniało kryteria wstępnego rozpoznania zaburzeń syntezy androgenów, u sześciu chłopców postawiono rozpoznanie niespecyficznego zespołu niepełnej maskulinizacji (ang. non-specific disorder of undermasculinisation, NSDUM), a pozostałym siedmiu pacjentom nadano rozpoznanie ZRP będących elementem zespołu wad. W grupie pacjentek czworo dziewcząt spełniało kryteria rozpoznania zaburzeń rozwoju gonad, u jednej wysunięto podejrzenie rozpoznania zaburzeń syntezy androgenów, u większości (n=8) rozpoznano zaburzenia działania androgenów, a jedna dziewczynka otrzymała diagnozę ZRP będących elementem zespołu wad.

Analiza genetyczna pozwoliła na zidentyfikowanie 22 mutacji w grupie chłopców oraz 19 mutacji w grupie dziewcząt. Większość mutacji była mutacjami typu zmiany sensu, a ich częstość była podobna u obu płci.

Następnym etapem analizy była klasyfikacja poszczególnych wariantów. W grupie chłopców zidentyfikowano 15 wariantów, a w grupie dziewcząt 14 wariantów. Wartość diagnostyczna mierzona identyfikacją wariantu patogennego lub prawdopodobnie patogennego była zdecydowanie wyższa wśród dziewcząt, choć należy zauważyć, że u chłopców wytypowano istotną liczbę (n=12) wariantów o nieznanym znaczeniu, których status może ulec zmianie po przeprowadzeniu dalszych badań. U chłopców ostateczne rozpoznanie na poziomie molekularnym było możliwe u 14,3%, natomiast u dziewczynek wynosiło aż 64,3%.

Na podstawie analizy grupy badanej bez względu na płeć stwierdzono, że definitywne rozpoznanie genetyczne mogło zostać postawione z największym prawdopodobieństwem wśród pacjentów z wstępnym rozpoznaniem zaburzeń działania androgenów, natomiast nie było możliwe wśród pacjentów z wstępnym rozpoznaniem zaburzeń regresji gonad.

Istotną zgodność pomiędzy wstępnym rozpoznaniem a identyfikacją poszczególnych wariantów uzyskano w podgrupie pacjentów z zaburzeniami działania androgenów i syntezy androgenów, mniejszą w grupie pacjentów z ZRP będącymi elementem zespołu wad, natomiast brak zgodności obserwowano wśród pacjentów z zaburzeniami rozwoju gonad. Ponadto analiza wykazała, że geny, które charakteryzowały się najmniejszą swoistością

względem fenotypu, były związane z wrodzonym hipogonadyzmem hipogonadotropowym (ang. congenital hypogonadotropic hypogonadism, CHH). Warianty wykryte w genach związanych z CHH zostały zidentyfikowane wśród pacjentów z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny, całkowitej dysgenezy gonad oraz ZRP będącymi elementem zespołu wad.

Ponadto w analizowanej grupie pacjentów zidentyfikowano pięciu pacjentów (14,3%) mających mutacje w więcej niż jednym genie z panelu 54 genów ZRP. Należy podkreślić, że prawie u wszystkich pacjentów było to skojarzenie wariantu w genie *AR* oraz innego genu. To potwierdza celowość stosowania sekwencjonowania NGS celowanego panelu genów do analizy dodatkowych czynników wpływających modulująco na różnorodność fenotypową ZRP, takich jak dziedziczenie oligogenowe.

W podsumowaniu należy zwrócić uwagę, że przeprowadzenie analizy sekwencjonowania NGS celowanego panelu genów wśród pacjentów z heterogenną grupą ZRP pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonującego poziomu identyfikacji podłoża molekularnego zaistniałego zaburzenia. Natomiast wśród pacjentów, u których analiza pozwoliła wyłącznie na identyfikację VUS, wynik ten mógłby stanowić doskonały punkt wyjścia do dalszych badań. Pomimo faktu, że sekwencjonowanie NGS celowanego panelu genów nie jest zaprojektowane i przeznaczone do odkrycia nowych genów związanych z ZRP, badanie 54 genów u 35 pacjentów pozwoliło na wzbogacenie dotychczasowego obrazu ZRP poprzez poszerzenie spektrum powiązanych fenotypów oraz wykrycie dziedziczenia oligogenowego. Niemniej jednak, należy zauważyć, że pomimo dołożenia wszelkich starań przy poszukiwaniu czynników genetycznych u pacjentów z ZRP z kariotypem 46,XY (zwłaszcza wśród tych z nadaną płcią męską), wyniki analizy są często niejednoznaczne, prowadząc do identyfikacji wariantów o nieznanym znaczeniu. Stąd, aby lepiej zrozumieć korelację pomiędzy genotypem a fenotypem u pacjentów z ZRP, zasadna wydaje się wyłącznie usystematyzowana, jednoczasowa ocena kliniczna, laboratoryjna i radiologiczna wraz ze skrupulatnym uszeregowaniem wykrytych wariantów. Przeprowadzona analiza pozwoliła na stworzenie zintegrowanego algorytmu diagnostycznego dla pacjentów z ZRP z kariotypem 46,XY.