МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
Медицински Факултет
Катедра по Медицинска химия и биохимия

Силвия Иванова Андонова-Бъклова

ПОДХОДИ ЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДИАГНОСТИКА НА НЯКОИ СЪСТОЯНИЯ ОТ СПЕКТЪРА НА НАРУШЕНИЯТА В ПОЛОВОТО РАЗВИТИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен "ДОКТОР"
по акредитирана докторска програма: Молекулярна генетика
професионално направление: 4.3. Биологически науки

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
проф. Алексей Савов, дб
проф. Албена Тодорова, дбн

2021

Авторът е докторант на самостоятелна подготовка към Катедра"Медицинска химия и биохимия", Медицински факултет, Медицински университет - София.

Дисертационният труд е с обем 171 стандартни страници.
Работата е онагледена с 23 таблици и 49 фигури.
Библиографията включва 126 литературни източници.

Експерименталната работа е извършена в Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом", МФ, МУ- София и в Института по човешка генетика, Мюнстер, Германия.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по Медицинска химия и биохимия при Медицински факултет на Медицински университет, София на 10.11.2020г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 23.02.2020г. от ..... ч. в зала ..... пред научно жури в състав:

Проф.д-р Савина Хаджидекова, дм
Катедра по медицинска генетика на Медицински факултет при МУ-София, рецензия
Проф. д-р Катя Ковачева, дм
Медицински Университет – Плевен, рецензия
Доц.д-р Ралица Робева, дм
Катедра по ендокринология на Медицински факултет при МУ-София, становище
Проф. д-р Таня Тимева, дм
Русенски Университет „Ангел Кънчев", становище
Проф. Маргарита Апостолова, дб
Българска Академия на Науките, становище

СЪДЪРЖАНИЕ

1.	Въведение	5
2.	Цел и задачи	7
3.	Материали и методи	8
4.	Резултати и обсъждане	9
4.1.	Въвеждане на QF-PCR технологията в диагностичната практика	9
4.2.	QF-PCR анализ за дородова диагностика на полови анеуплоидии	14
4.3.	QF-PCR анализ за послеродова диагностика на полови анеуплоидии	15
4.3.1.	QF-PCR анализ при 30 новородени	15
4.3.2.	QF-PCR анализ при 26 индивиди с женски фенотип	16
4.3.3.	QF-PCR анализ при 13 индивида с мъжки фенотип	19
4.3.4.	QF-PCR анализ при 13 индивида с мозайка/структурни изменения по половите хрозоми	21
4.3.5.	QF-PCR анализ при случай на химеризъм	24
4.4.	Изследвана група пациенти за моногенни междинно-полови състояния	27
4.4.1.	46,XY DSD и AIS, синдром на андрогенната нечувствителност	28
4.4.2.	46,XY DSD и дефицит на 5-α-редуктаза, тип 2	37
4.4.3.	46,XY DSD и пълна гонадна дисгенезия / синдром на Swyer	42
4.4.4.	46,XY DSD и мутация в гена *NR5A1*	45
4.4.5.	46,XY DSD и сидром на Денис-Драш с тумор на Уилмс	50
4.4.6.	46,XY DSD и без открита генетична находка	51
4.5.	Подходи на генетични изследване при пациенти с DSD	52
4.6.	Предложение за панел от DSD-асоциирани гени	55
5.	Изводи	58
6.	Приноси	59
7.	Публикации по темата на дисертацията	62
8.	Участия с представяне по темата на дисертацията	63
9.	Библиография	60
10.	Резюме	64

ПО-ВАЖНИ ИЗПОЛВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AIS - Androgen Insensitivity Syndrome , синдром на Андрогенната нечувствителност, пълна форма (CAIS, complete), парциална форма (PAIS, partial)

AMH – Антимюлеров хормон

aCGH – array Comparative Genome Hybridisation

CAIS - Complete Androgen Insensitivity Syndrome , пълна форма на синдрома на Андрогенната нечувствителност

DHT, ДХТ – Дихидротестостерон

DSD – disorders of sexual development, нарушения в половото развитие

GD – Gonadal Dysgenesis, гонадна дисгенезия

HMG box – High Mobility Group box

HRE – Hormone Response Element

KTS – група от 3 аминокиселини в WT1 бетъка: Лизин+Треонин+Серин

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

NGS – Next generation sequencing, секвениране от ново поколение

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Men

OvT DSD – Ovotesticular DSD, овотестикуларно състояние с нарушение в половото развитие

QF-PCR – Quantitative Fluorescent PCR, количествена флуоресцентна амплификация

PAR – Pseudoautosomal region, псевдоавтозомален регион

PAIS - Partial Androgen Insensitivity Syndrome , пълна форма на синдрома на Андрогенната нечувствителност, парциална форма

POF – Premature Ovarian Failure, преждевжеменна овариална недостатъчност

T – Тестостерон

WES – Whole Exome Sequencing, пълно екзомно секвениране

WGS – Whole Genome Sequencing, пълно геномно секвениране

НГЛ – Национална генетична лаборатория

ХЗТ – хормонално-заместителна терапия

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Формирането на пола при човека е комплексен процес, включващ действието на набор от множество гени. Грешки в действието на някой от тези гени може да доведат до нарушения в половото развитие [Paliwal, 2011]. Вариациите/нарушенията в половото развитие (познати и като *DSD – Differences/Disorders of Sex Development*) включват широка група от вродени състояния, при които развитието на хромозомния, гонадния или фенотипния пол е атипично [Lee, 2006]. Може да се наблюдава гонаден или генитален пол, противоположен на хромозомния, нечувствителност към андрогени, двойнственост на гениталиите, и др. Това може да се дължи както на вариации в пътя, отговорен за детерминирането на гонадното развитие, така и на смущения в половата диференциация заради дефекти в производството или в действието на хормоните (като напр. чувствителност на тялото към определени хормони).

Раждането на дете с DSD състояние винаги е силно стресиращо събитие за родителите. То носи със себе си изключителна несигурност и неяснота за здравето на детето и за бъдещия му социален пол – несигурност, която се влияе силно и от трудностите на медицинския екип да разясни бързо ситуацията чрез поставянето на сигурна клинична диагноза веднага.

Нашата цел беше да се фокусираме върху молекулните основи на нарушенията в половото развитие и да коментираме предимствата, които ни предоставят развитието на новите геномни технологии, довели до разкриването на множество нови гени, участващи в половото детерминиране. Важно е да се отбележи, че въпреки огромния напредък в разбирането на половата детерминация при бозайниците, при много пациенти с DSD все още не може да бъде достигнато до сигурна генетична диагноза. Със все по-широкото въвеждане в практиката на иновативните изследвания, каквото е секвенирането от ново поколение, тази ситуация би могла да бъде променена.

Настоящият труд поставя началото на молекулярно-генетичната диагностика на тази група заболявания в България с въвеждане на методика за извършване на генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза нарушение в половото развитие / междинно-полово състояние.

ВАРИАЦИИ / НАРУШЕНИЯ В ПОЛОВОТО РАЗВИТИЕ

(DSD – Differences/Disorders of sex development)

Вариациите / нарушенията в половото развитие (*disorders/differences of sex development – DSD*) са група от редки състояния, които се характеризират най-общо с нетипично развитие на хромозомни, гонадни или фенотипни черти, характеризиращи развитието на пола. Могат да възникнат по време на ембрионалното и феталното развитие на индивида. Тези състояния обикновено се презентират с нетипични гениталии в периода на новороденото или със задръжка в пубертетното развитие през по-късния етап. Въпреки, че двойнствени гениталии се наблюдават относително рядко (1 на 4 500 новодорени) се счита, че някакво нарушение в развитието на външните гениталии вероятно има реално при 1 от 300 новородени [Kyriakou, 2015]. Съгласно използваната в момента система за класификация, приета през 2006г с т.нар. Консенсус от Чикаго [Lee, 2006], вариациите / нарушенията в половото развитие се разделят на 3 основни групи, в зависимост от кариотипа на индивидите:

1. **Sex chromosome DSD – засягане на броя/структурата на половите хромозоми**
2. **46,XX DSD – индивиди с нарушения в половото развитие и кариотип 46,XX**
3. **46,XY DSD – индивиди с нарушения в половото развитие и кариотип 46,XY**

ОСНОВНИ ПОДХОДИ ЗА ГЕНЕТИЧНА ДИАГНОСТИКА НА DSD

За поставане на генетична диагноза при пациенти с DSD са описани различни диагностични алгоритми, в завивисмост от клиничните данни за пациента, хромозомния му пол, първоначални данни от хормоналните му изследвания, наличието на конкретни съпътстващи малформации, функциониращи тестиси или наличие на Мюлерови структури, фамилна история за DSD или репродуктивни неудачи, възможности на конкретния екип за извършване на генетични изследвания [Audi, 2018]. Алгоритмите на Croft, 2016 и Alhoramaidah, 2017 започват с описание на фенотипа на DSD пациента, хормоналните му нива и доказване на генетичен (хромозомен) пол, последвани от таргетно секвениране с панел от конкретни гени или цялосто екзомно/геномно секвениране и оценка на генетичните находки спрямо известните клинични данни. В някои алгоритми преди включването към цялостно секвениране се отчитат и данните за наличие на придружаващи малформативни стигми, както и резултатите от извършен *array CGH* анализ. При новородени с нетипични гениталии се отчита наличието на палпиращи се гонади, спецификата на анатомията на външните полови органи законкретния случай, наличието на матка, както и резултата от цитогенетичния анализ, което определя избора на последващи хормонални и генетични изследвания [Audi, 2018].

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Молекулярно-генетично охарактеризиране на някои състояния от спектъра на нарушенията в половото развитие и разработване на методологичен подход за поставяне на генетична диагноза при тях.

ЗАДАЧИ

1. Въвеждане на молекулярно-генетичен подход за **откриване на анеуплоидии чрез ДНК анализ** и валидиране на разработения подход върху контролна група ДНК проби за дородова и послеродова диагностика на най-честите анеуплоидии, вкл. засягащи половите хромозоми
2. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-генетичен подход за откриване на патологични варианти в гените ***AR, SRD5A2, SRY, NR5A2, WT1*** чрез **секвениране по Sanger**
3. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-генетичен подход за откриване на **делеции/дупликации в таргетни гени**, асоциирани с нарушения в половото развитие чрез **MLPA анализ**
4. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-генетичен подход за откриване на **делеции/дупликации по дължината на целия геном**, асоциирани с нарушения в половото развитие чрез **aCGH анализ**
5. **Охарактеризиране** на типа, честотата и клиничното значение на откритите генетични варианти
6. Предлагане на **диагностичен алгоритъм** за извършване на генетични изследвания при пациенти с клинични данни за нарушения в половото развитие.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. УЧАСТНИЦИ В ПРОУЧВАНЕТО

В дисертационния труд са включени изследвания върху ДНК проби от общо 1726 индивида, представени на таблица 1.

Таблица 1
Участници в настоящото изследване

	ОБЩО ИЗСЛЕДВАНИ	**1726**
1.	**Пилотно въвеждане на QF-PCR методика**	**1584**
1.1.	Пренатални проби	1050
1.2.	Постнатални проби	534
2.	**Индивиди с пренатално установени анеуплоидии по половите хромозоми**	**31**
3.	**Определяне на генетичен пол при новородени**	**30**
4.	**Определяне на вида и броя полови хромозоми**	**39**
4.1.	При индивиди с женски фенотип	26
4.2.	При индивиди с мъжки фенотип	13
5.	**Проби с мозайка по половите хромозоми**	**13**
6.	**Индивиди с нарушения в половото развитие**	**29**
6.1.	С изяснена генетична диагноза	21
6.2.	Без изяснена генетична диагноза	8

3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

За провеждане на генетичнние изследвания беше използвана високомолекулна геномна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки (левкоцити) от венозна кръв, както и ДНК, изолирана от разнообразен биологичен материал: амниотични клетки, хорионни въси, абортивна тъкан, букална лигавица, тъкан, фиксирана в парафинови блокчета.

3.3. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ за АНАЛИЗ

В настоящата работа беше приложена комбинация от различни молекулни и молекулно-цитогенетични методи за анализ:

- Изолиране на ДНК от различен биологичен материал (амниотични течности, кръв, букална лигавица, хорионни въси, FFPET и др.) – чрез търговски набори на основата на колонна екстракция или чрез солева екстракция
- Амплификация чрез полимеразна верижна реакция – PCR
- Количествен фрагментен анализ с флуоресцентно белязани праймери: QF-PCR (*quantitative fluorescent PCR*), MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*).
- Директно секвениране по Sanger
- Сравнителна геномна хибридизация върху олиго-микрочипове (*array comparative genome hybridization - aCGH*);
- Секвениране от ново поколение (*Next generation sequencing - NGS*)

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Настоящата работа има пилотна роля за въвеждането на генетичните изследвания в диагностиката на голямата и силно хетерогенна група на междинно-половите състояния. Извършваните в България до момента изследвания при засегнати индивиди не са включвали генетичен анализ, а поставяната клинична диагноза изключително рядко е била с изяснени молекулни основи на състоянието.

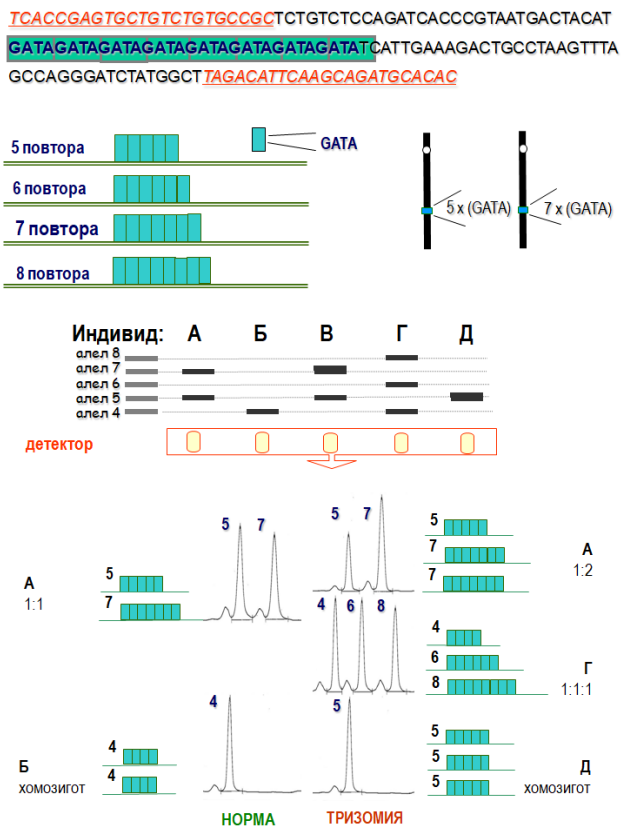
Изключителната хетерогенност на състоянията, включени в групата на нарушенията в половото развитие предполага търсенето на различни по природа генетични вариации, а това предполага използването на различни методи за генетичен анализ.

4.1. ВЪВЕЖДАНЕ НА QF-PCR ТЕХНОЛОГИЯТА В ДИАГНОСТИЧНАТА ПРАКТИКА

QF-PCR амплификацията на микросателитни ДНК маркери генерира флуоресцентно белязани продукти (ампликони), които са правопропорционални на количеството таргетна ДНК матрица. Количеството на флуоресцентен PCR продукт съответства на стойността на измерената площ на пика от електрофоретограмата. Височината на пика също може да бъде използвана като мярка за флуоресцентната активност - има правопропорционална зависимост между височината и количеството на флуоресцентен амплификационен продукт.

Откриване на нормална проба (дизомия)

При изследване на индивиди с две копия на прицелната хромозома, ако те са **хетерозиготи** по изследваните микросателити, то двата алела ще генерират еднакво количество флуоресценция. Очаква се съотношението между площта на двата пика (или между техните височини) да бъде близко до 1:1 – фигура 1А. Ако изследваният индивид е **хомозигот** по изследвания локус, то тогава алелите ще бъдат с еднаква дължина и еднакъв брой повтори и ще се генерира само един пик. Това няма да позволи извършването на количествена оценка и резултатът от изследването на конкретния маркер ще бъде оценен като **неинформативен** (фигура 1Б).



Фигура 1
Схематично представяне на QF-PCR техниката

Откриване на тризомия

В случай на тризомия, трите копия от дадената хромозома могат да бъдат открити с помощта на съответните STR маркери, локализирани там. Ако две от хромозомите носят еднакъв брой повтори, то алелите им ще бъдат с еднаква дължина, а само третият алел ще бъде различен. Количествената амлификация ще покаже 2 пика с различна интензивност на флуоресценция и съотношение между площите им близко до 2:1 или 1:2 (**тризомийно двуалелно** състояние) – фигура 1В. Ако един индивид носи 3 различни алела, то техните флуоресцентни пикове ще бъдат със сходен флуоресцентен интензитет и съотношението между площите им ще бъде близко до 1:1:1 (**тризомийно триалелно** състояние) – фигура 1Г.

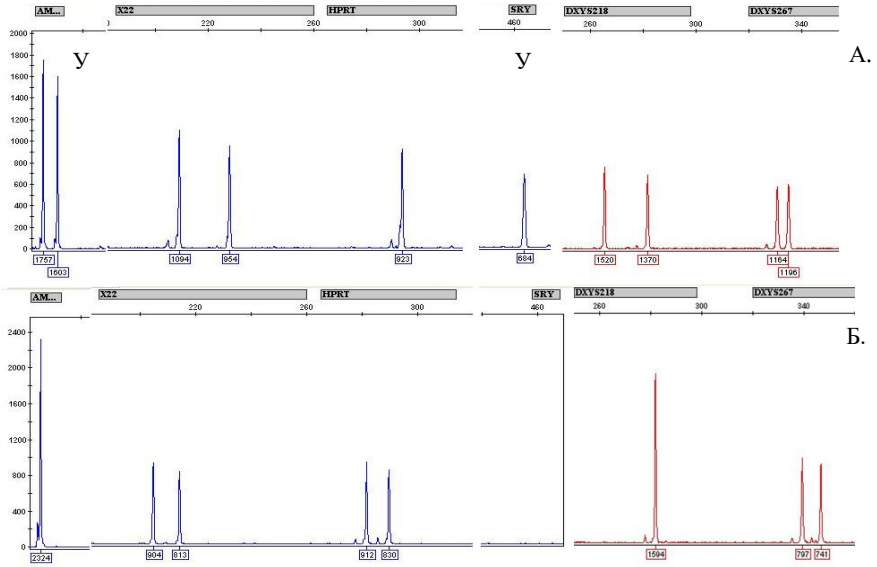
Аналогично с обясненото по-горе, ако изследваният индивид с тризомия е хомозигот по изследвания локус, тогава ще се генерира само един пик и резултатът ще бъде **неинформативен** (фигура 1Д).

Откриването на монозомия X беше основно предизвикателство за QF-PCR анализа дълго време. Въвеждането на ДНК маркер с локализизация както на X-хромозомата, така и на някоя автозома (какъвто е *TAF9L*) позволи количествената оценка и на наличните X-хромозоми. Изчисляването на съотношенията при *TAF9L* позволява ясното отдиференциране на пробите с монозомия X от пробите, носещи еднакви алели на двете си X-хромозоми, което се отчита като сериозно предимство.

Очаквани профили при изследване на ДНК проба с женски/мъжки генетичен пол

При проба с **женски генетичен пол** (с набор полови хромозоми XX) се очаква амплифициране само на X-специфичния продукт на маркера Амелогенин (*AMXY*); не се очаква амплификация на *SRY* района. Използваните псевдоавтозомални маркери (като напр. X22, DXYS267 and DXYS218), както и X-свързаният HPRT се очаква да бъдат нормални хетерозиготи или да дадат неинформативен резултат (фигура 2 А).

При проба с **мъжки генетичен пол** (с нормален набор полови хромозоми XY) се наблюдават както X-, така и Y-специфичния продукт на маркера Амелогенин (AMXY) в съотношение, близко до 1:1. Пробата се очаква да бъде положителна и за *SRY*, което потвърждава наличието на Y-хромозома. В този случай наличието на два вида полови хромозоми ще бъде потвърдено и от нормален хетерозиготен профил на използваните псевдоавтозомални маркери (фигура 2 Б).



Фигура 2
QF-PCR профил при изследване на ДНК проба от индивид с XY (А.) и ДНК проба от индивид с XX (Б.)

ВЪВЕЖДАНЕ НА QF-PCR МЕТОДИКАТА ЗА ОТКРИВАНЕ НА НАЙ-ЧЕСТИТЕ АНЕУПЛОИДИИ ЗА ЦЕЛИТЕ НА **ПРЕНАТАЛНАТА** ДИАГНОСТИКА

В предварителния анализ с Aneufast™ бяха изследвани общо 1050 **пренатални** ДНК проби, за които кариотипът е станал известен в хода на работа (таблица 2). Осем проби са имали данни за контаминация с майчин материал. Тризомия 21 (синдром на Даун) е била открита при 39 от случаите, тризомия 18 (синдром на Едуардс) – при 19 проби и тризомия 13 (синдром на Патау) – при 7 случая. Триплоидия е била диагностицирана при 5 от изследваните проби. Не бяха установени различия в количеството копия на изследваните хромозоми при използването на давата анализа – „златния стандарт" кариотипиране и QF-PCR методиката.

Таблица 2

Изследвани ДНК проби при пилотното въвеждане на QF-PCR метода за диагностика на най-честите хромозомни анеуплоидии при човека

	Състояние	**Пренатална Диагностика**	**Постнатална Диагностика**
1	Синдром на Даун (тризомия 21)	39	57
2	Синдром на Едуардс (тризомия 18)	19	3
3	Синдром на Патау (тризомия 13)	7	-
4	Триплоидия	5	-
5	**Анеуплоидия по половите хромозоми**	**32**	-
5.1	Синдром на Turner (монозомия X)	21	-
5.2	Синдром на Клайнфелтър (XXY)	5	-
5.3	47,XYY	1	-
5.4	Тризомия X	5	-
6	Проби с данни за майчина контаминация	8	
7	ДНК проби без отклонения	940	474
	ОБЩО изследвани	**1050**	**534**

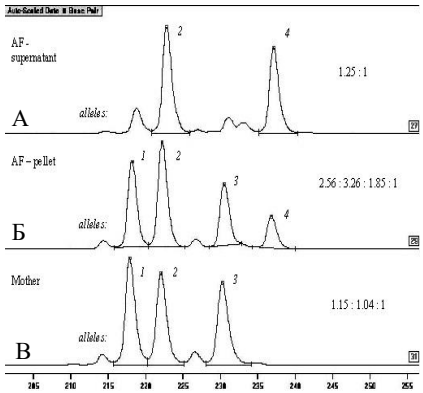
От друга страна, всичките 32 проби с анеуплоидия, касаеща **половите хромозоми** (3% от пренатално изследваните проби) са били коректно идентифицирани. Общо 1018 проби са били без анеуплоидия, касаеща автозомите или половите хромозоми. Резултатите са в съответствие с кариотипа, което показва 100% чуствителност и специфичност при използването на набора Aneufast™ за диагностични цели.

Предизвикателство за QF-PCR метода са комплицираните случаи при дородова диагностика, каквито са амниотични проби с видимо наличие на кръв и контаминация с майчин генетичен материал. Интересен пример за успешното прилагане на тази методика беше редкият случай на бременна жена с доказана регулярна форма на синдрома на Даун, при която се извърши диагностична амниоцентеза. Случаят е представен в една от публикациите по темата на настоящия дисертационен труд [Andonova, 2008]. Касае се за 27-годишна пациентка, самата тя с установена тризомия 21 и с репродуктивни неудачи – един спонтанен аборт, една прекъсната бременност,

заради данни за фетални аномалии и полихидрамнион и една загубена в 18 г.с. бременност след амниоцентеза (установен кариотип 46,XY). Четвъртата бременност - обект на нашето изследване, беше насочена за амниоцентеза поради повишена нухална гънка и УЗ данни за клинодактилия при фетуса.

Получената амниотична течност след извършената инвазивна процедура, беше видимо контаминирана с майчина кръв. Приложихме модифициран в НГЛ протокол за изолиране на ДНК паралелно от клетките в супернатантата и от утаените клетки. Двата набора клетки бяха събрани след нискооборотно центрофугиране за отделяне на амниоцитите - поради по-ниската им маса, в сравнение с наличните кръвни клетки с майчин произход, се очаква една част от амниоцитите да останат в надутайката, разделени от примеса с майчини клетки. При извършеният QF-PCR анализ бяха сравнени профилите на двете получени ДНК проби с профила на майката.

Получените резултати при клетките от надутайката показаха профила на мъжки фетус, в комбинация с лек примес от профила на майката (фигура 3 А), докато анализът на клетките от утайката показа наличие на контаминация с майчин материал (фигура 3 Б). Интерес за нас представляваха профилите по отношение на хромозома 21 заради регулярната форма на тризомия 21 при самата бременна жена (фигура 3 В). При ДНК пробата от клетките на надутайката бяха наблюдавани два алела на фетуса с нормално съотношение по отношение на маркерите D21S11 и D21S1440, като само един от тях беше с майчин произход. След предоставянето на материал от клетъчна култура, профилите отново бяха сравнени и беше потвърден резултатът за здрав фетус от мъжки пол. Цитогенетичният анализ показа кариотип 46,XY на култивираните амниотични клетки. Бременността завърши с раждането на здраво момченце в 39 г.с., което се развива нормално.



Фигура 3

Сравняване на профилите по маркер D21S11на ДНК проби, изолирани от амниотични клетки от супернатантата (А) и от амниоцити от утайката след центрофурирането (Б) и от периферна кръв от бременната (В). При ДНК от надутайката (А) се откриват се два различни алела при фетуса – един майчин (алел 2) и един бащин (алел 4). Майката е с алели 1, 2 и 3 (В), а при клетките след центрофугирането на кървавата амниотична течност се вижда смес от профилите на майката (алели 1, 2 и 3 са в по-голямо количество) и на бебето (алели 2 и 4) (Б).

Работата по описания казус показа, че QF-PCR технологията може да бъде прилагана и при комплексни случаи и да позволи разграничаване на различни генетични профили. Тази методиката беше успешно въведена в рутинната дородова диагностична дейност на Национална генетична лаборатория и от момента на въвеждането на този анализ (през 2000 г) до сега с тази методика са били изследвани пренатално повече от 12 000 проби.

4.2. ПРИЛАГАНЕ НА QF-PCR МЕТОДИКАТА ЗА **ДОРОДОВА ДИАГНОСТИКА НА ПОЛОВИ АНЕУПЛОИДИИ**

Ретроспектично, с прилагането на QF-PCR метода са открити 7 случая с Тризомия X, 11 случая със синдром на Клайнфелтър (47,XXY), 9 случая в Монозомия X (Синдром на Turner). При 3 случая има данни на дисбаланс по половите хромозоми – вероятно мозайка, а при един случай не са открити такива данни в изследвана проба, въпреки резултата от цитогенетичния анализ, показващ мозайка по половите хромозоми.

Таблица 3

Открити с QF-PCR анализ анеуплоидии по половите хромозоми при извършване на дородова диагностика

	Възраст майка	г.с.	Резултат QF-PCR	Резултат от ЦГ анализ	Повод за дородово изследване	Забележки
1	43	20+2	XXX	47,XXX	БХС Риск: 1:45	
2	39	17+4	XXX	47,XXX	БХС Риск: 1:75	
3	36	16+3	XXX	46,XisoX(q)	БХС Риск: 1:25	QF-PCR данни за тризомия X!
4	42	19	XXX	няма	БХС Риск: 1:80	
5	39	14	XXX	47,XXX	БХС Риск: 1:15	
6	30	17	XXX	няма	БХС Риск: 1:30	
7	38	16+4	XXX	няма	БХС Риск: 1:750	
8	29	18+1	XXY	47,XXY	NT=4mm	
9	40	22+4	XXY	47,XXY	УЗ находки	
10	33	18+5	XXY	45,X[18] / 46,XY[4]	БХС Риск: 1:800 за T18	
11	37	17+3	XXY	47,XXY	БХС Риск: 1:7	
12	41	17+6	XXY	няма	няма данни	
13	42	19+0	XXY	47,XXY	БХС Риск: 1:160	
14	39	19+2	XXY	47,XXY	БХС Риск: 1:80	ICSI
15	40	19+1	XXY	няма	БХС Риск: 1:10	
16	42	17	XXY	няма	няма данни	Съмнения за микродел.синдром
17	29	23+1	XXY	няма	Риск NIPT за XXY	
18	42	17+3	XXY	няма	БХС Риск: 1:70	
19	29	15+6	X	няма	БХС Риск: 1:20	УЗ = кистична хигрома
20	41	15+6	X	45,X	БХС Риск: 1:55	
21	29	19	X	няма	БХС Риск: 1:70	
22	24	19	X	няма	БХС Риск: 1:25	
23	35	15+6	X	няма	БХС Риск: 1:130	
24	26	12+3	X	няма	Риск NIPT за X	
25	28	24	X	няма	БХС риск: 1:220 Риск NIPT за X	
26	31	19+0	X	няма	УЗ находки	УЗ=кисти на плексус хориоидеус
27	26	19+1	X	няма	БХС риск: 1:270 Риск NIPT за X	
28	40	16+2	XXY ? дисбаланс	45,X	БХС риск: 1:9	16 митози са с 45,X
29	29	13	дисбаланс на X и У?	няма	БХС риск: 1:35	предишна бременост с T21
30	36	11+6	дисбаланс на X и У?	няма	БХС риск: 1:3	УЗ = кистична хигрома, NT=8.0mm; трикусп. регургитация
31	37	25	XY	46,XX [76] / 46,XY[24]	БХС риск: 1:90	

4.3. ПРИЛАГАНЕ НА QF-PCR МЕТОДИКАТА ЗА **ПОСЛЕРОДОВА ДИАГНОСТИКА НА ПОЛОВИ АНЕУПЛОИДИИ**

4.3.1. Прилагане на QF-PCR методиката за послеродова диагностика за определяне на вид и брой полови хромозоми **при 30 новородени**

Таблица 4

Новородени, изследвани с QF-PCR за определяне брой и вид полови хромозоми (по ред на постъпване на пробите за анализ)

	QF-PCR	Повод	Кариотип
1	XX	Obs.ВНХ, неясен пол, хипоспадия? + хидронефроза	-
2	**X**	Obs.синдром на Turner, оточни стъпала и длани,	-
3	XX	Obs.синдром на Turner	-
4	XY	тежка хипоспадия + интерсексуални гениталии	-
5	XY	хипоспадия, крипторхидизъм	-
6	XX	Obs.синдром на Turner	-
7	**X**	Obs.синдром на Turner	-
8	XX	Obs.синдром на Turner	-
9	XY	неясен пол, малформативен синдром	-
10	XX	Obs.синдром на Turner, двуплодна бременност, оточно	-
11	XX	Obs.ВНХ, хипосдадия, близнак от IVF, лицева асиметрия, 4-пръстна бразда, анурия, гърчове, отоци, нисък Na	-
12	**X**	Obs.синдром на Turner	-
13	**XXX**	Obs.Тризомия X	47,XXX
14	XX	Obs.ВНХ, дисморфични гениталии, клиторомегалия	-
15	XX	Obs. ВНХ, клиторомегалия, деформирани сбръчкани големи лабии	-
16	**X**	Obs.синдром на Turner	-
17	XX	малформативен синдром, двойнствени гениталии	46,XX,add(2)(q37.3) mat
18	XY	микропенис, хипоспадия	-
19	XX	Obs.синдром на Turner	-
20	XY	микропенис, атрезия на ануса, хипоспадия,	-
21	XX	Obs.ВНХ, клиторомегалия, хипопластични лабии, ИУРП	-
22	XX	Obs.ВНХ, клиторомегалия	-
23	XY	хипертелуризъм, раздвояване на уретрата	-
24	XY	неясен пол, малфромативен синдром	-
25	XX	Obs.синдром на Turner	-
26	XY	неясен пол, мускулна хипотония, микроретрогнатия	-
27	XY	неясен пол, тежка хипоспадия	-
28	XX	Obs.ВНХ, Клиторомегалия	-
29	XX	Obs.синдром на Turner	-
30	XY	пеноскротална транспозиция	-

При 7 от изследваните индивиди е имало съмнения за ВНХ, а при 11 е имало данни за малформации на гениталиите. При 3 от изследваните новородени (10%) е установено наличието на една полова хромозома – монозомия X, като със такава насочваща диагноза са били 11 от насочените.

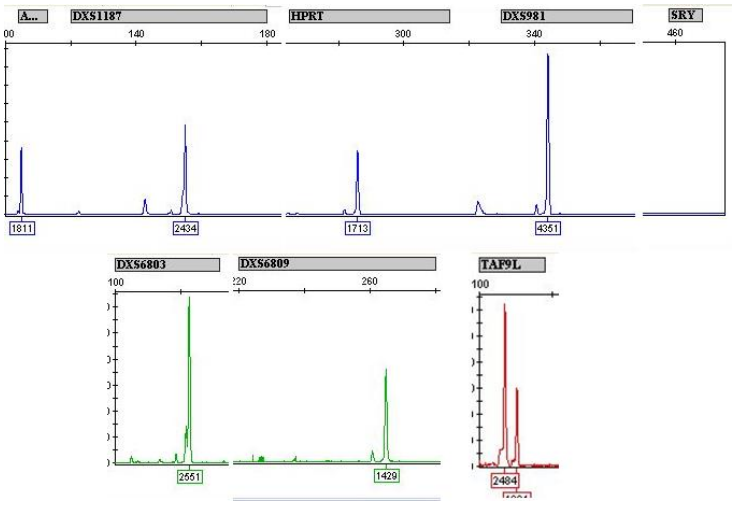
4.3.2. Прилагане на QF-PCR методиката за постнатална диагностика за определяне на вид и брой полови хромозоми при **26** индивиди с **женски фенотип**

Таблица 5

Пациентки с женски фенотип, изследвани с QF-PCR за определяне брой и вид полови хромозоми

	възраст	**QF-PCR**	**Повод**
1	1 мес	XX	Obs.синдром на Turner
2	3 мес	XX	Obs.синдром на Turner
4	3 г	XX	Obs.синдром на Turner
5	9 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански), има братче с 1 бъбрек, установен пренатално
6	10 г	XX	Клиторомегалия
7	12 г	XX	Obs.синдром на Turner
8	13 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански)
9	15 г	XX	Малформации на уро-генитална тракт, Uterus duplex, хидронефроза
10	16 г	XX	Obs.синдром на Калман с аносмия (*открита е мутация в FGFR1 гена впоследствие*)
11	16 г	**X**	Obs.синдром на Turner
12	16 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански), Първична аменорея
13	17 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански), Първична аменорея
14	17 г	XX	Гонадна дисгенезия?
15	18 г	**X**	Obs.синдром на Turner
16	18 г	XX	отхвърляне на мозайка - кръв и букална лигавица, заради овариална дисфункция и хипоталамична дисфункция
17	19 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански)
18	19 г	XX	хипогонадотропен хипогонадизъм, нанизъм?
19	21 г	XX	Хипергонадотропен хипогонадизъм
20	22 г	XX	Obs.синдром MRKH (Майер-Рокитански)
21	23 г	XX	Obs.синдром на Turner
22	**24 г**	**XX**	**Obs.синдром на Turner, Овариална дисфункция → t10q;Xq**
23	24 г	**X**	Obs.синдром на Turner
24	27 г	**X**	Obs.синдром на Turner
25	27 г	XX	Овариална дисфункция
26	34 г	XX	Obs.синдром на Turner, Овариална дисфункция

По-голямата част от насочваните в тази категория (13/25) са на възраст между 10 и 20 г, а най-малко са тези в ранна детска възраст. Със съмения за синдром на Turner са били насочени 10 от изследваните, като монозомия X е била потвърдена при 4 от тях. С данни за синдрома на Майер-Рокитански са 6 от насочените пациентки за определяне на вида и броя полови хромозоми.



Фигура 4

QF-PCR профил при изследване на ДНК проба от индивид с 45,X

Клиничният случай, представен по-долу (#22 от таблица 5) е пример за прилагането на различни техники за генетичен анализ при решаването на сложен казус при жена с данни за овариална дисфункция.

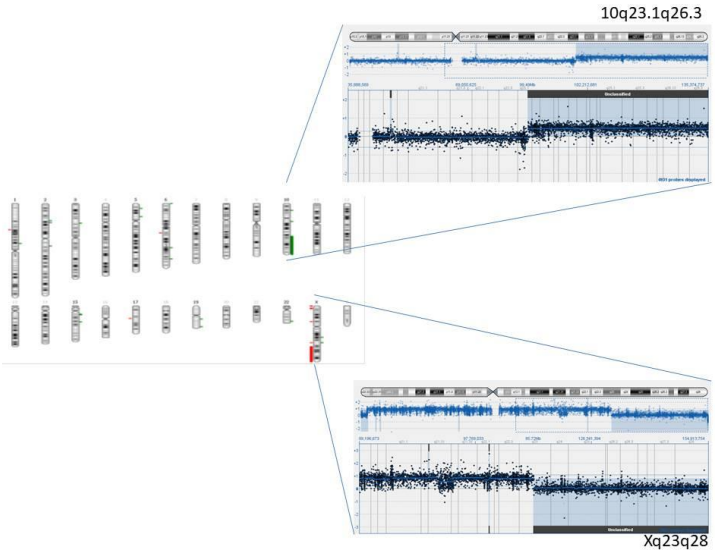
Клинична картина

Пациентката е на възраст 24 години, родена от първа, нормално протекла бременност и нормално раждане. На 9 мес възраст се установява изоставане във физическото развитие с мускулна хипотония и нистагъм. След поставяне на диагнозата ДЦП е започната терапия с вит В комплекс – при проследяването до края на пубертетната й възраст пациентката е без отклонения в неврологичния статус, но и без промяна в клиничната картина. При посещението на пациентката в консултативния кабинет прави впечатление грацилната структура на тялото и микрогнатията,съобщава се за аменорея с еднократно кървене на 18 год възраст. Налично е аксиларно окосмяване, а пубисното е III-IV ст по Танер; установяват се хипопластични млечни жлези (B1) с раздалечени ареоли. При проведените изследвания се откриват нормални хормонални нива за TSH, LH, Естрадиол, Тестостерон, DHEAS, Кортизол, Пролактин. Повишени са нивата на FSH и Инсулин, както и на общия холестерол и триглицеридите. Костната възраст на рентгенографията отговаря на индивид от женски пол между 16 и 17 год възраст (при календарна 24 години). При цитогенетичния анализ е открит женски кариотип 46,XX със съмнения са известна вариация по отношение на едната Х-хромозома.

Молекулярно-генетичен анализ

Извършеният QF-PCR анализ показа данни за две Х-хромозоми, без позитивиране на сигналите за У-хромозома. ДНК маркерите, локализирани дистално на Х-хромозомата имаха хомозиготен профил, но това не позволява да се потвърди или отхвърли някаква вариация по отношение на тази хромозома. На следващата стъпка от анализите беше проведен aCGH анализ, при който се установи arr[hg19] Xq23q28(112,049,930-154,908,471)x1,10q23.1q26.3(85,629,408-135,372,492)x3 - наличие на небалансирано хромозомно пренареждане, включващо дългите рамена на хромозоми 10 и Х (фигура 5). При пациентката е налице частична тризомия (дупликация) на дългото рамо на 10-та хромозома (10q23.1q26.3) с размер 49.743 Мб, съчетана с частична монозомия (делеция) на дългото рамо на Х-хромозомата (Xq23q28) с размер

42.859 Мб. В дуплицирания район на 10-та хромозома са картирани 662 гена, а в делетирания на Х-хромозомата 655 гена (таблица 6).



Фигура 5
Резултат от извършения aCGH анализ при случай #22

Таблица 6

Характеристики на откритите варианти при извършения aCGH анализ на случай #22

Chr :	**10**	**X**
ISCN Notation :	arr 10q23.1q26.3(85,629,408-135,372,492)x3	arr Xq23q28(112,049,930-154,908,471)x1
Начало :	85,629,408	112,049,930
Край :	135,372,492	154,908,471
Цитогенетична локализация :	q23.1-q26.3	q23-q28
Размер (Mb) :	49.743	42.859
Брой проби :	2,660	3,721
Синдромен регион? :	10q22-23 deletion, Cowden, Split/hand foot malformation -3 , Schizencephaly	X linked lymphoproliderative syndrome, Lowe, Simpson - Golabi Behmel type 1, Lesch-Nyhan syndrome, X linked heterotaxy, Mental retardation X linked Xq27.1 dup and del, FMR1 deletion, FMR2 deletion, Xq28 (MECP2) duplication, MECP2 / Retts, FLNARelated Disorders, Emery- Dreifuss muscular dystrophy
Брой OMIM гени :	52	50
OMIM гени :	***PAX2***, *RBM20, MXI1, PNLIP, ACADSB, HABP2, HPS1, ANKRD1, UROS, FAS, DMBT1, MINPP1,* ***PTEN***, *TCF7L2, GLUD1, BLNK, SLC16A12, LDB3, LIPA,* ***FGF8***, *RGR, PITX3,* ***CYP17A1***, *C10orf4, PAPSS2, LGI1, BAG3, OAT, ACTA2,* ***CYP2C19***, *HPS6, SMC3, RBP4, ALDH18A1, FBXW4, TLX1, EMX2,* ***CYP2C9***, *CPN1, SUFU, ZFYVE27, SHOC2,* ***COL17A1***, *HTRA1, PLEKHA1, PDE6C,* ***FGFR2***, *ADRB1, ABCC2, COX15, PLCE1, BMPR1A*	***F9***, *AGTR2, GPC3, HPRT1, SLC9A6,* ***MECP2***, *AVPR2,* ***EMD***, *L1CAM, NDUFA1, USP26, VMA21, LAMP2, FAM58A, SOX3, C1GALT1C1, OCRL, GDI1, BCAP31, SLC6A8, TAZ,* ***G6PD***, *SH2D1A, ZDHHC9, OPN1LW, MTM1, CD40LG, IKBKG, XIAP, PHF6, GRIA3,* ***F8***, *NSDHL, ARHGEF6, AFF2, FRMD7, OPN1MW, OPN1MW2, SLC6A14, FLNA,* ***FMR1***, *UPF3B, ZIC3,* ***MAMLD1***, *IDS, RPL10, DKC1, FHL1,* ***ABCD1***, *CUL4B*
Брой гени :	662	655

Заради възможността хромозомното пренареждане да е унаследено от родител- носител на балансирана транслокация между Х-хромозомата и 10-та хромозома, беше извършено кариотипиране само при майката и при по-малката сестра на пациентката, тъй като бащата е починал. Х-хромозома с подобен на нейния профил не беше наблюдаван при тях. За проверка на хипотезата, че изненадващо лекият фенотип може да се дължи на случайна инактивация на Х-хромозомата, носеща третото копие на част от дългото рамо на хромозома 10 бяха анализирани 100 метафази от две самостоятелни клетъчни култури, третирани пулсово с BrDU през късната S-фаза. В 92 от метафазите дериватната Х-хромозома се беше реплицирала по-късно от нормалната, което беше в подкрепа на хипотезата ни, че по-слабата фенотипна изява на

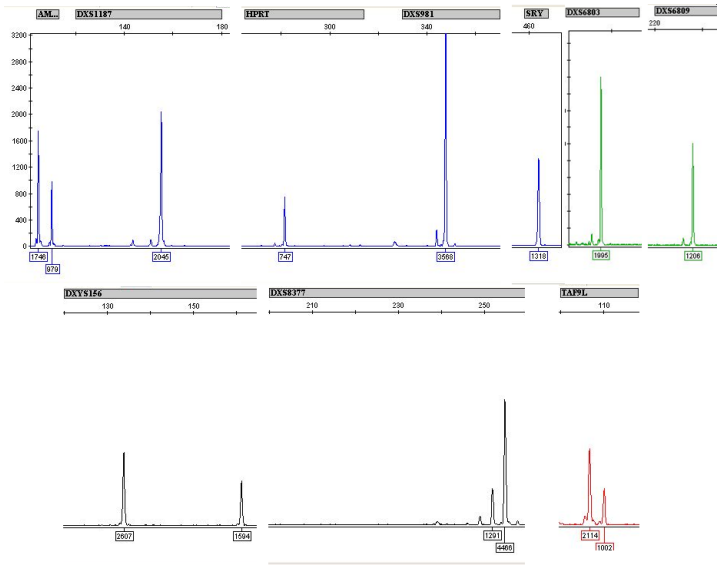
частичната тризомия 10q се дължи на хетерохроматинизиране на дериватната Х-хромозома. Изследването беше извършено от д-р Вължарова и екипът й в Клиника „Малинов" .

4.3.3. Прилагане на QF-PCR методиката за постнатална диагностика за определяне на вид и брой полови хромозоми при **13** индивида с **мъжки фенотип**

Таблица 7

Пациенти с мъжки фенотип, изследвани с QF-PCR за определяне брой и вид полови хромозоми

	Възраст	QF-PCR	Повод
1	8 мес	ХУ	хипоспадия + хидронефроза вляво
2	**11 г**	**XX, SRY+**	**Овотестикуларно ХХ състояние, без мутации в *NR5A1***
3	10 г	ХУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
4	11 г	ХУ	Хипогонадотропен хипогонадизъм
5	16 г	ХХУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
6	20 г	ХУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
7	26 г	XX, SRY+	Инфертилитет, данни за делеция на локуси AZFa, AZFb и AZFc от У-хромозомата
8	28 г	XX, SRY+	Инфертилитет, данни за делеция на локуси AZFa, AZFb и AZFc от У-хромозомата
9	33 г	XX, SRY+	Инфертилитет, данни за делеция на локуси AZFa, AZFb и AZFc от У-хромозомата
10	33 г	ХУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
11	36 г	XX, SRY+	Инфертилитет
12	37 г	XX, SRY+	Инфертилитет, данни за делеция на локуси AZFa, AZFb и AZFc от У-хромозомата
13	45 г	ХУ	Obs.синдром на Клайнфелтър



Фигура 6

QF-PCR профил при изследване на ДНК проба от индивид с ХХУ

При 5 от насочените имаше съмнения за синдром на Клайнфелтър, който обаче беше потвърден само при един от тях – фигура 6. При шестима имаше данни само за 2 броя Х-хромозоми, като при всички се отчете сигнал за наличие на *SRY* гена. Петима от тях бяха насочени за генетични изследвания във връзка с инфертилитет в семейството и

търсене на микроделеции върху У-хромозомата. Именно при извършването на този анализ бяха възникнали съмнения за липса на У-хромозома, което беше потвърдено с бързия QF-PCR анализ за определяне на вида и броя полови хромозоми и пациентите бяха насочени към извършване на цитогенетичен анализ. Един от пациентите (#2 от таблица 7) беше насочен със съмнения за Овотестикуларно състояние, като кличният случай е представен по-долу:

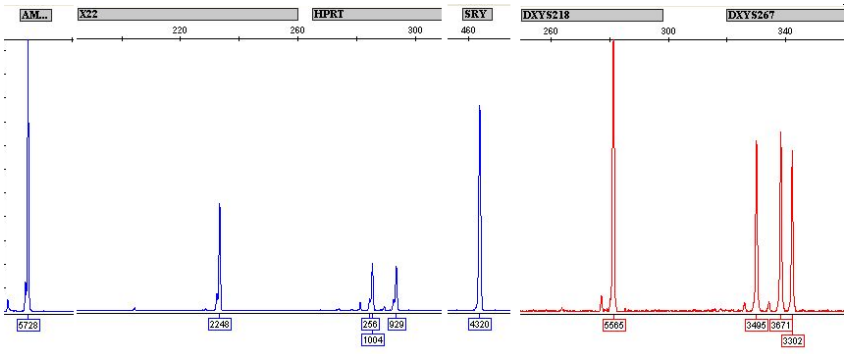
Клинична картина

Семейството на 11-годишния пациент е потърсило спешна консултация с детски уролог във връзка с болка в десния тестис, появила се след контузия при игра. На ултразвук се установява, че тестисът се разполага по-високо в скротума и е с видимо хомогенна структура, а левият тестис е с нормално разположение, форма и ехоструктура. При оперативната процедура е установена кръгловато образувание в областта на горния полюс на десния тестис (вероятно киста), което е екстирпирано. Допълнително, в опашката на епидидима е установено образувание, покрито с епидидимална тъкан, от което е взет биопсичен материал. Хистологичното изследване показва тестикуларна тъкан с добре развити канали и участък на фиброзиране в единия биопсичен материал, а в материала от кистата се установява яйчникова тъкан с множество първични фоликули, единият от които – в стадий на съзряване и добре развита яйникова строма. В заключение е изказано съмнение на Овотестикуларно състояние.

Молекулярно-генетичен анализ

При извършеното изследване с QF-PCR е установено наличие на две Х хромозоми, както и позитивиране на сигнала за *SRY* гена (фигура 7). Дадена е препоръка за извършване на цитогенетично изследване, което потвърди съмненията за кариотип 46,XX.

На следващия етап от генетичните изследвания беше извършено секвениране на *NR5A1*, както и търсене на делеции в гена с MLPA, като не бяха открити генетични варианти, които да бъдат свързани със състояния от спектъра Нарушения в половото развитие.



Фигура 7
QF-PCR профил при овотестикуларно състояние на фенотипен мъж,с данни за XX и SRY+

Чрез оценка на маркерите с променено алелно съотношение беше предположено, че районът от У-хромозомата между Yp11.31 и Yp11.2 е именно този, който е прехвърлен върху Х-хромозомата при вероятно настъпилата рекомбинация. Микросателтният маркер DXYS156 (Yp11.2) с координати в генома 3,152,191 - 3,152,355 е последният от маркерите, с които разполагаме с данни за променено алелно съотношение. Следващият от наличните ДНК маркери е AMEL, с локализация Yp11.2 и координати върху У-хромозомата 6,865,918-6,874,027, но той дава позитивен сигнал само за наличие на Х-хромозома. Всички ДНК маркери от Х-хромозомата показват данни за наличиен на 2 копия от нея.

4.3.4. Прилагане на QF-PCR методиката за постнатална диагностика за определяне на вид и брой полови хромозоми при **13** индивида със съмнения / данни за **мозайка или структурни изменения по половите хрозоми**

Таблица 8

Пациенти със съмненият за мозаицизъм или структурни изменения по половите хромозоми, изследвани с QF-PCR за определяне брой и вид полови хромозоми

	Възраст	QF-PCR резултат	Кариотип
1	6 мес	Профил като при мозайка, без данни за У-хромозома Хомозиготност по всички маркерите с локализация след Xq13	46,XX / 46,X+mar / 45,X
2	2 г	Профил като при мозайка	45,X / 46,X r(X)(p22.3q22)
3	3 г	Профил като при монозомия Х	46,Xr(X)(p11q12) / 45,X
4	4 г	Профил като при мозайка, има данни за У-хромозома	Предстои цитогенетичен анализ
5	5 г	Профил като при мозайка, има данни за У-хромозома	mos46,XY[17]/45,X[13]
6	7 г	Профил като при мозайка, има данни за У-хромозома ДНК данни за микроделеция на Y-хромозомата (локус AZFc)	45,X [6] / 46,XY [14]
7	7 г	Профил като при ХХ, няма данни за У-хрозозома	46,XX[29] / 46,X?mar[1]
8	10 г	Профил като при мозайка, има данни за У-хромозома	45,X[10] / 46,X+mar(Y?)[10]
9	10 г	Профил като при мозайка, има данни за У-хромозома ДНК данни за микроделеция на Y-хромозомата (локус AZFc)	Мозайка, не разполагаме с резултат
10	16 г	Хомозиготност по всички маркерите с локализация след Xq13	45,X[12] / 46,X r(X?)(p11.3q13)
11	**19 г**	**Данни за ХУ в периферна кръв и за Х/ХУ в букална лигавица**	**46,ХУ в периферна кръв**
12	28 г	Хомозиготност по всички маркерите с локализация след Xq21.31	46,X del(X)(q21.1)
13	**42 г**	**Профил като при мозайка, данни за ХХХ**	**47,ХХХ / 46,ХХ**

Счита се, че мозаицизъм на нормална клетъчна линия с клетъчна линия с тризомия може да бъде откриван с QF-PCR анализ при определени случаи - поне 15 до 20% от втора клетъчна линия [Donaghue, 2005]. Очаква се наличие на допълнителни пикове и нетипични съотношения между площите само за маркерите на таргетната хромозома, въвлечена в мозайката. Обикновено опитният лабораторен специалист може да разграничи генотип на мозайка и смесване на два различни генотипа, какъвто е случая с майчина контаминация при дородовата диагностика и при химеризъм. Очаквано, особено затруднение за откриване на мозайка може да бъдат случаите, при които едната клетъчна линия е например с частично делетирала или рингова Х-хромозома. Тогава QF-PCR метода може да не отчете отклонения от нормалните резултати. Търсенето на мозайка с У-клетъчна линия е особено важно при случаите с кариотип 45,X/46,XY както и за тези с 45,X/46,X+mar, заради очаквания негативен ефект за развитието на патологични изменения в гонадите и риск за развитие на гонаден тумор.

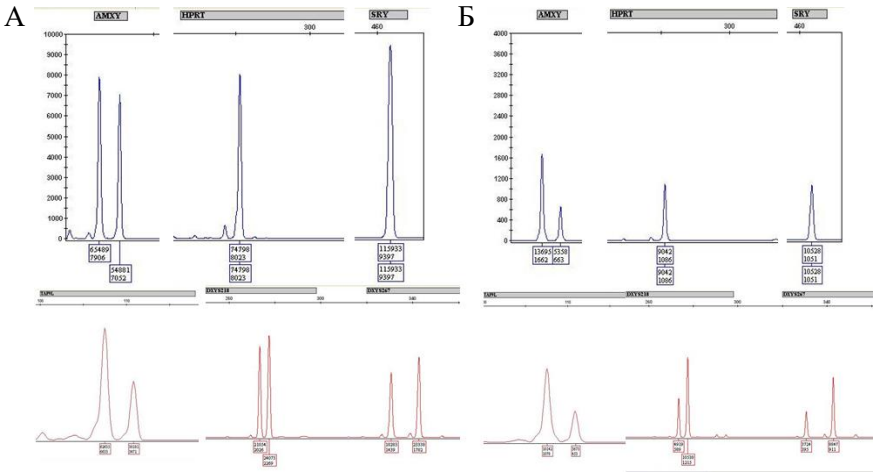
Получените резултати в тази изследвана група са разнообразни и специфични за всеки отделен случай. Представянето на клиничните данни и генетичните находки при два от изследваните случаи (#11 и #13 от таблица 8) следва по-долу.

Клиничен случай с тъканен мозаицизъм с 45,X / 46,XY (#11/таблица 8)

Пациентката е 19 годишна с олигоменорея и вторична аменорея, с предполагаема диагноза синдром на Суайър. На 17 годишна възраст е установен кариотип 46,XY и хормонални данни за хипергонадотропен хипогонадизъм; ЯМР показва хиполастична матка, не са визуализирани гонади. Съгласно гинекологичната анамнеза, менархе е настъпило на 17 годишна възраст. Към момента на насочването за генетични изследвания пациентката е с ръст 139 см (прогнозен: 146см). Костната възраст изостава с около 5-6 години спрямо реалната. Пубертетното развитие липсва (млечни жлези – B2), има вторична аменорея, налично е готическо небце. Пациентката съобщава за изоставане и затруднения в училище – особено по математика. При ЯМР изследвания се визуализира формация в областта на лявата гонада, с оглед на което е препоръчана профилактична двустранна гонадектомия. Извършените изследвания при пациентката показват констелация на хипергонадотропен хипогонадизъм и морфологични данни, характерни за синдром на Turner - във връзка с което е препоръчано генетично изследване за изключване на мозаечна форма на синдрома на Turner.

Молекулярно-генетичен анализ

Във връзка със съмненията за мозаечна форма на синдрома на Turner беше пристъпено към генетични изследвания при клетки/тъкани с различен произход – на ДНК, изолирана от венозна кръв и на ДНК, изолирана от букална лигавица от пациентката. QF-PCR методът показа различни електрофоретични профили при сравняване на резултатите. Във венозната кръв има данни за наличие на една X и една У хромозома. При изследването на букалната лигавица обаче се откри наличие на У хромозома и и променено съотношение в профилите за X хромозомата (фигура 8 и таблица 9). С оглед на клиничната презентация това би могло да се интерпретира като данни за мозаицизъм от типа 45,X/46,XY. Чувствителността на използвания ДНК метод за анализ QF-PCR позволява откриването на мозаицизъм при наличие на поне 15% клетки с различен генотип или друга клетъчна линия. За потвърждаването на такъв тип мозаицизъм в тъкани с произход, различен от този на кръвните клетки, беше препоръчано извършване на генетичен анализ с FISH.



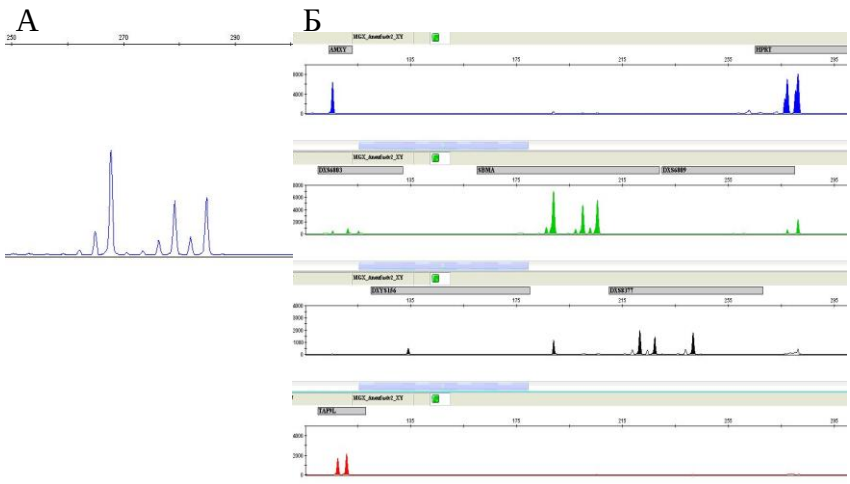
Фигура 8
QF-PCR профил при тъканен мозаицизъм по половите хромозоми X/XY:
А. ДНК от венозна кръв,
Б. ДНК от букална лигавица.

Таблица 9
QF-PCR резултати при извършено сравняване на ДНК профилите от букална лигавица и венозна кръв

	ДНК маркер	Локализация		Венозна кръв		Букална лигавица	
		Хромозома X	Хромозома Y	Брой алели	Съотношение	Брой алели	съотношение
1	SRY	-	Yp11.2	Има данни за У-хромозома		Има данни за У-хромозома	
2	AMXY	Xp22.1	Yp11.2	2	1 : 1.15	3	2.45 : 1
3	X22	Xq28	Yq	2	1 : 1.03	3	1 : 2.01
4	DXYS218	Xp22.32	Yp11.3	2	1 : 1.14	3	1 : 2.13
5	DXYS267	Xq21.31	Yp11.31	2	1 : 1.27	3	1 : 2.35
6	DXYS156	Xp21.31	Yp11.31	2	1.11 : 1	3	2.61 : 1
7	DXS981	Xq11.2-12	-	1	-	1	-
8	DXS6803	Xq12-21.33	-	1	-	1	-
9	HPRT	Xq26.1	-	1	-	1	-
10	DXS8377	Xq28	-	1	-	1	-
11	DXS1187		-	1	-	1	-
12	DXS6809	Xq	-	1	-	1	-
13	TAF9L	Xq13 / 3p24		Има данни за една Х-хромозома		Има данни за допълнителна Х-хромозома	

Клиничен случай с 46,XX / 47,XXX (#13/таблица 8)

Пациентка е на 42 години, с овариална дисфункция и удължаване на интерменструалните периоди, както и с повишаване на андроген-зависимото окосмяване и на телесното тегло. Физикалният преглед установява висок ръст, обезитет и леко повишеното окосмяване по вътрешната страна на бедрата, линея алба и *ad sacrum*. Лабораторните изследвания се представят с данни за изразена инсулинова резистентност и повишени нива на FSH. При УЗД на малък таз не се визуализират патологични находки, с изключение на функционална киста на ляв яйчник. С оглед на несъответствието между хормоналните нива и повишеното окосмяване по андроген-зависимите зони беше извършено ДНК изследване за определяне на броя повтори при (CAG)n полиморфизъм на гена за андрогенния рецептор. Установено беше наличие на три алела (вместо очакваните два) с дължина 19, 23 и 25 CAG повтора (фигура 9 А), с нетипично съотношение между площта на флуоресцентните им пикове (1.93:1:1.02), насочващо към вероятно наличие на три Х-хромозоми. QF-PCR анализът показа данни за мозаицизъм, касаещ Х-хромозомите – наличие на три Х-хромозоми, вероятно в състояние на мозайка с нормална линия XX (фигура 9 Б).



Фигура 9
Данни за мозаицизъм по половите хромозоми XX/XXX:
А. AR-CAG повтори,
Б. QF-PCR профил.

Пациентката е насочена за генетична консултация и цитогенетично изследване, което потвърди наличието на мозаечен кариотип 46,XX[74]/47,XXX[26]. В описания случай мозаицизъм на тризомия X беше установен случайно, макар че в ретроспективен план при болната бяха налице дискретни белези на синдрома като епикант, необичайно висок ръст и менструални нарушения. В литературата има описан случай с подобен фенотип и 46,XX/47,XXX мозаицизъм [Kanaka-Gantenbein, 2004].

4.3.5. Прилагане на QF-PCR методиката при случай на химеризъм

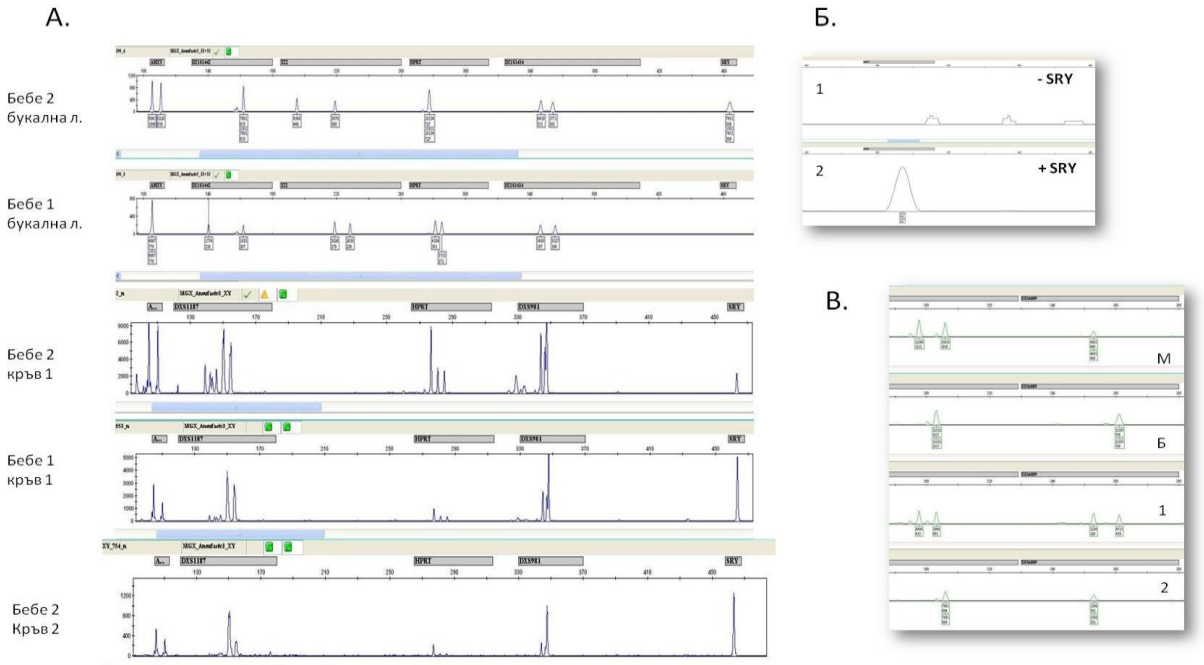
Клиничният случай на химеризъм, който е включен в настоящия труд касае първа бременност на 34 годишна жена от семейство с инфертилитет. Два оплодени с метода ISCI овоцита са трансферирани в матката. В началото на настъпилата бременност се е считало, че трансферът само на единият ембрион е бил успешен, тъй като не се е визуализал втори плоден сак. След УЗ преглед в първия триместър са установени 2 плодни сака и е прието, че се касае за двуплодна едноядрена бременност, възникнала вследствие на последващо разделяне при един от имплантираните успешно ембриони. При проведения УЗ преглед за оценка на феталната морфология на двата плода във втория триместър от бременността се установяват данни за мъжки външни гениталии на единия близнак и женски гениталии при другия. До края на бременността тези данни остават постоянни, като извън тази находка няма показания за някаква малформация на органи и системи при двата плода. При раждането в 37 седмица от бременността екип от генетици от МБАЛ „Надежда" взима кръв за извършване на кариотипиране веднага след раждането. Близнак 1 е новороденото с гениталии от женски пол. Извършеният цитогенетичен анализ показва кариотип chi46,XY[78]/46,XX[22] сред анализирани 100 метафазни пластинки, оцветени по GTG метод. Близнак 2 е новороденото с мъжки външни гениталии. Извършеният цитогенетичен анализ при него показва кариотип chi46,XY[69]/46,XX[31] сред анализирани 100 метафазни пластинки. Не се описват аномалии, засягащи външните гениталии на двете деца. Няма информаци да са провеждани хормонални изследвания както в периода около раждането, така и след това.

Съгласно проведената медико-генетична консултация на семейството, повторно цитогенетично изследване при клетки от венозна кръв е направено след 6 месеца с цел проследяване на клетъчните линии. Бебе 1 (момиче) е с кариотип chi 46,XY[87] / 46,XX[13], а бебе 2 (момче) е с кариотип chi 46,XY[86] / 46,XX[14]. Семейството се насочва за ДНК изследване на ДНК, изолирана от букална лигавица от двете деца за установяване/отхвърляне на химеризъм в тъкан с произход, различен от този на хемопоетичната. От родителите е получено подписано писмено информирано съгласие за извършване на тези генетични изследвания. Извършени са серия от молекулярно-генетични анализи (таблица 16), вкл и за потвърждване на дизиготността при близнаците с QF-PCR. При всяко от двете деца се установиха различни ДНК профили (фигура 10). При сравнение с профилите на родителите няма съмнение за унаследяването на алелите от всеки един родител, като се установи, че децата са унаследили по една различна X-хромозома от майка си. Получените резултати не показват данни за химеризъм в ДНК пробите от букална лигавица, но трябва да се има предвид, че във възможностите на използваният метод не се включва откриване на мозаицизъм с нива под 10-15%.

Таблица 10

Обобщение на извършените резултати при разглеждания случай на химеризъм

	Бебе 1 (Ж)	Бебе 2 (М)
Кръв за ЦГ	При раждането	При раждането
Кариотип	chi 46,XY[78] / 46,XX[22]	chi 46,XY[69] / 46,XX[31]
QF-PCR резултат	Данни за мозайка	Данни за мозайка
Букална лигавица QF-PCR	Няма данни за мозайка	Няма данни за мозайка
Кръв за ЦГ	На 6 мес възраст	На 6 мес възраст
Кариотип	chi 46,XY[87] / 46,XX[13]	chi 46,XY[86] / 46,XX[14]
QF-PCR	Данни за мозайка	Данни за мозайка



Фигура 10

Представяне на QF-PCR профилите от проведените изследвания при случая с химеризъм.

Допълнително беше изолирана ДНК от суспензиите с култивирани лимфоцити, използвани за извършването на цитогенетичния анализ при взимането на кръв от децата при раждането и 6 месеца след това (таблица 10). Наблюдаваните електрофоретични профили и при двете деца са в съответствие с получените резултати от цитогенетичния анализ – данните за едновременно наличие на генетични профила на двете деца потвърждават наличето на химеризъм по отношение на хемопоетичната система. Към момента на последния контакт със семейството (4-годишна възраст на децата) родителите не съобщават на някакви видими аномалии, касаещи гениталиите или половата система при децата. Не са извършвани специализирани УЗ изследвания при децата и не е известно дали е правена оценка на техния хормонален и физически статус. Особено голям интерес би представлявало състоянието на вътрешните полови органи при момиченцето.

ОСОБЕНОСТИ НА QF-PCR МЕТОДА - ОБОБЩЕНИЕ

Специфична особеност на QF-PCR анализа е, че **не може да открива вариации** в генома **извън тези, заложени в него** като прицелни. Той не може да открие и пренареждания и мозаицизъм <15%, касаещи прицелните хромозоми. Съгласно препоръките на производителите, резултатите, получени при анализирането на проби с QF-PCR анализ следва да бъдат интерпретирани единствено в светлината на цялостната клинична картина.

QF-PCR метода има следните ограничения:

- Дупликации и делеции на малки райони могат да дадат фалшиво-положителни или фалшиво отрицателни резултати, особено ако се работи с малък брой маркери за дадена хромозома, или локализацията им не покрива по-голямата част от хромозомата;
- Качеството на материала може да варира в широки граници;
- Съществува вероятност от мозаицизъм;
- Съществува вероятност от контаминация (замърсяване) на материала с майчини клетки в случаите на дородова диагностика;
- Тризомийно състояние се открива, без да може да се разграничат формите му;
- Определени хромозомни болести (като монозомия и др.) може да не бъдат диагностицирани надеждно в някои случаи, а други (тризомийни състояния, включващи други хромозоми, които не са обект на изследване – освен хромозомите 21, 18, 13 Х и У) въобще няма да бъдат диагностицирани.

Предимства на PCR метода:

- Изследването има ниска себестойност като разходи за реактиви. Тук обаче не се включва цената на автоматичния секвенатор, но обикновено всяка съвременна молекулярно-генетична лаборатория разполага с такъв апарат;
- Позволява автоматизиране на анализа и обработка на много проби за кратко време;
- За разлика от цитогенетични метод, може да се диагностицира и частична тризомия на дадена хромозома;
- Проведен при стандартизирани условия този анализ се характеризира с висока надеждност и повтаряемост на резултатите;
- Може да се работи с различен вид тъкани в малки количества – амниотични клетки, хорионни въси, кръв, различни типове тъкан, без значение времето на взимане и съхраняване на материала.
    - Резултатът може да се получи в рамките на 1-3 дни.

4.4. ИЗСЛЕДВАНА ГРУПА ПАЦИЕНТИ ЗА МОНОГЕННИ МЕЖДИННО-ПОЛОВИ СЪСТОЯНИЯ

Обект на изследване в настоящия дисертационен труд беше група от 29 индивида с клинично определено междинно-полово състояние и нарушение в половото развитие в различна степен. На таблица 11 са представени изследваните пациенти с различни клинични състояния от спектъра на 46,XY DSD

Таблица 11

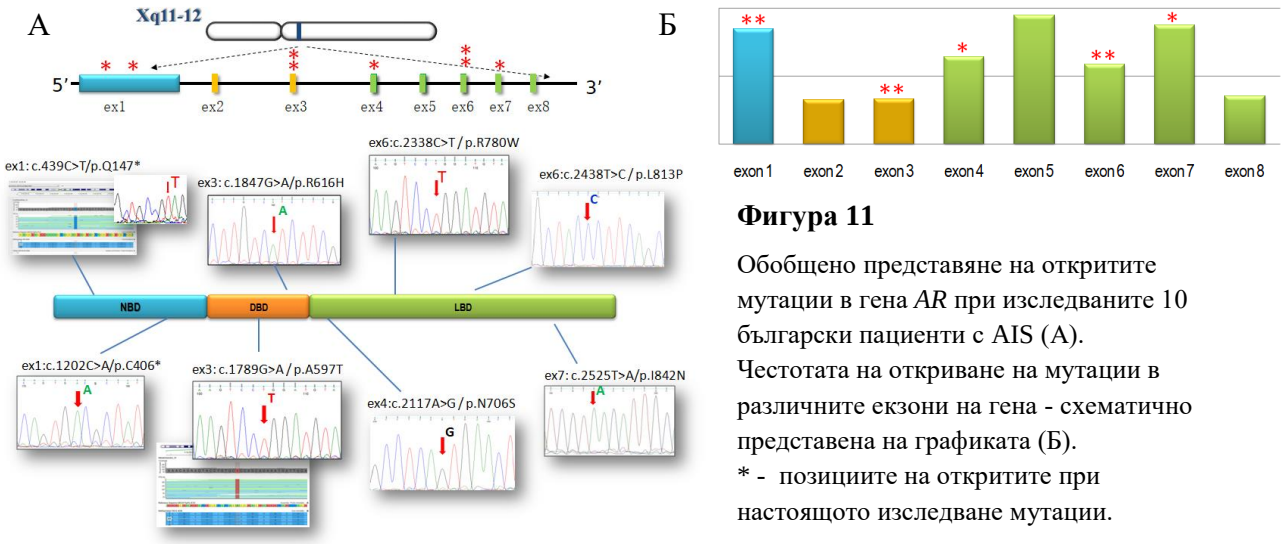
Изследваните пациенти с различни клинични състояния от спектъра на 46,XY DSD

	46, XY DSD	29
1	Синдром на андрогенната нечувствителност	10
2	Дефицит на 5-α-редуктазата тип 2	4
3	Гонадна дисгенезия / гонадна дисфункция	6
4	Синдром на Денис-Драш с тумор на Уилмс	1
5	Случаи с 46,XY DSD без изяснена ДНК диагноза	8

4.4.1. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD – AIS, СИНДРОМ НА АНДРОГЕННАТА НЕЧУВСТВИТЕЛНОСТ

В рамките на настоящия труд са включени общо **10 случая** с клинични данни за андрогенна нечувствителност (AIS). Бяха изследвани 9 пациентки с пълна форма на синдрома и 1 пациент с парциална андрогенна нечувствителност. Включени са общо 8 семейства, като едно от тях е представено от 3 засегнати индивида - две сестри и тяхната леля по майчина линия. Девет от изследваните пациенти са с женски фенотип, граждански пол и самосъзнание, а един (пациентът с PAIS) е с мъжки граждански пол и двойнствени гениталии. Установени бяха 8 различни мутации в *AR* гена – 3 нови, несъобщавани и 5 познати от литературата мутации, откривани при пациенти с AIS (фигура 11). Само при едно семейство от изследваните имаше данни за *de novo* произход на откритията генетичен вариант, докато при всички останали беше доказано унаследяване от майката, която е здрав носител.

	Случай	*Год*	*Екзон*	*cDNA*	*Белтък*		*Унаследяване*	*Цитат*
1	*AR-1*	31 г	1	c.439C>T	p.Gln147Ter	p.Q147*	Майка?	**Несъобщавана**
2	*AR-2*	17 г	1	c.1202C>A	p.Cys406Ter	p.C406*	Майка	**Несъобщавана**, *но има подобна*
3	*AR-3*	5 м.	3	c.1789G>A	p.Ala597Thr	p.A597T	Майка	Съобщавана
4	*AR-4*	15 г	3	c.1847G>A	p.Arg616His	p.R616H	Майка	Съобщавана
5	*AR-5*	16 г	4	c.2117A>G	P.Asn706Ser	p.N706S	Майка	Съобщавана
6	*AR-6.1* *AR-6.2* *AR-6.3*	18 г 8 г 51 г	6	c.2338C>T	p.Arg780Trp	p.R780W	Майка	Съобщавана
7	*AR-7*	18 г	6	c.2438T>C	p.Leu813Pro	p.L813P	Майка	Съобщавана
8	*AR-8*	15 г	7	c.2525T>A	p.Ile842Asn	p.I842N	***de novo***	**Несъобщавана**, *но има подобна*



Фигура 11

Обобщено представяне на откритите мутации в гена *AR* при изследваните 10 български пациенти с AIS (А). Честотата на откриване на мутации в различните екзони на гена - схематично представена на графиката (Б).
* - позициите на откритите при настоящото изследване мутации.

СЛУЧАЙ AR-1

Клинична картина

Индексната пациентка в клиничен случай AR-1 е жена на 31г с произход – страна от Близкия Изток. Заради инфертилитет в семейството и първична аменорея се планира асистирана репродукция и е извършен цитогенетичен анализ. Установеният кариотип е 46,Xinv(Y)(p11.3q12).

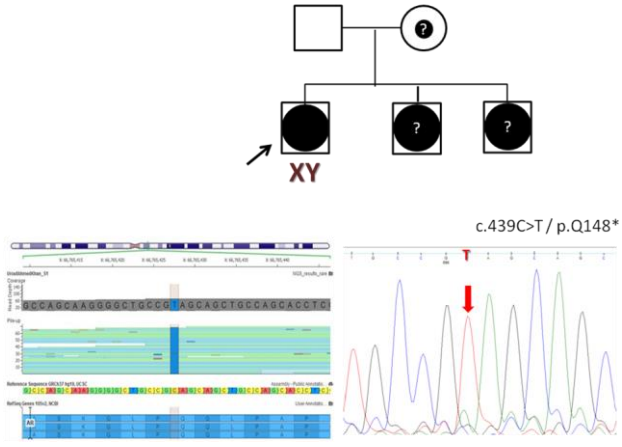
Пациентката е без малформативни и дисморфични стигми. Съобщава, че не е забелязала някаква вирилизация на тялото си по време на пубертета. Липсва аксиларно и пубисно окосмяване, млечните жлези са много добре развити. Няма данни за наличие на Мюлерови структури, съобщава за много високи нива на тестостерон (липсва документация). По данни на пациентката, като дете е била оперирана от херния и е извършена гонадектомия вляво. Операцията е извършена в родната ѝ страна, но медицинската документация не е налична.

В семейството има фамилна история за подобна клиника – при две от сестрите ѝ е бил установен кариотип 46,XY, като по информация от пациентката фенотипът им съвпада с нейния. При всички останали деца на баща ѝ от други бракове няма данни за подобно на нейното и на сестрите ѝ състояние.

Молекулярно-генетичен анализ

Тъй като клиничната картина при индексната пациентка, заедно с наличето на фамилна история насочват към синдрома на андрогенна нечувствителност, беше пристъпено към секвениране по Sanger на *AR* ген. В екзон 1, кодиращ N-терминалния район на рецептора беше открита мутацията **c.439C>T** в хемизиготно състояние. Откритият вариант води до промяна на кодона на позиция 147 от CAG в TAG и съответната замяна на аминокиселината Глутамин с преждевременно възникнал Стоп-кодон - **p.Gln147Ter** / p.Q147* (фигура 12).

Откритата мутация не е описвана досега в базата данни. Подобна nonsense мутация, водеща до генерирането на преждевременен стоп-кодон беше открита и при втория клиничен случай със синдром на андрогената нечувствителност, описван тук, като ролята на тези две мутации за клиничната проява на състоянието ще бъде разгледана общо по-късно.



Фигура 12
Представяне на клиничен случай AR1 – родословие и резултат от генетичния анализ

СЛУЧАЙ AR-2

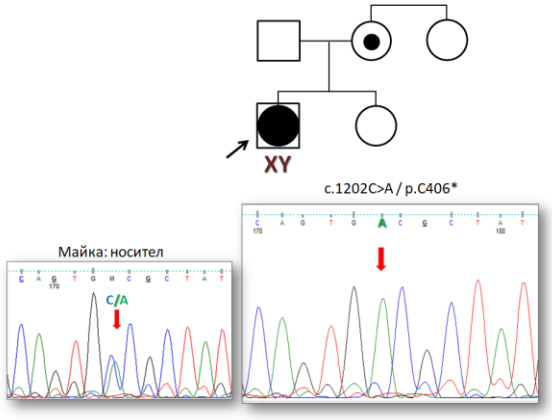
Клинична картина

Пациентката, насочена за генетично изследване беше 17-годишна, с първична аменорея, много добре развити млечни жлези и оскъдно окосмяване. Родена от първа нормално протекла бременност, с нормално физическо и психическо развитие. Пубархе (оскъдно, PH2) и телархе на 12 г. възраст, с аменорея, без аксилархе. Анамнезата показва операция от десностранна херния, появила се на 1.2 год възраст, като установената срастнала гонада е репонирана (липсва документация). При УЗ преглед не са визуализирани Мюлерови структури, в областта на матката се установява малка ехопозитивна структура, наподобяваща маточна шийка. На мястото на очакваните яйчници вляво се наблюдава хипопластична гонада, а вдясно такава не се визуализира. Установяват се значително повишени нива на серумния LH и на Тестостерона, на фона на нормални нива на FSH и естрадиол. След извършване на ЯМР на малък таз с оглед локализиране и морфологична оценка на гонадите е пристъпено към извършване на диагностична лапароскопия и отстраняване на гонадите с оглед желанието на пациентката и женското й себеусещане. Фамилната анамнеза показва майка с инфертилитет и аденом на хипофизата, фамилно намалено окосмяване – при майката и бабата по майчина линия има оскъдно пубисно окосмяване, без аксилархе.

Молекулярно-генетичен анализ

Клиничните данни подкрепяха хипотезата за пълна форма на синдрома на андрогенната нечувствителност. При извършеното секвениране по Sager на гена *AR* беше открита мутацията **c.1202C>A** на позиция 1202 от кодиращата последователност на екзон 1. Този вариант води до **p.Cys406Ter**/p.C406* - промяна на аминокиселината Цистеин от позиция 406 с преждевременен Стоп-кодон и синтезиране на скъсен белтък. При извършеният потвърдителен и сегрегационен анализ в семейството, чрез секвениране по Sanger е верифицирано наличието в хемизиготно състояние при майката. При по-малката сестра и при лелята по майчина линия не беше открита мутацията, носена от индексния пациент (фигура 13).

Съгласно данните от съобщаваните с базата данни за мутации в гена AR (Gottlieb, 2012, http://androgendb.mcgill.ca/) прави впечатление, че промените в кодиращата последователност, водещи до преждевеменен стоп-кодон се откриват най-често в първи екзон на гена. Там са и 56% от описаните единичните нуклеотидни замени при случаите с CAIS.



Фигура 13
Представяне на клиничен случай AR-2 – родословие и резултат от генетичния анализ

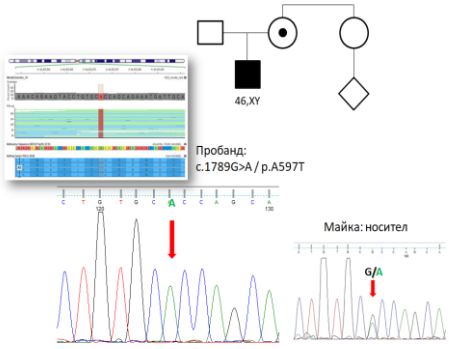
СЛУЧАЙ AR-3

Клинична картина

Пробандът от семейство 3 е дете, родено от първа бременност на 38-годишна майка, родителите не съобщават за известно кръвно родство между тях. Извършеният биохимичен скрининг в 16 г.с. на бременността показва риск за раждане на дете с болест на Даун, което налага пристъпването към дородова диагностика на плода. Получените резултати са нормални, установено е наличие на У-хромозома; кариотипът е 46,ХУ. При раждането е установена двойственост на външните гениталии на новороденото, но резултатите от дородовата диагностика дават основание то да бъде записано с мъжки граждански пол. На 5-месечна възраст гениталиите на детето са интерсексуални, без хиперпигментация по хипопластичния и разцепен скротум. Пенисът е хипопластичен, с перинеална хипоспадия и с данни за ингвинално разположени гонади (нормални за възрастта тестиси); не са установени Мюлерови структури. Нивата на 17-ОН-прогестерон, LH, FSH са нормални, а на Тестостерона - изключително ниски. След стимулационен тест с hCG е отчетено нормално покачване на Тестостерона. Изследваният стероиден профил в урината е без индикации за дефицит на 5-α-редуктазата, 21-хидроксилаза, 11-β-хидроксилаза, 3-β-хидроксистероид дехидрогеназа. В диференциален план е била обсъждана частична гонадна дисгенезия, частичен дефект в тестостероновата синтеза, 17/20-лиазен дефицит, 17-β-хидроксистероид дехизрогеназа, както и възможен тератогенен фактор по време на бременността, заради възможен хормонален или медикаментозен прием от страна на майката.

Молекулярно-генетичен анализ

При извършените генетични изследвания не бяха открити мутации в гените *SRD5A2* и *HSD17B3* , които биха могли да се свържат с фенотипната проява на недобре диференцирани мъжки гениталии. Проведеният MLPA анализ не показа наличие на делеции/дупликации, касаещи гените *SRD5A2, DMRT1, HSD17B3, CYP17A1*. След извършено ново-генерационно секвениране в клиника „Малинов" чрез панела TSI, в екзон 3 на гена *AR* беше открита мутацията **c.1789G>A** в хемизиготно състояние (фигура 14). Откритият вариант води до замяна на аминокиселината Аланин с Треонин на позиция 597 (**p.Ala597Thr**/p.A597T) от ДНК-свързващия район на андрогенния рецептор (DBD – *DNA-binding domain*). Сегрегационният анализ в семейството чрез секвениране по Sanger установи унаследяването на мутацията по майчина линия.



Фигура 14
Представяне на клиничен случай AR-3 – родословие и резултат от генетичния анализ

Откритата мутация AR:c.1789G>A е описвана при 4 пациенти с парциална форма на синдрома на андрогенна нечувствителност (PAIS) и интерсексуални гениталии – всички отглеждани като момчета в семействата си [Gast, 1995; Holterhus, 1999; Giwercman, 2000, Deeb, 2005]. Позицията 597 от аминокиселинната последователност на белтъка се намира в ДНК-свързващия район (D-loop) и откриването на замяната Аланин>Треонин при пациенти с клиника на PAIS показва, че този регион е с важно значение за ДНК-свързващата активност на белтъка.

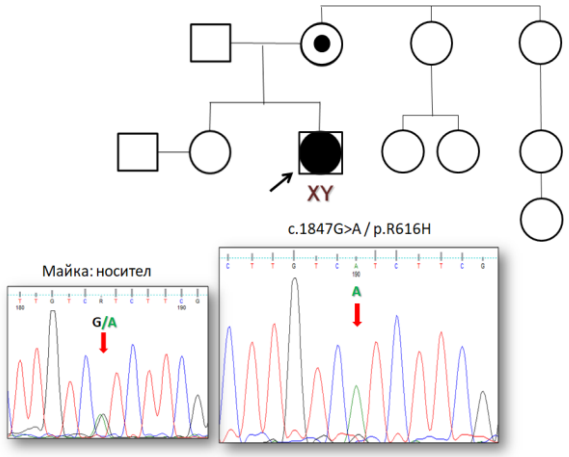
СЛУЧАЙ AR-4

Клинична картина

Касае за момиче на 15 години с първична аменорея и оскъдно пубисно и аксиларно окосмяване. Установено е наличие на сляпо-завършващо влагалище, без данни за матка и други Мюлерови структури; Tanner III-IV, като двете гърди са с различна големина, вляво - с данни за мастопатия. Нивата на Testosteron се описват като високи за жена, но в нормалните референтни стойности за мъж. Цитогенетичния анализ показва кариотип 46,XY. При извършената лапароскопска гонадектомия са били изолирани гонади, определени от хистолог като препубертетни тестиси.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвенирането по Sanger на кодиращите райони на гена *AR* в екзон 3 беше установено хемизиготно носителство на мутацията **c.1846G>,** която води до замяната на Аргинин на позиция 616 с Хистидин (**p.Arg616His** / p.R616H**).** Мутацията се намира в района, кодиращ ДНК-свързващия домейн (DBD). При майката беше установено хетерозиготно носителство на мутацията, без данни за клинична изява (фигура 15).



Фигура 15
Представяне на клиничен случай AR-4 – родословие и резултат от генетичния анализ

Откритата замяна AR:c.1847G>A/p.Arg616His е известна и е съобщавана в базата данни с мутации в AR при 9 пациентки с CAIS, 1 пациент с двойнствени гениталии и PAIS, 1 пациент с лека форма на андрогенна нечувствителност и инфертилитет. На позиция 616 от аминокиселинната последователност на белтъка са описвани и 5 други мутации при пациенти с различна степен на вариации в половото развитие.Замяна C**G**T>C**C**T на същата позиция в генома (c.1847G), но водеща до промяна на Аргинина с Пролин, е съобщавана при 1 пациентка с CAIS и при 1 пациент с PAIS и двойнствени гениталии. Замяна на предходния нуклеотид с кодона (c.1846C) с A, T или G е съобщавана при пациентки с CAIS. *In-frame* делеция на целия кодон е описвана също при пациентка с CAIS.

СЛУЧАЙ AR-5

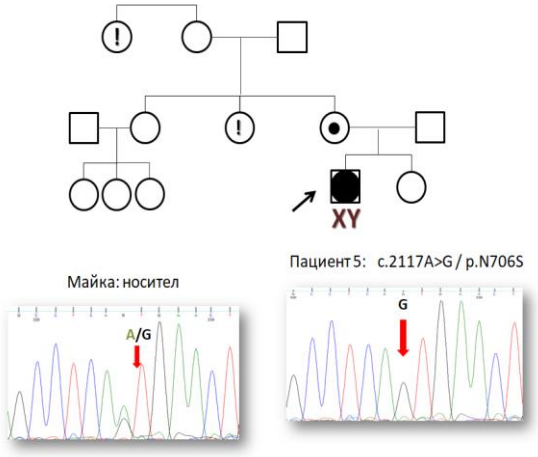
Клинична картина

Индексната пациентка е момиче на 16г с данни за първична аменорея и хиперандрогения, при стартирало навреме пубертетно развитие. Родена е от първа нормално протекла бременности и раждане, оперирана е на 11-месечна възраст от ингвинална херния вдясно. Съгласно предоставената ни медицинска документация при индексната пациентка липсва окосмяване по тялото; пубертет – телархе IV степен, мъховидно пубархе, без аксилархе, без акне; с данни за микрогнатия. Лабиите са описани като „по-хипопластични". Има фамилни данни за леля (сестра на майката, на 40 год) с първична аменорея, а за сестра на бабата по майчина линия се съобщава, че е със стерилитет. При извършен ЯМР на органите в малък таз е визуализирана структура с характеристика на сляпо-завършващо влагалище, както и липса на Мюлерови структури. Вдясно се описва солидна формация, демонстрираща интензитет на маточна тъкан с максимални размери 30/5мм. Изказано е съмнение за вероятно дистопична и манифестно хипопластично представена матка и кистозно трансформиран десен аднекс без визуализиране на ляв аднекс. Хормоналните изследвания показват високи нива на LH и на Тестостерон; негативни са туморните маркери.

Молекулярно-генетичен анализ

Липсата на вирилизация при пациентката, в комбинация с хормоналния й профил насочваха към вероятна диагноза Синдром на андрогенна нечувствителност. При извършеното секвениране по Sanger на *AR* ген беше открита мутацията **c.2117A>G** (AAT>AGT) в хемизиготно състояние (фигура 16). Откритият вариант води до замяна на аминокиселината Аспаргин на позиция 706 със Серин (**p.Asn706Ser**/p.N706S). Носителство в хетерозиготно състояние на мутацията е открита и при майката на пробанда.

Откритата мутация е описвана при няколко пациентки с пълна форма на андрогенна нечувствителност и един с парциална. Намира се в консервативен район на екзон 4 – първият от кодиращите лиганг-свързващия район (LBD – *Ligand-binding domain*). При част от пациените се съобщава за фамилна история и носителство на мутацията от майките и/или сестрите на засегнатите. Клинично се описва женски фенотип, повишени нива на LH и Тестостерон, липсващо аксиларно и оскъдно пубисно окосмяване, локализация на гонадите с коремната кухина или в ингвиналния канал [Melo, 2003]. Други две замени на същата аминокиселинна позиция има съобщавани при други няколко случая с CAIS (AR:c.2116A>G/p.Asn706Tyr и AR:c.2117A>T/p.Asn706Ile), което е в съответствие с консервативната природа на засегнатия район за свързване на рецептора с лиганда (андрогените). За наличието на някаква остатъчна Мюлерова структура се съобщава много рядко при пациенти с CAIS и PAIS [Audi, 2010] въпреки, че механизмът на възникване не може да бъде обяснен. AMH се регулира негативно от Т и нивата на AMH са повишени през първата година от живота на детето и след началото на пубертетното развитие.



Фигура 16
Представяне на клиничен случай AR5 – родословие и резултат от генетичния анализ

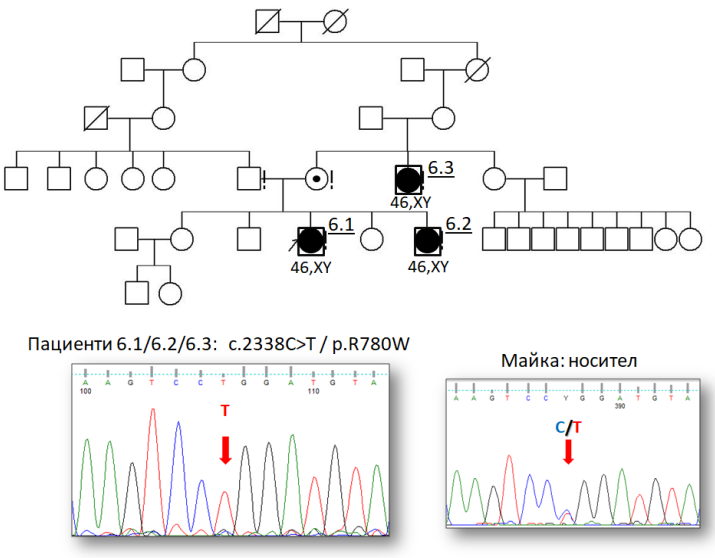
СЕМЕЙСТВО AR-6 (AR-6.1, AR-6.2, AR-6.3)

Клинична картина при AR-6.1.

Индексния пациент е девойка на 18 годишна възраст от ромски произход с първична аменорея, постъпила в хирургично отделение по повод двустранна ингвинална херния. Родена е от трета бременност в семейство с близкородствен брак – бащата и майката са втори братовчеди Цитогенетичният анализ показва кариотип 46,XY. При извършената генетична консултация на семейството става ясно, че по-малката й сестра (на 8 години, AR-6.2) е с двустранна ингвинална херния. Лелята по майчина линия, която също е първична аменорея (AR-6.3), е била оперирана от двустранна ингвинална херния, но няма налична медицинска документация. Няма данни и за извършвани хормонални изследвания при трите пациентки.

Молекулярно-генетичен анализ

В екзон 6 на гена *AR* беше открита мутацията **c.2338C>T**, водеща до замяна на Аргинин с Триптофан на позиция 780 (**p.Arg780Trp**/p.R780W). Мутацията беше открита и при трите пациентки (двете сестри и тяхната леля по майчина линия) в хемизиготно състояние, а майката е хетерозиготен носител на замяната (фигура 17). Мутацията е описвана при 7 пациентки с CAIS [Hiort, 1994; Murono, 1995; Sinnecker, 1997; Ahmed, 2000; MacLean, 2004; Melo, 2003; Ledig, 2005]. При две от тях фамилната история е негативна. Мутацията засяга LBD, като намалява способността на рецептора за свързване с андрогени, но не я изключва напълно [MacLean, 2004]. При изследвания на частично пречистен AR протеин се установява редуцирана молекулна маса, което предполага някакво скъсяване на рецептора [Gyorki, 1988]. Наличието на някакви нива на свързване на андрогени към рецептора при кожни фибробласти означава, че такова скъсяване няма *in vivo*. Предполага се, че мутацията p.Arg780Trp дестабилизира андрогенния рецептор, правейки го по-податлив на протеолиза по време на екстракцията от цитозола на протеина [MacLean, 2004].



Фигура 17
Представяне на клиничен случай AR6 – родословие и резултат от генетичния анализ

СЛУЧАЙ AR-7

Клинична картина

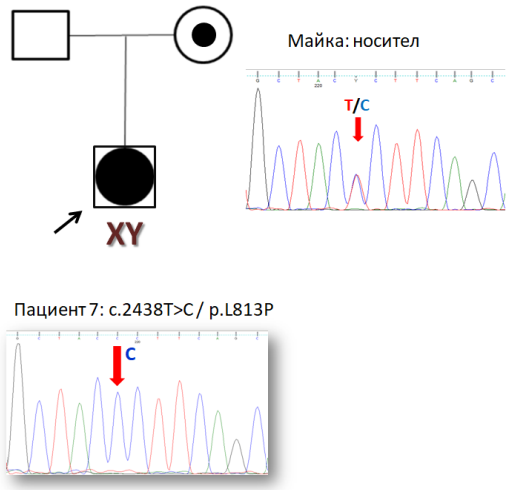
Касае се за 18г момиче, родено от втора нормално протекла бременност, като в семейството има още две момчета, които са здрави. След раждането палпаторно са установени формации в големите лабии, суспектни за тестиси. Още тогава е изказано съмнение за синдром на андрогенна нечувствителност и родителите са били насочени за извършване на кариотипиране, но такива изследвания не са били направени. На 17 годишна възраст пациентката е насочена към детски ендокринолог във връзка с първична аменорея и затлъстяване, с водеща диагноза Метаболитен синдром. Налични са повишени нива на Тестостерон и LH, на УЗ не се откриват на матка и яйчници.

Към момента на поставяне на клиничната диагноза CAIS на 18 годишна възраст, при пациентката липсва окосмяване в аксилите и по пубиса. Половата система е с телархе III-IV степен, пубархе = I степен, аксилархе = I степен, без клиторомегалия. Не се палпират формации в лабиите и ингвиналните гънки. В проксималната част на десен ингвинален канал е установена овална паренхимна структура, симетрично на същото ниво вляво има структура със сходна характеристика и по-малки размери. Няма данни за фоликули. Костната възраст на пациентката е леко занижена. Диагозата Метаболитен синдром се обсъжда заради повишен LDL и понижен HDL. Извършеният цитогенетичен анализ показва кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

В екзон 6 на гена *AR* се открива мутацията **c.2438T>C**, водеща до замяна на Левцин с Пролин на позиция 813 (**p.Leu813Pro**/p.L813P). Откритата мутация се намира във високо-консервативния С-терминалния край на 8-ма спиралната структура, която е критичен за LBD район. Носи се от майката на пациентката в хетерозиготно състояние, като по анамнестични данни има информация за стерилитет при лели на пациентката по майчина линия (фигура 18).

Мутацията c.2438T>C е описвана при пациент с PAIS (мъж с гинекомастия) и при пациентка с CAIS [Yaegashi, 1999; Jaaskelainen, 2006]. Аминокиселината Левцин на позиция 813 е консервативна и изглежда е необходима за нормалната конформация на AR протеина. Както Левцина, така и Фенилаланина са неутрални, неполярни аминокиселини и вероятно тази замяна не би довела до големи конформационни промени в белтъчната конформация, а ще редуцира транскрипционната активност на AR [Yaegashi, 1999]. Изследванията при втория описан пациент обаче [Jaaskelainen, 2006], показват само минимален остатъчен трансактивационен потенциал, който изисква много по-високи от физиологичните концентрации на DHT. Предполага се, че това, в комбинация с високите нива на андрогени биха довели до частично развитие на Волфиевите структури [Jaaskelainen, 2006].



Фигура 18
Представяне на клиничен случай AR7 – родословие и резултат от генетичния анализ

СЛУЧАЙ AR-8

Клинична картина

Индексната пациентка в това семейство е 15 годишна, с първична аменорея, насочена за генетично изследване от наблюдаващия ендокринолог. Клиничната картина се презентира с липсващо пубисно и аксиларно окосмяване, без УЗ данни за наличие на матка и други Мюлерови структури, Tanner IV, Prader III-IV сляпо завършващо влагалище, недостъпно поради кожна перинеална преграда (*introitus vaginae*). Клиторът е леко уголемен, в ингвиналните гънки двустранно се палпират кръгловати формации (вероятно ингвинално разположени аднекси). Нивата на Тестостерон и LH са завишени. Цитогенетичният анализ показва кариотип 46,XY. След лапароскопската гонадектомия са установени гонади с размери 2/3 см, които хистологично са определени като двустранно препубертетни тестиси.

Молекулярно-генетичен анализ

При изследването на *AR* ген в хемизиготно състояние в екзон 7 е открита мутацията c.2525T>A. Единичната нуклеотидна замяна води до промяната на аминокиселината Изолевцин (A**T**C) на позиция 842 с аминокиселината Аспаргин (A**A**C) (p.Ile842Asn / p.I842N). При изследване на майката на индексната ни пациентка AR-8, мутацията c.2525T>A не беше открита. Тя е нововъзникнала при пробанда в семейството (фигура 19).



Фигура 19

Представяне на клиничен случай AR8 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извъшенията предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритата мутация

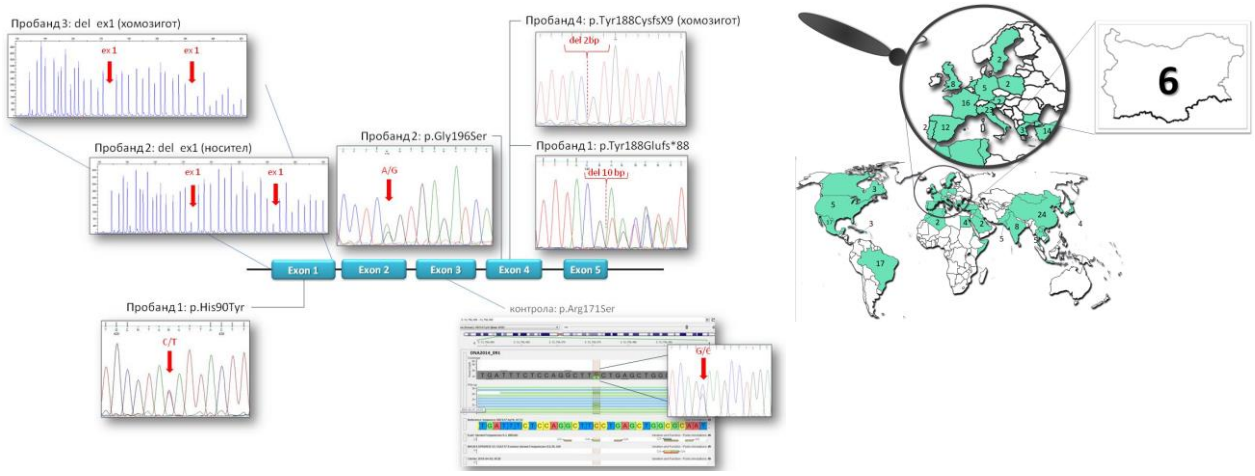
Извършения предикционен софтуерен анализ с алгоритъма на PolyPhen-2 класифицира откритият вариант c.2525T>A/p.Ile842Asn в *AR* като вероятно патогенна (*probably damaging,* score = 1.0). Разположен е в относително консервативен регион на белтъка (фигура 28). Мутацията не е регистрирана досега в достъпните ни ресурси с информация. Справка в базата данни с мутации в *AR* показва, че на същата позиция в гена има друга мутация, водеща до замяната на Изолевцин със Серин (A**T**C>A**G**C) (c.2525T>G, p.Ile842Ser). Описвана е при пациентка с двойнствени гениталии [Hiort, 1996].

4.4.2. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD и ДЕФИЦИТ НА 5-А-РЕДУКТАЗА, ТИП 2

За мутации в гена *SRD5A2* бяха изследвани **четири** пробанда от български произход с 46,XY DSD и женски фенотип, както и контролна група от 76 индивида. Пациентите 1, 2 и 3 бяха насочени за генетични изследвания с първоначална клинична диагноза парциална андрогенна нечувствителност (PAIS). При пациент 4 диагнозата 5-α-редуктазен дефицит е поставена на ниво биохимични изследвания преди 25 години, но генетичните основи на състоянията не бяха известни.

	Случай	*Год*	*Екзон*	*cDNA*	*Белтък*		*Унаследяване*	*Цитат*
1	*SRD5A2-1*	14 г	1	c.268C>T	p.His90Tyr	p.H90Y	*?*	**Несъобщавана**
			4	c.562_571del	p.Tyr188Glufs*88	p.Y188Efs*88	*?*	**Несъобщавана**
2	*SRD5A2-2*	2 г	1	делеция			Майка	Съобщавана
			4	c.586G>A	p.Gly196Ser	p.G196S	Баща	Съобщавана
3	*SRD5A2-3*	44 г	1	делеция			**Хомозигот**	Съобщавана
4	*SRD5A2-4*	36 г	4	c.563-564del	p.Tyr188Cysfs*9	p.Y188Cfs*9	**Хомозигот**	Съобщавана
	Контрола	?	3	c.512G>C	p.Arg171Ser	p.R171S	*?*	Съобщавана

При изследваните четири пациенти бяха открити 5 различни мутации в гена *SRD5A2*: p.His90Tyr, p.Glu196Ser, p.Tyr188Cysfs*9, p.Tyr188Glufs*88 и делеция на екзон 1. В една от контролните проби беше открито носителство на мутацията p.R171S.



Фигура 20

Обобщено представяне на откритите мутации в гена *SRD5A2* при изследваните 4 български пациенти с клинични данни за нарушения в половото развитие и кариотип 46,XY и актуализирана световна карта на разпространението на мутациите в *SRD5A2* с включване и на България. Част от случаите са представени в една от публикациите по темата на настоящия дисертационен труд [Andonova, 2017].

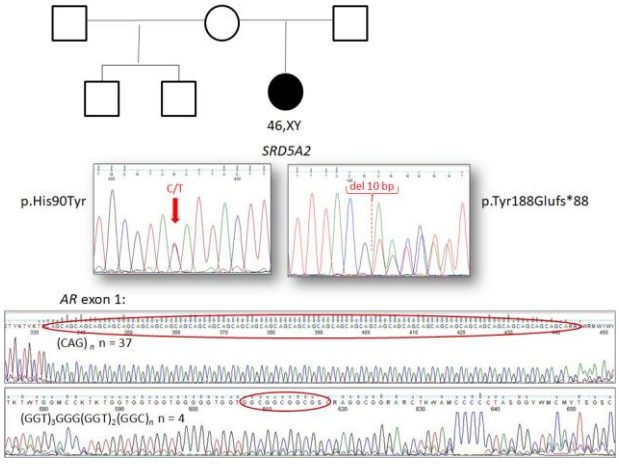
СЛУЧАЙ SDR5A2 / 1

Клинична картина

Момиче на 14 годишна възраст е било насочено за консултация с клиницист по повод първична аменорея и липса на развитие на млечните жлези. Родена е от трета нормално протекла бременност в семейство без данни за близко родство (фигура 29), с нормално развитие до момента. Наблюдава се леко повишено окосмяване над горната устна, по *linia alba* и по медиалната повърхност на бедрата, със следи от епилация. Има редуцирана подкожна мастна тъкан, гласът се описва като по-нисък и дрезгав. Липсва развитие на млечни жлези и галакторея. В ингвиналните гънки се палпират неболезнени плътни формации с диаметър около 1 см, суспектни за тестиси. Гинекологичният статус показва Prader III, не се палпират маточна структура и аднекси. Има наличие на сляпо завършващо влагалище, а клиторът е увеличен. На УЗ не се визуализират яйчници и матка, като няма данни за повишени гонадотропини, но нивата на Тестостерон са силно завишени. При извършената билатерална гонадектомия са установени два тестиса *in situ* - хистологичният резултат посочва препубертетни тестиси. При извършения цитогенетичен анализ се установи кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

Заради подадената работна диагноза PAIS на първия етап бяха търсени мутации в гена за *AR*. Наличие на мутация не беше установено, но имаше интересна специфична находка в екзон 1 на гена (фигура 21) : **37 броя** CAG **повтора** в полиглутаминовия тракт (при нормални стойности **между 10 и 36**) и **4 на брой вариабилни повтора** в GGC частта на полиглициновия тракт $(GGT)_3GGG(GGT)_2(\mathbf{GGC})_n$ (при нормални стойности **между 7 и 37).** Липсата на мутация в гена *AR* направи диагнозата парциална форма на синдрома на андрогенната нечувствителност малко вероятна, без да я изключва напълно. Забелязаното повишено окосмяване по тялото и клиторомегалия, в комбинация с дрезгавия глас ни насочиха към следващ кандидат-ген: *SRD5A2*. Изследванията бяха извършени в Института по Генетика в Мюнстер, Германия, по време на специализация там във връзка с настоящия дисертационен труд. Открити бяха два варианта (фигура 30), неописвани досега в литературата: c.268C>T в екзон 1, p.His90Tyr (p.H90Y) и делеция на 10 нуклеотида TATGTTTCTG в екзон 4 - c.562_571del, p.Tyr188Glufs*88 (p.Y188Efs*88), която води до промяна на рамката на четене и възникване на стоп-кодон след 87 аминокиселини със скъсен белтък. ДНК от родителите не е налична и сегрегационен анализ не беше извършен. Пациентката е с женско самосъзнание и не е изявявала желание за промяна в гражданския си пол.



Фигура 21
Представяне на клиничен случай SRD5A2/1 – родословие и резултат от генетичния анализ

Извършеният ДНК анализ при този клиничен случай доведе до доказването на мутации в гена *SRD5A2* за пръв път при български пациент с нарушения в половото развитие от спектъра на 46,XY DSD.

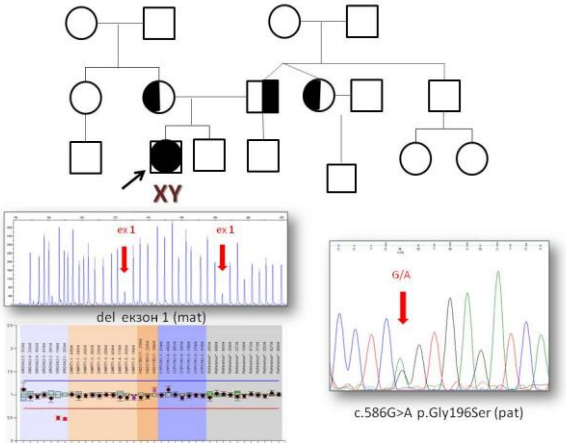
СЛУЧАЙ SDR5A2 / 2

Клинична картина

Пробанда на второто изследвано семейство е дете на 2 години, родено след първа, нормално протекла бременност в семейство без родствена връзка. При раждането детето е определено като момиче с лека клиторомегалия и до момента на насочване за генетични изследвания е отглеждано като момиче. Между първата и втората му година родителите забелязват постепено увеличаване на клитора, но хормонални нива са в норма за възрастта. След тест с hCG на възраст 2г 10м, е наблюдавано сигнификантно повишение на нивата на Тестостерон, но измерване на нивата на DHT не е извършено. Външните гениталии на детето се описват като уголемени лабии, под формата на скротална торбичка; липсват малки лабии, както и пигментация и окосмяване. Фалосът е хипертрофирал, с перинеална хипоспадия. Палпират се образувания в скроталната торбичка - най-вероятно тестиси. На УЗ не се визуализира маточно тяло. Цитогенетичния анализ показва кариотип 46,XY и като за водеща клиничната диагноза се приема Синдром на Андрогенната нечувствителност. Ядрено-магнитния резонанс направен при детето показва задържани в коремната кухина тестиси и липса на маточно тяло и влагалище

Молекулярно-генетичен анализ

След оценка на предоставената ни на по-късен етап клинична информация и данните за постепенно нарастване на клитора при детето, беше преценено като по-удачно да се пристъпи към секвениране по Сангер на кодиращите райони на гена *SRD5A2*, вместо на гена *AR*. В екзон 4 на *SRD5A2*, в хетерозиготно състояние беше открита мутацията **c.586G>A**, описвана при пациенти с дефицит на 5-алфа-редуктаза тип 2 от различни популации от региона на Близкия изток и Средиземноморието. Замяната води по заместването на аминокиселината Глицин със Серин на позиция 196 от белтъчната верига (**p.Gly196Ser**). При анализирането на ДНК проби от двамата родители беше установено унаследяване на мутацията от бащата. Извършеният MLPA анализ откри хетерозиготно носителство на делеция на екзон 1 при индексния пациент, както и при неговата майка (фигура 22). При проведената медико-генетична консултация, на семейството бяха разяснени получените генетични резултати, налагащи промяната в диагнозата на детето от синдром на андрогенната нечувствителност към дефицит на 5-алфа-редуктазата тип 2. Семейството беше насочено за консултации към уролог и психолог. По данни на майката по това време, детето „*има предпочитания към момчешки игри, играе си основно с момченца и показва момчешко поведение*". Предложението за посещение при психолог беше отклонено от тях като евентуална възможност на по-късен етап. Около 3-годишната възраст на детето, семействоо пристъпва към коригиращи уретрата операции, последвани от промяна и на гражданския му пол, съгласно избора на родителите. По данни от майката след тази промяна детето се чувства добре, приема себе си като момче, използва мъжкото си име и е „*много по-спокойно и щастливо от преди*". Оценката във времето на това решение на семейството тепърва ще бъде направена.



Фигура 22
Представяне на клиничен случай SRD5A2/2 – родословие и резултат от генетичния анализ

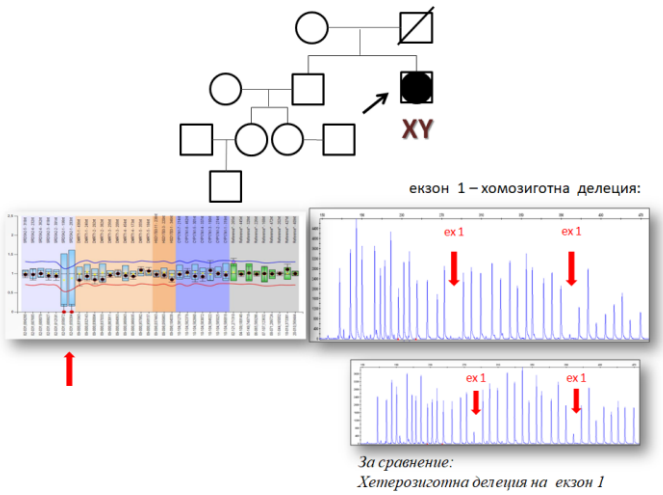
СЛУЧАЙ SDR5A2 / 3

Клинична картина

Третият индексен пациент е жена на 44 годишна възраст с клинична диагноза „Мъжки псевдохермафродитизъм", поставена преди 30 години. Родена на термин от втора бременност, като по данни от майката, пациентката почти не е наддавала на тегло през първата си година. На 16 годишна възраст заради съмнения за заклещена ингвинална херния с болки и подутина с в лявата слабинна област е извършена операция и е открит ингвинално разположен тестис, но няма западена медицинска документация. Пациентката е с първична аменорея, външни гениталии с окосмяване от женски тип и хипертрофия на клитора, превалиращо мъжки хабитус на тялото. Гласът се описва като груб и нисък. На 20 г. възраст влагалището е късо и рудиментирало, няма данни за матка и яйчници в малкия таз. По данни от пациентката, двата тестиса са отстранени след пубертета в съответствие с женската й идентичност, но медицинска документация от този период не е налична. Извършвана е пластична операция за коригиране на външните гениталии и вагината, измерваните хормонални нива показват повишен FSH, високо-нормален LH и нормален за жени Тестостерон. Хормонално-заместителната терапия е довела до добро развитие на гърдите и придобиване на окосмяване от женски тип. Проведеното цитогенетично изследване показва кариотип 46,XY. Към момента на насочване към Национална генетична лаборатория на 45 годишна възраст пациентката е с водещата клинична диагноза Парциална Андрогенна нечувствителност (PAIS).

Молекулярно-генетичен анализ

При данните за клинична диагноза парциална андрогенна нечувствителност (PAIS), първият ген, към който се пристъпи за изследване е *AR*. Извършените изследвания обаче не показаха наличие на единични нуклеотидни замени или малки делеции и дупликации в него, което направи водещата клинична диагноза по-малко вероятна, без да я изключва напълно. Заради посочените в клиничната документация мъжки хабитус на тялото и нисък глас, се пристъпи към секвениране на следващия подбран кандидат-ген: *SRD5A2*. Секвенирането на екзони 2, 3, 4 и 5, както и на интрон-екзонните граници не откри наличие на мутации. Намножаването на екзон 1 обаче неколкократно беше неуспешно, което ни наведе до предположението за наличие на хомозиготна делеция, обхващаща района на целия първи екзон на гена. Включването на ДНК пробата на пациентката в MLPA изследване доведе до откриването на хомозиготна делеция и потвърждаване на изказаната хипотеза (фигура 23). ДНК от родителите не е налична и потвърждаване на носителския им статус по отношение откритата делеция не е възможно. До данни на пациентката между семействата на бащата и на майката няма известна роднинска връзка, въпреки, че родом са от едно и също населено място.



Фигура 23
Представяне на клиничен случай SRD5A2/3 – родословие и резултат от генетичния анализ

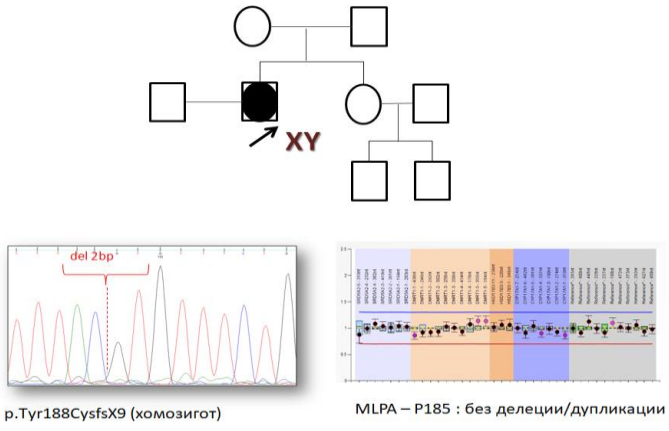
СЛУЧАЙ SDR5A2 / 4

Клинична картина

Пациентката е жена на 36 г, родена от първа, нормално протекла бременност в семейство без данни за родствена връзка. На 14 годишна възраст е с първична аменорея, липса на развитие на млечни жлези, клиторна хипертрофия и забелязана от близките промяна на гласа към по-нисък регистър. При статуса се описва мъжки хабитус с масивна костно-мускулна структура на тялото, пубисното окосмяване, отговарящо на Танер III - женски тип, с данни за вирилизация на тялото с умерен хирсутизъм и клиторомегалия. Налични са скротоподобни големи лабии, малките лабии са хипопластични; сляпо-завършващото влагалище е късо, няма данни за матка или яйчници. Описва се билатерална ингвинална херния с наличие на тестиси в ингвиналните канали. Съобщава за операция от левостранна ингвинална херния на 7 годишна възраст, без данни за находката. Цитогенетичното изследване показва кариотип 46,XY, а хормоналните изследвания на 14 годишна възраст показват високи нива на прогестерон и FSH и леко завишени на LH; Тестостеронът е силно завишен според нормите за жени, но в нормалните за мъже граници. След извършени измервания на нивата на T и DHT в чужбина, се установява съотношение T/DHT силно изтеглено към Тестостерона и така е поставена водеща диагноза дефицит на 5-α-редуктазата тип 2. В унисон с клиничния алгоритъм през 90-те години на XX в и с личното й усещане за полова принадлежност е извършена двустранна гонадектомия на 15 годишна възраст и пластична операция на външните гениталии. Хистологичната находка отговаря на тестиси билатерално с рудиментирали епидидим, *vas deferens* и нарушена сперматогенеза. Пациентката не съобщава за колебания в половата си идентичност по време на пубертета и след това, като продължава да възприема себе си като момиче.

Молекулярно-генетичен анализ

В *SRD5A2* гена беше открита хомозиготна делеция на TA в кодон 4 (позиция c.563-564del), водеща до изместване на рамката на четене, с начало промяна на аминокиселината Тирозин с Цистеин и възникване на по-ранен стоп-кдон след 9 аминокиселини (p.Tyr188Cysfs*9/p.Y188Cfs*9). За потвърждаване на очаквания автозомно-рецесивен модел на унаследяване на състоянието в семейството е нужно генетично изследване на двамата родители, но ДНК проби от тях не са налични. На пациентката не й е известно да има някаква роднинска връзка между родителите й. С оглед на това беше извършен и MLPA анализ за търсене на делеция в *SRD5A2* гена. Резултатите от анализа показаха нормален профил (фигура 24) и така отпадна вероятността пациентката да бъде съставен хетерозигот по мутацията p.Y188Cfs*9, в комбинация с по-голяма делеция, обхващаща и екзон 4. В литературата обаче има данни за унипарентна дизомия (uniparental disomy (UPD) при пациентка с дефицит на 5-редуктаза тип 2 и кариотип 46,XY [Chavez et al., 2000], което показва, че са възможни и алтернативни механизми за унаследяване на състоянието.



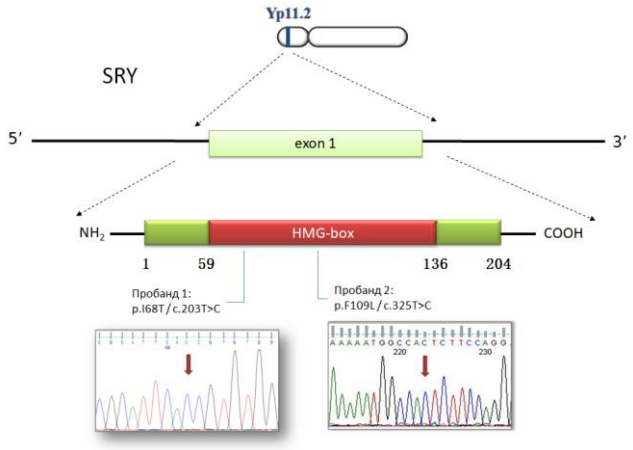
Фигура 24
Представяне на клиничен случай SRD5A2/4 – родословие и резултат от генетичния анализ

4.4.3. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD – ПЪЛНА ГОНАДНА ДИСГЕНЕЗИЯ / синдром на Swyer

В настоящото изследване бяха открити мутации в гена *SRY* при две пациентки със съмнения за пълна гонадна дисгенезия.

	Случай	*Год*	*cDNA*	*Protein*	*Protein*	*унаследяване*	*Цитат*
1	*SRY / 1*	16	c.203T>C	p.Ile68Thr	p.I68T	*de novo*	Съобщавана
2	*SRY / 2*	17	c.325T>C	p.Phe109Leu	p.F109L	*de novo*	Съобщавана

На фигура 25 са представени схематично генът *SRY*, неговата локализация, синтезираният продукт, както и откритите мутации при изследваните в настоящия труд пациентки.



Фигура 25

Обобщено представяне на откритите мутации в гена *SRY* при изследваните 2 пациентки с клинични данни за нарушения в половото развитие и кариотип 46,XY

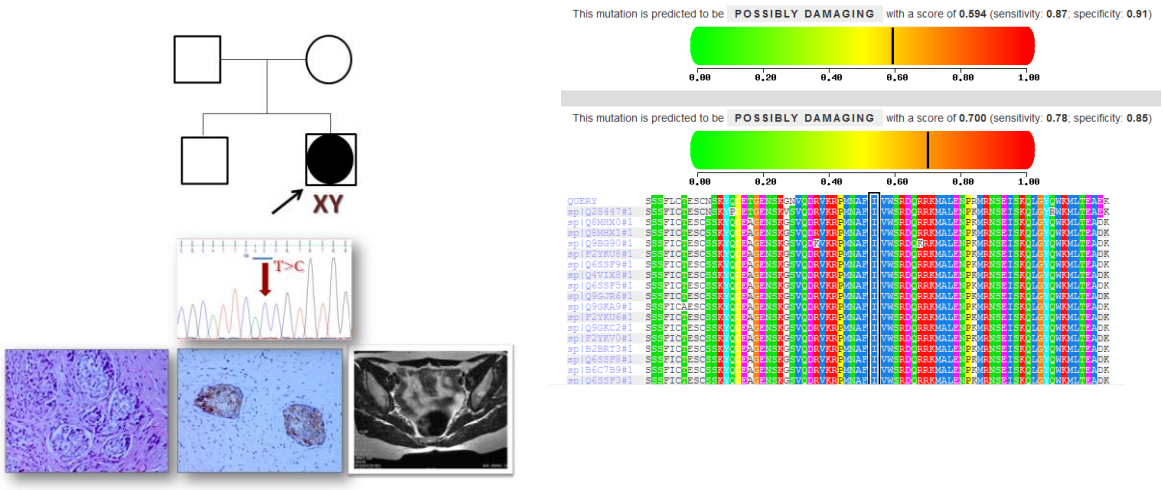
СЛУЧАЙ SRY / 1

Клинична картина

Пациентката е 16 годишна, родена след 10 год инфертилитет в семейството от втора двуплодна бременност, със загуба на единия плод в първия триместър (по данни на майката). След раждането пациентката е била в тежко депресивно състояние, с данни за възседнати черепни кости, отглеждана е в кувьоз 20 дни. Краниосиностозата е коригирана двукратно до навършване на 5 годишна възраст. На 15 годишна възраст е установен инсулин-зависим диабет тип 1 без кетоацидоза, като скоро след това се открива изоставане в пубертетното развитие, първична аменорея и с високи нива на LH и FSH. Цитогенетичният анализ показва кариотип 46,XY. При диагностична лапароскопия се описват хиполастична матка, инфантилни, лентовидно двустранни маточни тръби и хипопластични яйчници с диаметър <1 см. При направения ЯМР се установяват хипопластични влагалище и матка с дебелина на миометриума < 2 мм, не се визуализират овоидни структури, наподобяващи гонади в областта на малкия таз и интраабдоминално. Не се изобразяват и структури със сигнална характеристика на тестиси. Извършена е двустранна аднексектомия, като след хистологични анализи е дадено мнение, че морфологичната и фенотипна находки съответстват на ивицеста гонада с епителни cord-like структури. Не се визуализират герминативни клетки.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвениране на кодиращия района на гена *SRY* беше открита мутация c.203T>C / p.Ile68Thr (фигура 26), описана в литературата по-рано при пациент с 46,XY гонадна дисгенезия [McElreavy, 1992]. При изследването на гена *FGFR2* заради съобщавана връзка между краниосиностоза и 46,XY нарушение в половото развитие [Bagheri, 2015] мутации при индексния ни пациент не бяха открити. Откритата мутация не беше установена при бащата на пациентката и е *de novo* възникнала.



Фигура 26
Представяне на клиничен случай SRY 1 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извъшения предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритата мутация

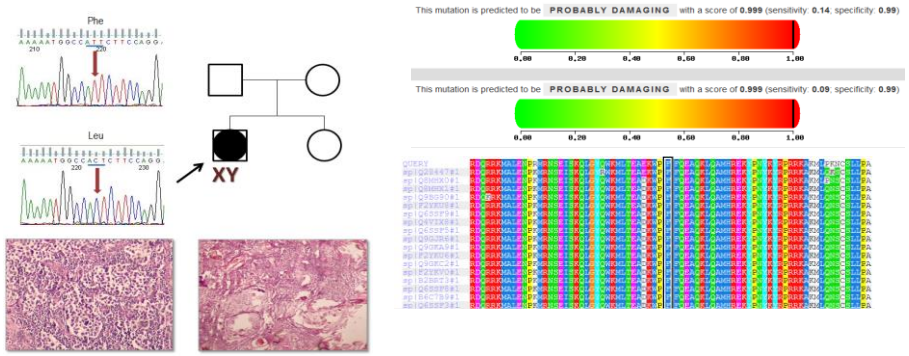
СЛУЧАЙ SRY / 2

Клинична картина

Индексният пациент беше 17-годишно момиче с първична аменорея, родена от първа бременност в семейство без данни за близко-родствена връзка. Пубертетното развитие е нормално - с пубисно окосмяване Танер V, развитие на млечни жлези B5 с нормална фиброзна структура, нормални женски външни гениталии. Костната възраст изостава и отговаря на 15 г. Установен е първичен хипогонадизъм с повишени нива на LH и FSH; стероидните хормони са в нормални граници за жена. На 16-годишна възраст при диагностична лапароскопия са описани хипопластични матка и фалопиеви тръби, както и 4 см формация на мястото на левия яйчник и ивицеста гонада вдясно. При ЯМР е визуализирана туморна формация на мястото на лявата гонада, като метастази не са открити. Негативни са и всички изследвани към съответния момент туморни маркери. След извършване на билатерална гонадектомия е доказано наличието на гонадобластом с дисгермином на мястото на лявата гонада (фигура 38). Препоръчано е извършването на химиотерапия, но не е предприета. Една година по-късно с PET/CT скенер е открита 3 см формация, локализирана под диафрагмата. След хирургичното й отстраняване, с хистологично изследване се потвърждава метастазния й характер. Проведени са 2 курса на химиотерапия. В момента състоянието на пациентката е добро, провежда се перорална ХЗТ.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвенирането по Sanger на района, кодиращ *SRY* гена беше открита нова, непубликувана в базите данни мутация: c.325T>C, водеща до замяна на Фенилаланин с Левцин на позиция 109 (p.F109L). *SRY* генът беше изследван и при бащата на пациентката, но тази замяна не беше открита при него (фигура 27). Случаят е представен в една от публикациите по темата на дисертационния труд [Andonova, 2015]. Намерената мутацията p.F109L не е съобщавана в достъпните ни бази данни и се определя като „Probably damaging" от PolyPhen2, патогенна от SIFT и „Disease causing" от Mutation Tester. Замяната е на ароматната аминокиселина Фенилаланин с Левцин, имащ алифатна структура, което предполага, че структурата на белтъка се променя в голяма степен. И двете аминокиселини са неполярни и хидрофобни, но на съответната позиция при другите HMG-box мотиви по правило винаги е ароматна аминокиселина. Описана е замяна на аминокиселината Фенилаланин на същата позиция 109 със Серин [Jäger, 1992] – тя е открита освен при индексния пациент с 46,XY нарушение в половото развитие, също и при 4 живи родственици на пробанда, вкл. и при бащата. Авторите предполагат, че наблюдавания фенотип при засегнатия и при незасегнатите индивиди вероятно зависи от генетичния background при всеки един от тях или от фактори на средата.

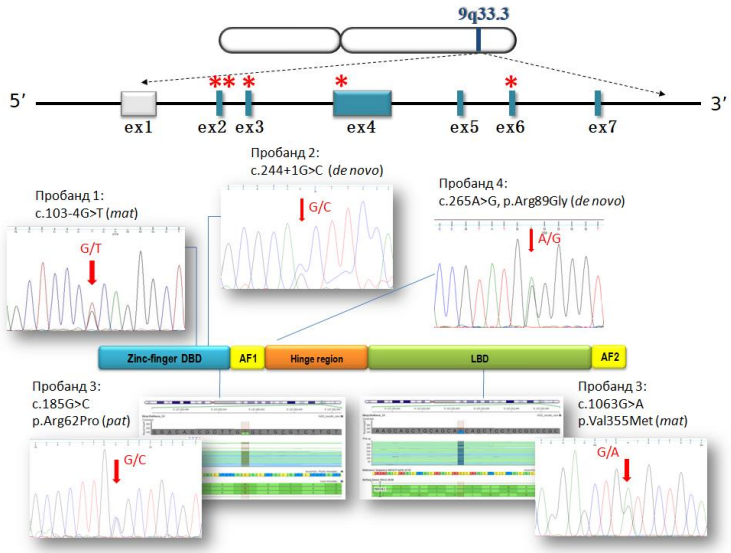


Фигура 27
Представяне на клиничен случай SRY 2 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извършения предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритата мутация

4.4.4. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD И МУТАЦИЯ В ГЕНА *NR5A1*

Мутации в гена *NR5A1* бяха открити при **четири** индексни пациента с 46,XY DSD на възраст между 1г и 3г (фигура 28). Трима от пациентите (пробанд 1 , пробанд 2 и пробанд 4) се презентираха с двойнствени гениталии, като са отглеждани в семействата си като момчета. Четвъртото дете (пробанд 3) беше с женски фенотип и работна диагноза синдром на андрогенната нечувствителност. Двама от пробандите (2 и 3) бяха от турски етнически произход. При извършените изследвания бяха открити 5 различни мутации в гена *NR5A1*: c.103-4G>T; c.244+1 G>C; c.185G>C(p.Arg62Pro), c.265A>G(p.Arg69Gly) и c.1063G>A(p.Val355Met). Две от мутациите бяха определени като нововъзникнали, докато за останалите 3 беше доказано носителство при родителите на пациентите.

	Случай	*възраст*	*cDNA*	*Protein*	*Protein*	*унаследяване*	*Цитат*
1	*NR5A1 / 1*	1 г	c.103-4G>T			Майка	Съобщавана
2	*NR5A1 / 2*	3 г	c.244+1G>C			*de novo*	Несъобщавана
3	*NR5A1 / 3*	2.5 г	c.185G>C	p.Arg62Pro	p.R62P	Баща	Несъобщавана, *има подобна*
			c.1063G>A	p.Val355Met	p.V355M	Майка	Съобщавана
4	*NR5A1 / 4*	1 мес	c.265A>G	p.Arg89Gly	p.R89G	*de novo*	Несъобщавана



Фигура 28

Обобщено представяне на откритите мутации в гена *NR5A1* при изследваните 4 пациенти с клинични данни за нарушения в половото развитие и кариотип 46,XY

До момента са известни повече от 188 патогенни варианта в *NR5A1* гена [Robevska, 2018; Fabbri-Scallet, 2019], като те са разпръснати из целия ген с преобладаване в DBD района (35%) и в LBD района (42.3%) без да има обособени горещи мутационни (*hotspot*) точки в него (фигура 44). Няма и зависимост между фенотипа на пациентите и локацията на патогенния вариант в *NR5A1*, както това беше наблюдавано до някаква степен и при българските пациенти с намерени мутации (фигура 28) .

СЛУЧАЙ NR5A1 / 1

Клинична картина

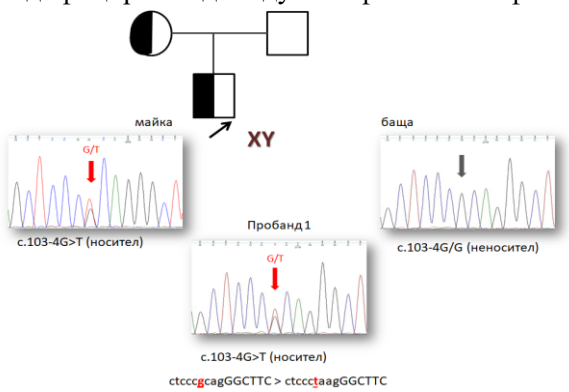
Пробандът е момченце на 1 година, родено от първа нормално протекла бременност при 28 годишна майка. Насочено за консултация със съмнения за хипогонадизъм/анорхия/гонадна дисгенезия и двойнствени гениталии. Описват се интерсексуални външни гениталии – микропенис с хипоспадия и хиперпигментация на скротумната торбичка. Скоро след раждането е било невъзможно палпирането на тестиси в скротумната торбичка, като на възраст около 1 год ехографски е установена формация вляво с размер 4/3 мм, суспектна на хипопластичен тестис. Вдясно не се визуализира тестис, не се палпира матка. Хормоналните изследвания показват повишени нива на LH и FSH и почти недоловими нива на Тестостерон; останалите хормонални нива са в норма. Цитогенетичното изследване показва кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвениране по Sanger на гена *SRY* не бяха открити мутации. При изследването на втория кандидат-ген *NR5A1* беше открит един вариант в хетерозиготно състояние G/T, разположен на 4 бази преди началото на екзон 3 на гена. Откритият вариант води до промяната ctccc**g**cagGGCTTC > ctccc**t**aagGGCTTC. Мутацията c.103-4G>T беше открита в хетерозиготно състояние и при майката на пробанд 1, бащата беше неносител (фигура 29).

Справка в базата данни EXAC показа, че откритата от нас замяна c.103-4G>T е съобщена при 1 Европейска ДНК проба сред **66 906** изследвани, но без данни за пола и възрастта на изследвания участник в проучването, както и за наличие на клинични данни, свързани пряко или косвено с някакво нарушение в половото развитие. Откриването на носителство на замяната c.103-4G>T при майката, в комбинация с очаквания полово-свързан автозомно-доминантен ефект на мутации в гена *NR5A1* може да прогнозира евентуално по-ранно изчерпване на яйчниковия резерв при майката.

Подобна на откритата в индексния ни пациент мутация, но разположена на 3 (а не на 4) бази преди началото на екзон 3 (c.103-3C>A) и засягаща акцепторното сплайс място на интрон 2 (ctccc**g****c**agGGCTTC > ctccc**g****a**agGGCTTC) е съобщена през 2009 г от Kohler. Описваният пациент е новородено дете с микропенис с тежка хипоспадия, недесцендирали ингвинални тестиси и леко хипопластичен скротум с пълна скротална сраединна фузия при раждането. Нивата на Тестостерон са ниски, без отговор след стимулиране с hCG, нисък Инхибин B и леко повишен FSH на 7-дневна възраст. С помощта на софтуер за предсказване на ефекта от възникнали мутации, за описаната от Kohler, 2009 замяна е определено, че засяга акцепторното сплайс място при интрон 2 - екзон 3. Ефектът от сплайс-сайт замените не винаги е пълен, като може да бъде синтезиран паралелно и нормален белтък, което е в съответствие с данните за по-лек фенотип при описвания от Kohler, 2009 пациент. Вероятно е също така да има влияние на други гени-модификатори, на епигенетични фактори или на фактори на средата , които да модифицират индивидуалия фенотип на фона на SF-1 хаплоинсуфициенция.



Фигура 29
Представяне на клиничен случай NR5A1/1 – родословие и резултат от генетичния анализ

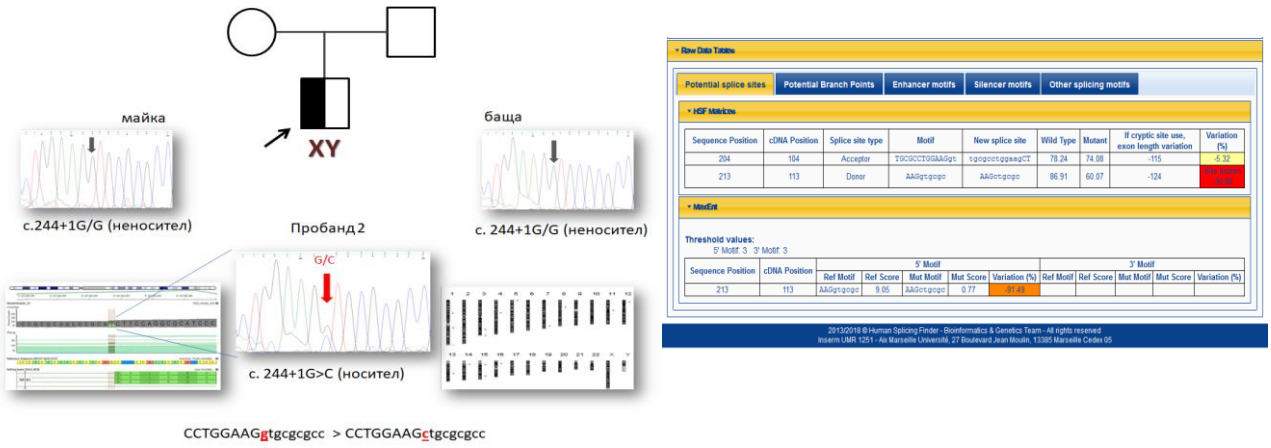
СЛУЧАЙ NR5A1 / 2

Клинична картина

Индексния пациент е дете на 3 г, родено от втора бременност в семейство без данни за близко родство, насочено за генетични изследвания с диагноза Двойнствени гениталии и микропенис, с вероятна парциална андрогенна нечувствителност. Наблюдават се неопределени гениталии с микропенис, тестиси не се палпират убедително. Детето е с лицев дисморфизъм – хипертелоризъм, тесни очни цепки, къс нос с екстровертирани ноздри, плоска основа на носа и малка уста. Има данни за хипотония и изпъкнали париетални тубери. В семейството не се съобщава за други подобни случаи, по-голяма сестричка се развива нормално. Извършеният цитогенетичен анализ показа кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

Тъй като детето беше насочено към НГЛ за потвърждаване или отхвърляне на парциална андрогенна недостатъчност, на първата стъпка беше изследван *AR* гена, но мутации не бяха открити. Поради описаните данни за малформации при пациета, на следващата стъпка от генетичните изследвания беше пристъпено към микрочипов анализ (*aCGH*), но и там не бяха открити геномни изменения извън бройни полиморфни вариации в копийните повтори. При извършването на секвениране от ново поколение чрез панела *TrueSight Inherited* в Клиника „Малинов" в гена *NR5A1* беше открита замяната **c.244+1 G>C**, разположена в интрон 3. Със секвениране по Sanger тази мутация не беше открита при изследването на родителите, което предполага възникването ѝ *de novo*. (фигура 30). С използването на он-лайн платформата Human Splicing finder откритата замяна беше оценена като вероятно патогенна.



Фигура 30
Представяне на клиничен случай NR5A1/2 – родословие и резултат от генетичните анализи, както и от извършеният предикционен анализ с он-лайн платформата Human Splicing finder за патогенността на откритата мутация

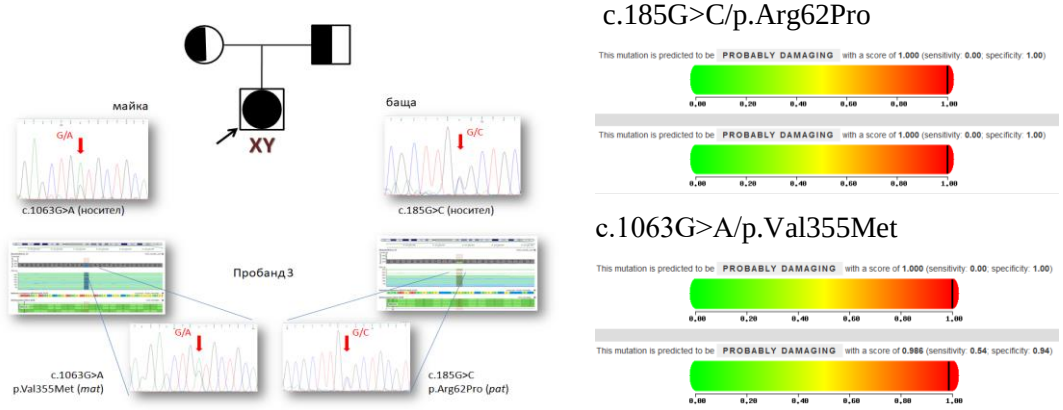
СЛУЧАЙ NR5A1 / 3

Клинична картина

Детето е родено от втора бременност в семейство след процедура за асистирана репродукция, но не разполагаме с данни за повода за пристъпване към нея. Родителите са от турски етнически произход и не им е известна родствена връзка между тях. Детето се отглежда като момиче, като след раждането са установени увеличени размери на лабиите и клитора. След първата година на майката прави впечатление, че клиторът е започнал да нараства. Има вход на влагалище, а в областта на дясната лабия се палпира окръглена формация с размери 2см/1см. Кариотипът на детето е 46,XY. При лапарокопия, извършена 2.5 годишна възраст заради ингвинална херния вдясно са изказани са съмнения за овотестис друстранно. Хистологичните изследвания на препарати след биопсия на тестисите показват наличие на нормална тестикуларна тъкан. Не са открити мутации в гена *SRD5A2*. На ЯМР на малък таз не се визуализира структура с макроморфология на матка. Над перинеума има данни за мекотъканен участък, наподобяващ корена на хипопластичен пенис. В двата ингвинални канала се изобразяват овални структури, като недесцендирали тестиси.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвениране по Sanger на гена за *SRY* и гена за *AR* мутации не бяха открити. На по-късен етап стана възможно пациентката да бъде изследвана чрез новогенерационно секвениране в Клиника „Малинов". В хетерозиготно състояние бяха открити две мутации в гена *NR5A1*: c.185G>C/p.Arg62Pro и c.1063G>A/p.Val355Met. Чрез секвениране по Sanger беше извършен потвърдителен и сегрегационен анализ при пациентката и двамата й родители. Мутациите бяха открити при детето, а родителите бяха доказани като хетерозиготни носители. При майката имаше носителсто на варианта c.1063G>A/p.Val355Met (съобщавана в литературата), а при бащата – на варианта c.185G>C/p.Arg62Pro, който не е съобщаван в базите данни (фигура 31). Интересно е, че при пробанда липсата на андрогенизация е още при раждането, което показва, че нарушението на работата на Лайдиговите клетки е настъпило още по време на пренаталния живот на индивида. За разлика от тях, ембрионалните Сертолиеви клетки изглежда са функционирали нормално достатъчно дълго време, за да произведат адекватното количество АМН, необходимо за предизвикване на пренаталната регресия на Мюлеровите структури.



Фигура 31
Представяне на клиничен случай NR5A1/3 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извъшения предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритите мутации

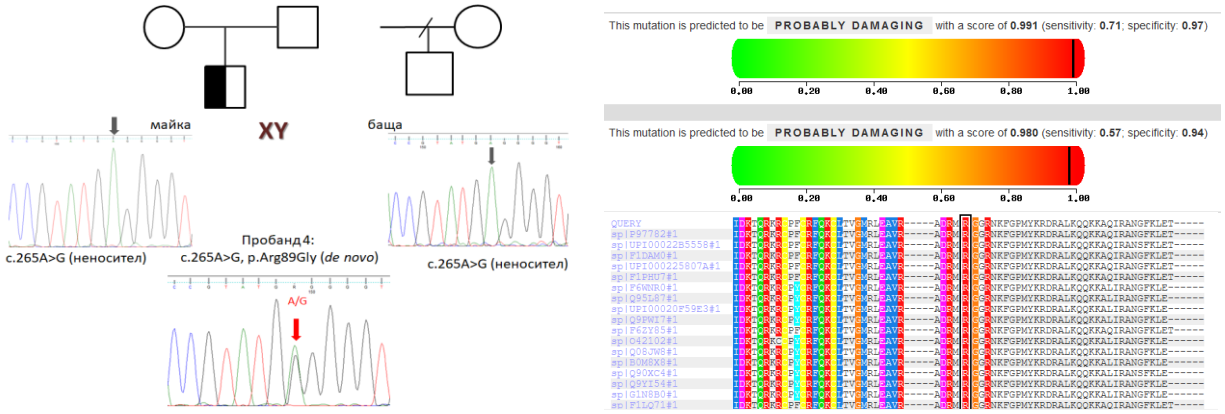
СЛУЧАЙ NR5A1 / 4

Клинична картина

Четвъртият пробанд с открита мутация в *NR5A1* гена беше дете на възраст 1 месец, родено от първа нормално протекла бременност, след стимулирана овулация. Веднага след раждането е установена аномалия на гениталиите – скротална хипоспадия и бифиден скротум, със силно хипопластични *labia minora*, скротално девииран пенис, като браздата на *glans penis* е на анатомичното място на *orificium urethrae ext*. Цитогенетичният анализ открива кариотип 46,XY. Съгласно снетата анамнеза, при бащата е извършвана операция във връзка с ингвинална херния, той има пълнолетен син от предишен брак, без съпътстващи заболявания.

Молекулярно-генетичен анализ

При извършеното секвениране по Sanger на гена *NR5A1* беше открита замяната c.265A>G в хетерозиготно състояние. Вариантът е разположен в екзон 4 на гена и води до замяна на аминокиселината Аргинин с Глицин на позиция 89 на синтезирания протеин – локализира се в ДНК-свързващия домейн (DBD) на стероидогенния фактор-1. Носителство на мутацията не беше открито при двамата родители (фигура 32).



Фигура 32
Представяне на клиничен случай NR5A1/3 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извъшения предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритата мутация

4.4.5. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD и СИДРОМ НА ДЕНИС-ДРАШ С ТУМОР НА УИЛМС

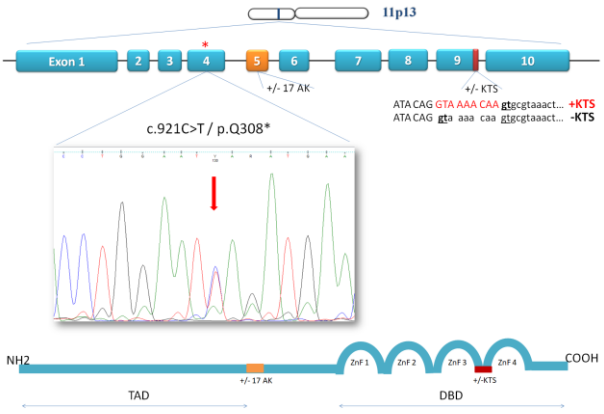
	Случай	*Год*	*cDNA*	*Protein*	*Protein*	*унаследяване*	*Цитат*
1	*WT1 / 1*	18	c.325T>C	p.Gln308Ter	p.Q308X	*de novo*	Съобщавана

Клинична картина

Касае се за момиче на 19г възраст с овариална дисфункция и съмнения за синдром на Денис-Драш. Родена от втора нормално протекла бременност, с нормално физическо и психическо развитие, като на 2 годишна възраст е установена бъбречна формация, а на 3 години е извършена радикална екстирпация на тумора с десностранна нефректомия. Хистологичния резултат показва данни за тумор на Уилмс, без туморни инфилтрации в околната тъкан и с нормална надбъбречна тъкан. Като съпътстваща находка са установени хипоплазия на гонадите и агенезия на матката. Проведеният цитогенетичен анализ показва кариотип 46,XY. На 5 годишна възраст е извършена коригираща операция на външните гениталии, а в началото на пубертета е започнато хормонално заместително лечение. Не се откриват матка и аднекси с ЯМР. УЗ преглед показва хипопластични яйчници, агенезия на матката, ВПО – Прадер, III степен, млечни жлези - Таннер III.

Молекулярно-генетичен анализ

В хетерозиготно състояние в екзон 4 на гена *WT1* беше установена единичната нуклеотидна замяна c.921C>T (p.Q308X / p.Gln308Ter) (фигура 33). Замяната води до възникване на преждевременен стоп-кодон на позиция 308 **C**AG>**T**AG и терминиране на транскрипцията / транслацията. При проверка на достъпните бази данни с резултати от извършвани анализи с новогенерационно секвениране в различни лабратории по света, беше открито едно съобщение за такава замяна в хетерозиготно състояние (*rs865829249*), но няма информация за пола и възрастта на индивида, при който е открита, както и за клиничния му статус.



Фигура 33

Мутацията в гена *WT1* , открита при изследваната пациентка с клинични данни за нарушения в половото развитие, кариотип 46,XY и синдром на Денис-Драш

Като цяло, *nonsense* мутации при пациенти със синдром на Денис-Драш се описват по-рядко в литературата – има съобщени по-малко от 30 такива мутации, които се откриват на практика по цялата дължина на гена [Wagner, 2003]. Справката в достъпната литература и в базата данни HGMD показва две други хетерозиготни **nonsense** мутации в екзон 4 на *WT1* гена, в домейна, отговарящ за транскрипционната активност на белтъка - p.Trp306X, c.917G>A и p.K313X, c.946C>T (по новата номенклатура) [Jeanpierre, 1998, da Silva, 2011].

4.4.6. Представяне на клиничните случаи на пациентки с клинични данни за 46,XY DSD и БЕЗ ОТКРИТА ГЕНЕТИЧНА НАХОДКА

Без достигане до ДНК диагноза са 8 пациентки с женски фенотип и кариотип 46,XY (две от тях – сестри), които бяха насочени към нас за генетични изследвания. При тях не бяха открити мутации при изследването на гените, които бяха обект на нашето изследване: *AR, SRD5A2, NR5A1, SRY*.

ОБОБЩЕНИЕ – ИЗВЪРШЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА МОНОГЕННИ СЪСТОЯНИЯ, СВЪРЗАНИ С НАРУШЕНИЯ В ПОЛОВОТО РАЗВИТИЕ

От извършените генетични изследвания при 29 пациенти с данни за нарушения в половото развитие от групата 46,XY DSD, генетична диагноза беше успешно поставена при 21, а без открити мутации в изследваните гени бяха 8 от тях. Най-честата причина за 46,XY DSD в събраната група от пациенти беше **синдромът на Андрогенната нечувствителност** (AIS) - диагностициран при 10 от тях. Възрастта на насочване за генетични изследвания при CAIS пациентките ни е между 8 и 51 години, като най-често е между 15 и 18 години (67% от изследваните). Три от клиничните случаи са от едно семейство.

При четири пациенти на възраст 2 г, 14 г, 36 г и 44 г беше достигнато до генетичната диагноза **дефицит на 5-α-редуктаза тип 2**, което постави и България на световната карта на разпространение на това състояние. При две пациентки (на възраст 16 г и 17 г) с **пълна гонадна дисгенезия** беше открита нововъзникнала мутация в гена *SRY*, което въответстваше на поставената клинична диагноза. Мутации в гена *NR5A1*, кодиращ стероидогенния фактор-1 бяха открити при 4 пациенти на възраст между 1 мес и 3 годони, с данни за **нарушение в половото развитие**. Трима от пациентите се отглеждат в семействата си като момчета и при тях е открито хетерозиготно носителство на 1 мутация; момиченцето (на възраст 2.5 г) е хетерозиготен носител на две мутации, унаследени от двамата родители. При пациентката с клинични данни за **синдрома на Денис-Драш** беше установено хетерозиготно носителство на мутация в единствения кандидат-ген *WT1*.

При 8 пациентки с женски фенотип и клинични данни за нарушения в половото развитие от групата 46,XX DSD **не беше достигнато до изясняване** на генетичните основи на състоянието. Изследваните са на възраст от 1 ден до 40 г, като болшинството (75%) са на възраст между 12 и 22 години, със средна възраст при тях – 17 г. Две от пациентките са сестри, което води до очакването за евентуално автозомно-рецесивно състояние.

4.5. ПОДХОДИ НА ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С НАРУШЕНИЯ В ПОЛОВОТО РАЗВИТИЕ

Когато в кабинета на клиничния специалист влезе пациент с малформация на гениталиите или с фенотип, който не съответства на носения набор полови хромозоми, алгортимите на работа определят търсенето на допълнителна клинична информация – хормонални и метаболитни тестове, образна диагностика (УЗ, ЯМР), генетични изследвания. Намирането на генетични патогенни варианти в гени, асоциирани с DSD състоянията има голямо значение за потвърждаването на клиничната диагноза и по-нататъшното терапевтично поведение [Wisniewski, 2019]. Намирането на генетични варианти в райони, за които не е известна връзка с нарушенията в половото развитие обаче не предлага решение на случаите.

Съгласно предложения обобщен консенсус за работа с индивиди с предполагаемо състояние от спектъра на нарушенията в половото развитие [Cools, 2018], при всички тях следва да се пристъпи към извърпване на поредица от диагностични изследвания – в т.ч. оценка на тялото и на външните гениталии, извършване на образна диагностика и на биохимични и генетични изследвания. Всички получени резултати следва да бъдат общо дискутирани от мултидисциплинарна работна група. На таблица 23 са представени възможните подходи за генетични изследвания, уместни за използване при търсенето на генетичните основи на възникване на нарушения в половото развитие. Диагностичният процес в някои случаи обаче може да се окаже твърде продължителен и много стресиращ от пациентите и техните семейства. Получаването на диагноза на молекулярно-генетично ниво би могло да има важно прогностично значение за хода на клиничното състояние и съставянето на индивидуализиран план за конкретния пациент, както и ще позволили извършването и на медико-генетична консултация на семейството.

Първа стъпка от генетичните анализи е **определянето на генетичния пол** на пациента на хромозомно ниво – това ще помогне дефинирането на подгрупата на DSD състоянията: свързани с вариации в половите хромозоми, 46,XX DSD или 46,XY DSD. Този етап може да бъде осъществен при особено спешни ситуации и в рамките на 1 ден чрез използването на QF-PCR анализ.

Извършването на **биохимични изследвания** следва да бъде със същия приоритет, както генетичните, тъй като в случаите на липса на генетична диагноза биохимичните резултати могат да насочат към основната причина за състоянието, както и да помогнат при избора на ефективна хормонална терапия. При всички новородени или малки деца, със съмнения за някаква презентация на DSD състояние следва да бъдат извършени пълни анализи на стероидния профил с оглед да се избегне потенциално животозастрашаващо състояние, каквото е остра надбъбречна недостатъчност. Тук се включват 46,XY DSD, дължащи се на StAR или P450scc дефицити, както и 46,XX DSD състояния с вирилизираща форма на ВНХ, като дефицити на 21-хидроксилаза, 11-β-

хидроксилаза или 3-β-хидроксистероид дехидрогеназа. За най-точно измерване на нивата на стероидните хормони се препоръчва използването на хроматографските mass-спектрофотометрични методи за анализ. За съжаление обаче тези методи все още не са масово приложими, а междулабораторното стандартизиране на лабораторните методиките е едва в началото [Cools, 2018]. Специфичния стероиден профил в урина и/или в плазма обаче може бързо да насочи към определен конкретен прицелен ген, който да бъде секвениран по Sanger или с NGS [Audi, 2018].

Изследването за вариации в **броя на копийните варианти** CNV може да бъде извършено на първия етап както при 46,XX DSD, така и при 46,XY DSD състояния, особено ако фенотипът на пациента включва малформации и в други системи, освен тези в пикочо-половата система или има съмнения за синдромно състояние.

Прилагането на **таргетно секвениране по Sanger** на конкретен ген/гени е оправдано при случаи на сигурна клинична диагноза при добре разпознаваеми състояния, каквото е пълната форма на синдрома на андрогенната нечувствителност (CAIS). Хетерогенната природа на състоянията от спектъра на нарушенията в половото развитие обаче може да доведе до удължаване на времето на анализ, изследвайки потенциалните кандидат-гени един по един, а това да направи чакането мъчително за засегнатото семейство. Голямо предимство при търсенето на генетичните основи на изследваните състояния дават **изследванята от ново поколение**, които все по-широко навлизат в рутинната практика. Въпреки предимствата, които ни дава развитието на новите генетични технологии с цялостно обхващане на генома, не бива да се забравя обаче, че все още при около 50% от индивидите с 46,XY DSD състояния не може да се достигне до сигурна генетична диагноза, което все повече насочва вниманието ни към възможното ключово значение на неидентифицирани досега регулаторни механизми.

Много от генетичните варианти при DSD се откриват в гени, кодиращи транскрипционни фактори – *SRY, SOX9, NR5A1, FOXL2*. Може да се предположи, че поне част от неизвестните генетични варианти при случаите на тежка клиника на DSD състояние вероятно се намират в некодиращи части на регулаторни елементи, което може да бъде изяснено евентуално с използването на **пълно геномно секвениране** WGS. Тези стратегии са по-гъвкави отколкото онези, стъпващи върху конкретни готови генни панели и позволяват откриването на нови кандидат-гени за DSD състоянията. Не бива да се забравя, че едно от най-големите предизвикателства при работата с WES/WGS остава съобщаването и интерпретацията на откритите варианти, особено по отношение на тези с неясно клинично значение (VUS – *variants of unknown significance*) или случайните находки, привидно несвързани с насочващото състояние.

Таблица 12

Сравнение на използваните техники за търсене на генетичните основи на състоянията от спектъра на нарушенията в половото развитие

Техника	Приложение за DSD диагностицирането	Предимства	Ограничения / предизвикателства
QF-PCR	• Откриване на анеуплоидии по половите хромозоми • Определяне на генетичния (хромозомен) пол	• Относително бърз метод 1-2 дена. • Първа линия генетични изследвания за определяне насоката за клинична диагноза.	• Използва специфични генетични маркери. • Трудности с мозайките. • Не може да установи хромозомни пренареждания (транслокации)
Кариотипиране	• Откриване на анеуплоидии по половите хромозоми, в .т.ч 45,X или 47,XXY, както и мозаицизъм	• Възможност за откриване на анеуплоидии, както и структурни хромозомни аномалии и мозайки.	• Относително ниска резолюция - не може да открива аномалии под 5Mbp. • По-бавен от QF-PCR: отнема около 10 дена
array CGH (сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове)	• Откриване на генни делеции и дупликации	• Възможност за откриване на делеции и дупликации извън разделителната способност на светлинния микроскоп. • Възможност за анализиране на практика на почти всички геномни райони.	• Затруднения в интерпретацията на данните, касаещи бройните вариации в определени райони (CNVs) • Често има нужда от изследване и на родителски ДНК проби. • Невъзможност за откриване на балансирани хромозомни пренареждания.
MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification)	• Откриване на суб-микроскопски делеции/дупликации, засягащи конкретни гени (напр. *CYP21A2*, *SRD5A2* и др.)	• Веднъж въведен в рутинната практика на дадена лаборатория е относително стабилен анализ. • Обикновено резултатите са еднозначни.	• Анализиране само на конкретни гени. • Технологията не е подходяща за откриване на точкови мутации.
Секвениране по **Sanger**	• Откриване на точкови мутации и малки делеции/дупликации в конкретни гени (напр. *AR, NR5A1, SRY, SRD5A2, HSD17B3, MAMLDl, DAX1, WT1*)	• Необходиното оборудване, софтуер и апаратура (PCR апарати и автоматичен секвенатор) обикновено са налични във всяка генетична лаборатория	• Времеемко и трудоемко при анализиране на големи гени или на няколко по-малки гени. Това оскъпява анализа.
Прицелен NGS Масивно паралелно секвениране на панели с гени, имащи опношение към DSD	• Едновременно анализиране и скриниране за мутации на разширен панел от DSD-свързани гени. • Все по-широко се използва в практиката	• Възможност за анализиране на много гени едновременно • Възможност за откриване на големи делеции/дупликации с количествен анализ на броя ридове в даден район	• Трудности в интерпетирането на откриваните варианти с неизвестно значение (VUSs). • Висока цена за модифициране на пред-селекционния панел (напр. за въвеждане на допълнителни гени). • Генерират се големи файлове с данни. • Необходимост от скъпи консумативи и апаратура.
WGS / WES Цялостно геномно / цялостно екзомно секвениране с последващ биоинформатичен анализ на прицелни DSD-гени	• Едновременно скриниране за мутации на голям панел от DSD-свързани гени. • Позволява (при определени условия) откриването на гени, които до този момент не са били разпознати като свързани с DSD	• Възможност за анализиране на много гени едновременно. • Оносително лесно биоинформатично модифициране на групата гени, които представляват интерес. • При достигане на добра дълбочина на четене – може да се анализират и бройни копийни повтори.	• Трудности в интерпетирането на откриваните варианти с неизвестно значение (VUSs) и при WGS – на интронни и междугенни варианти. • Генериране на огромни файлове с данни. • Необходимост от много скъпи консумативи и апаратура, обработка и съхранение на данните. • Много бързо променящи се методики. • Необходимост от често преанализиране на резултатите във връзна с непрекъснато обновяващата се информация в базите данни • Етични въпроси, касаещи потенциалното откриване на клинично-важна информация.

Генетичните и хормоналните изследвания следва да бъдат задължително допълващи се, като ключово значение има събирането на клиничните и генетичните данни в **общ регистър с бази данни** (какъвто е напр. *I-DSD Registry*) [Audi, 2018].

Всички тези препоръки се основават единствено на наличните към момента данни и технологии за анализ и следва да бъдат обсъждани като такива спрямо конкретните условия на местно ниво в конкретните държави и действащи здравни системи. Ясно е, че в много страни и региони по света липсват ресурси и възможности да бъдат извършвани дори и основни изследвания на засегнатите от DSD хора. На други места част от нуждаещите се хора не винаги имат достъп до такива медицински изследвания, въпреки, че има достатъчно ресурси за извършването им.

4.6. ПРЕДЛОЖЕНИЕ ЗА ПАНЕЛ ОТ DSD-АСОЦИИРАНИ ГЕНИ

От началото на използването на NGS технологията измина време, но новите технологии продължават да променят пейзажа на генетичните изследвания. Възможностите за изследване на цялата екзомна последователност на генома (WES), вместо определени райони на прицелни гени съществено промени диагностичните изследвания и нашите разбирания, особено по отношение на мултигенните състояния. Някои автори вярват, че най-ефективната стратегия за идентифициране на генетичната основа на DSD състоянията са именно WES изследванията. Много са данните, които демонстрират предимствата на NGS панелите при използването им за изследване на силно хетерогенни състояния, каквито са и нарушенията в половото развитие. На таблица 13 са предствени предложенията за включване на гени, асоциирани с DSD състоянията (А.) и на набор от гени, подходящи за включване в NGS панел за едновременно генетично изследване (Б.) при пациенти с неясна етиология на състоянието.

Ако при пристъпването към генетични изследвания се разполага само с ДНК проба от пробанда, стратегията на генетичните изследвания предполага оценка на резултатите от новогенерационното секвениране само за гени, асоциирани с DSD. Това позволява бързо идентифициране на варианти в тези гени, но ако не бъдат открити никакви варианти, тогава резултатът би бил негативен. Изследването на триоси (пробанд, майка и баща) обаче позволява проверката на трите индивидуални екзома едновременно и сравняването на всички открити варианти. Средно се очаква този брой да бъде около 20 000 / проба, в сравнение с референтната секвенция, но по-голямата част от тях се унаследяват, като по този начин може да се отдиференцират лесно *de novo* възникналите хетерозиготни варианти, в допълнение към откритите хомозиготни или съставно-хетерозиготни варианти, унаследени от незасегнатите родители.

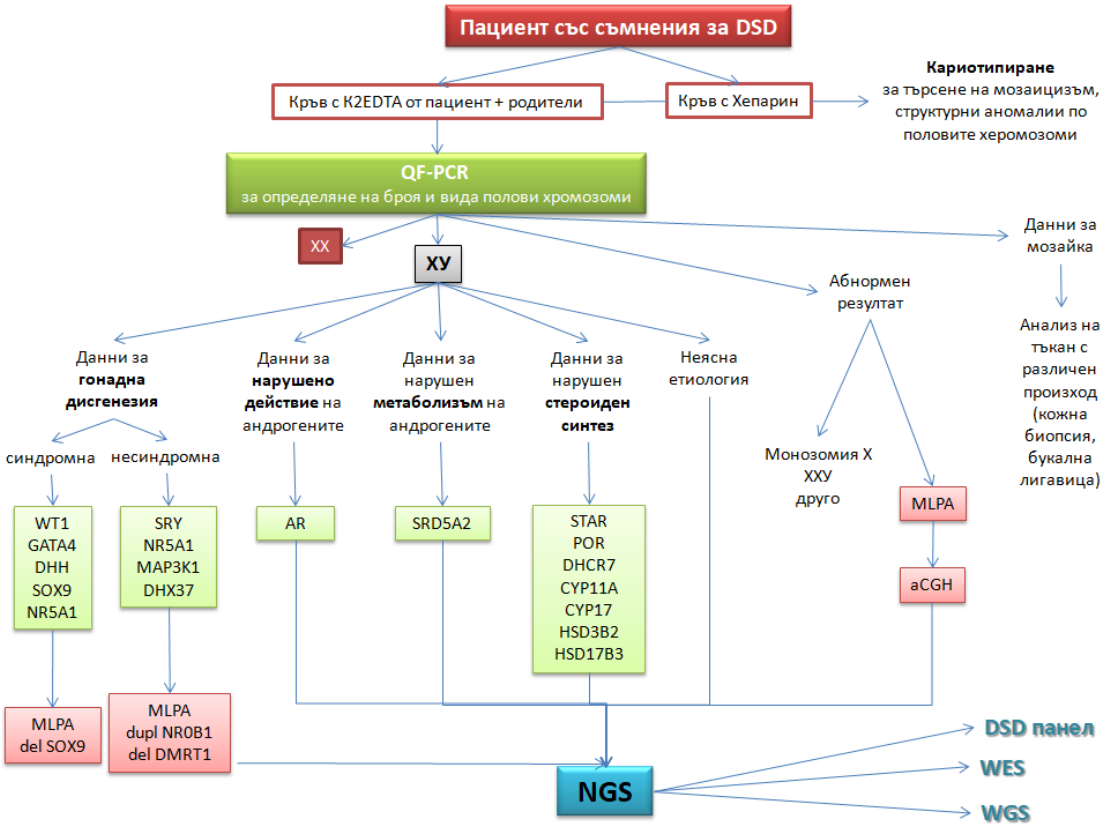
Таблица 13

А. DSD-свързани гени (по азбучен ред), подходящи едновременно изследване на първата стъпка от генетичните анализи – напр. в панели за NGS /адаптирано по Kyriakou, 2015/

Ген	OMIM #	Асоцииран фенотип
AR	300068	Синдром на андрогенната нечувствителност
CYP21A2	201910	21-хидроксилазен дефицит
MAMLD1	300120	Хипоспадия
HSD17B3	264300	Дефицит на 17-β-хидроксистероид дехидрогеназа тип III
NROB1	300018	46,XY sex reversal
NR5A1	612965	46,XY sex reversal; XX преждевременна овариална недостатъчност
SRD5A2	264600	Дефицит на 5-α-редуктаза тип 2
SRY	400044	46,XX тестикуларни DSD; 46,XY овариални DSD

Б. Разширен панел от гени (по азбучен ред), за включване в едновременно генетично изследване, в случаите при които не са открити мутации в гените от листа за първа стъпка (отбелязани тук с *) генетични анализи

AKR1C2	*AMH*	*AMHR2*	***AR****	*ARX*	*ATRX*	*BMP4*	*BMP15*	*CBX2*
CYB5A	*CYP11A1*	*CYP11B1*	*CYP17A1*	*CYP19A1*	*CYP11A1*	***CYP21A2****	*DHCR7*	*DHH*
DMRT1	*DMRT2*	*EMX2*	*FGF9*	*FGFR2*	*FOG2*	*FOXL2*	*FSHR*	*GATA2*
GATA4	*HOXA13*	*HSD3B2*	***HSD17B3****	*INSL3*	*LGR8*	*LHCGR*	*LHX9*	***MAMLD1****
MAP3K1	***NR0B1****	***NR5A1****	*NOBOX*	*POR*	*P450scc*	*RSPO1*	*SOX3*	*SOX9*
SOX10	***SRD5A2****	***SRY****	*STAR*	*TSPYL1*	*WWOX*	*WNT4*	*WT1*	



Фигура 34

Предложение на молекулярно-генетичен подход при изследване на пациенти от групата 46,XY нарушения в половото развитие. Графиката показва потенциалната последователност от използване на технологиите за генетичен анализ при търсенето на генетичната етиология на тези състояния. Стрелките указват последователността на извършването им, на база познанията към този момент на молекулните дефекти, асоциирани с 46,XY DSD

За пациентите обаче приоритетно остава бързото поставяне на сигурна диагноза, което да им помогне да се справят с предизвикателствата, които им носи тази реалност и да продължат напред с ефективни и информирано обосновани стратегии на клиницистите, както и с възможно най-доброто качество на живот и минимални травми за тях и техните семейства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Един от ключовите и определящи човешкия живот моменти настъпва в самото начало на развитието ни – когато организмът поема мъжкия или женския път. Начинът, по който се определя пола отдавна удивлява човека, а всяка бременност - с очакването, което носи с информацията за пола на бебето, напомня за мистериозната сложност на половото развитие. Разбирането на този процес би позволило не само дешифрирането на механизмите и физиологията на възпроизводството на вида, но и знанията за мъжкото и женското начало. За съжаление ние непрекъснато се изправяме срещу предизвикателствата както на не толкова съвършените диагностични възможности, с които разполагаме, така и на все още неизвестното в познанията ни по темата и обработката и осмислянето на масивите от данни, които се генерират при използването на новите технологии.

Достигането на генетична диагноза за семействата с DSD може да се превърне в една от първите стъпки, с които те ще се опитат да продължат напред в бъдещето и да изградят живота си, отговаряйки си на много въпроси.

Изясняването на човешкото гонадно развитие и на половата ни диференциация би помогнало и за правилното диагностициране и ефективно клинично проследяване на пациентите с DSD.

Важно е да се отбележи, че въпреки огромния напредък в разбирането на половата детерминация при бозайниците, при много пациенти с DSD все още не може да бъде получена сигурна генетична диагноза. Със все по-широкото въвеждане в практиката на иновативните изследвания каквото е секвенирането от ново поколение, тази ситуация би могла да бъде променена.

5. ИЗВОДИ

1. Въведеният молекулярно-генетичен подход за определяне на анеуплоидни състояния, в т.ч. и по половите хромозоми, има диагностична стойност и е приложим при дородова и послеродова диагностика.

2. Молекулните дефекти в изследваните гени включват както точкови мутации, така и по-големи преустройства, което налага използването на различни диагностични методи за анализ.

3. Отчита се относително висок дял на *de novo* възникналите молекулни дефекти в изследваната група (около 30%), което е от съществено значение при провеждане на генетичното консултиране и проследяване на фамилната сегрегация.

4. Характерът на молекулните дефекти в изследваните гени, включващи редки и неописвани мутации, представя подчертана алелна хетерогенност при тези състояния.

5. Установените генетични дефекти имат различен модел на унаследяване и изява, което е свързано с трудности при поставяне на клиничната диагноза.

6. Включването на технологиите от ново поколение в диагностичния подход за нарушенията в половото развитие ще даде възможност за повишаване на успеваемостта при изясняване на генетичните основи на тези състояния.

6. ПРИНОСИ

Приноси с методичен характер:

1. За пръв път в България е въведен и верифициран QF-PCR методът за ДНК откриване на анеуплоидии.

2. Поставено е началото на молекулярно-генетичната диагностика на нарушенията в половото развитие у нас, като за първи път тези състояния биват генетично охарактеризирани при български пациенти.

Приноси с научно-приложен характер:

3. Получените разултати са приложени при прецизирането на клиничната диагноза и последващото терапевтично поведение при част от пациентите.

4. Новооткритите мутации в изследваните гени обогатяват базите данни за редки болести и дават възможност за дородова диагностика в засегнатите семейства и за изследване на близки родственици.

7. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Andonova S**, Robeva R, Vazharova R, Ledig S, Grozdanova L, Stefanova E, Bradinova I, Todorov T, Hadjidekov G, Sirakov M, Wieacker P, Kumanov P, Savov A. New Territory for an Old Disease: 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency in Bulgaria. Sex Dev. 2017;11(1):21-28.
   IF = 1.913 Забелязани цитирания в Scopus: 6

2. **Andonova S**, Robeva R, Sirakov M, Mainhard K, Tomova A, Ledig S, Kumanov P, Savov A. A Novel SRY Gene Mutation p.F109L in a 46,XY Female with Complete Gonadal Dysgenesis. Sex Dev. 2015;9(6):333-7.
   IF = 2.164 Забелязани цитирания в Scopus: 4

3. **Andonova S**, Dimitrova V, Boneva I, Kremensky I. A case of a bloodstained amniotic fluid sample from a pregnant woman with Down syndrome analyzed by QF-PCR after low-speed centrifugation. Prenat Diagn. 2008 May;28(5):457-9.
   IF=1.596 Забелязани цитирания в Scopus: 1

4. **Andonova S**, Vazharova R, Dimitrova V, Mazneikova V, Toncheva D, Kremensky I. Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria-estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18. Prenat Diagn. 2004 Mar;24(3):202-8.
   IF = 1.612 Забелязани цитирания в Scopus: 18

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР = 7.285

8. УЧАСТИЯ С ПРЕДСТАВЯНЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА:

Постери

1. Дефицит на 5-алфа-редуктаза тип 2: (не)вероятната генетична диагноза при ХУ-жени? Постер 9. **Силвия Андонова** 10-та Национална конференция за редки болести и лекарства сираци, 13-15.09.2019 г. Пловдив.
2. Dyzigotic sex-discordant IVF-ICSI twins with blood but not tissuechimerism; **S.Andonova**, S.Hadjidekova, R.Staneva, M.Mihova, B.Zaharova, A.Savov; European Human Genetics Conference in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics; June 16–19, 2018, Milan, Italy
3. A rare case of a 46,XY female with Diabetes Mellitus, Craniosynostosisand subsequently found Gonadaldysgenesis: impact of multidisciplinary team work, M. Georgieva, **S. Andonova**, A. Balabanova, I. Bradinova, A. Savov, T. Todorov, L. Grozdanova, M. Sirakov, S. Kedikova, V. Ivanova, G. Hadjidekov, Варна, 2017
4. Molecular analysis of AR gene in fourteen female patients with 46,XY - advances of two generations of sequencing; **S. Andonova**, R. Vazharova, L. Grozdanova, R. Robeva, I. Bradinova, E. Stefanova, L.Balabanski, S. Ivanov, D. Toncheva, P. Kumanov, M. Sirakov, A. Savov; European Human Genetics Conference 2016; May 21-24, 2016, Barcelona, Spain
5. 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis with Late Diagnosis, W. Mladenov, **S.Andonova**, A.Savov, M.Hachmeryian, R.Popova, V.Iotova, 55th Annual Meeting of the ESPE, 10-12 September 2016, Paris, France
6. Current state of diagnostic approach to disorders of sexual development in neonatal period. A case report of an infant with genital ambiguity. N. Jekova, I.Boneva, **S. Andonova**, Ir. Bradinova, A. Savov, 1st Congress of joint European Neonatal Societies (jENS) / 56th ESPR/ESN Annual Meeting / 5th International Congress of UENPS • Budapest, Hungary • September 16th-20th 2015
7. Rare case of familial XY complete gonadal dysgenesis. R.Vazharova, **S.Andonova**, S.Ledig, P. Wieacker, R.Robeva, P.Kumanov, A.Savov, M. Sirakov; International Symposium on DSD, 11 - 13 Jun 2015, NV Zebrastraat, Ghent, Belgium
8. Molecular analysis of the AR gene in two patients with 46,XY CAIS - a recurrent (p.Agr616His) and a novel (p.Ile842Asn) mutations. **S.Andonova**, R.Vazharova, R.Robeva, P.Kumanov, A.Savov, M. Sirakov; International Symposium on DSD, 11 - 13 Jun 2015, NV Zebrastraat, Ghent, Belgium

Лекции

Лекция „Генетични изследвания при ХУ жени", С.Андонова, Симпозиум „Генетика и епигенетика на човешките болести", част от Симпозиуми „Акад. Чудомир Начев", организиран от БАН, МУ-София, БНАМ, СЮБ, 24.11.2018г гр. София

9. БИБЛИОГРАФИЯ

Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Feb;85(2):658-65.

Bagheri-Fam S, Ono M, Li L, et al. FGFR2 mutation in 46,XY sex reversal with craniosynostosis. Human Molecular Genetics. 2015;24(23):6699-6710.

Audi L, Fernández-Cancio M, Carrascosa A, et al Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Apr;95(4):1876-88.

Audi L, Ahmed SF, Krone N, Cools M, McElreavey K, Holterhus PM, Greenfield A, Bashamboo A, Hiort O, Wudy SA, McGowan R; The EU COST Action. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. Eur J Endocrinol. 2018 Oct 1;179(4):R197-R206.

Croft B, Ayers K, Sinclair A & Ohnesorg T. Review disorders of sex development: the evolving role of genomics in diagnosis and gene discovery. Birth Defects Research Part C: Embryo Today 2016 108 337–350.

Chávez B, Valdez E, Vilchis F. Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Sep;85(9):3147-50.

Cools M, Nordenström A, Robeva R, Hall J, Westerveld P, Flück C, Köhler B, Berrra M, Springer A, Schweizer K et al. Caring for individuals with a difference/disorder of sex development (DSD) across the life span: an expert opinion. Nature Reviews Endocrinology 2018 14 415–429.

da Silva TE, Nishi MY, Costa EM, Martin RM, Carvalho FM, Mendonca BB, Domenice S. A novel WT1 heterozygous nonsense mutation (p.K248X) causing a mild and slightly progressive nephropathy in a 46,XY patient with Denys-Drash syndrome. Pediatr Nephrol. 2011 Aug;26(8):1311-5.

Deeb A, Mason C, Lee YS, Hughes IA. Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Jul;63(1):56-62.

Giwercman Lundberg Y, Nikoshkov A, Lindsten K, Byström B, Pousette A, Knudtzon J, Alm J, Wedell A. Response to treatment in patients with partial androgen insensitivity due to mutations in the DNA-binding domain of the androgen receptor. Horm Res. 2000;53(2):83-8.

Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. Hum Mutat. 2012 May;33(5):887-94. doi: 10.1002/humu.22046. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22334387.

Gast A, Neuschmid-Kaspar F, Klocker H, Cato AC. A single amino acid exchange abolishes dimerization of the androgen receptor and causes Reifenstein syndrome. Mol Cell Endocrinol. 1995 Apr 28;111(1):93-8.

Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zöllner A, Sinnecker GH. Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. German Collaborative Intersex Study Group. Hum Mol Genet. 1994 Jul;3(7):1163-6.

Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. Am J Med Genet. 1996 May 3;63(1):218-222.

Holterhus PM, Wiebel J, Sinnecker GH, Brüggenwirth HT, Sippell WG, Brinkmann AO, Kruse K, Hiort O. Clinical and molecular spectrum of somatic mosaicism in androgen insensitivity syndrome. Pediatr Res. 1999 Dec;46(6):684-90.

Gyorki S, Warne GL, Funder JW. Photoaffinity labelling with [3H]R1881 of androgen receptors from human cultured genital fibroblasts of normal individuals and patients with androgen receptor abnormalities. J Steroid Biochem. 1988 Jun;29(6):611-5.

Fabbri-Scallet H, de Sousa LM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, de Mello MP. Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. Hum Mutat. 2020 Jan;41(1):58-68.

Jeanpierre C, Béroud C, Niaudet P, Junien C. Software and database for the analysis of mutations in the human WT1 gene. Nucleic Acids Res. 1998 Jan 1;26(1):271-4.

Kanaka–Gantenbein, C., S. Kitsiou, A. Mavrou, L. Stamoyannou, A. Kolialexi, K. Kekou, M. Liakopoulou, G. Chrousos. Tall stature, insulin resistance, and disturbed behavior in a girl with the triple X syndrome harboring three SHOX genes: offspring of a father with mosaic Klinefelter syndrome but with two maternal X chromosomes. Horm. Res., 61, 2004, 5, 205-210.

Köhler B, Lin L, Mazen I, Cetindag C, Biebermann H, Akkurt I, Rossi R, Hiort O, Grüters A, Achermann JC. 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 Aug;161(2):237-42.

Kyriakou A, Lucas-Herald A, McGowan R, Tobias E, Ahmed, S. Disorders of sex development: advances ingenetic diagnosis and challenges in management, Advances in Genomics and Genetics 2015:5 165–177

Ledig S, Jakubiczka S, Neulen J, Aulepp U, Burck-Lehmann U, Mohnike K, Thiele H, Zierler H, Brewer C, Wieacker P. Novel and recurrent mutations in patients with androgen insensitivity syndromes. Horm Res. 2005;63(6):263-9.

Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA; International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics. 2006 Aug;118(2):e488-500.

Jääskeläinen J, Mongan NP, Harland S, Hughes IA. Five novel androgen receptor gene mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome. Hum Mutat. 2006 Mar;27(3):291.

Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. Hum Genet. 1992; 90(4):350-355.

MacLean, 2004 Novel Androgen Receptor Gene Mutations in Australian Patients with Complete Androgen Insensitivity Syndrome HUMAN MUTATION 23: 287, 2004 Mutation in Brief #692 (2004) Online

McElreavey, K., & Achermann, J. C. (2016). Steroidogenic factor-1 (SF-1,NR5A1) and 46,XX ovotesticular disorders of sex development: One factor, many phenotypes. Hormone Research in Pædiatrics, 87(3), 189–190.

Melo KF, Mendonca BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inácio M, Silva FA, Leal AM, Latronico AC, Arnhold IJ. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Jul;88(7):3241-50.

Murono K, Mendonca BB, Arnhold IJ, Rigon AC, Migeon CJ, Brown TR. Human androgen insensitivity due to point mutations encoding amino acid substitutions in the androgen receptor steroid-binding domain. Hum Mutat. 1995;6(2):152-62.

Paliwal P, Sharma A, Birla S, Kriplani A, Khadgawat R, Sharma A. Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. Mol Hum Reprod. 2011; 17(6):372-378.

Robevska G, van den Bergen JA, Ohnesorg T, Eggers S, Hanna C, Hersmus R, Thompson EM, Baxendale A, Verge CF, Lafferty AR, Marzuki NS, Santosa A, Listyasari NA, Riedl S, Warne G, Looijenga L, Faradz S, Ayers KL, Sinclair AH. Functional characterization of novel NR5A1 variants reveals multiple complex roles in disorders of sex development. Hum Mutat. 2018 Jan;39(1):124-139.

Sinnecker GH, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. Eur J Pediatr. 1997 Jan;156(1):7-14.

Wagner KD, Wagner N, Schedl A. 2003. The complex life of WT1. J Cell Sci 116:1653–1658.

Wisniewski AB, Batista RL, Costa EMF, Finlayson C, Sircili MHP, Dénes FT, Domenice S, Mendonca BB. Management of 46,XY Differences/Disorders of Sex Development (DSD) Throughout Life. Endocr Rev. 2019 Dec 1;40(6):1547-1572.

Yaegashi N, Uehara S, Senoo M, Sato J, Fujiwara J, Funato T, Sasaki T, Yajima A. Point mutations in the steroid-binding domain of the androgen receptor gene of five Japanese patients with androgen insensitivity syndrome. Tohoku J Exp Med. 1999 Mar;187(3):263-72.

РЕЗЮМЕ

Формирането на пола при човека е комплексен процес, включващ действието на набор от множество гени. Грешки в действието на някой от тези гени може да доведат до вариации/нарушения в половото развитие (*DSD – Differences/Disorders of Sex Development*) - широка група от вродени състояния, при които развитието на хромозомния, гонадния или фенотипния пол е атипично. Може да се наблюдава гонаден или генитален пол, различен от хромозомния, нечувствителност към андрогени, двойнственост на гениталиите, и др. Това може да се дължи както на вариации в пътя, отговорен за детерминирането на гонадното развитие, така и на смущения в половата диференциация заради дефекти в производството или в действието на хормоните (като напр. чувствителност на тялото към определени хормони).

Настоящата работа се фокусира върху молекулярно-генетично охарактеризиране на някои състояния от спектъра на нарушенията в половото развитие и разработване на методологичен подход за поставяне на генетична диагноза при тях. За тази цел бяха използвани различни методи за генетичен анализ - количествена флуоресцентна амплификация (QF-PCR), MLPA, микрочипов aCGH анализ, секвениране по Sanger, секвениране от ново поколение (NGS).

В пилотния етап на настоящата работа беше въведен ДНК анализа за откриване на най-честите анеуплоидии в пренаталната и постнаталната диагностика чрез QF-PCR технологията. От извършените на следващия етап генетични изследвания при 29 пациенти с данни за нарушения в половото развитие от групата 46,XY DSD, генетична диагноза беше успешно поставена при 21, а без открити мутации в изследваните гени бяха 8 от тях. Най-честата причина за 46,XY DSD в събраната група от пациенти беше **синдромът на Андрогенната нечувствителност** (AIS), с откриване на мутация в гена AR при 10 от тях. При четири пациенти беше достигнато до генетичната диагноза **дефицит на 5-α-редуктаза тип 2**, което постави и България на световната карта на разпространение на това състояние. При две пациентки с **пълна гонадна дисгенезия** беше открита нововъзникнала мутация в гена *SRY*, което съответстваше на поставената клинична диагноза. Мутации в гена *NR5A1*, кодиращ стероидогенния фактор-1 бяха открити при 4 пациенти с данни за **нарушение в половото развитие** - 3 от пациентите (хетерозиготни носители на 1 мутация) се отглеждат в семействата си като момчета, а 1 – като момиче (хетерозиготен носител на две мутации, унаследени от двамата родители). При пациентката с клинични данни за **синдрома на Денис-Драш** беше установено хетерозиготно носителство на мутация в единствения кандидат-ген *WT1*.

Въпреки огромния напредък в разбирането на половата детерминация при бозайниците, при много пациенти с DSD обаче все още не може да бъде достигнато до сигурна генетична диагноза. NGS-базираните изследвания са изключително полезен инструмент за генетични изследвания от първа линия за диагностициране на нарушенията в половото развитие, за търсенето на нови гени, асоциирани с тези състояния и за разширяване на познанията за евентуалната им мултигенна и/или епигенетична основа.

SUMMARY

Sex determination in humans is a complex process that integrates the function of many genes. Abberations in function in some of these genes may lead to Disorders/Differences of Sex Development – DSD. This is a large group of congenital conditions in which development of chromosomal, gonadal or phenotypic sex is atypical – including gonadal or genital sex that differ from the genetic sex, insensitivity to androgens, genital ambiguity, etc. DSD conditions may be caused by disruption of the gonadal development pathway or by disturbance of the sex differentiation process due to defects in the hormone secretion or action (for example sensitivity to specific hormones).

Here we have focused on the molecular-genetic characterization of some condtiotions from the DSD spectrum and to develop methodological algorithm for achieving a genetic diagnosis. Different techniques for genetic analysis were performed to accomplish this goal – quantitative fluorescent PCR (QF-PCR), MLPA, array CGH, Sanger sequencing, Next generation sequencing (NGS).

In the pilot stage of this work DNA analysis for aneuploidy detection with QF-PCR technique was implemented in practice for prenatal and postnatal diagnosis in Bulgaria. Next, after performing a variety of genetic analyses in a total of 29 patients with clinical data for 46,XY DSD, genetic diagnosis was achieved in 21 of them; 8 were without pathogenic variants in the investigated genes. The most frequent cause for 46,XY DSD in our group of patients was Androgen Insensitivity Syndrome (AIS) – mutations in AR gene were detected in 10 individuals. In 4 patients the diagnosis deficiency in 5-alpha-reductase type 2 was obtained and this put our country on the world distribution map of this condition. In two females with complete gonadal dysgenesis de novo mutations in the *SRY* gene were detected – in accordance to their clinical diagnosis. Mutations in the *NR5A2* gene, which is coding the Steroidogenic Factor 1 were identified in 4 children with some disturbance of sex development – 3 boys (heterozygous for one mutation in this gene) and a girl (compound heterozygous for two mutations, inherited from her parents). In a patient with clinical presentation of Denys-Drash syndrome was detected a heterozygous mutation in the only candidate-gene *WT1*.

Despite the extensive progress in the understanding of the mammals sex determination and differentiation, many patients with DSD still remain without a reliable genetic diagnosis. NGS-based investigations are an extremely usefull first-line tool for genetic investigation of disorders of sex development; for discovering new genes, accotiated with this conditions and for achieving new knowledge for their potentially multigenetic and/or epigenetic basis.

- Не тъжи! – каза Алиса – Рано или късно всичко ще стане ясно, всичко ще си дойде на мястото и ще се подреди в красива схема като дантела. Ще се изясни, за какво е било нужно всичко, защото всичко ще се окаже правилно.

- Да, така и ще бъде. Но понякога човек има нужда от малко помощ в този процес, а не просто да чака – отвърна котаракът – необходимо е да знаеш и чувстваш как е правилно, иначе има вероятност да не проумееш, когато всичко си дойде на мястото.

"Алиса в страната на чудесата" от Луис Карол

БЛАГОДАРНОСТИ

Изразявам своята благодарност и дълбоката си признателност на научните ми ръководители проф. Албена Тодорова и проф. Алексей Савов за това, че вярваха в мен. За безрезервната им подкрепа, за всичко, на което ме научиха, за шанса, който ми дадоха. За приятелството! За мен беше огромна чест да бъда докторант на този екип!

На Боряна Захарова – за това, че избра мен и беше моят пръв учител, който ми даде крила.

На д-р Радослава Въжарова, без която тази тема нямаше да ме открие. Благодаря, че никога не ми отказа съвет, напътствия и помощ.

На д-р Надя Богданова и д-р Арсени Марков – за това, че споделиха с мен уюта на своя дом по време на престоя ми в Мюнстер, Германия и така невъзможни неща станаха реалност.

На колегите ми от Национална генетична лаборатория - за подкрепата и екипността и за атмосферата там горе, на последния етаж.

На всички клиницисти, с които работих - за съдействието и помощта, които ми оказваха.

На всички пациенти, с които се срещнах и на техните семейства. Особено майките - за доверието към мен и моята работа.

На моите родители и на семейството ми – за това, че ме оставиха да следвам своя път и да бъда това, което искам да бъда, за проявеното търпение и разбиране и за безрезервната подкрепа.

И най-вече на Кирил Бъклов - моят съпруг. Благодаря ти! За всичко!

Силвия Андонова