

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**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”
Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика”
по акредитирана докторска програма: Молекулярна генетика
професионално направление: 4.3. Биологически науки

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

проф. Алексей Савов, дб

проф. Албена Тодорова, дбн

2021

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ

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

Резервни членове:

Доц. д-р Даниела Авджиева, дм

Катедра по педиатрия на Медицински факултет при МУ-София

Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Медицински Университет-Варна

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.

СЪДЪРЖАНИЕ

	Въведение	5
1	Литературен обзор	6
1.1.	Физиология на нормалното полово развитие	6
1.1.1.	Хромозомен пол	7
1.1.2.	Диференциация на гонадите (половите жлези)	7
1.1.3.	Вътрешни структури на половата система	9
1.1.4.	Външни структури на половата система (гениталии)	10
1.1.5.	Гени, участващи във формирането на пола	11
1.2.	Вариации / нарушения в половото развитие	18
1.2.1.	Група DSD със засягане на броя/структурата на половите хромозоми	19
1.2.2.	Група 46,XX DSD	22
1.2.3.	Група 46,XY DSD	24
	46,XY DSD с нарушения в гонадното развитие	25
	46,XY DSD с нарушения в синтеза или действието на андрогените	27
1.2.4.	Риск за развитие на гонаден тумор при пациентите с DSD	31
1.3.	Генетични изследвания в диагностичната практика	33
1.3.1.	Определяне на хромозомния пол	35
1.3.2.	Анализ за определяне на делеции/дупликации и вариации в броя копия	37
1.3.3.	Секвениране по Sanger	39
1.3.4.	Технологии за генетични анализи от ново поколение (NGS)	40
1.4.	Съществуващ диагностичен алгоритъм в световната литература	41
2.	Цел и задачи	44
3.	Материали и методи	45
3.1.	Участници в проучването	45
3.2.	Биологичен материал	47
3.3.	Използвани методи за анализ	47
4.	Резултати и обсъждане	61
4.1.	Въвеждане на QF-PCR технологията в диагностичната практика	61
4.2.	QF-PCR анализ за дородова диагностика на полови анеуплоидии	67
4.3.	QF-PCR анализ за послеродова диагностика на полови анеуплоидии	69
4.3.1.	QF-PCR анализ при 30 новородени	69
4.3.2.	QF-PCR анализ при 26 индивиди с женски фенотип	70
4.3.3.	QF-PCR анализ при 13 индивида с мъжки фенотип	74
4.3.4.	QF-PCR анализ при 13 индивида с мозайка/структурни изменения по половите хромозоми	76
4.3.5.	QF-PCR анализ при случай на химеризъм	80
4.4.	Изследвана група пациенти за моногенни междинно-полови състояния	85
4.4.1.	46,XY DSD – AIS, синдром на андрогенната нечувствителност	86
4.4.2.	46,XY DSD и дефицит на 5- α -редуктаза, тип 2	101
4.4.3.	46,XY DSD – пълна гонадна дисгенезия / синдром на Swyer	116
4.4.4.	46,XY DSD и мутация в гена <i>NR5A1</i>	122
4.4.5.	46,XY DSD и синдром на Денис-Драш с тумор на Уилмс	134
4.4.6.	46,XY DSD и без открита генетична находка	137
4.5.	Подходи на генетични изследване при пациенти с DSD	143
4.6.	Предложение за панел от DSD-асоциирани гени	146
5.	Изводи	150
6.	Приноси	151
7.	Публикации по темата на дисертацията	158
8.	Участия с представяне по темата на дисертацията	159
9.	Библиография	152
	Приложение 1 Лабораторни протоколи	160
	Приложение 2 Основни характеристики на изследваните гени	166

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, преждевременно 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

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, гонадният или фенотипния пол е атипично [Lee, 2006]. Може да се наблюдава гонаден или генитален пол, противоположен на хромозомния, нечувствителност към андрогени, двойственост 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 [Baxter & Vilain, 2013].

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.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. ФИЗИОЛОГИЯ НА НОРМАЛНОТО ПОЛОВО РАЗВИТИЕ

Един от най-ключовите моменти в ранното индивидуално развитие на човека е определянето на мъжкия или женски пол на организма [Baxter & Vilain, 2013]. Половото развитие е сложен процес, който се основава на комплекс от координирани събития на ниво хромозоми (и носените от тях гени), гонади и тъкани [Kutney, 2006]. Включва две основни стъпки:

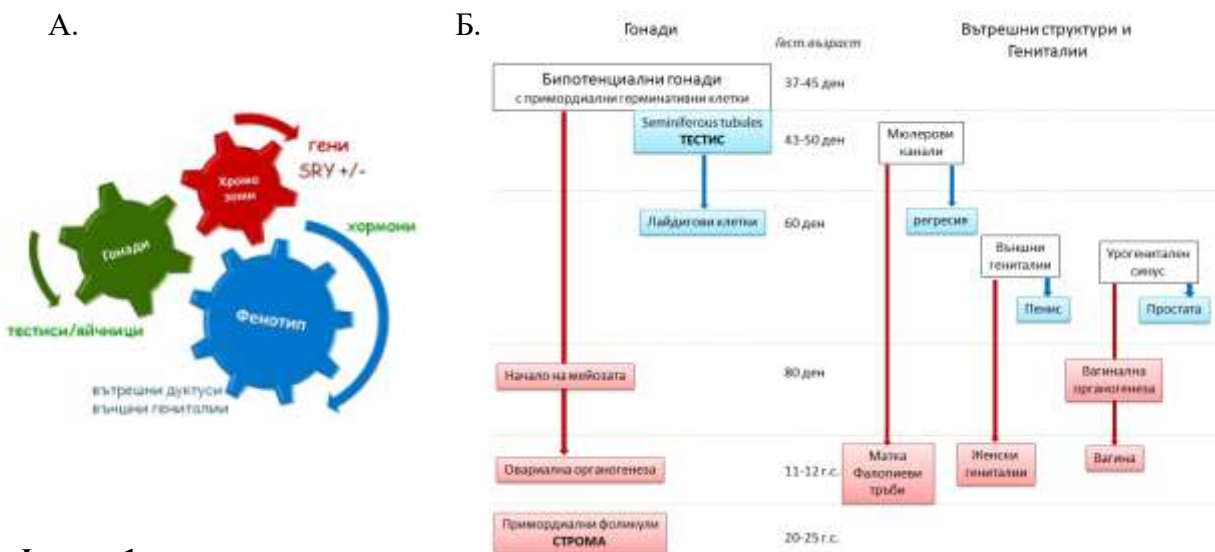
- **Определяне/детерминиране на пола (*sex determination*):**

Процес, при който от бипотенциалния прекурсор на половата жлеза (гонадата) налична в тялото, се развива яйчник или тестис.

- **Диференциация на пола (*sex differentiation*):**

Последващ процес, протичащ под ръководството на половите хормони, произведени от формираните полови жлези и водещ до формирането на репродуктивни структури/органи, характерни за мъжкия или женския биологичен пол [Kutney, 2006; Baxter & Vilain, 2013].

Понятието „биологичен пол” включва в себе си **комбинацията** от хромозомния пол, гонадният пол (т.е. на половите жлези), както и вида на формираната полова система (в т.ч. вътрешни структури и външни гениталии). Формирането на тези три компонента на биологичния пол се осъществява **паралелно** в три отделни процеса, които не са независими, а си взаимодействат един с друг (фигура 1).



1.1.1. ХРОМОЗОМЕН ПОЛ

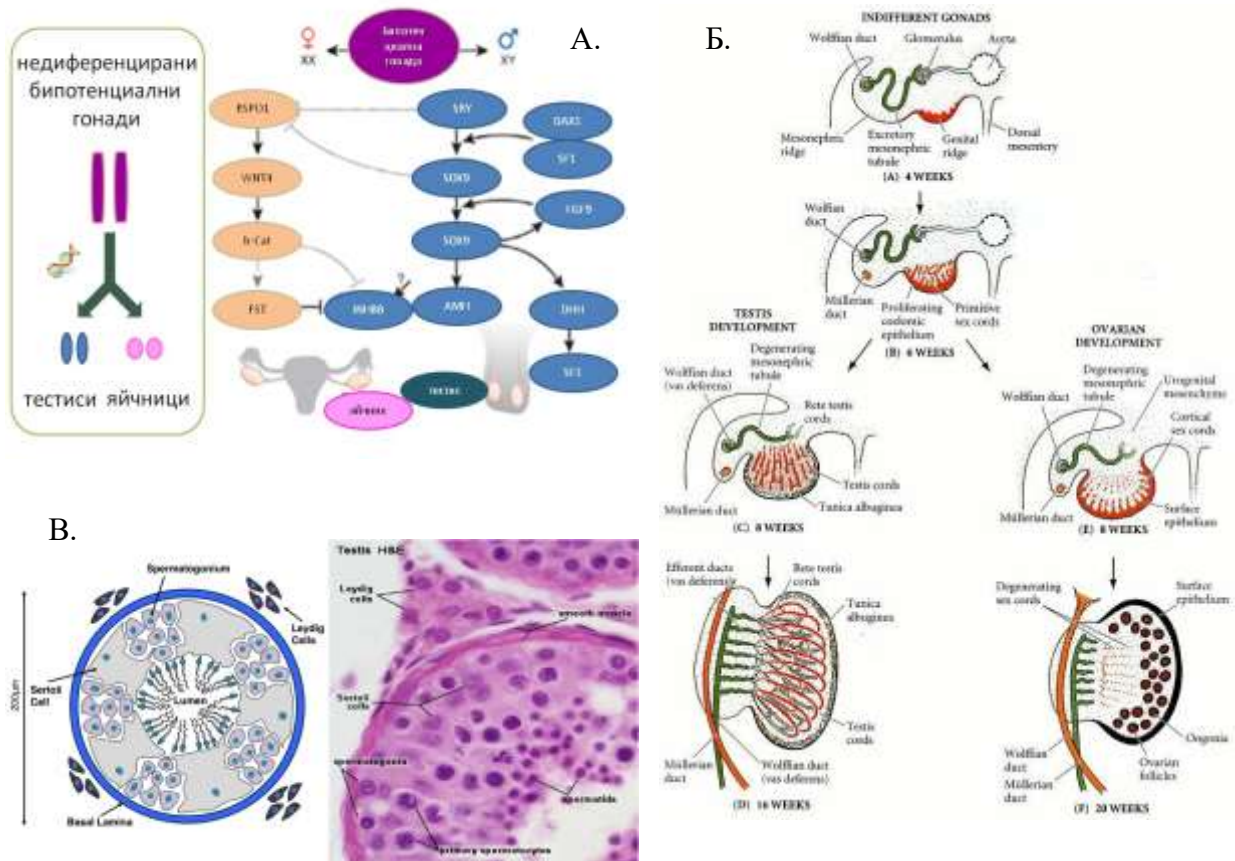
Хромозомният пол следва класическите Менделови закони за унаследяване – всеки нов организъм получава по една полова хромозома от всеки родител: овоцитите носят само един вид полова хромозома - X, докато сперматоцитите могат да носят или X-хромозома, или Y-хромозома. Зиготата, включваща X+X хромозоми обикновено се развива във фенотипно женски фетус, докато зиготата, носеща X+Y хромозоми следва да се развие във фенотипно мъжки фетус. Счита се, че полово-определящият район върху Y-хромозомата (*Sex-determining region of the Y-chromosome - SRY*) е наследственият фактор, който отключва тестикуларното развитие на недиференцираната гонада.

Анеуплоидното състояние, касаещо половите хромозоми (или промяна в броя на хромозомите в тази двойка) може да доведе до получаването на разнообразни състояния с вариации в половото развитие. Мозаицизмът по отношение на половите хромозоми е друг вариант, който е резултат от загубата или придобиване на генетичен материал от половите хромозоми след процеса на оплождането. Много рядкото състояние химеризъм се получава когато клетки от различен произход (две различни зиготи) присъстват в един индивид.

1.1.2. ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ГОНАДИТЕ (половите жлези)

Най-същественят, есенциален момент за половия диморфизъм е именно **гонадната диференциация** или формирането на яйчник или тестис от общия бипотенциален прекурсор. Развитието на половите жлези се различава много от развитието на всички останали органи в човешкия организъм, тъй като те имат потенциала да се превърнат (диференцират) в два функционално различни органа, каквито са тестисите и яйниците. Независимо от своите анатомични и хистологични различия, тестистите и яйчниците са изненадващо сходни като форма и функция. И двете структури имат две основни функции – 1) да произвеждат хормони, които се секретират в кръвния ток и повлияват редица процеси в тялото и 2) да произвеждат полови клетки (гамети) [Ungewitter, 2013]. Като структури яйчникът и тестисът имат един и същ ембрионален произход. През 6 седмица на бременността от гонадния ствол (*gonadal ridge*) се формират бипотенциалните прекурсори на половите жлези. По същото време се осъществява и миграцията на герминативните клетки от жълтъчното мехурче (*yolk sac*) към гонадния ствол (фигура 2). За формирането на бипотенциалните гонади са необходими няколко транскрипционни фактора: SF1, WT1, DAX1.

Наличието на хормони, синтезирани от мъжката полова жлеза (тестис) – АМН (антимюлеров хормон - произвеждан от Сертолиевите клетки) и Т (тестостерон - произвеждан от Лайдиговите клетки), определя формирането на вътрешни и външни мъжки структури. При липсата на такива хормони се развиват женски структури. Това е причината процесът на гонадна диференциация се приема за полово-определящ (*sex determination*).



Фигура 2

Гонадна диференциация или формирането на яйчник или тестис от общия бипотенциален прекурсор А. Гени, имащи отношение към гонадната диференциация; Б. Път на диференциация в тестис (ляво) или яйчник (дясно) [<http://dxline.info/dictionary/gonad-indifferent>]; В. Формиране на Сертолиевите и Лайдигови клетки в тестисите - Сертолиевите клетки имат поддържаща, изхранваща и секреторна функция, докато в Лайдиговите клетки се синтезира Тестостерон

1.1.3. ВЪТРЕШНИ СТРУКТУРИ НА ПОЛОВАТА СИСТЕМА

Урогениталният ствол се формира от мезодермата през 4-6 г.с. (или 6-8 ембрионална седмица), като се залагат гонадите, надбъбречния кортекс, бъбреците и репродуктивния тракт. В началото всеки фетус има налични както Волфиеви тръби (*Wolffian ducts*), така и Мюлерови канали (*Mullerian ducts*). Наличието или отсъствието на антимюлеровия хормон (АМН) е факторът, който ще определи по-нататъшната съдба на тези структури в репродуктивния тракт на фетуса (фигура 3).

Около 8 г.с. (10 ембрионална седмица) Сертолиевите клетки на формиращите се тестиси започват да произвеждат АМН [Kutney, 2006]. При **наличието** на АМН настъпва регресия на Мюлеровите канали и пролиферация на Волфиевите структури – събития, които се случват около 10-12 г.с. (12-14 ембрионална седмица). Тестостеронът, произвеждан от Лайдиговите клетки на тестисите стабилизира допълнително Волфиевите канали и позволява развитието и диференцирането на простата, семенни каналчета и епидидимус. При **отсъствието** на АМН настъпва регресия на Волфиевите структури, а Мюлеровите канали формират фалопиевите тръби, маточното тяло и горната 2/3 от вагината. Около 12 г.с. (14 ембрионална седмица) при развиващия се фетус матката и цервикалният канал са диференцирано женски [Kutney, 2006].



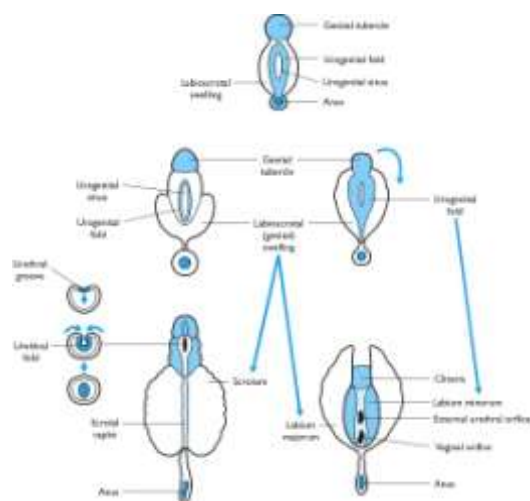
Фигура 3

Схематично представяне на диференцирането на вътрешните структури на половата система - Волфиеви канали при ХУ индивидите под действието на АМН (ляво) и Мюлерови канали при ХХ индивидите при отсъствие на АМН (дясно)

АМН (Анти-мюлеров хормон) е част от семейството на трансформационните β -фактори и един от първите хормони, които се произвеждат от развиващите се тестиси. Синтезира се от Сертолиевите клетки и причинява регресия на Мюлеровите канали (от където идва и името му), които при женския организъм ще се развият като фалопиеви тръби, матка и горна част на влагалището. Следователно АМН е необходим за полово-специфичната диференциация на репродуктивния тракт. От друга страна обаче липсата на АМН не влияе на протичането на тестикуларната диференциация.

1.1.4. ВЪНШНИ СТРУКТУРИ НА ПОЛОВАТА СИСТЕМА (гениталии)

Мъжките и женските структури на половата система произхождат от общи структури [Schwartz, 2019]: гениталния туберкулум (*genital tubercle*), урогенитална гънка (*urogenital fold*) и лабиоскроталните гънки (*labioscrotal swelling*) от двете страни на урогениталните гънки (фигура 4).



Фигура 4

Схематично представяне на формирането на външните гениталии при човека – при ХУ индивиди (ляво) и ХХ индивиди (дясно) [<http://embryology.med.unsw.edu.au>]

Вирилизацията на мъжкия фетус зависи от синтеза на хормона Тестостерон (Т) от половите жлези и превръщането му в ДХТ (5-дихидротестостерон, *DHT*) с помощта на ензима 5- α -редуктаза тип 2. Под на действието на тези андрогени се стига до оформянето на външните гениталии като мъжки. Активността на ДХТ се опосредства от ядрен транскрипционен фактор, наречен Андрогенен рецептор (AR), който има висок афинитет към андрогените и в особено голяма степен - към ДХТ [Kutney, 2006].

Под **действието на ДХТ** урогениталните гънки се сливат, за да формират уретрата на пениса и спонгиозното тяло. Гениталното хълмче формира кавернозното тяло, а лабиоскроталните гънки се сливат в една срединна линия в скроталния ръб и дават началото на скроталната торбичка (фигура 4). Формирането на мъжките гениталии е завършено в 12 г.с.

В условията на **липса на ДХТ** лабиоскроталните и урогениталните гънки не се сливат в срединната линия – първите ще формират големите лабии, а урогениталните гънки - малките лабии. От крайната част на урогениталния синус се формира предверието и долната част на влагалището. Гениталния туберкулум остава с относително малки размери и формира клитора (фигура 4). По този начин, именно **липсата** на мъжките полови хормони андрогени или на тяхното действие е факторът, отговорен за формирането външни женски гениталии, а не наличието на естрогени (женски полови хормони) в развиващия се организъм [Kutney, 2006].

1.1.5. ГЕНИ, УЧАСТВАЩИ ВЪВ ФОРМИРАНЕТО НА ПОЛА

Развитието на всяка една система от органи изисква комплексното взаимодействие на серия от клетъчни сигнали, за да бъде инициирана диференциацията и развитието на различните клетъчни и тъканни типове, нужни за осъществяването на функциите на организма. Изненадващо малко са сигналните пътища, които са замесени в ембриогенезата, като формирането на гонадите (т.нар. гонадогенеза) е уникален процес, при който морфологично различни органи каквито са тестисите и яйчниците, възникват от общ предшественик. Счита се, че повечето от сигнални пътища по време на ембриогенезата са ключови за определянето на пола при бозайниците и за развитието на половите жлези [Windley, 2015, Wilhelm, 2013]. Процесът на полова диференциация на организма включва серия от стъпки с начало – формирането на половите жлези. В този процес са въвлечени серия от гени (фигура 2 А), като по-важните от тях ще бъдат разгледани накратко по-долу.

Гени, асоциирани с формирането на ранните недиференцирани гонади

- **NR5A1** (OMIM*184757)

Кодира синтеза на Стероидогенен фактор 1 (SF1 - *steroidogenic factor 1*), който принадлежи към семейството на ядрените рецептори-сираци и е ключов фактор, участващ в регулацията на множество стероидогенни ензими. При **човека** мутации в *NR5A1* гена водят до 46,XY гонадна дисгенезия, преждевременна овариална недостатъчност (*Premature ovarian failure - POF*) и надбъбречна недостатъчност. Взети заедно тези данни подкрепят ролята на SF1 за формирането на недиференцираните ембрионални полови жлези, както и за последващото определяне на пола на гонадите [Ohnesorg, 2014].

- **WT1** (OMIM*607102, *Wilms tumor 1*)

Кодира белтък с цинкови домейни (zinc-fingers), начерен WT1. Той е важен транскрипционен фактор, включен в гонадното формиране и диференциация като опосредства транскрипционната активност и/или подтискането на няколко прицелни гена. Предполага се, че участва заедно с SF1 в регулацията на стероидогенезата и половата диференциация чрез регулиране на експресията на хормона АМН [Nachtigal, 1998; Lefebvre et al. 2015]. Играе роля и при формирането на бъбреците, както и в туморната супресия – асоциира се с ракови състояния на бъбреците при деца, като Туморът на Уилмс. Това е онкологично състояние, при което се развива тумор на бъбрека – понякога като част от други синдроми, асоциирани с мутации в *WT1*. Такива са например **WAGR** синдромът (*Wilms's tumor, Aniridia, Genitourinary anomalies*,

and mental Retardation), характеризира се с тумор на Уилмс, аниридия, уро-генитални аномалии и умствено изоставане, синдром на Денис-Драш (*Denys-Drash syndrome*) и синдром на Фразие. Всички те споделят уро-генитални аномалии и в частност – ХУ гонадна дисгенезия [Baxter & Vilain, 2013].

Генът *WT1* се състои от 10 кодиращи екзона, като районът 1-6 екзон кодира регион, регулиращ транскрипцията (богат на аминокиселините Пролин и Глутамин), докато районът 7-10 екзон кодира областта на четирите *Zn-fingers* от ДНК-свързващия домейн на белтъка. Известни са 4 основни вида РНК молекули, които се синтезират в следствие на наличието на два алтернативни сплайсинг региона, като те се произвеждат в относително постоянни количества, но с различна специфичност за свързване и с различна вътреядрена локализация.

Сплайсинга, осъществяващ се в първия регион води до включването или изключването на екзон 5. Алтернативния сплайсинг е в 3' края на екзон 9 и позволява включването или изключването на три аминокиселини: Лизин-Треонин-Серин (KTS) на мястото между третия и четвъртия *Zn-finger*. Това води до KTS-позитивни или KTS-негативни изоформи на белтъка. Те се имат различен афинитет за свързване с ДНК и следователно – различни регулаторни функции. Мутацията IVS9+4C>T води до промяна в сплайсинга, вследствие на което се променя съотношението между KTS позитивните спрямо KTS негативните изоформи на белтъка, което означава, че за нормалната функция на *WT1* белтъка е ключов прецизния баланс между неговите изоформи.

- **CBX2** (OMIM*602770, *chromobox homolog 2*),

Мишките, носещи променен (нарушен) *Cbx2* ген показват дефекти в развитието на далака, надбъбреците и половите жлези, като има асоцииране с различни степени на ХУ *sex-reversal*. Допълнителните анализи на тези мишки показват намалени нива на експресията на няколко гена, свързани с формирането на тестисите, вкл. и *Sry*. При човека има описвани мутации в *CBX2*, водещи до загуба на функцията на белтъка при случаи на 46,ХУ гонадна дисгенезия с нормално женско фенотипно развитие [Ohnesorg, 2014].

Гени, асоциирани с формирането на тестисите

Последващото развитие на половата жлеза зависи от наличието или отсъствието на интактна, цялостна У-хромозома. Ако ембрионът е унаследил една Х и една У хромозома, локализиращият върху У-хромозомата *SRY* ген ще инициира работата на група от гени, които водят до формирането на функционални тестиси и като следствие от това – на мъжки фенотип на организма [Ohnesorg, 2014]. Доскоро класическите схващания, касаещи половото развитие приемаха, че единственото условие бипотенциалната гонада да се развие в тестис е наличието

на гена *SRY*. Новите молекулярно-биологични технологии обаче откриха, че това не е толкова просто, а съществува каскада от транскрипционни фактори, които си взаимодействат - по определен начин, в точно определено време и в точно определена доза.

- ***SRY*** (OMIM*480000 *sex determining region on the Y chromosome*, (полово-детерминиращ регион върху У-хромозомата)

Кодира белтък, включващ консервативен между различните видове бозайници *HMG-box* (***high mobility group box***), който може да разпознава и да се свързва със специфичен мотив върху ДНК молекулата (т.нар. *DNA-binding and bending* мотив). Протеинът *SRY* действа като „архитектурен” транскрипционен фактор, влияещ на експресията на прицелните гени чрез предизвикване на конформационни промени в заобикалящия хроматин.

Отдавна е известно, че Тестис-детерминиращият фактор е позициониран върху У-хромозомата [Sinclair, 1990]. *SRY* генът е бил клониран с използването на ДНК проби от 4 мъже с кариотип 46,XX, но носещи фрагменти от У-хромозомата. Потвърждението, че именно *SRY* е тестис-детерминиращият фактор идва от последващо изследване, доказващо мутации в този ген при жени с кариотип 46,XY и гонадна дисгенезия. Оказва се, че 80-90% от XX-мъжете носели материал от У-хромозомата (вкл. и *SRY* гена), транслоциран върху едната X-хромозома, и около 15-20% от XY-жените с гонадна дисгенезия имали мутация в *SRY* гена, водеща до загуба на функцията на белтъка. Това потвърдило хипотезата, че *SRY* генът е необходим за формирането на тестиси и за определянето на мъжкото гонадно развитие, но генетични варианти в този ген могат да обяснят генетичната основа само на една част от пациентите с нарушения в половото развитие [Baxter & Vilain, 2013]. *SRY* генът е единственият известен засега ген, локализиран върху У-хромозомата, който може да се разглежда като необходимо и достатъчно условие да се отключи развитието на тестиси [Ohnesorg, 2014].

Редица изследвания са показали ключовата роля на У-хромозомния полово-детерминиращ ген (*SRY*) за тестикуларното развитие [Mitchell & Harley, 2002; Hersmus, 2009]. Генът *SRY* е член на семейството транскрипционни фактори (*SRY-related high mobility group box* (*SOX*)), имащи основна роля за определянето на пола при бозайниците [Kashimada & Koorman, 2010]. *SRY* е локализиран върху късото рамо на хромозома У (Yp11.3), близо до границата с псевдо-автозомалния район (*PAR – pseudoautosomal region*) на хромозомата. Приема се, че това е „генетичният ключ”, който иницира процеса на диференциране на бипотенциалните гонади в посока тестиси [Mitchell & Harley, 2002]. Човешкият *SRY* ген включва само един екзон, който кодира белтък от 204 аминокиселини, структуриран в 3 домейна – N-терминален, HMG-централен и C-краен.

Повече от 50 мутации при пациенти с 46,XY CGD са описани досега в *SRY* гена, като повечето от тях възникват *de novo* и засягат централната му част (*HMG-box*) и променят

способността на протеина да се свързва към ДНК (*DNA binding*), да свързва ДНК (*DNA bending*) или да се акумулира в ядрото [Mitchell & Harley, 2002; Harley et al., 2003; Sánchez-Moreno, 2008; Mendonca, 2009; Wang, 2018; Hawkins, 1993; Kashimada & Koopman, 2010, Helszer, 2013]. HMG района на протеина съдържа високо-консервативния ДНК-свързващ домейн, което определя и биологичната роля на *SRY* гена като транскрипционен фактор.

Някои мутации, макар и рядко могат да бъдат откривани при бащата на индексния пациент и при други мъже от семейството. При тези т.нар „фамилни мутации” се установява по-слаб негативен ефект върху функцията на *SRY* протеина. Предполага се, че генетичният *background* вероятно модифицира или компенсира ефекта на мутацията при незасегнатите от състоянието носители [Mitchell, 2002].

Известни са няколко автозомни гена, които показват диференциална полово-специфична експресия и имат отношение към развитието на тестисите. Те са разположени след *SRY* гена в каскадата на половото развитие, като мутации в тези гени, както и вариации в копийните им повтори (*copy number variations* - CNVs) могат да се считат за причина за възникване на DSD състояние [Ohnesorg, 2014].

- ***SOX9*** (OMIM*608160, *SRY-related HMG box-containing gene 9*)

Кодира транскрипционен фактор, ключов както за скелетното, така и за гонадното развитие. Принадлежи на същото семейство от регулатори на развитието, както *SRY* – семейството на SOX-протеините, но той притежава както ДНК-свързващ *HMG box*, така и трансактивиращ домейн. *SOX9* се експресира в различни фетални тъкани – в т.ч. мозък, тестиси и хондроцити.

След откритието на *SRY* и немалкото количество останали неизяснени чрез анализа му клинични случаи, става ясно, че съществуват и други фактори, въввлечени в процесите на полово детерминиране. Докато генът *SRY* може да бъде представен като „молекулното копче” за стартиране на тестис-формираща каскада от събития и процеси, то явно само присъствието му не е достатъчно за трансформацията на бипотенциалната гонада в тестис. За осъществяването на този процес се счита, че е необходимо достигането на определени нива на белтъка *SOX9*, чрез което се индуцира позитивна обратна връзка за синтез на *SRY*, *SF1* и *SOX9*. Ако необходимите нива на *SOX9* не бъдат постигнати в точно определено време, позитивната обратна връзка не се осъществява и се започва диференциация на гонадата в посока на яйчникова структура [Kutney, 2006].

Делеции и транслокации на района **17q24.3-25.1** водят до дисгенезия при ХУ индивиди и причиняват Кампомелна дисплазия (OMIM #114290) – рядък синдром, включващ летални скелетни малформации. Приема се, че този регион на хромозома 17 съдържа ген/гени,

необходими за тестикуларното развитие. Клонирането и мутационният анализ на *SOX9* от две независими групи показва, че мутации, водещи до загуба на функция в този ген са отговорни както за Кампомелна дисплазия, така и за XY гонадна дисгенезия. Тъй като инактивиращите варианти на *SOX9* водят до достатъчно тежък и очевиден фенотип по отношение на дългите кости, този ген не се изследва при случаите на изолирана XY гонадна дисгенезия [Baxter & Vilain, 2013]. Дупликации на района 17q, който включва и гена *SOX9* също могат да доведат до 46,XX тестикуларно DSD, вероятно поради повишаване на експресионните нива на *SOX9*. Това предполага, че както и *SRY*, така и *SOX9* са необходими и достатъчни за мъжкото развитие на един организъм [Ohnesorg, 2014].

След като експресията на *SRY* затихне, *SRY* се заменя от *SOX9* на мястото в този енхансер и започва да участва в регулацията на собствената си експресия. Счита се, че основната функция на *SRY* е иницирането на *SOX9 up-regulation*. За разлика от *SRY*, *SOX9* е наличен при всички гръбначни, изследвани досега. Това предполага, че критичният момент в мъжкото развитие е регулацията и поддръжката на експресионните нива на *SOX9* в тестисите [Ohnesorg, 2014].

DMRT1 (OMIM*602424, *Doublesex-and MAB3-Related Transcription Factor 1*)

Друг ген, имащ отношение към половото определяне, идентифициран чрез позиционно клониране при клинични случаи е *DMRT1*. Терминални делеции на 9p, открити с цитогенетичен анализ, се асоциират с XY женски фенотип. Съобщаваните случаи на пациенти с делеции на 9p позволиха по-финото картиране на района, разположен дистално на 9p24.3. Човешкият ген *DMRT1* първоначално е идентифициран на базата на сходство с гена *doublesex* при *Drosophila* и на *mab-3* ген при *Caenorhabditis elegans* - и двата гена са необходими за определянето на пола. Скоро след откриването му *DMRT1* е картиран на 9p24.3 района, а *DMRT2* генът е локализиран в същия район. И двата гена липсват дори и при най-малките установени делеции на локуса 9p, свързани с нарушение в пола. Все още не е ясно обаче дали само единия или и двата гена са нужни за нормалното полово развитие на човека. Не са идентифицирани и варианти в тези гени при пациенти с DSD, въпреки че има съобщаван случай на частична делеция на екзони 3 и 4 на гена *DMRT1* при XY пациент с овотестикуларно състояние. Проучвания при миши модели показват, че генът *Dmrt1* е необходим за тестикуларното развитие, докато генът *Dmrt2* няма отношение към гонадното развитие [Baxter & Vilain, 2013].

DHH (OMIM*605423, *Desert hedgehog gene*)

Член на семейството на *hedgehog*-гените, кодиращи сигнални молекули, участващи в регулацията на морфогенезата. *DHH* е единственият представител на това генно семейство,

който участва в тестикуларното развитие и фертилитета. При човека, хомозиготни *missense* мутации в *DHH* водят до 46,XY пълна или парциална гонадна дисгенезия с или без мини-фасцикуларна полиневропатия. Въпреки, че *Dhh knock-out* мишките са стерилни и имат понижени нива на тестостерон, поради нарушаване на функцията на Лайдиговите клетки, при тях не се наблюдава промяна на пола. Следователно, при мишките *Dhh* вероятно индуцира правилната диференциация на Лайдиговите клетки в развиващите се тестиси [Ohnesorg, 2014].

Гени, асоциирани с формирането на яйчниците

Класическите схващания относно яйчниковата диференциация също претърпяха промени. Новите технологии, използвани при генетичните изследвания на хора с нарушения в половото развитие показваха, че процесът на формиране на яйчника не е напълно пасивен процес, както се смяташе до скоро. За разлика от тестисите, овариалното развитие и функциониране зависи от наличието на герминативни клетки [Kutney, 2006]. Липсата на SRY фактора при **XX-гонадите** води до невъзможност експресията на *SOX9* да достигне определените критични нива. Формирането на яйчник изисква и експресия на DAX1–рецептор, кодиран върху X-хромозомата. В ранните гранулозни клетки се продуцира WNT4 (*wingless type MMVT integration site family 4*), който засилва експресията на DAX1. Това, в комбинация с експресията на фактори като RSP01/WNT4, FST и FOXL2 води до формирането на яйчници – до някаква степен и чрез супресия на активността на т.нар. „тестис-гени“ [Kyriakou, 2015]. Интересно е, че дупликации, обхващащи районите, кодиращи DAX1 и WNT4 водят до 46,XY гонадна дисгенезия [Kutney, 2006; Baxter & Vilain, 2013].

Дълго време формирането на женския пол е считано за пасивно или за „развитие по подразбиране“, тъй като то се осъществява дори при липса на каквато и да било диференцирана гонадна тъкан. През последните години обаче са описани няколко гена, които активно подпомагат овариалното (яйчниково) развитие или потискат определени аспекти на „мъжкото“ развитие. Например дупликации на късото рамо на X-хромозомата са наблюдавани при XY-жени, предполагайки наличието на дозово-чувствителни гени върху X-хромозомата, които отключват „женското“ развитие. Локусът с откритите дупликации отначало е наречен *DSS* (*dosage-sensitive sex reversal*) и след клонирането на ген в него, той получава името *DAX1* (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*). Сега вече той е известен и с името *NROB1*.

- ***NR0B1*** (OMIM*300473, *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1/DSS-АНС critical region of the X-chromosome, gene 1* - разположен в дозово-специфичния (дозово-чувствителен) район на X-хромозомата

Кодира необичаен ядрен рецептор-сирак - *DAX1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on X)* с лиганд-свързващ домейн, но без характерния за нуклеарни рецептори ДНК-свързващ Zn-домейн. *DAX1* е ключов за развитието на надбъбреците, гонадите и хипофиза-хипоталамус.

Повишените дози на *NR0B1* (напр. при **дупликации**) могат да доведат до „женско“ развитие, независимо от наличието на интактен *SRY* ген и XY-кариотип. Генът *NR0B1* е особено интересен заради своите **инактивиращи варианти**, които водят до X-свързана вродена адренална **хипоплазия** (АНС - *Adrenal Hypoplasia Congenita*). Това е много тежка форма на надбъбречна недостатъчност или т.нар. Адренална хипоплазия. АНС възниква в резултат на грешки в развитието на надбъбречната кора, асоциирани с хипогонадотропен хипогонадизъм – нарушение в половото развитие, причинено от комбиниран дефицит на секрецията на гонадотропин-освобождаващия хормон (*GnRH – gonadotropin-releasing hormone*) и на питуитарна нечувствителност към *GnRH* [Baxter & Vilain, 2013]. Някакъв ефект върху тестикуларното развитие обаче не е наблюдаван - в случаите на АНС, първоначалният ход на тестикуларното развитие е нормален и не се наблюдава промяна в пола. Изследванията за делеции/дупликации на *NR0B1* или за търсене на точкови мутации се провеждат за установяване на клиничната диагноза АНС.

Пациентите със синдром на Клайнфелтър (XXY) са пример за мъже, при които вероятно не се отключва промяна във фенотипния пол именно заради ефекта на X-хромозомната инактивация при *DAX1*. Има предположения, че *DAX1* може би функционира в определен активационен прозорец. Ако протеинът му е представен в определени концентрации той може да инициира правилно тестикуларно развитие. От друга страна, прекалено висока или ниска *DAX1* активност води до неправилно регулиране на тестикуларното развитие [Ohnesorg, 2014].

1.1. 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 двойствени гениталии се наблюдават относително рядко (1 на 4 500 новородени) се счита, че някакво нарушение в развитието на външните гениталии вероятно има реално при 1 от 300 новородени [Kyriakou, 2015].

Вариациите / нарушенията в половото развитие могат да възникнат на всяко едно от нивата на детерминиране или диференциация на пола и могат да се дължат на [Audi, 2018]:

1. Бройни или структурни вариации, касаещи половите хромозоми
2. Вариации в гените, участващи в развитието на гонадите и/или гениталиите (и съответно - водещи до инактивиране или активиране на съответните гени)
3. Засягане на стероидогенезата в гонадите и/или надбъбречните (адреналните) жлези
4. Ендокринни нарушения, които могат да повлияват развитието на гениталиите на индивида
5. Майчини фактори – ендогенни или екзогенни

Класификация на DSD състоянията

Използваната в момента система за класификация на DSD състоянията е приета през 2006г с т.нар. Консенсус от Чикаго [Lee, 2006] и ги разделя 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**
Нарушения в развитието на гонадите / яйчници
Излишък на андрогени
3. **46,XY DSD – индивиди с нарушения в половото развитие и кариотип 46,XY**
Нарушения в развитието на гонадите / тестиси
Нарушения в синтеза на андрогените
Нарушения в действието на андрогените
Синдром на персистиращите Мюлерови структури

1.2.1. ГРУПА DSD със засягане на броя/структурата на половите хромозоми / **Sex chromosome DSD**

Включва състояния, при които има вариации или нарушения в кариотипа, касаещи половите хромозоми [Lee, 2006]. Тук се включват например:

45,X	Синдром на Turner и варианти
47,XXY	Синдром на Клайнфелтър и варианти
45,X / 46,XY	Смесена гонадна дисгенезия Овотестикуларни DSD
46,XX / 46,XY	Химеризъм Овотестикуларни DSD

Анеуплоидиите (брой на хромозомите от конкретна хромозомна двойка, различен от 2), засягащи половите хромозоми, са относително чести събития, водещи до възникване на вариации в половото развитие. Пълната форма на такава анеуплоидия обикновено е резултат от мейотично неразделяне на половите хромозоми по време на мейозата при гаметогенезата. Мозайката като форма на анеуплоидия се дължи на грешки в митозата, възникнали след етапа на оплождане и формиране на зиготата [Kutney, 2006].

Обикновено тези състояния се откриват преди раждането - често като случайна находка. Дородовата диагностика позволява фокусът да бъде насочен към съпътстващи малформации или нарушения, които могат да се наблюдават при тези състояния – като напр. вродени сърдечни аномалии при синдрома на Turner. Дава се възможност и за генетично консултиране на семействата преди раждането [Kyriakou, 2015].

Синдром на Turner (45,X) и варианти

Синдромът на Turner се определя като състояние с кариотип 45,X, възникнало в резултат на неправилно разделяне на половите хромозоми по време на мейозата в овоцита или в сперматоцита. При формите на синдром на Turner с мозайка се наблюдават различни кариотипи – 45,X/46,XX , 45,X/46,XY , както и други вариации. Счита се, че около 12% от пациентите с монозомия X са позитивни за материал от Y-хромозомата, който не се открива при цитогенетичния анализ заради нискостепенен мозаицизъм, транслокации на този материал върху X или автозомите и др. [Bianco, 2008]. Наличието на Y-хромозомен генетичен материал при пациенти с монозомия X се асоциира с повишен риск за развитие на гонадни тумори като

гонадобластома, който има потенциал за малигнизация, дисгермином, както и за андроген-продуциращи лезии [Gravholt , 2000].

Честотата на монозомия X се определя като 1/2000 – 1/2500 новородени момичета, около 1-2% от всички бременности и 15% от всички спонтанни аборти. Индивидите със синдром на Turner фенотипно се характеризират най-често с нисък ръст (98%), гонадна дисгенезия с първична аменорея и инфертилитет (97%) с преждевременна овариална недостатъчност, задържано полово развитие, лимфедема (71%), скъсен гръден кош (75%), скъсен врат (80%) и др. [Stan, 2012] Смята се, че ниският ръст се дължи на хаплоинсуфициенция на гена, отговарящ на индуцирането на растежа *SHOX* (OMIM *312865 - *Short Stature Homeobox*), локализиран в псевдоавтозомалния регион (PAR) на късото рамо на X-хромозомата (Xp22.33). При някои пациенти се наблюдават оточни длани и ходила, задебелен врат, високо небце, къса четвърта метакарпална кост, пигментни петна, дисплазия на ноктите. Възможно е да се срещат и сърдечно-съдови и бъбречни аномалии, както и обучителни затруднения. Често при засегнатите индивиди има пълна гонадна дисгенезия с ивицести (т.нар. „*streak*”) гонади и обикновено пубертетът не се отключва спонтанно. При някои пациенти може да се наблюдава начало на пубертета, но заради гонадната дисгенезия да не се развият характерните вторични полови белези. В много редки случаи се наблюдават развитите характеристики на завършено полово съзряване без включване на хормонално-заместителна терапия. Рядко се съобщава за фертилност [Kutney, 2006].

Синдром на Клайнфелтър (47,XXY) и варианти

Наблюдава се при индивиди, носещи в кариотипа си една Y-хромозома и две копия на X-хромозомата, честотата е 1/650 – 1/1000 мъже. Класическата форма на синдрома се придружава от кариотип 47,XXY, но се срещат и хора с негови вариации – 48,XXXY, или 49,XXXXY и др. Счита се, че макар средната честота на синдрома да се изчислява на 1/1000, вероятно по-малко от половината от индивидите със синдром на Клайнфелтър се диагностицират изобщо. За засегнатите е характерен високият ръст и евнухоидните пропорции с дълги ръце и крака – вероятно заради дозовия ефект на гена *SHOX* (OMIM *312865), локализиран върху Xp22.33. Мъжете с Клайнфелтър синдром имат инфертилитет и хипогонадотропен хипогонадизъм заради невъзможността от правилно развитие на тестисите (обикновено не функционират нормално и са с по-малки размери). Пенисът също е с намален размер. Възможно е да се наблюдава и гинекомастия при някои от тях. Синдромът на Клайнфелтър се счита за най-честата причина за инфертилитет при мъжете [Kutney, 2006].

Мозайки 45,X / 46,XY

Счита се че мозаицизъм по отношение на половите хромозоми (45,X/46,XY и варианти) има при 1.5 / 10 000 новородени и вероятно се дължи или на загуба на Y-хромозомата по време на анафазата или на вътрехроозомни пренареждания с резултат загуба на структурно абнормната Y-хромозома. Клиничният спектър е силно хетерогенен, като няма ясна корелация между фенотипната изява и процентът на отделните клетъчни линии, открити при стандартно кариотипиране на периферна кръв или половите жлези. Предполага се, че около 95% от индивидите с 45,X/46,XY вероятно остават недиагностицирани и живеят като нормални мъже. Неопределените гениталии при новородено обаче, както и хипоспадия при момчета и дори типична клинична картина за синдром на Turner и за гонадна дисгенезия могат да бъдат асоциирани с мозаицизъм 45,X/46,XY [Cools, 2011, Lindhardt Johansen, 2012].

Индивидите с такъв кариотип може да имат повишен риск за развитие на малигнени гонадни тумори от около 15-18%, което се свързва с наличието на гена *TSPY*, кодиращ тестис-специфичния протеин (върху Yp) и на неговата аберантна експресия. Този риск се оценява като по-нисък при момчета с кариотип 45,X/46,XY и клинични данни за синдрома на Turner [Cools, 2011, Wu, 2017].

На основа на гонадната хистология, 45,X/46,XY мозаицизмът и неговите варианти могат да бъдат класифицирани на 3 групи [Matsumoto, 2020]: 1) когато и двете гонади са в недиференцирана, ивицеста форма, пациентите обикновено са с женски фенотип и клинични данни за синдром на Turner; 2) когато едната гонада е ивицеста, а другата – дисгенезирал тестис, пациентите се определят със смесена гонадна дисгенезия; 3) когато и двата тестиса са с дисгенезия, тогава се използва терминът парциална гонадна дисгенезия. Тези форми са разгледани и в частта, описваща гонадната дисгенезия по-долу в настоящата работа.

Овотестикуларни състояния

Овотестикуларните състояния (OvT DSD – ovotesticular Disorder of sex development) са известни в близкото минало с термина „истински хермафродитизъм”. Счита се, че честотата им на възникване е около 1/100 000 живородени деца с известна географска вариабилност – най-често е при чернокожите африканци в южна и западна Африка [Ganie, 2017]. В DSD групата това състояние се оценява с честота между 3 и 10% от всички [Scarpa, 2017].

Характеризира се с наличието както на тестикуларна тъкан със семенни каналчета, така и на овариална тъкан с примордиални фоликули при един и същ индивид; те могат да бъдат както в една и съща гонада (овотестис), така и независимо една от друга (яйчник от едната страна и тестис – от другата) [Мао, 2017]. Най-честата гонадна комбинация (при близо 34% от случаите) е на овотестис и яйчник, а комбинацията овотестис и ивицеста гонада е описана при само 1.2% от случаите [Matsui, 2011]. Хистологичната оценка обикновено показва нормална овариална тъкан, с данни за фоликуларен растеж. Тестикуларната тъкан от друга страна често е

с дисгенезия и хиалинизация на семенните каналчета, с оскъдно развити герминативни клетки, което почти винаги води до инфертилитет при тези пациенти – особено отглежданите като момчета. Външните гениталии на пациентите показват вариабилен фенотип – от нормални мъжки до нормално женски, но най-често се манифестират с неопределеност [Мао, 2017].

Кариотипът при пациентите по-често е 46,XX (както с мъжки, така и с женски фенотип и самосъзнание), но може да има и такива с 46,XY (10%) и по-рядко - с мозайки 45,X/46,XY и химеризъм 46,XX.46,XY [Ganie, 2017]. Развитие на гонаден тумор има при между 2.6 и 4.6% от случаите и е по-чест при пациентите с кариотип 46,XY, като са описвани както гонадобластоми, така и дисгерминоми [Scarpa, 2017, Мао, 2017].

1.2.2. ГРУПА 46,XX DSD

Индивиди с нарушения в половото развитие и КАРИОТИП 46,XX

Тази група би могла условно да бъде разделена на 3 по-големи групи [Lee, 2006]:

1. Нарушения в развитието на гонадите / яйчници:

- (Ово)гестикуларни DSD
- Моногенни форми на първична овариална недостатъчност (мутации в гените, отговорни за овариалното развитие: *NR5A1*, *WT1*)
- Гонадна дисгенезия
- Синдромни форми

2. Излишък на андрогени:

- Ароматазен дефицит (*CYP19A1*)
- Вродена надбъбречна хиперплазия (мутации / дефицит на *CYP21A2*, *HSD3B2*, *CYP11B1*, *POR*)
- Фетален, Фетално-плацентарен или Майчин

3. Некласифицирани другаде

- Синдром на Майер-Рокитански (MRKH, *Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser*), тип I или II
- Вагинална атрезия
- Комплексни синдромни състояния

В тази група се включват състояния, при които има нарушение в развитието на гонадите, както и състояния, свързани с излишък на андрогени. Излишъкът на андрогени по време на бременността може да бъде [Kyriakou, 2015]:

- ендогенен – вторичен, дължащ се на надбъбречен аденом, дермоидни кисти, тумор на Сертолиевии или Лайдигови клетки, тумор на половите върви (*sex cord stroma*) или метастатичен карцином
- екзогенен – вторичен, дължащ се на прилагането на Даназол, Прогестини или диуретици и др. Екзогенните стероиди, приемани по време на бременността също могат да доведат до задна фузия на лабиите, клиторно уголемяване и повишена андрогенизация.

Най-честото автозомно-рецесивно състояние, асоциирано с моногенно DSD е вродената надбъбречна хиперплазия (**ВНХ**), дължаща се на дефицит на 21-хидроксилазата. Приема се, че това е състоянието, засягащо 90-95% от пациентите от групата 46,XX DSD. Честотата на ВНХ е между 1/10 000 и 1/14 000 новородени годишно [Kyriakou, 2015].

По-редки са състояния като **46,XX тестикуларните DSD**, които касаят мъже с тестиси, мъжки външни гениталии и кариотип 46,XX, както и **46,XX овотестикуларните DSD**, които се отнасят за индивиди, имащи както овариална, така и тестикуларна тъкан в гонадите си (най-често под формата на овотестиси, а по-рядко – като отделни гонади) [Kyriakou, 2015]. Тези състояния са изключително редки и поставянето на молекулярна диагноза при тях е сериозно предизвикателство [Audi, 2018].

1.2.3. ГРУПА 46,XY DSD

Индивиди с нарушения в половото развитие и КАРИОТИП 46,XY

Тази най-голяма и най-разнородна група може да бъде разделена условно на няколко по-големи подгрупи [Lee, 2006; Cools, 2018]:

1. Нарушения в развитието на гонадите / тестиси:

- Гонадна дисгенезия – пълна или парциална форма (мутации в *SRY*, *NR5A1*, *WT1*)
- Гонадна (тестикуларна) регресия
- Овотестикуларни DSD
- Синдромни форми

2. Нарушения в синтеза на андрогените:

- Дефект в биосинтезата на андрогените (мутации/дефицит на *HSD17B3*, *SRD5A2*)
- Асоциирани с вродена надбъбречна хиперплазия и дефекти в ранните етапи на андрогенния синтез (мутации и/или дефицит на *STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B2*, *POR*, *CYP17A1*)
- Асоциирани с плацентарна недостатъчност или ендокринна дисфункция
- Синдромни форми (напр. Smith-Lemli-Opitz)

3. Нарушения в действието на андрогените:

- Синдром на андрогенната нечувствителност – пълна или парциална форма

4. Синдром на персистиращите Мюлерови структури

- Дефект или мутации в *AMH* или в рецептора му *AMHR2*

5. Некласифицирани другаде нарушения

- Хипоспадия с неясна етиология
- Хипогонадотропен хипогонадизъм
- Комплексни синдромни състояния

Пациентките с женски фенотип и кариотип 46,XY DSD е най-вероятно да бъдат с клинична диагноза Синдром на андрогенната нечувствителност (AIS – *Androgen Insensitivity Syndrome*), с Гонадна дисгенезия или с нарушение в андрогенната синтеза [Kyriakou, 2015].

46,XY DSD с нарушения в гонадното развитие

Гонадна дисгенезия

Терминът гонадна дисгенезия се използва за обозначаване на хормонално несекретиращи („спящи”, „тихи”) зачатъци от бипотенциални гонади. Формите на **46,XX** гонадна дисгенезия са свързани с типично женски вътрешни структури на половата система и външни гениталии и затова диагностицирането им се забавя във времето. При гонадната дисгенезия с кариотип **46,XY** обаче има развитие на женски вътрешни и външни структури на половата система, но без развитие на вторичните полови белези, характерни за женския пол. Тези форми се разпознават от клиничните специалисти на относително ранен етап, тъй като променените нива на АМН и Т водят до проявата на отклонения в развитието на гениталиите [Kutney, 2006].

Разпознават се няколко форми:

- Пълна гонадна дисгенезия (*Complete Gonadal Dysgenesis – CGD*):

има билатерално (двустранно) неактивни полови жлези. Може да бъде резултат от възникнали мутации в някой от гените, имащи отношение към формирането на тестиси от недиференцираните гонади. Мутации при пациенти с пълна гонадна дисгенезия са откривани в гените *SRY*, *NR0B1* (*DAX1*), *NR5A1* (*SF1*), *WNT4* и др., като при 10-15% от случаите мутация е откривана в гена *SRY* [Hughes , 2008, Ostrer, 2009, Paliwal, 2011]. Нарушеното развитие на гонадите при засегнатите от пълна гонадна дисгенезия индивиди води до развитие на нормален женски фенотип с недобре развити (но не малформативни) външни гениталии, матка и фалопиеви тръби, както и до формиране на т.нар. ивицести (*streak*) гонади [Behtash and Zarchi, 2007]. Повечето от пациентките с 46,XY пълна гонадна дисгенезия се диагностицират по време на пубертета, заради първична аменорея или отложено пубертетно развитие [Behtash and Zarchi, 2007; Carrillo, 2007]. Наличието на развити млечните жлези или на менструация при пациенти със синдром на Суайър например може да бъде важен белег за наличие на естроген-секретиращ тумор в тялото (Carrillo, 2007).

- Парциална гонадна дисгенезия (*Partial Gonadal Dysgenesis – PGD*):

едната или двете гонади запазват до някаква степен способността си да произвеждат хормони, но не в достатъчни количества. Степента на вирилизация на организма и на регресия на Мюлеровите структури зависи от степента на тестикуларната функция.

- Смесена гонадна дисгенезия (*Mixed Gonadal Dysgenesis – MGD*):

наблюдава се в случаите, при които едната полова жлеза е напълно дисгенезирала, а другата има частично или нормално функциониране. Характерно е, че регресията на Мюлеровите структури е ипсилатерално спрямо функциониращата гонада [Kutney, 2006].

Гонадна дисгенезия, асоциирана със синдромен фенотип

Съществуват няколко синдрома, асоциирани с 46,XY гонадна дисгенезия при човека, дължащи се на мутации в гени, включени в процесите на гонадно детерминиране.

46,XY DSD, дължащи се на понижена експресия на WT1

Туморсупресорният ген за Тумор на Уилмс (*WT1*) кодира транскрипционен фактор с Zn-finger домейни, който има отношение към развитието на урогениталния тракт – бъбреци и гонади. Генът *WT1* е локализиран на хромозома 11p13 и мутации в него водят до нарушено развитие на половите жлези и уриналния тракт. Това се свързва с три синдрома: WAGR, синдром на Денис-Драш и синдром на Фразие.

Синдромът WAGR се характеризира с наличие на тумор на Уилмс, аниридия, урогенитални аномалии, умствено изоставане и затлъстяване. Дължи се на делеции, обхващащи *WT1* гена и гени, локализирани в близост – като например *PAX6*.

Синдромът на **Денис-Драш** (*Denys-Drash syndrome*) се характеризира с нарушено в различна степен гонадно развитие (в т.ч. 46,XY гонадна дисгенезия), аномалии на гениталиите, ранна бъбречна глумерулопатия и висок риск за развитие на тумор на Уилмс в първата декада от живота на пациента [Drash, 1970; Hashimoto, 2017]. В генетичната основа на това състояние обикновено са доминантни хетерозиготни Missense мутации предимно в екзони 8 и 9 на гена *WT1* - екзони, които кодират районите *Zn-finger 2* и *Zn-finger 3* (ДНК-свързващия домейн) на белтъка. Нефропатията се изявява като дифузна мезангиална склероза и се манифестира основно през първата година след раждането.

От друга страна, мутации в донорното сплайс място на екзон 9 на гена *WT1* (позиция IVS9+4C>T) водят до специфичен функционален дисбаланс на +KTS изоформата (инсерция на Лизин-Треонин-Серин) и до развитие на синдром на **Фразие** (*Frasier syndrome*) и асоциираната с него 46,XY гонадна дисгенезия [Ohnesorg, 2014, Haber, 1991]. Този синдром се характеризира с женски или двойствени външни гениталии при индивиди с кариотип 46,XY, бъбречна недостатъчност във втората декада от живота на пациента, недиференцирани (ивицести) гонади и висок риск от развитие на гонадобластом. Счита се че при тези пациенти няма предразположеност към развитие на тумор на Уилмс, но има висок риск от развитие на гонадобластом на по-късен етап [Hashimoto,2017].

46,XY DSD, дължащи се на понижена експресия на стероидогенен фактор 1 (SF1)

Стероидогенният фактор 1 (SF1) е част от суперсемејството на транскрипционните фактори - ядрени хормонални рецептори. Първият съобщен случай за носителство на хетерозиготна мутация в гена *NR5A1* при човека е p.G35E – в ДНК-свързващия домейн на

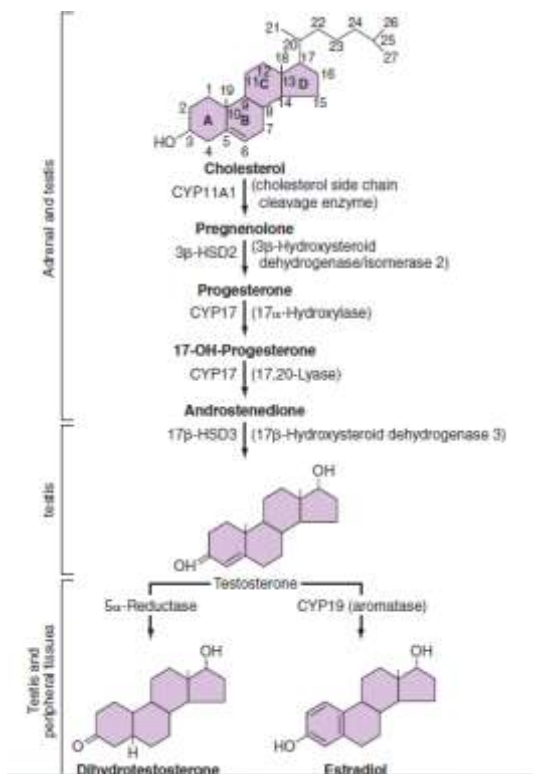
белтъка, при пациент с външни гениталии от женски тип, наличие на Мюлерови деривати и надбъбречна недостатъчност. След този случай са идентифицирани множество случаи с хетерозиготно носителство на мутации в *NR5A1* гена и клинични данни за 46,XY DSD, но без наличие на бъбречна недостатъчност. Предполага се, че транскрипцията на SF1 вероятно е с тъканно-специфичен ефект при човека. Повечето от идентифицираните мутации в *NR5A1* гена лежат в ДНК-свързващия домейн на синтезирания белтък, но са описвани и мутации в лиганд-свързващия район. При по-голямата част от описваните случаи няма данни за надбъбречна недостатъчност.

46,XY DSD с нарушения в синтеза или действието на андрогените

Стероиди

Стероидите са ключови метаболити в развитието на пола. Те са липидни съединения, редуцирани на позиция 5 α , като в тази група се включват Тестостерона, Прогестерона, Кортизола, Алдостерона. Всички те са производни на Холестерола (фигура 5) и се формират след серия от ензимни реакции, осъществяващи се в цитозола на клетката, както и в митохондриите на надбъбречния кортекс, тестисите и яйчниците. В някои случаи стероидните хормони подлежат на модификации в таргетната тъкан, водещи до тяхното активиране и до превръщането им в по-активни метаболити/деривати. Инактивирането се осъществява основно в черния дроб – напр. чрез редукция на кето-групи или чрез десатурация на двойни връзки, окисление на ОН групи, хидроксилиране на пръстените, откъсване на странични вериги.

Молекулните механизми на действие на хормоните зависят от техните физични и химични характеристики. Стероидните хормони като част от групата на хидрофобните хормони, след навлизането си в клетката се свързват интрацелуларно със съответния хормонален рецептор. Белтъците, изграждащи тези рецептори от своя страна се отнасят към суперсемейството на ядрените (нуклеарни) рецептори, които са под формата на сложни белтъчни комплекси с други протеини. Тези комплекси се разпадат след свързването с хормона-лиганд, рецепторът хомодимеризира и след това лиганд-рецепторният комплекс се свързва със строго-специфично място от нуклеотидната последователност, наречено *hormone-responce element*, HRE. Тези места от генома представляват рецептор-активиращи се енхансерни елементи, разположени на различно разстояние от промотора на хормонално-регулируемите гени.



Фигура 5

Схематично представяне на стероидогенезата

Свързването на хомодимерния комплекс хормон-рецептор с HRE води до активиране или инхибиране на генната транскрипция и съответно влияе на генната експресия. Синтезираният белтък и неговите специфични характеристики и функции ще имат ефект върху фенотипа. Това е в основата на действието на андрогените при формирането на половата система.

Синдром на Андрогенната нечувствителност

Синдромът на андрогенната нечувствителност (AIS – *Androgen Insensitivity Syndrome*) е вродено състояние, което засяга развитието на половата система преди раждането. Дължи се на невъзможността на организма на индивид с кариотип 46,XY да отговори на действието на андрогените заради променен андрогенен рецептор. Най-често това е в резултат на мутация в гена *AR*, локализиран върху X-хромозомата и в резултат се развиват женски външни полови характеристики на тялото [Quigley, 1995; Hughes, 2012].

Описват се две форми:

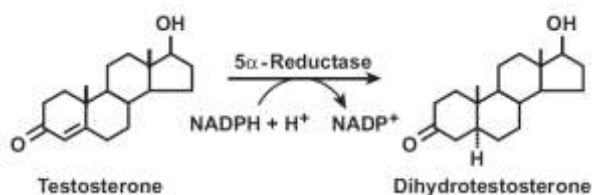
- Пълна форма - **Complete** (CAIS): пълна загуба на функцията на *AR*, пациентите обикновено са **изцяло женски** фенотип с много добре развити гърди, липса на аксиларно/пубисно окосмяване, липса на менархе, ингвинална херния (тестиси)

- Парциална форма - **Partial** (PAIS): значително нарушена активност на AR, наблюдава се хипоспадия, микропенис, или фузия на лабиалните гънки, очаква се настъпване на вирилизация през пубертета

Смята се, че честотата на възникване на пълната форма на синдрома е около 2-5/100 000 човека с кариотип 46,XY. Честотата на парциалната форма е значително по-ниска. Най-често се унаследява X-свързано, но при около 1/3 от случаите се съобщава за нововъзникнали мутации в гена AR.

Дефицит на 5- α -редуктаза тип 2

Дефицитът на 5- α -редуктазата тип 2 е вродено състояние с автозомно-рецесивно унаследяване. Познато е още и като псевдовагинална перинеоскротална хипоспадия (*Pseudovaginal perineoscrotal hypospadias* – PPSH). Дължи се на мутации в гена, кодиращ 5- α -редуктазата тип 2 (*SRD5A2*), която превръща Тестостерона в Дихидротестостерон (фигура 6). По време на ембриогенезата това има критична роля за развитието на мъжките полови структури и за вирилизацията на гениталиите [Batista & Mendonca 2020].

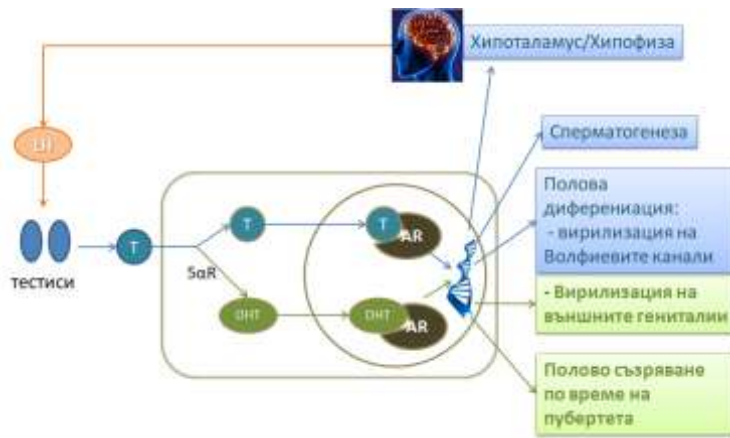


Фигура 6

Ензимна реакция, катализирана от 5- α -Редуктаза (с ко-фактор NADPH) - превръщане на Тестостерон в ДНТ

Синтезът на Тестостерона се осъществява в Лайдиговите клетки под контрола на хормона LH, синтезиран в хипофизата. При мъжкия фетус Т се свързва с AR и това повлиява върху диференциацията на Волфиевите канали до характерните структури на мъжката полова система – епидидиум, *vas deferens*, семенни каналчета. Комплексът [T-AR] е важен и за индуциране на мъжката психосексуалност, което се счита че започва още в ембрионалното развитие на мозъка. Втретклетъчно Т бива подложен на ензимна преработка до ДНТ, който е по-активния андроген – той има 2.5 пъти по-висок афинитет с AR, както и 10 пъти по-висок потенциал да индуцира този рецептор. По време на втутробното развитие на плода ДНТ е критичен за развитието на простата и за диференцирането на външните гениталии като мъжки (фигура 7). Ето защо вирилизирването на външните гениталии зависи изключително от функционирането на AR и на хормона ДНТ, който от своя страна зависи от Тестостерона като субстрат на действието на 5- α редуктазата. Ко-фактор на 5- α -редуктазите е NADPH, като на позиция C5a се вмъква H⁺. Важно е да се отбележи, че 5- α -редукцията на Тестостерона към

ДНТ е най-висока в простата и външните гениталии преди тяхното вирилизиране, но е много по-ниска при Волфиевите структури [Batista & Mendonca 2020].



Фигура 7

Схематично представяне на класическия път на андрогенното действие в мъжката физиология; адаптирано по Фиг.4А.2 на "Genetic Steroid Disorders", 2014 Edited by: Maria I. New"

5αR – 5-α-редуктаза, Т – Тестостерон, ДНТ-дихидротестостерон, AR – андрогенен рецептор

Поставянето на диагнозата дефицит на 5-α-редуктаза тип 2 може да бъде сериозно предизвикателство дори за най-опитните клиницисти заради голямата клинична хетерогенност, която фенотипно може да манифестира от напълно женски до напълно мъжки фенотип с изолирана хипоспадия или микропенис. Липсата на ясна генотип-фенотипна корелация все още не е изяснена, но се предполага, че има някаква зависимост от тежестта на ензимния дефект, както и наличието на фактори, различни от активността на 5-α-редуктазата тип 2, които оказват влияние [Sinnecker, 1996, Batsita & Mendonca 2020]. Най-често се наблюдават външни гениталии от женски тип и мъжки уrogenитален тракт с билатерално наличие на тестиси. Еякулаторните дуктуси достигат до слапо завършващо влагалище. В типичните случаи на дефицит на 5-α-редуктазата тип 2 настъпва вирилизация (клинична и психологична) по време на пубертета, като не се наблюдава гинекомастия. За разлика от други подобни 46, XY DSD състояния, при пациентите с дефицит на 5-α-редуктазата тип 2 се счита, че може да има запазена фертилност, както и значително по-нисък риск от малигнизация на гонадите [Pleskacova, 2010; Nordenskjold & Ivarsson, 1998]. Първоначално съобщенията за това състояние касаят отделни клъстерни групи от хора в конкретни региони по света и сред специфични етноси. Към настоящия момент обаче пациенти с този дефицит са откривани почти навсякъде по света.

1.2.4. РИСК ЗА РАЗВИТИЕ НА ГОНАДЕН ТУМОР

при пациентите с нарушения в половото развитие

Рискът за развитие на малигнени състояния, засягащи половите жлези е особено важен въпрос както за пациентите и техните семейства, ката и за лекуващите ги клиницисти. Счита се, че различните форми на XY и X/XY DSD състояния имат различен риск за развитие на гонаден тумор, като той може да се модулира от възрастта на пациента, локацията на гонадата и вероятно – от генетичната предразположеност. Рискът е много по-голям за индивидите с гонадна дисгенезия (особено формите, дължащи се на дефекти, засягащи ранните етапи на формиране на гонадата – каквито са мутации в гените *SRY* и *WT1*), отколкото за индивидите с овотестикуларни състояния или тези с нарушения в синтеза или действието на андрогените (като AIS), като все още тези данни подлежат на непрекъсната актуализация (таблица 1) [Looijenga, 2007; Pleskacova, 2010]. Ето защо разкриването на генетичните основи на нарушенията в половото развитие при XY и X/XY пациенти може да бъде от ключово значение за последващото клинично поведение. Рискът за развитие на гонаден тумор е сравнително по-висок при случаите на синдром на Фразие (60%), в сравнение със синдрома на Денис-Драш (40%) и PAIS - парциална андрогенна нечувствителност (15%). Гонадобластом обикновено се развива през втората декада от живота на пациента, но при деца с гонадна дисгенезия може да се развие и след първите 9 месеца след раждането [Hashimoto, 2017].

Напоследък нараства тенденцията да бъдат запазвани гонадите при пациентите с нарушения в половото развитие, като обаче тепърва ще се трупат данни за ефекта с времето на възрастта на пациента, придружаващите заболявания, прилаганата ХЗТ, използването на различни медикаменти, факторите на средата, начина на живот върху прогнозата за развитието на гонадните тумори. До натрупването на тези данни, липсата на сигурни туморни маркери или надеждни образни изследвания за ранно откриване на прекурсорни лезии, все още биопсията остава остава методът, който се избира за изключване на неоплазия, засягаща герминативните клетки *in situ* или гонадобластома при пациенти с 46,XY или 45,X/46,XY DSD със съхранени гонади.

Гонадобластомът се състои от герминативни (полови) клетки (*germ cells*) и клетки на стромата (*stroma cells*) и това е *in situ* ресурса за малигнизация на герминативните клетки на яйчника и на гонадите с дисгенезия. Гонадобластомът има потенциалът да прогресира в инвазивен тумор на герминативните клетки (в частност – в дисгермином) при 60% от случаите и по-рядко – към други малигнени тумори катквито са ембрионален карцином, тумор на *yolk sak* и хориокарцином. В сравнение с останалите състояния с 46,XY DSD рискът за развитие на гонадален тумор е сравнително висок при пациентите със синдром на Фразие.

Таблица 1

Риск за малигнизация на гонадите при пациенти с DSD състояния

А. по Looijenga, 2007 и по Pleskacova, 2010;

Б. фактори, модулиращи риска за развитие на гонадни тумори, Pyle, 2017

А.

Рискова група	Състояние	Риск за малигнизация (Looijenga, 2007)	Честота (Pleskacova, 2010)
Висок риск	Гонадна дисгенезия (Y+)	15-35 %	12%
	PAIS	50 %	15%
	Синдром на Frasier	60 %	60%
	Синдром на Denys-Drash (Y+)	40 %	40%
	45,X/46,XY GD		15-40%
Междинен риск	Синдром на Turner (Y+)	12 %	-
	17-β-HSD	28 %	17%
Нисък риск	CAIS	2 %	0.8%
	Овотестикуларни DSD	3 %	2.6%
	Синдром на Turner (Y-)	11 %	-
Няма(?)	Дефицит на 5-α-редуктаза тип 2	1 %	?
	Хипоплазия на Лайдиговите клетки	1 %	?

Б.

риск	Висок	→	Нисък
Морфология на гонадите	Пълна дисгенезия	Парциална дисгенезия	Овотестиси Тестиси Яйчници
Наличие на герминативни клетки	Да		Не
Локализация на герминативните клетки	Интраабдоминално или екстрагонадно		Скротално
Възраст на пациента	По-възрастни пациенти	Пациенти в пубертет	Пред пубертетна
TSPY	да		не

1.3. ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ДИАГНОСТИЧНАТА ПРАКТИКА

Предимства на генетичните и геномните технологии за клиничното диагностициране на DSD

Диференциалната диагностика на DSD състоянията е една от най-сложните в медицинската практика и изисква подчертано интегриран мултидисциплинарен подход, оценяващ обобщено клиничния фенотип, биохимичните и хормонални констелации, както и данните от молекулярно-генетичните изследвания [Achermann, 2015; Audi, 2018].

По-голямата част от причините за възникване на DSD състоянията са генетично обусловени и това определя и необходимостта от извършване на генетични изследвания. Откриването на молекулярните основи и поставянето на генетична диагноза е важна информация, която би могла да бъде от ключово значение при клиничното поведение спрямо конкретния пациент. До някаква степен позволява и да се прогнозира евентуалната насока на биологичния му пол, оценката на гонадните и адреналните функции и фертилитета, както и евентуални последици в по-дългосрочен план - като риск от развитие на рак на половите жлези и свързаната с това преживяемост [Audi, 2018]. Определянето на генетичните основи на тези състояния е полезно и за останалите членове на семейството на пробанда - както заради изясняване на етиологията на възникване на състоянието и типа на унаследяване, така и за изчисляването на риска за повторно събитие в семейството [Audi, 2018, Kyriakou, 2015].

ОСНОВНИ ПОДХОДИ ЗА ГЕНЕТИЧНА ДИАГНОСТИКА НА DSD

Ако DSD състоянията се разглеждат с оглед на всички атипични презентации на гениталиите при раждането, заедно с **всички** случаи на различен от стандартния хромозомен, гонаден или генитален пол, може да се приеме, че честотата им достига **5 на 1000** новородени (или 0.005%). От тях 73% (или 3.7/1000 или 4 на 1081 новородени) ще бъдат момчетата с хипоспадия, което е и най-честият клиничен симптом при DSD. Статистически, сред новородените с атипични гениталии, 75% ще бъдат с кариотип 46,XY, 10-15% ще бъдат с кариотип 46,XX и останалите 10-15% ще имат бройни или структурни аномалии по половите хромозоми [Audi, 2018].

Обобщените данни в Дания, касаещи периода 1966-2014 [Yatsenko, 2017] показват, че честотата на жените с кариотип 46,XY може да се изчисли на **6.4 на 100 000** живородени момичета. От тях, пациентките със състояния, асоциирани с нечувствителност към андрогени (AIS) са 4.1/100 000, а тези с някаква форма на гонадна дисгенезия – 1.5/100 000 [Audi, 2018].

Изясняването на молекулните основи на състоянията при пациентите с 46,XY DSD е с ниска успеваемост. Това вероятно се дължи на [Audi, 2018]:

- голямата хетерогенност на клиничната и хормонална презентация на много от тези DSD състояния,
- големия брой гени, за които е известно, че имат някаква връзка с възникването на тези състояния, но в същото време често са с изключително слаба генотип-фенотип корелация

Все повече данни има в подкрепа на предположението, че значителна част от патогенезата на състоянията може да бъде мултифакторна. Новите молекулярно-биологични диагностични стратегии, използващи *High-throughput sequencing* (HTS) за едновременно скриниране на големи панели с известни DSD-свързани гени дават възможност за повишаване на диагностичната успеваемост. Пълното екзомно (WES – *Whole Exome Sequencing*) или геномно (WGS – *Whole Genome Sequencing*) секвениране може да позволи откриването на нови гени, имащи отношение към развитието на един или друг DSD фенотип. В момента са известни **62 гена**, доказано свързани с **46,XY DSD** и **61 гена**, свързани с **46,XX DSD** клиниката – в т.ч. гени, въввлечени в гонадната дисгенезия, първичната или вторична гонадна инсуфициенция, нарушена стероидогенеза, резистентност към андрогени, изолирани урогенитални аномалии и синдромни състояния, асоциирани с двойственост на гениталиите. В близко бъдеще се очаква да бъдат идентифицирани още нови кандидат-гени, имащи отношение към адреналните и репродуктивни заболявания [Audi, 2018].

Диагностицирането на DSD състояние може да бъде извършено в дородовия или неонаталния период, през детството или предпубертетния етап, при подрастващи младежи или възрастни хора. Това може да стане заради фамилна история за DSD или защото клиничния фенотип предполага наличие на такова състояние. Задължително при пристъпването към работа с DSD пациенти е да има налични:

- информирано съгласие за генетични изследвания
- извършване на диагностични изследвания
- предоставяне на информация и психологическа подкрепа на пациентите и родителите им
- гладко прехвърляне от детските клиницисти към тези, проследяващи възрастни пациенти

Съществена, ключова част от диагностичния процес е диагностиката на стероидните профили със съответните методи [Audi, 2018].

Мултидисциплинарният екип, който да работи с пациентит с DSD следва да включва минимум:

- Детски ендокринолог (за децата) -> ендокринолог (за възрастните пациенти)
- Уролог / гинеколог
- Радиолог (образна диагностика)
- Клиничен специалист – биохимик
- Генетик – молекулярен биолог
- Патолог
- Психолог

По време на пренаталния период, съмнения за наличието на DSD състояние биха могли да възникнат при случаи с фамилна история или при разминаване на УЗ данните за пола на гениталиите и генетичния пол, определен при инвазивна процедура (хорионна биопсия в 9-11 г.с. или амниоцентеза в 15-20 г.с.), както и след извършване на неинвазивна дородова диагностика (NIPD - след 7 г.с.).

1.3.1. Определяне на хромозомния пол

Паралелно с поставянето на клинична оценка за фенотипа на пациентите с DSD, задължителните за първия етап изследвания (*first-line investigations*) включват определянето на генетичния/хромозомен пол. Уместно е това да стане с използването на кариотипиране, както и

с количествен-флуоресцентен PCR (*QF-PCR*) анализ или с флуоресцентната *in-situ* хибридизация (*FISH*). Желателно е времето за получаване на резултат да бъде съкратено до минимум - в рамките съответно на 1-2 дена за *QF-PCR* и *FISH* и 5 дена за кариотипиране [Audi, 2018]. Тези изследвания са ключови и от особена важност, когато има неяснота относно пола на новороденото [Kyriakou, 2015].

Анализът на **кариотипа** е цитогенетична техника, включваща *G-banding* и е ключова при идентифициране на DSD състоянията със засягане на броя и/или структурата на половите хромозоми, както и за случаите с мозаицизъм. При откриване на някои от редките форми на мозаицизъм, касаещ половите хромозоми, е уместно да се извърши кариотипиране на тъкан с различен произход – например кожни фибробласти или тъкан от гениталиите, за да се търси наличие на Y-хромозомна клетъчна линия. Извършвани дородови изследвания показват, че по-голямата част от фетусите с потвърден 45,X/46,XY мозаицизъм са фенотипно нормални при раждането. Част от тях може да развият стигми, подобни на тези при синдром на Turner на по-късен етап, но няма ясна корелация между тежестта на засягане на фенотипа и съотношението между клетъчните линии с кариотип 45,X и тези с 46,XY в кръвта [Kyriakou, 2015].

Технологията **QF-PCR** работи с набор от ДНК маркери, локализирани върху половите хромозоми и позволява определянето на вида и броя им в рамките на 1-2 дена. В последните години тази техника навлезе широко в рутинната практика и почти напълно измести *FISH* технологията. *QF-PCR* методът се основава на презумпцията, че в първата експоненциална фаза на амплификационната реакция, количеството на получавания продукт е правопропорционално на количеството таргетна секвенция, налична като матрица. Критичен момент за успеха на тази методика е именно използваното количество ДНК, спрямо приложените амплификационни цикли. Търговските *QF-PCR* набори, предлагани в момента са разработени за използването на минимални количества ДНК, изолирана *ex tempore* от биологични проби за дородова диагностика или от фетална кръв. Това предполага известно оптимизиране на използваното количество ДНК и на броя на амплификационните цикли при работа с ДНК, изолирана от венозна кръв или тъкани (вкл. букална лигавица, абортивен материал и парафинови блокчета).

В някои диагностични центрове кариотипирането вече е заменено със сравнителна геномна хибридизация с микрочипов анализ (*array CGH*, *aCGH*) или *SNP array*, заради краткото време за обработка и получаване на резултат (в рамките на 5-10 дни). За разлика от кариотипирането обаче, тези технологии не могат да откриват една част от структурните хромозомни пренареждания и са по-малко ефективни при откриването на мозаицизъм, касаещ половите хромозоми [Yatsenko, 2017].

1.3.2. Анализ за определяне на делеции/дупликации и вариации в броя копия (CNVs)

Вариации в копийните повтори CNV (*copy number variations*) може да се открият при 1/5 (т.е. 20%) от случаите с DSD, въпреки че преобладават при синдромните форми на DSD [Audi, 2018]. Това ги прави важни допълващи методи (*second-line investigations*) при данни за наличие на асоциирани с DSD малформации или други увреждания. За няколко гени е известно наличието на дозово-свързан ефект с DSD състоянията:

- Дупликации на гените *FGF9*, *SOX3* или *SOX9* – при случаи с 46,XX DSD
- Дупликация на гените *DAX1* или *WNT4* – при случаи с 46,XY DSD
- Делеция на гените *ATRX*, *DMRT1*, *EMX2* или *WT1* – при случаи с 46,XY DSD.

Например при индивиди с 46,XX DSD и състояния, засягащи развитието на Мюлеровите структури, може да се наблюдават aCGH вариации при около 25% от случаите. Специфични геномни райони със CNV може да корелират с наличие на атипични гениталии, крипторхидизъм и хипоспадия. CNVs може да са възникнали *de novo* при засегнатия индивид, но може и да са унаследени и по този начин да имат отношение към риска от повторно раждане на дете със същия проблем в семейството [Kyriakou, 2015]. Известно е, че има вариабилен DSD фенотип при някои гени – като напр. *NR5A1*, при който се наблюдава доминантно полово-свързана проява на определена клиника. Клинично здравата майка на дете с 46,XY DSD, която е носител на определена вариация в този ген, вероятно ще развие преждевременна овариална недостатъчност (POF) на определен етап от живота си.

Делеции/дупликации и нарушения в броя копия от даден ген могат да бъдат откривани с:

- **MLPA** анализ (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) – дизайниран да открива CNV, касаещи конкретни прицелни райони - част от гени или цели гени
- **aCGH** анализ – може да открива CNV из целия геном
 - o **SNP array** – може да открива много по-малки райони CNV, отколкото с използването на други платформи, каквито са *oligo-aCGH*.
- **NGS** анализ (т.нар. хромозомно секвениране) – аналог на aCGH, базиран на технологията за секвениране от ново поколение, с която може да откриват CNV из целия геном

Сравнителната геномна хибридизация върху чипове (*Array comparative genomic hybridization*, array CGH, aCGH) е молекулярно-цитогенетична методика с висока резолюция, която се използва за откриване на промени в броя копия на определени райони в генома. Основава се на сравняване на изследвания геном на пациента с референтен (контролен) геном и

идентифициране на различията между двата генома. При array CGH се използват клонирани ДНК фрагменти около 60-100 н.дв., чиято хромозомна локализация е известна, което позволява откриването на аберации и позиционирането им директно в геномната секвенция. Array CGH е метод с висока специфичност, чувствителност и бързина, позволяващ работа едновременно с по-голям брой проби. Могат да бъдат откривани промени в копийните варианти на генома от порядъка на 1 до 5 Мб ДНК последователност, но може да се сведе и до 40 кб.

Array CGH се базира на на същите принципи, както конвенционалната сравнителна геномна хибридизация. И при двете техники ДНК от референтна (контролна) проба и ДНК от тествания пациент се бележат с два различни флуорохроми и хибридизират конкурентно с таргетни последователности ДНК. Това могат да бъдат клонирани геномни фрагменти (каквито са плазмидите), сДНК или олигонуклеотиди. Обикновено тестовата ДНК проба се бележи с розовия флуорохром Cy5 (Цианин 5), а референтната ДНК – със синия Cy3 (цианин 3). Еднакви количества от двете ДНК проби се смесват и ко-хибридизират върху ДНК микрочип, съдържащ няколко хиляди олигонуклеотиди или клонирани ДНК фрагменти. След хибридирането се използва специална дигитална система за сканиране на образи и количествена и качествена оценка на получената интензивност на флуоресценция от хибридираните флуорохроми. Полученото съотношение на интензивността на флуоресценция е пропорционално на съотношението на копийните варианти на ДНК последователностите в референтния и тествания геном. Ако интензивността е еднаква за двата флуорохроми в една и съща проба/точка от чипа, се счита, че този регион има едно и също количество при изследвания пациент и при контролата. Ако има отклонение в съотношенията Cy3:Cy5, това е индикация за увеличени или намалени брой копия на конкретния регион при изследвания пациент.

Основното ограничение на метода е невъзможността да бъдат откривани структурни хромозомни аномалии, при които няма промяна в броя на копията – напр. мозаицизъм, балансирани хромозомни транслокации и инверсии. Могат да бъдат откривани увеличения/загуби на генетичен материал, които са кратни на пloidия. Освен това, специфична особеност е, че регионите от генома, които съдържат къси повторени последователности са силно вариабилни между отделните индивиди и това може да рефлектира на резултатите от array CGH анализа. Ето защо, тези повторени ДНК региони (каквито са напр. центромерните и теломерните) трябва да бъдат блокирани с небелязана ДНК (т.е. Cot1 DNA) и да бъдат изключени от скринирането за бройни промени.

Нивата на мозаицизъм, които могат да бъдат засечени зависят от чувствителност и спектралната резолюция на клонингите.

В някои центрове тези анализи се използват рутинно, особено при случаи с данни за изоставане в интелектуалното развитие, като честотата на откриване на клинично значими микроделеции/микродупликации е около 15% [Kyriakou, 2015]. Техниките за микрочипов анализ (aCGH), SNP array и хромозомно секвениране са с по-висока резолюция от кариотипирането. Използването им позволява откриването на микроделеции/микродупликации, с размери по-малки от разделителната способност на микроскопа 5 Mb при стандартния кариотипен анализ [Kyriakou, 2015, Audi, 2018].

Използването на aCGH и NGS може да помогне за идентифицирането на нови гени, имащи отношение към DSD, както и за изясняване на някои механизми на развитието. Напр. изследването на индивиди с миотубуларна миопатия и 46,XY DSD с тези технологии даде възможност да бъде открита обща делеция при изследваните, включваща един и същ ген – *MAMLD1 (CXorf6)*. По-късно са открити и nonsense мутации в този ген при японски момчета с пеноскротална хипоспадия [Kyriakou, 2015]. С помощта на тези техники могат да се откриват и делеции, които не се детектират със стандартното секвениране по Sanger. При около 1/3 от изследваните пациенти са откривани вариации в копийните повтори, които са определени като находки с неясно значение (*VUS – variants with unknown significance*), но в последствие са били асоциирани с DSD.

Като допълнение, използването и на технологията за цялостно екзомно секвениране WES, дава възможност за откриване на CNV в кодиращите райони на ниво на резолюция на метода „екзон“. Това не винаги е възможно с MLPA и с aCGH техниките. В близко бъдеще се очаква все по-широкото използване на технологията за цялостно геномно секвениране WGS да позволи откриването на разлики в копийните повтори и при некодиращите регулаторни региони на генома.

Алгоритмите за извършване на молекулярно-генетични изследвания при DSD обикновено включват секвениране по Sanger, често в комбинация с MLPA или aCGH, с които могат да се открият дозови аномалии при конкретен ген – като делеции и дупликации [Kyriakou, 2015].

1.3.3. Секвениране по Sanger

Секвениране по Sanger на кодиращите екзони на кандидат-гените, фланкиращите райони от интроните и в някои случаи други таргетни райони (като напр. промоторни региони) е удачно да се извършва при следните случаи на пациенти с нарушения в половото развитие:

- Насочено изследване на гени с **известна асоциация с DSD**, заради убедителни клинични данни за **конкретно DSD** състояние – напр. изследване на гените *AR*, *SRD5A2*, *CYP21A2*, *CYP11B1*, *HSD17B3* и др.
- Насочено изследване на гени с известна асоциация с DSD, при които обаче резултатите от *high-throughput sequencing* технологиите биха дали **труден за интерпретация** резултат, заради сложни пренареждания, делеции, псевдогени и т.н. (като напр. *CYP21A2*).
- Изследване заради извършване на **сегрегационен** анализ за специфични варианти в конкретно семейство.
- **Валидиране** на нововъведените методики за секвениране от ново поколение – DSD панели, WGS, WES като част от лабораторното ободурване на конкретен диагностичен център.
- Валидиране на резултатите от извършено новогенерационно секвениране при **единични клинични случаи** и сегрегация на вариантите сред техните преки и по-далечни роднини

С навлизането на новите технологии и намаляването на разходите по извършването им се наблюдава тенденцията стандартното „единично” секвениране да бъде измествано от секвенирането от ново поколение на набор от гени или на целия екзом, дори и в случаи на убедителни клинични данни, насочващи еднозначно към конкретно DSD състояние или ген за изследване [Audi, 2018].

1.3.4. Технологии за генетични анализи от ново поколение (NGS – next generation sequencing)

Голямата клинична хетерогенност и разнообразната етиология на междинно-половите състояния определя големия брой кандидат-гени, които следва да бъдат включвани в изследванията на пациенти от тази диагностична група. Клиничната картина и хормоналните нива при отделни пациенти биха могли да бъдат много вариабилни и нееднозначни и това допълнително да затрудни подбора на кандидат-гените, подходящи за включване в генетичните изследвания. Включването на технологиите от ново поколение в диагностичния подход за междинно-половите състояния на мястото на традиционния подход за секвениране дава големи възможности за повишаване на успеваемостта на изясняване на генетичните основи на тези състояния. За диагностичната практика е ключово разработването на панели, включващи региони от генома, за които е известна връзката с развитието на нарушения в половото развитие, както и на нови кандидат-региони. Смята се обаче, че молекулярно-генетичните изследвания не могат реално да предвидят функционалните последици от откритите с NGS

технологията варианти в конкретни случаи на пациенти с DSD, с изключение на определени известни мутации в някои (но не всички) DSD-гени (като напр. *AR*-ген и някои други), които имат доказан негативен ефект върху половото развитие [Audi, 2018]. Такива са напр. промените в сложната мрежа на стероидната биосинтеза при гонадите или надбъбречните жлези, чувствителността към половите стероиди на конкретния индивид и др., а клиничният ефект на мутациите е основен аспект от индивидуализирания подход за терапия при такива пациенти.

Технологиите от ново поколение търпят непрекъснато развитие и подобрение, като има тенденция цената за базова дойка изследвани нуклеотиди да намалява. Подбора на най-добра стратегия за извършване на изследвания с технологии от ново поколение ще зависи от броя подходящи DSD-гени включени в конкретния панел, покритието на тези гени и наличните възможности на конкретната лаборатория. Например използването на пълното екзомно секвениране WES позволи откриването на нови кандидат-гени, свързани с половото развитие и имащи отношение към DSD при човека: *FOG2/ZFPM2*, *HNAT*, *FGFR1*, *SOX8*, *NR2F1*, *ZNRF3*. Описани бяха варианти в познати гени, като *NR5A1*, при които беше открит друг, неописван фенотип. Друг пример за успешно използване на WES / WGS технологиите са случаите с AIS клинична диагноза, без открити мутации в кодиращите райони на гена *AR*. Бяха открити на патологични варианти в промоторния регион или в други регулаторни части на гена. В допълнение, бяха открити варианти и в други гени, регулиращи експресията на *AR* гена – напр. гена *ApoD*, с което беше възможно изясняването на скоро предложената подгрупа на синдрома AIS тип II, при която няма *upregulation* чрез андрогени във фибробласти от кожата на гениталиите на пациентите [Audi, 2018].

Технологиите от ново поколение имат още едно предимство – те биха могли евентуално да покажат случаи, при които DSD фенотипът се дължи на комбинация от варианти в различни гени (олигогенна природа). Използването на моногения модел като причина за възникване на клинични състояния би останал приложим за специфични фенотипове – като определен дефицит на конкретен ензим от стероидния път или синдроми с резистентност към определени хормони, какъвто е случаят с AIS.

1.4. СЪЩЕСТВУВАЩ ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ В СВЕТОВНАТА ЛИТЕРАТУРА

За поставане на генетична диагноза при пациенти с DSD са описани различни диагностични алгоритми, в зависимост 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 цялостно 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].

Разработеният алгоритъм конкретно за случаите с 46,XY DSD без данни за хромозомни преустройства включва работа на мултидисциплинарен екип (клинични специалисти по ендокринология, биохимия, клинична генетика и молекулярна генетика), който да може да интерпретира резултатите от секвенирането от ново поколение WGS/WES и при нужда – втора линия от допълнителни хормонални и функционални анализи с оглед оценката и интерпретацията на находките с неясно значение (VUS) [Audi, 2018].

Повечето от генетичните лаборатории следват препоръките на Американския Колеж по Медицинска Генетика (ACMG) за интерпретация на откритите генетични варианти и използват стандартната терминология за описването на варианти, идентифицирани при гени, водещи до Менделови заболявания [Richards, 2015; Eggermann, 2020]:

- Патогенна находка (*Pathogenic*) – Откритият вариант засяга структурата и функцията на гена/протеина и има клинично значение
- Вероятно патогенна находка (*Likely pathogenic*) – Откритият вариант засяга ген, в който има открити подобни варианти с известна патогенност и клинично значение.
Патогенността на находката се поддържа от епидемиологични данни, биоинформатични предиктори и сегрегационен анализ
- Находка с неясно значение (VUS, *variant of unknown significance*) – при открития вариант не се покриват всички критерии за патогенност, а биоинформатичните предиктори не дават окончателно потвърждение за патогенността на находката
- Вероятно непатогенна находка (*Likely Benign*) – Откритият вариант се определя като непатогенен въз основа на наличните епидемиологичните и биоинформатични данни и няма клинично значение
- Непатогенна находка (*Benign*) – Откритият вариант няма клинично значение

Препоръчително е обаче да се докладват находките като пагени, вероятно патогенни и с неясно значение при ген(и), имащи отношение към фенотипа на пациента, докато вариантите,

открити с клинично екзомно или геномно секвениране в несвързани с фенотипа гени да се съобщават като допълнителни находки [Kalia, 2016; Green, 2017]. С натрупването на все по-голямо количество нови данни от секвенирането от ново поколение вероятно тези препоръки ще еволюират, тъй като връзката между генотипа и фенотипа става все по-задълбочена [Audi, 2018].

ОБОБЩЕНИЕ

От откриването на *SRY* гена и функциите му не е изминало много време. От тогава до днес е настъпило драматично нарастване на знанията и разбирането на механизмите и междугенните взаимодействия, имащи отношение към половата детерминация и диференциация при човека. Идентифицирането на няколко ключови за това развитие гени даде възможност да бъде изяснен до голяма степен сложния процес на развитието на функциониращи яйчници и тестиси, но неясните въпроси са все още много.

Не малка част от случаите с нарушения в половото развитие все още не могат да бъдат разгадани. Нашата цел е да се фокусираме върху генетичната основа на тези състояния и да коментираме предимствата, които ни предоставят различните методи за генетичен анализ и развитието на новите геномни технологии.

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 2.

Таблица 2

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

- **1584 проби за пилотно въвеждане на QF-PCR методиката**

В дисертационния труд са включени резултатите от изследвания, извършени на предварителния етап на въвеждането на количествения ДНК метод за откриване на автозомни и полови анеуплоидии в клиничната практика. В това проучване бяха изследвани ДНК проби от общо 1584 индивида и фетуси. При 1050 от тях биологичният материал е получен перинатално, а 534 са изследвани постнатално. Общо 474 ДНК проби от клинично здрави индивиди без данни за анеуплоидия от ДНК банката към Националната Генетична Лаборатория бяха включени като здрави контроли. Като сигурни контроли с тризомия 21 бяха изследвани 57 деца с цитогенетично потвърден синдром на Даун, както и 3 проби от новородени с тризомия 18. За всички изследвани е било получено подписано информирано съгласие за включване в изследването.

Оценката на вида и качеството на материала от хорионни вѐси и абортивни тъкани в групата проби за дородова диагностика беше извършвана чрез инверторен микроскоп в

Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ “Майчин дом” и в Катедрата по медицинска генетика, Медицински Университет - София. Бременните жени бяха насочвани за изследване от генетичните консултанти на Националната генетична лаборатория, Катедрата по медицинска генетика, МУ-София и Секция по клинична генетика към СБАЛДБ, както и от акушер-гинеколози основно от СБАЛАГ “Майчин дом”, I АГ болница “Шейново”. Цитогенетичните изследвания бяха извършвани в Лабораторията по пренатална диагностика, СБАЛАГ “Майчин дом” и в Катедрата по медицинска генетика, МУ-София.

Пациентите от групата с послеродова диагностика бяха диагностицирани цитогенетично в Катедрата по медицинска генетика, МУ-Софият или в Секция по клинична генетика, СБАЛДБ.

- **113 проби за определяне на брой и вид полови хромозоми**

Част от изследваните бяха новородени с неясен пол на външните гениталии – 30 бебета. Останалите ДНК проби бяха насочени за определяне на вида и броя полови хромозоми (при 39 индивида) или на пациенти със съмнения за мозаечен кариотип, касаещ половите хромозоми (X/XX или X/XY) (13 ДНК проби); при 31 от изследваните дородово проби беше установена някаква бройна патология по половите хромозоми.

- **29 индивиди с нарушения в половото развитие (DSD)**

Тези пациенти бяха насочвани към Национална генетична лаборатория в периода 2013-2020 с предварителна диагноза Нарушение/Вариации в половото развитие. В допълнение бяха изследвани и здрави родственици на засегнатите индивиди – родители и сибси. Описание на изследваните пациенти е представено на таблица 18 в раздела Резултати и обсъждане.

Пациентите са клинично диагностицирани и насочени за ДНК анализ от няколко клинични звена от цялата страна: СБАЛАГ „Майчин дом” ЕАД, гр.София, УСБАЛЕ „Ив.Пенчев”, гр.София, СБАЛДБ ЕАД, гр.София, УМБАЛ “Александровска”, гр. София, УМБАЛ “Св. Георги”, гр. Пловдив, МБАЛ „Св. Марина”, гр. Варна, УМБАЛ „Странски”, гр. Плевен. Една част от изследванията бяха извършени с реактиви, осигурени по Програма 26 за редки болести на МЗ. Останалите изследвания бяха проведени в рамките на 16-дневна специализация в Института по човешка генетика, Мюнстер, Германия.

Клиничната диагноза е поставена от клиницисти в съответните лечебни заведения на базата на стандартни клинични и лабораторни изследвания. След получаване на писмено информирано съгласие за извършване на генетично изследване от пълнолетните пациенти или от родител при непълнолетните бяха взимани биологични проби – кръвна проба или букална лигавица за изолиране на ДНК и извършване на генетичните изследвания.

3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

За провеждане на генетични изследвания беше използвана високомолекулярна 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.

В случаите, при които е била проведена дородова диагностика, ДНК се изолира от хорионни въси или от амниотични клетки, взети чрез пункция (съответно биопсия или амниоцентеза), от култивирани амниоцити или от абортивен материал. Изолирането на ДНК от тези проби беше извършвано чрез търговски набори на принципа на колонна екстракция.

Клетките от букална лигавица бяха събирани във физиологичен разтвор в епруветки тип Eppendorf 1.5 мл чрез остъргване на лигавица от вътрешната страна на бузата с пластмасова шпатула и промиване на шпатулата в разтвора.

3.3. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ за АНАЛИЗ

В настоящата работа беше приложена комбинация от различни молекулярни и молекулярно-цитогенетични методи за анализ:

- Изолиране на ДНК от различен биологичен материал (амниотични течности, кръв, букална лигавица, хорионни въси, FFPEТ и др.) – чрез търговски набори на основата на колонки 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*)

3.3.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ГЕНОМНА ДНК ОТ ПЕРИФЕРНА ВЕНОЗНА КРЪВ чрез ИЗСОЛВАНЕ [Miller et al.,1988]

Солевата екстракция се основава на извличането на белтъци и други съставки от клетъчен лизат в органична фаза, като ДНК остава във водната фаза и се преципитира с етанол.

ПРИНЦИП и ЕТАПИ на работа:

- *Разрушаване* на безядрените кръвни клетки (еритроцитите) с лизиращ хипотоничен солеви разтвор;
- *Утаяване* на ядрените кръвни клетки (левкоцитите) след центрофугиране;
- *Разпукване (лизис)* на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К;
- *Пречистване* от белтъците и протеиназата чрез преципитация;
- *Утаяване* на ДНК с етанол.

Реактиви и разтвори

Използваните разтвори и буфери са систематизирани по-долу:

<i>Еритроцит-лизирац буфер</i> pH=7.4	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na ₂ EDTA
<i>Нуклеолизирац буфер</i> pH=8.0	75 mM NaCl, 25 mM Na ₂ EDTA
<i>20% Натриев додецилсулфат</i>	SDS
<i>Преситен NaCl</i>	6 M NaCl
<i>Протеиназа К</i>	20 U/mg 10 мг/мл ddH ₂ O
<i>96% Етилов алкохол</i>	96% EtOH
<i>70% Етилов алкохол</i>	70% EtOH
<i>Стерилен TE⁻⁴ буфер</i>	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4

Използваните протоколи за работа при изолиране на ДНК чрез изсолване и с търговски набори (с колонки) са представени в Приложение 1 на настоящия дисертационен труд.

3.3.2. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (Polymerase Chain Reaction - PCR)

ПРИНЦИП:

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика, разработен от Kary Mullis през 1985г [Mullis, 1986]. Това е технология за специфично ензимно намножаване (амплификация) на желани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции, в условия *in vitro*.

Във всяка амплификационна реакция участват матрична ДНК, праймери, дезоксинуклеотид три фосфати (dNTPs), Taq-полимераза, реакционен буфер. Като качествен контрол на чистотата на използваните консумативи и достоверността на експеримента, всяка серия полимеразни реакции съдържа и т.нар. отрицателна/ сляпа/ празна/ негативна контрола. Тя съдържа всички компоненти, необходими за протичане на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която е заместена с ddH₂O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена със случайно попаднала чужда ДНК - матрица. За избягване изпарението на реакционната смес беше използвано надслояване със стерилен течен парафин.

За провеждане на амплификационната реакция бяха използвани апарати-термостати, в които чрез последователни стъпки на денатурация, хибридизация на праймерите и синтез се извършва намножаването на съответните фрагменти.

Амплификация на кодиращите екзони и екзон/интронните граници на анализирания гени

В настоящото изследване се амплифицират екзоните на избраните за изследване гени *SRY*, *AR*, *SRD5A2*, *NR5A1(SF-1)* и *WT1*, като анализираният фрагмент включват и екзон/интронните граници. Някои екзони са по-големи и анализите бяха провеждани в няколко независими реакции на амплификация и последващо секвениране. Дизайнът на праймерите за амплификация на екзоните на гените *SRY*, *AR*, *SRD5A2*, *NR5A1(SF-1)* и *WT1* беше направен за нуждите на настоящия труд, съгласно публикуваните в достъпната литература данни (съответно по Rajender, 2006; Audi, 2010; Baldinotii, 2008; Lourenco, 2009; da Silva, 2011). Оптимизираните условията за амплификация са представени на таблица 3 и таблица 4.

Таблица 3

Оптимална концентрация на компонентите, участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на райони от генома, прицелни за настоящата работа.

Компонент на реакционната смес	Обем (µl)
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	1.5
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, dNTPs (10 mM)	2
Праймер F/R (10 pmol/µl)	1
Термостабилна полимераза Prime Taq,(GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Високомолекулна ДНК	2.0
Дестилирана вода	До краен обем 15.0µl

За провеждане на амплификационната реакция бяха използвани апарати-термостати, в които чрез последователни стъпки на денатурация, хибридизация на праймерите и синтез се извършва размножаването на съответните фрагменти.

Таблица 4

Оптимални условия за провеждане на PCR за получаване на специфични продукти наприцелните райони

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	7 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	30
Хибридизация на праймерите	53-68°C	40 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	7 min	1

Основните характеристики на избраните за изследване в настоящия дисертационен труд 5 гена, асоциирани с нарушения в половото развитие при човека са представени в ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

3.3.3. КОЛИЧЕСТВЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНА АМПЛИФИКАЦИОННА РЕАКЦИЯ (QF-PCR)

При QF-PCR технологията се използва размножаване на микросателитни ДНК маркери, което генерира флуоресцентно белязани продукти (ампликони), правопрпорционални на количеството таргетна секвенция, налична в първоначалната ДНК матрица. Количеството флуоресцентен PCR продукт съответства на стойността на измерената площ на пика от електрофоретограмата.

ЕТАПИ:

- Намножаване на ДНК фрагментите чрез мултиплексен PCR;
- Подготовка на пробите за автоматичния анализатор;
- Капилярна електрофореза;
- Анализирание на резултатите;

В настоящия дисертационен труд бяха използвани 2 варианта на количествен флуоресцентен амплификационен анализ. QF-PCR технологията за рутинна лабораторна дейност беше въведена първоначално за целите на дородовата и послеродовата диагностика за откриване на най-честите анеуплоидии при човека. На този начален етап беше избран набор от 17 микросателитни ДНК маркери, локализирани върху хромозоми 21, 18, 13, X и Y. Анализът беше въведен при работа с наличния в лабораторията към момента автоматичен анализатор ALFExpress (Pharmacia), работещ единствено с флуорохрома Cy5. Пилотното проучване върху пренатални и постнатални проби показва, че този метод е надежден и има висока чувствителност и специфичност. Това ни позволи да въведем QF-PCR технологията за пръв път в България в рутинната диагностична практика.

След доказване на ефективността на прилагане на QF-PCR технологията за откриване на най-честите бройни хромозомни аномалии и преминаването към работа с автоматичен анализатор от по-висок клас (ABI3130/3130x1) беше пристъпено към използване на търговски набор - Aneufast™ QF-PCR. Той използва система с 5 флуорохрома: 6-FAM™, VIC™, NED™ и PET™, като те се използват паралелно със задължителния вътрешен стандарт GS500 LIZ™, служещ за определяне на амплификационния продукт. Това позволява едновременното размножаване и електрофоретично разделяне на 21 локуса едновременно и е ключово предимство на посочения кит.

Търговският набор Aneufast™ QF-PCR включва 6 отделни мултиплексни набора от микросателити (*short tandem repeats* - STRs), както и ДНК маркерите *Amelogenin* и *SRY*, използвани за определяне на пол. Тази комбинация от маркери позволява откриването на анеуплоидии, засягащи половите хромозоми X и Y, хромозоми 21, 18 и 13 - чувствителността и специфичността се оценява на 100% за случаи без мозайка по таргетните хромозоми.

• Амплификация

ДНК пробите могат да бъдат изолирани от разнообразен биологичен материал – амниотична течност, хорионни вѐси (*chorionic villus samples* - CVS), кръв, тъкани. За откриване на състояние на анеуплоидия рутинно на първата стъпка от анализа се използва комбинацията от маркери в двата комплекта S1 и S2, които се изследват едновременно, в една електрофорезна стъпка. Впоследствие, при наличието на данни за някакво отклонение, се включват

допълнителните набори за съответния случай (MXY, M21, M18, M13) - с тяхна помощ може да се получи информация съответно с още 6, 4, 4 и 3 маркера. Едновременно с това се подsigурява и вътрешен контрол за идентичност на диагностицираната проба с независимо повторно амплифициране на 2 от изследваните до този момент ДНК маркери.

Мултиплексни набори S1/S2

Двата мултиплексни набора S1 и S2 позволяват едновременното анализиране на по 5 STR локуса от хромозомите 21, 18 и 13, както и на 3 псевдо-автозомални района (DXYS267, X22, DXYS218) и един X-свързан STR маркер. В допълнение има включени 2 неполиморфни района - *Amelogenin* (AMXY) и *SRY*, които се използват за независимо определяне на генетичния пол на индивида, от който е изолирана ДНК пробата.

Мултиплексни набори MXY, M21, M18, M13

Наборите M21 и M13 съдържат по 5 маркера от съответната хромозома, докато M18 носи 4 маркера. Наборът MXY съдържа 6 STR и 2 допълнителни маркера за определяне на биологичния пол. Освен тях са включени праймери за амплифициране на хромозомно-специфични секвенции от маркера *TAF9L*, който е локализиран върху хромозома 3. Районът там има висока степен на идентичност на последователност върху хромозома X, което позволява да се използват минималните разлики помежду им, за да се генерират хромозомно-специфични PCR продукти. Това спомага за акуратното и независимо оценяване на дозата (броят) X-хромозоми при всички изследвани случаи. Маркерите, включени във всеки от шестте набора на Aneufast™ QF-PCR са представени на таблица 5, а в таблица 6 са обобщени техните основни характеристики.

Таблица 5

ДНК маркери в отделните търговски набори на Aneufast QF-PCR, използван в настоящата работа

	S1	S2	MXY	M21	M18	M13
1	AMXY	SRY	SRY	D21S1411	D18S386	D13S631
2	DXYS267	X22	AMXY	D21S1435	D18S391	D13S634
3	D21S1414	DXYS218	HPRT	D21S1437*	D18S858*	D13S742*
4	D21S1446	HPRT	TAF9L*	D21S1412*	D18S499*	D13S628*
5	D21S1442	D21S1411	DXYS156*	D21S1809*	D18S1002*	
6	D18S535	D21S1435	SBMA*			
7	D18S391	D18S386	DXS6803*			
8	D18S976	D18S390	DXS6809*			
9	D13S797	D13S634	DXS8377*			
10	D13S631	D13S258				
11	D13S305					

Използвани от Aneufast™ QF-PCR флуорохроми: 6-FAM™, VIC™, NED™ и PET™

Допълнителните маркери, които не са включени в стандартно използваните набори S1 и S2, са отбелязани със знака *. Във всички допълнителни набори има ДНК маркери, които са включени и в наборите S1/S2 – с оглед на независима вътрешна контрола на диагностичния процес за потвърждаване идентичността на изследваната ДНК проба. Всяко разминаване в профила е сигнал за възможна размяна на проби и повторен анализ.

Таблица 6

Характеристики на ДНК маркерите, използвани в търговския набор Aneufast™, локализация, дължина на анализирания амплификационни фрагменти и ниво на хетерозиготност по литературни данни.

Маркер	Хетерозиготност	локализация	PCR продукт (bp)	Брой алели	Брой повторени нуклеотиди	
AMXY	6-FAM	-	Xp22.1 / Yp11.2	X: 104 / Y: 109	2	-
SRY	6-FAM	-	Yp11.2	463	1	-
TAF9L*	PET	-	Xq13 / 3p24	X: 110 / 3: 107	2	
X22	6-FAM	0.91	Xq28 / Yq(PAR2)	189 – 253	15	5
DXYS267	PET	0.78	Xq21.31 / Yp11.31	330 – 354	7	4
DXYS218	PET	0.65	Xp22.32 / Yp11.3 (PAR1)	266 – 294	8	4
DXYS156*	NED	0.68	Xq21.31 / Yp11.31	134 – 164	7	5
HPRT	6-FAM	0.75	Xq26.1	264 – 313	12	4
DXS6803*	VIC	0.68	Xq12-Xq21.33	106 – 128	7	4
DXS6809*	VIC	0.75	Xq	238 – 274	13	4
DXS8377*	NED	0.85	Xq28	213 – 252	11	3
DXS981*	6-FAM	0.78	Xq13.1	336 – 360	8	4
DXS1187*	6-FAM	0.70	Xq26.2	136 – 172	10	4
D21S1414	6-FAM	0.85	21q21	328 – 443	14	4
D21S1411	VIC	0.93	21q22.3	246 – 319	14	4
D21S1446	PET	0.77	21q22.3-ter	200 – 228	9	4
D21S1437*	VIC	0.78	21q21.1	120 – 144	7	4
D21S1809*	6-FAM	0.70	21q22.1	196 – 220	7	4
D21S1412*	6-FAM	0.73	21q22.2	384 – 418	9	4
D21S1435	PET	0.75	21q21	142 – 188	9	4
D21S1442	6-FAM	0.76	21q11.11	136 – 174	9	4
D18S391	VIC	0.75	18p11.2	144 – 168	7	4
D18S390	VIC	0.75	18q22.2	398 – 430	9	4
D18S535	NED	0.82	18q12.2	126 – 156	9	4
D18S386	NED	0.89	18q22.1	319 – 387	16	4
D18S858*	PET	0.66	18q21.1	186 – 204	6	4
D18S499*	6-FAM	0.72	18q21.32	386 – 408	6	4
D18S1002*	6-FAM	0.80	18q11.2	122 – 142	5	4
D18976	NED	0.76	18p11.31	164 – 184	9	4
D13S631	VIC	0.78	13q31-32	192 – 218	8	4
D13S634	VIC	0.85	13q14.3	460 – 500	12	4
D13S258	NED	0.89	13q21	230 – 281	17	2
D13S305	PET	0.75	13q12.1-q14.1	426 – 458	9	4
D13S628*	6-FAM	0.70	13q31-q32	436 – 464	8	4
D13S742*	VIC	0.75	13q12.12	254 – 274	7	4
D13S797	NED	0.65	13q32-q33	417 – 454	8	4

Използвани от Aneufast™ QF-PCR флуорохроми: 6-FAM™, VIC™, NED™ и PET™

- **Капилярна електрофореза**

С използването на Aneufast™ QF-PCR Kit се получават амплификационни продукти с дължина между 105 и 490 н.дв., които могат да бъдат разделени ефективно с електрофореза в капиляри с дължина 36 см и POP7 и използването на стандартни микросателитни модули.

- **Анализиране на данните**

За събиране на данните след извършването на капилярната електрофореза, се използва специализиран софтуер *Applied Biosystems Data Collection™ Software*. Анализването на получените данни става автоматично с помощта на зададени модули за анализ в *GeneMapper software*.

Всеки маркер се подлага на идентифициране по очакван размер и цвят на използвания флуорохром, като маркери с очакван близък размер на ампликона се бележат с различни цветове. Флуорохромите **6-FAM™**, **VIC™**, **NED™** и **PET™**, използвани за белязане на праймерите се отчитат от софтуера върху електрофоретограмите съответно като синьо, зелено, жълто (черно) и червено. Багрилото **LIZ** (оранжево) се използва единствено за включване във вътрешния стандарт (*Size Standard*), който задължително се използва паралелно с всяка проба в извършваната капилярна електрофореза.

Като цяло, в голяма част от случаите се очаква да бъдат получени еднозначни резултати, осигуряващи бърза и сигурна диагностика на изследваните проби. В някои случаи обаче, би могло да се наблюдават резултати, които не могат да бъдат оценени еднозначно. Това може да се дължи на мозаицизъм, химеризъм или замърсяване на пробата с друг генетичен материал (каквито са случаите с наличие на майчина контаминация при амниотичните проби, видимо примесени с майчина кръв).

Използваният протокол за работа е представен в Приложение 1 на настоящия дисертационен труд.

3.3.4. MLPA - Мултиплексната лигазно-зависима амплификация (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Генетичните дефекти при около 10% от вродените състояния са делеции/дупликации на части от гени или по-големи райони в генома. В някои случаи обаче тази част може да достигне и до над 30%. Мултиплексната лигазно-зависима амплификация (MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) е вариант на мултиплексната амплификационна реакция, която се използва за откриване на делеции/дупликации в конкретни райони на генома. При този анализ се осъществява намножаване на множество прицелни райони само с помощта на една двойка праймери.

ЕТАПИ И ПРИНЦИП НА MLPA:

Етапите на работа са представени на фигура 8

- **Подготовка на пробите и разреждане**

Измерва се чистотата и концентрацията на ДНК пробите. Приготвят се работни разредки от 100 ng/ul с TE-буфер.

- **Хибридиране със специфични за отделните локуси сонди**

След денатурирането им, ДНК пробите се смесват със съответните MLPA сонди, специфични за конкретните прицелни райони. Сместа се инкубира на 60°C за поне 16 часа с цел осъществяване на хибридизация между таргетните райони на ДНК молекулата и съответните сонди.

Всяка MLPA проба се състои от две олигонуклеотидни последователности, които разпознават конкретен прицелен район в генома. Сондите включват и по една праймерна последователност (права или обратна). Всяка двойка олигонуклеотидни сонди хибридира към специфичния си таргетен район. Само когато и двете олигонуклеотидни проби в двойката успешно хибридизират с прицелния си район, само тогава може да бъде осъществено и свързването (лигирането) между тях в една цялостна проба на следващия етап от анализа.

- **Лигазна реакция**

След охлаждане до 54°C и в тези температурни условия, към пробите се прибавя лигазния микс. След последваща денатурация и охлаждане до 4°C се пристъпва към полимеразната верижна реакция. При тази стъпка се осъществява свързването между двете олигонуклеотидни проби от всяка двойка MLPA сонди.

- **PCR**

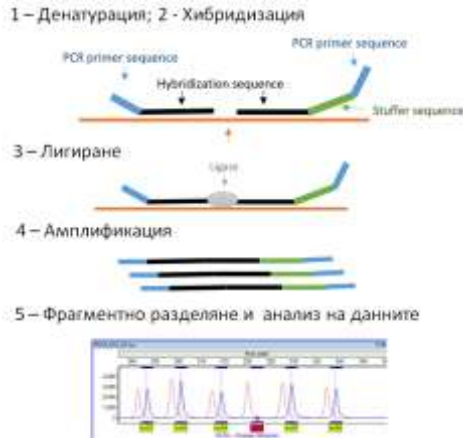
В условията на 60°C започва амплификационната реакция, включваща съответните буфери, праймери и полимераза. Само успешно лигираните проби ще бъдат експоненциално амплифицирани на този етап и това ще позволи количествената оценка на броя прицелни секвенции в изследвания геном.

- **Капилярна електрофореза.**

Всяка от пробите е с уникална, специфична дължина. Това позволява получените ампликони да бъдат разделени и идентифицирани с помощта на капилярна електрофореза. Анализът се осъществява заедно със стандарт ROX500 в среда от HiDi формамид след денатурация. Пробите, които не са се лигирали успешно ще съдържат само една праймерна последователност и поради неуспешното им амплифициране няма да генерират флуоресцентен сигнал при електрофорезата.

- **Анализиране на получените данни**

Използва се специфичен софтуер за анализ (Cofalizer TM). Сравняването на профила на флуоресцентните пикове, получени за дадена ДНК проба, с тези на използваните за референтни ДНК проби позволява извършването на количествена оценка на всеки ампликон. Това се постига с измерване на нивото, с което определен прицелен район присъства в изследваната ДНК проба.



Фигура 8

Схематично представяне на стъпките на MLPA анализа

В работата по настоящия труд бяха използвани MLPA търговски набори SALSA MLPA P334-A3 – Gonadal probemix и SALSA MLPA P185-C1 – Intersex probemix. Техните характеристики са представени на таблица 7.

Таблица 7

Характеристики на използваните в настоящата работа търговски набори за MLPA за търсене на делеции/дуPLICATIONS в гени, асоциирани с някои състояния от спектъра на нарушенията в половото развитие

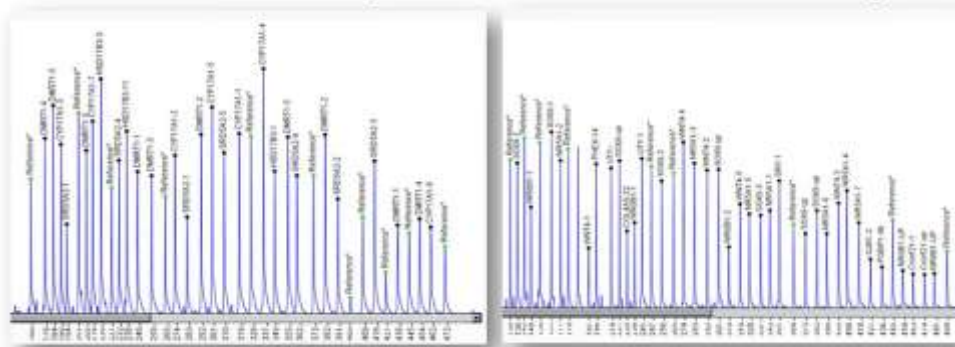
SALSA MLPA P334-A3 – Gonadal probemix:

SALSA MLPA P185-C1 – Intersex probemix:

DMRT1	CYP17A1	SRD5A2	HSD17B3	SOX9	Chr X/Y	NR0B1 / DAX1	WNT4	NR5A1 / SF1
Exon 1 (x2)	Exon 1	Exon 1 (x2)	Exon 1	Exon 1 (x2)	Yp11.31 (x2)	Exon 1 – x2	Exon 1	Exon 1
Exon 2 (x2)	Exon 2	Exon 2	Exon 3	Exon 2	Yq11.221 (x2)	Exon 2	Exon 2	Exon 2
Exon 3 (x2)	Exon 3	Exon 3	Exon 11	Exon 3	Xp11.23	NR0B1 region (x2)	Exon 3	Exon 3
Exon 4 (x2)	Exon 4	Exon 4 (x2)		upstream (x5)	Xp22.11	CXorf21 region (x2)	Exon 4	Exon 4
Exon 5 (x2)	Exon 5	Exon 5			Xq13.1		Exon 5	Exon 5
	Exon 6				Xq22.3			Exon 6
	Exon 7							Exon 7

SALSA MLPA P334-A3 – Gonadal probemix

SALSA MLPA P185-C1 – Intersex probemix



Използваният протокол за работа е представен в Приложение 1 на настоящия дисертационен труд.

3.3.5. СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER

ЕТАПИ:

- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR;
- Пречистване на продукта с ExoSAP;
- Секвенционна реакция;
- Преутаяване на продукта;
- Разтваряне на утайките.

ПРИНЦИП:

- **Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR**

PCR реакцията се извършва при оптимизираните условия за съответните маркери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел и хоризонтална електрофореза. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да бъдат чисти, без неспецифични екстрабендове.

- **Пречистване на продукта с ExoSAP**

Необходимо е пречистване на амплифицирания продукт от останалите в пробата dNTPs, праймери, неспецифични продукти и соли, които биха повлияли върху по-нататъчните реакции. Пречистването се извършва с **ExoSAP** - разтвор на два хидролитични ензима: Екзонуклеаза I и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (*Shrimp Alkaline Phosphatase* - SAP). **Екзонуклеаза I** разгражда неизползваните едноверижни праймери и всички други допълнителни едноверижни ДНК фрагменти, получени се по време на PCR реакцията. **SAP** хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди.

- **Секвенционна реакция**

Използваният търговски набор за секвенционната реакция **Big Dye® Terminator kit v3.1.** (Applied Biosystems) включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеоди и флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди в състава на своя Ready-Reaction Mix. В 3'-края на всеки един от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA, ddT, ddC) – дидеокситерминаторите, има различно багрило. Съотношението на ddNTPs и dNTPs е различно при различните китове, в зависимост от приложението им. Секвенционният микс се смесва с матричната ДНК (пречистеният PCR продукт) и праймера за секвениране (единият от използваната при амплифицирането двойка праймери). Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация при определени условия.

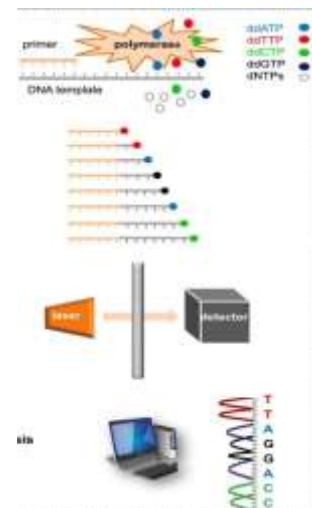
- **Преутаяване на продукта**

Следва преципитация на реакционните продукти с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Пречистването по този начин е лесно и евтино, но е относително продължително. След центрофугирането е важно пробите да бъдат извадени внимателно, без разклащане и възможно най-бързо да се отстрани супернатантата (напр. чрез аспириране).

- **Разтваряне на утайките**

Получената утайка (обикновено не се вижда ясно) се разтваря в подходящ буфер за нанасяне (формамид), след което пробите се зареждат в секвенатора за автоматично инжектиране.

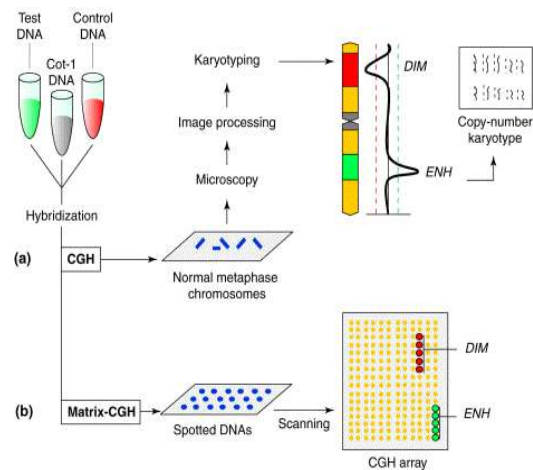
Използваният протокол за работа е представен в Приложение 1 на настоящия дисертационен труд.



3.3.6. СРАВНИТЕЛНА ГЕНОМНА ХИБРИДИЗАЦИЯ ВЪРХУ МИКРОЧИПОВЕ

ЕТАПИ:

- Подготовка на пробите:
измерване концентрациите на ДНК и
разреждане до 500 нг;
- Рестрикция;
- Прайминг;
- Белязане;
- Пречистване;
- Оценка на инкорпорираното багрило;
- Хибридизация;
- Промиване;
- Сканиране;
- Анализ на данните.



TRENDS in Molecular Medicine

ПРИНЦИП:

Сравнителната геномна хибридизация върху чипове (*Array comparative genomic hybridization*, array CGH, aCGH) е молекулярно-цитогенетична методика, която се основава на сравняване на изследвания геном на пациента с референтен (контролен) геном и идентифициране на различията между двата генома. При array CGH се използват клонирани ДНК фрагменти около 60-100 н.дв., чиято хромозомна локализация е известна, което позволява откриването на аберации и позиционирането им директно в геномната секвенция.

Обикновено тестовата ДНК проба се бележи с розовия флуорохром **Cy5** (Цианин 5), а референтната ДНК – със синия **Cy3** (Цианин 3). Еднакви количества от двете ДНК проби се смесват и ко-хибридизират върху ДНК микрочип, съдържащ няколко хиляди олигонуклеотиди или клонирани ДНК фрагменти. След хибридизирането се използва специална дигитална система за сканиране на образи и количествена и качествена оценка на получената интензивност на флуоресценция от хибридизираните флуорохроми. Полученото съотношение на интензивността на флуоресценция е пропорционално на съотношението на копийните варианти на ДНК последователностите в тестовия и референтния геном. Ако интензивността е еднаква за двата флуорохрома в една и съща проба/точка от чипа, се счита, че този регион има едно и също количество при изследвания пациент и при контролата. Ако има отклонение в съотношенията Cy3: Cy5, това е индикация за увеличени или намалени брой копия на конкретния регион при изследвания пациент.

Използваният протокол за работа и анализ е предоставен по време на специализацията в Institut für Humangenetik, UKM, Munster, Germany и е представен в Приложение 1 на настоящия дисертационен труд.

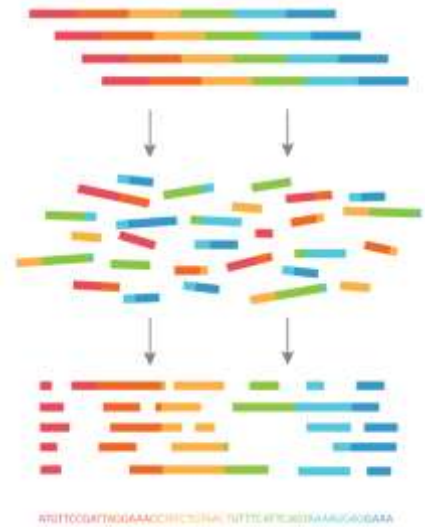
3.3.7. СЕКВЕНИРАНЕ ОТ НОВО ПОКОЛЕНИЕ (NGS – Next generation sequencing)

ЕТАПИ:

- Подготовка и създаване на секвенционни библиотеки
- Амплифициране
- Секвениране
- Анализ

ПРИНЦИП:

Независимо от съществуването на различни платформи за секвениране от ново поколение, всички системи залагат на няколко основни стъпки подготовка на секвенционните библиотеки, амплификация и секвениране. Принципната разлика със секвенирането по Sanger е в едновременното паралелно секвениране на милиони фрагменти, което води до повишаване на скоростта и точността на извършваните реакции, като едновременно с това силно се намаляват разходите. NGS технологията има много висока чувствителност за откриване на редки варианти, позволява работа едновременно с много проби за по-кратко време, както и възможност за паралелно изследване на стотици до хиляди гени и генни райони едновременно.



При приготвяне на библиотеката от таргетни райони за всеки пациент, след довеждане на концентрацията на ДНК пробите до 10 ng/μl се извършва фрагментация на случаен принцип на геномната ДНК и се добавят адапторни секвенции в двата края на получените фрагменти.

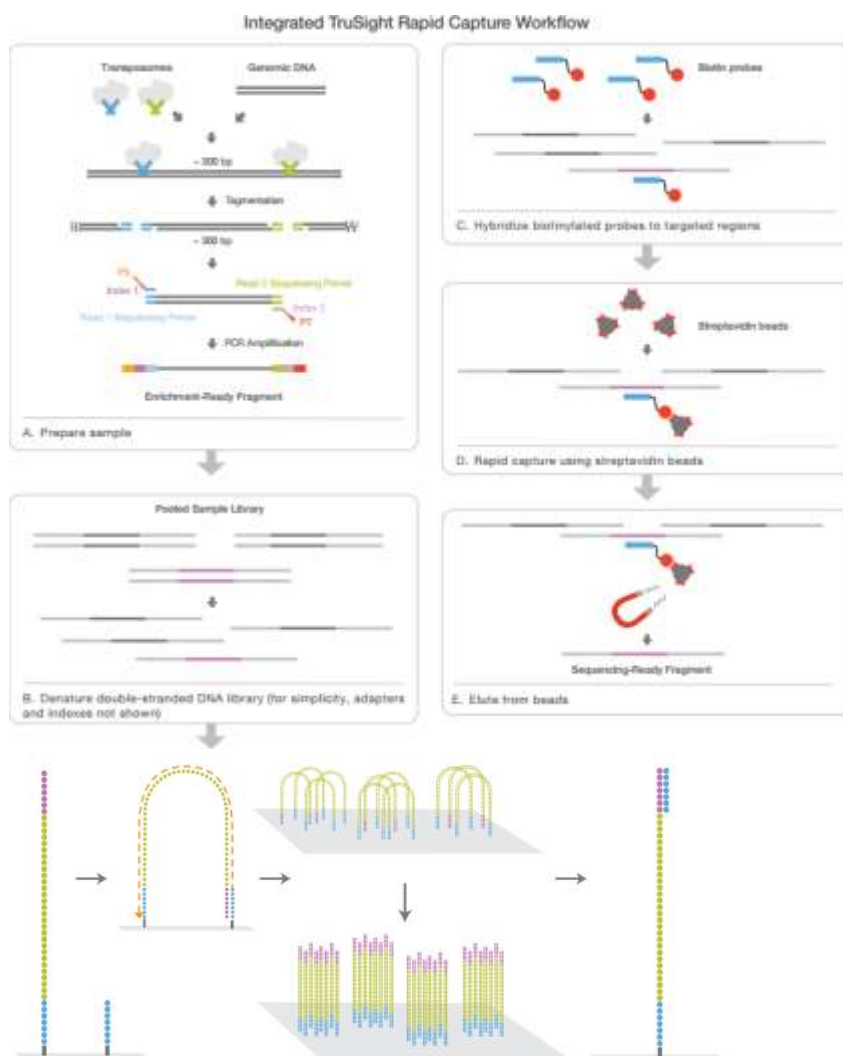
Следва двукратно PCR амплифициране и хибридизиране на тагментирани ДНК фрагменти с междинно пречистване с цел обогатяване и по-специфично амплифициране само на таргетните региони. Добавените специфични индекси позволяват едновременното мултиплексно секвениране в обща ДНК библиотека (т.нар pool) на няколко ДНК проби. Капацитетът на секвентатора MiSeq позволява в едно секвениране с панела TruSight Inherited Disease да се комбинират до 6 различни библиотеки, при желана средна дълбочина на секвениране около 100 x. Измерването на пробите се извършва посредством Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System.

Секвенирането се осъществява в поточни (flow) клетки за 500 цикъла. По повърхността на микроканалчетата ковалентно са фиксирани огромен брой олигонуклеотиди (комплементарни на адапторните секвенции), за които се закрепят ДНК фрагментите. Генерирането на клъстери става чрез т.нар. bridge или мостова амплификация, последвано от секвениране по време на синтез (т. нар. *sequencing-by-synthesis*). Генерират се секвенции с много високо ниво на прецизност.

Първичният анализ на получените секвенции се извършва чрез софтуера MiSeq Reporter, като получените секвенции се подравняват с референтния човешки геном (версия GRCh37) и несъответствията се отчитат като варианти. За подравняване на

последователностите спрямо референтния геном е бил ползван алгоритъма на Burrows-Wheeler или Isaac, а за идентифициране на вариантите (еднонуклеотидни замени, делеции / инсерции с дължина до 25 бази) - приложението GATK Variant Caller или Isaac Variant Caller.

В настоящата работа са включени резултатите, получени с технологията NGS при 4 от DSD пациентите. Анализите с новогенерационно секвениране с панела *TruSight Inherited Disease* (552 таргетни гена, 8801 таргенти екзона, общ размер на таргетния регион 2.25 Mb), бяха извършени от екипа на Лаборатория „Геномика“ на СБАЛГАР „д-р Малинов“ София. Използвани са апаратите Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System и MiSeq като е следван протокола на работа, описан в дисертационния труд на тема „Аналитичен подход за разкриване на генетични нарушения при редки болести чрез ДНК секвениране от ново поколение“ на д-р Радослава Вържарова.



Фигура 9

Схематично представяне на секвенирането от ново поколение (по Illumina)

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 правопрпорционални 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 правопрпорционална зависимост между височината и количеството на флуоресцентен амплификационен продукт.

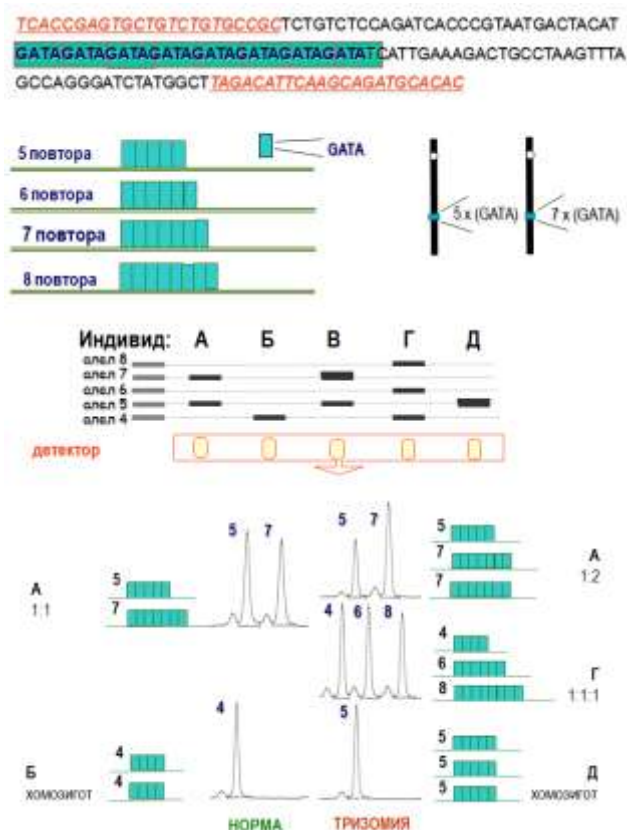
Съотношения между алелите

Съотношението между площите/височините на флуоресцентните пикове се използва за изчисляване на количествата получени алели. Може площта/височината на първия пик (късия алел) да бъде разделена на площта/височината на втория (дългия алел) или алелът с по-голямата площ/височина да бъде разделена на алела с по-малката. В случаите, когато разликата в дължините между двата алела е >20 нуклеотида, може да се очаква получено съотношение извън очакваните нормални стойности, като това да се дължи на преференциалната амплификация на по-късия 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 10А. 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 10Б).



Фигура 10

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 амплификация ще покаже 2 пика с различна интензивност на флуоресценция и съотношение между площите им близко до 2:1 или 1:2 (**тризомийно дваалелно** състояние) – фигура 10В. 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 10Г.

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 10Д).

Пробите с триплоидия ще дадат тризомийно триалелно или тризомийно диалелно състояние за информативните си STR маркери, локализирани върху всички изследвани хромозоми.

Изследваната проба може да бъде приета за проба с тризомия **само ако поне 2** от изследваните маркери от една и съща хромозома покажат ясно състояние на тризомия (1:1:1, или 2:1, или 1:2), като резултатите по останалите маркери от съответната хромозома могат да бъдат **неинформативни**.

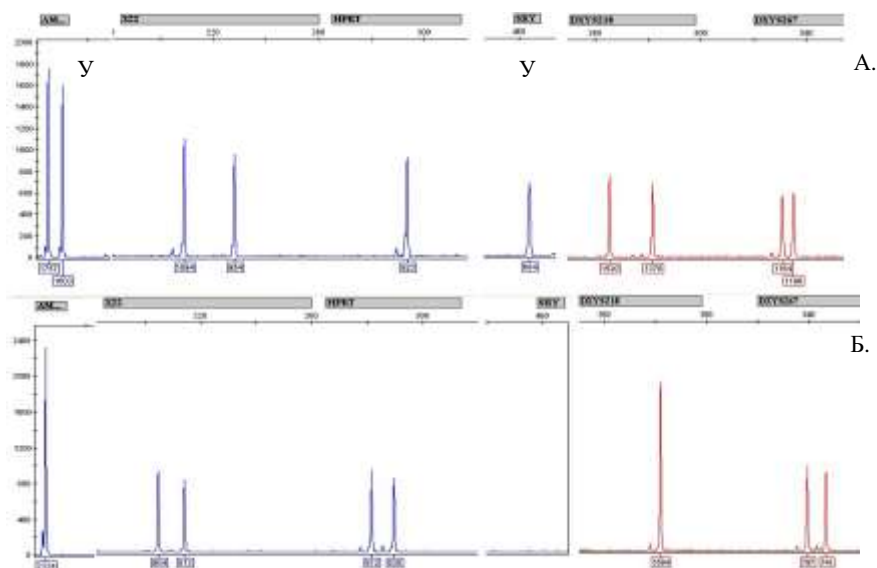
Откриването на монозомия X беше основно предизвикателство за QF-PCR анализа дълго време. Въвеждането на ДНК маркер с локализация както на X-хромозомата, така и на някоя автозома (каквото е *TAF9L*) позволи количествената оценка и на наличните X-хромозоми. Изчисляването на съотношенията при *TAF9L* позволява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

Съгласно стандартния ход, възприет в Национална генетична лаборатория за случаите с междинно-полови състояния, на първия етап от ДНК изследването беше извършвано определяне на вида и броя полови хромозоми чрез количествен флуоресцентен PCR анализ (QF-PCR).

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 11 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 11 Б).



Фигура 11

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

Очаквани резултати при изследване на ДНК проба с отклонения по половите хромозоми

Монозомия X (синдром на Turner):

Очаква се за всички маркери, локализирани върху половите хромозоми да бъде отчетен само по един алел, както и липса на амплификация на Y-специфичните продукти на *AMXY* и на *SRY*. По отношение на маркера *TAF9L* се отчита съотношение 2:1 в полза на по-късия алел, който е специфичен за хромозома 3.

XXY (Синдром на Клайнфелтър):

Два пика с еднаква интензивност и съотношение 1:1 (както при нормална жена) се отчитат за информативните маркери на X-хромозомата, както и за *TAF9L* – показателно за наличието на две X-хромозоми.

Тризомия X:

Очаква се съотношението на двата алела на *TAF9L* да бъде около 0.7:1 в полза на по-дългия алел, специфичен за хромозома X. В този случай всички информативни маркери на половите хромозоми следва да показват съотношения, характерни за тризомийно състояние.

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 8). 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 8

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

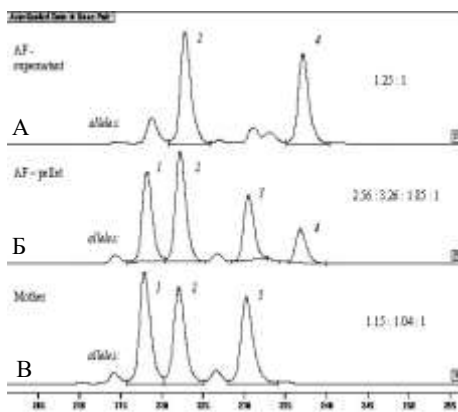
От друга страна, всичките 32 проби с анеуплоидия, касаеща **половите хромозоми** (3% от пренатално изследваните проби) са били коректно идентифицирани. Нормални резултати на проби с женски генетичен пол са отчетени при 482 проби (вкл. пробите с друга анеуплоидия), а с мъжки генетичен пол – при 536 проби (вкл. пробите с друга анеуплоидия). Т.е. общо 1018 проби са били без анеуплоидия, касаеща автозомите или половите хромозоми. Резултатите са в съответствие с кариотипа, което показва 100% чувствителност 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 нискооборотното 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 12 А), докато анализът на клетките от утайката показва наличие на силна контаминация с майчин материал (фигура 12 Б). Особен интерес за нас представляваха профилите по отношение на хромозома 21, заради регулярната форма на тризомия 21 при самата бременна жена (фигура 12 В). При ДНК пробата, изолирана от клетките на надутайката, беше наблюдавано ясно наличие на 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 показва кариотип 46,XY на култивираните амниотични клетки. Бременността завърши с раждането на здраво момченце в 39 г.с., което се развива нормално.



Фигура 12

Сравняване на профилите по маркер D21S11 на ДНК проби, изолирани от амниотични клетки от супернатантата (А) и от амниоцити от утайката след центрофугирането (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 показва, че QF-PCR технологията може да бъде прилагана и при комплексни случаи, каквито са тези на пренатални проби с контаминация с майчин генетичен материал и да позволи разграничаване на различни генетични профили, каквито биха могли да бъдат и случаите на химеризъм.

QF-PCR 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 **ДОРОВО ДИАГНОСТИКА НА ПОЛОВИ АНЕУПЛОИДИИ**

След въвеждането на QF-PCR метода като рутинна дородова диагностика на анеуплоидии беше извършена ретроспекция за дородово откритите анеуплоидии по отношение на половите хромозоми. Направената извадка от данните за открити анеуплоидии по половите хромозоми при 31 проби е представена на таблица 9

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 9

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

	Възраст на майката	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, след редукция на единия плод заради аномалия (Денди-Уокър)
15	40	19+1	XXY	няма	БХС Риск: 1:10	
16	42	17	XXY	няма	няма данни	Изпратено е за микроделеционни синдроми
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, хидроцефалис
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 = двустранни кисти на плексеус 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	Анализираните 16 митози са с 45,X
29	29	13	Мозайка? дисбаланс на X и Y	няма	БХС риск: 1:35	предишна бременост с T21
30	36	11+6	Мозайка? дисбаланс на X и Y	няма	БХС риск: 1:3	УЗ = кистична хигрома, NT=8.0mm; трикуспидална 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**

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.

Таблица 10

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	XУ	тежка хипоспадия + интерсексуални гениталии	-
5	XУ	хипоспадия, крипторхидизъм	-
6	XX	Obs.синдром на Turner	-
7	X	Obs.синдром на Turner	-
8	XX	Obs.синдром на Turner	-
9	XУ	неясен пол, малформативен синдром	-
10	XX	Obs.синдром на Turner, двуплодна бременност, оточно	-
11	XX	Obs.ВНХ, хипоспадия, близък 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, двойствени гениталии	46,XX,add(2)(q37.3) mat
18	XУ	микропенис, хипоспадия	-
19	XX	Obs.синдром на Turner	-
20	XУ	микропенис, атрезия на ануса, хипоспадия,	-
21	XX	Obs.ВНХ, клиторомегалия, хипопластични лабии, ИУРП	-
22	XX	Obs.ВНХ, клиторомегалия	-
23	XУ	хипертелуризм, раздвояване на уретрата	-
24	XУ	неясен пол, малформативен синдром	-
25	XX	Obs.синдром на Turner	-
26	XУ	неясен пол, мускулна хипотония, микроретрогнатия	-
27	XУ	неясен пол, тежка хипоспадия	-
28	XX	Obs.ВНХ, Клиторомегалия	-
29	XX	Obs.синдром на Turner	-
30	XУ	пеноскротална транспозиция	-

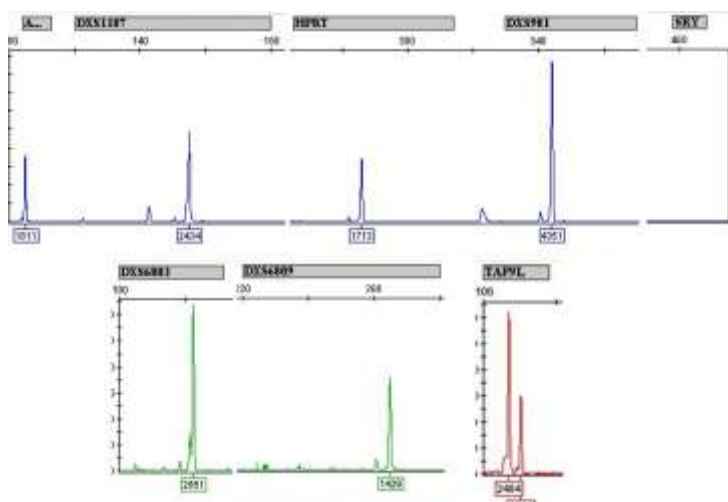
При 7 от изследваните индивиди е имало съмнения за Вродена надбъбречна хиперплазия (ВНХ), а при 11 е имало данни за някакви малформации на гениталиите, в т.ч. двойственост, хипоспадия, микрофалус.

Цитогенетичният анализ, извършен при едно от децата със съмнение за малформативен синдром и с двойствени гениталии беше установен кариотип 46,XX,add(2)(q37.3) mat с допълнителен материал на дългото рамо на хромозома 2, който е с майчин произход.

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**

При анализ на насочваните индивиди в тази категория беше отчетено, че по-голямата част от тях са на възраст между 10 и 20 г (13/25), а най-малко са тези в ранна детска възраст. Със съмнения 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, при който развитието на яйчниците е нормално, но липсват Мюлерови структури са б от насочените пациентки за определяне на вида и броя полови хромозоми. При част от тези пациентки бяха извършени допълнителни генетични анализи по време на специализацията в Мюнстер, Германия по проект на Института по човешка генетика (aCGH и търсене на мутации в гените *LHX1* и *HNF1B*), но патогенни варианти не бяха идентифицирани.



Фигура 13

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

Таблица 11

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-гениталния тракт, Uterus duplex, хидронефроза
10	16 г	XX	Obs.синдром на Калман с аносмия (открита е мутация в <i>FGFR1</i> 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

Пациентките, които бяха насочвани за определяне на вида и броя полови хромозоми със съмнения за нарушения в половото развитие и синдром на андрогенната нечувствителност, гонадна дисгенезия и др. и данни за ХУ след QF-PCR и/или кариотипиране са представени като отделна група в настоящия труд.

Клиничният случай, представен по-долу (#22 от таблица 11) 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. Детски невролог поставя диагнозата ДЦП и е започната

терапия с вит В комплекс – при проследяването до края на пубертетната ѝ възраст пациентката е без отклонения в неврологичния статус, но и без промяна в клиничната картина.

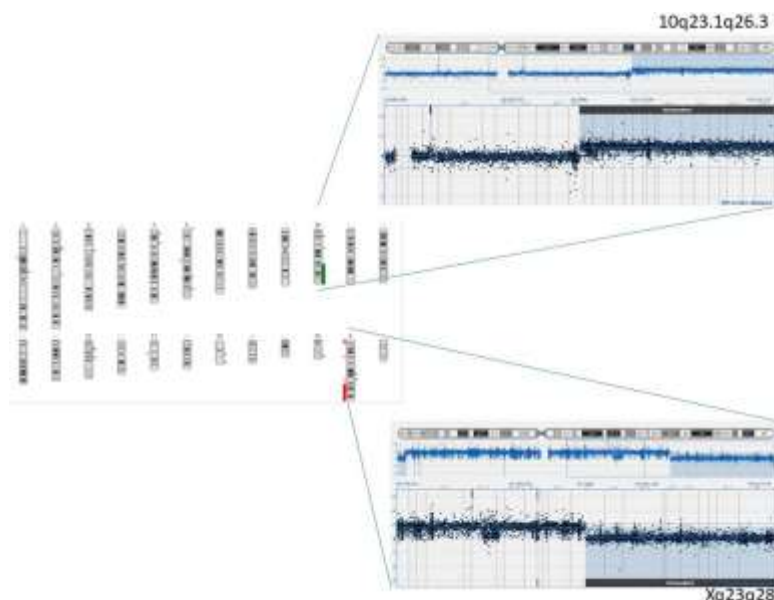
При посещението на пациентката в консултативния кабинет прави впечатление грацилната структура на тялото и микрогнатия, съобщава за аменорея с еднократно кървене на 18 год възраст. Насочена е към специалист ендокринолог за диагностично уточняване - аксиларното окосмяване е налично, а пубисното е III-IV 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 за известна вариация по отношение на едната X-хромозома.

Молекулярно-генетичен анализ

Извършеният QF-PCR анализ показва данни за две X-хромозоми, без позитивиране на сигналите за Y-хромозома. ДНК маркерите, локализирани дистално на X-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 $\text{arr[hg19] Xq23q28(112,049,930-154,908,471)x1,10q23.1q26.3(85,629,408-135,372,492)x3}$ - наличие на небалансирано хромозомно пренареждане, включващо дългите рамена на хромозоми 10 и X (фигура 14).



Фигура 14

Резултат от извършения aCGH анализ при случай #22

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 (делетия) на дългото рамо на X-хромозомата (Xq23q28) с размер 42.859 Мб. В дуплицирания район на 10-та хромозома са картирани 662 гена, а в делетирия на X-хромозомата 655 гена (таблица 12).

Заради възможността хромозомното пренареждане да е унаследено от родител-носител на балансирана транслокация между X-хромозомата и 10-та хромозома, беше препоръчано извършване на хромозомен анализ при родствениците от първа степен на пациентката. Тъй като бащата е починал, кариотипиране беше възможно само при майката и при по-малката сестра на пациентката, но X-хромозома с подобен на нейния профил не беше наблюдаван при тях.

Таблица 12

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 lymphoproliferative 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 :	<i>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, BMPRIA</i>	<i>F9, AGTR2, GPC3, HPR1, SLC9A6, MECP2, AVPR2, EMD, LICAM, NDUFA1, USP26, VMA21, LAMP2, FAM58A, SOX3, CIGALT1C1, OCLR, GDI1, BCAP31, SLC6A8, TAZ, G6PD, SH2D1A, ZDHHC9, OPN1LW, MTM1, CD40LG, IKBKG, XIAP, PHF6, GRIA3, F8, NSDHL, ARHGEF6, AFF2, FRMD7, OPN1MW, OPN1MW2, SLC6A14, FLNA, FMRI, UPF3B, ZIC3, MAMLD1, IDS, RPL10, DKC1, FH1, ABCD1, CUL4B</i>
Брой гени :	662	655

Беше изказана хипотеза, че изненадващо лекият фенотип при наличието на такова сериозно геномно пренареждане може да се дължи на случайна инактивация на X-хромозомата, носеща допълнителния район от дългото рамо на хромозома 10. При пациентката бяха анализирани 100 метафази от две самостоятелни клетъчни култури третирани пулсово с BrDU през късната S-фаза. Целта беше да се идентифицира инактивираната X-хромозома чрез по-късната ѝ репликация през S-фазата на клетъчното делене и по-бледо оцветяване при третиране на хромозомите с бои като Giemsa. Микроскопският анализ показва, че в 92 от метафазите дериватната X-хромозома се реплицира по-късно от нормалната. Това беше в подкрепа на хипотезата ни, че по-слабата фенотипна изява на частичната тризомия 10q се дължи на хетерохроматинизиране на дериватната X-хромозома. Изследването беше извършено от д-р Вължарова и екипът ѝ в Клиника „Малинов” .

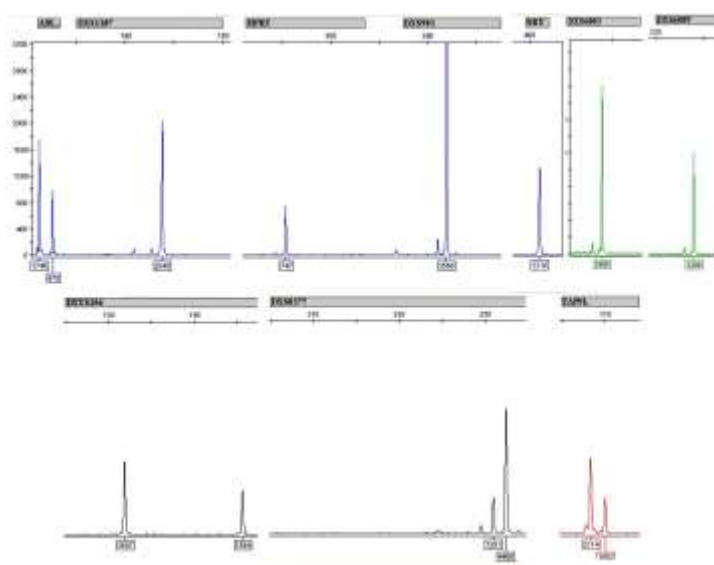
4.3.3. Прилагане на QF-PCR методиката за постнатална диагностика за определяне на вид и брой полови хромозоми при **13** индивида с **мъжки фенотип**

Всички пациенти от тази изследвана група са представени на таблица 13. При 5 от насочените имаше съмнения за синдром на Клайнфелтър, който обаче беше потвърден само при един от тях – фигура 15.

Таблица 13

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

	Възраст	QF-PCR	Повод
1	8 мес	XУ	хипоспадия + хидронефроза вляво
2	11 г	XX, SRY+	Овотестикулярно XX състояние, без мутации в NR5A1
3	10 г	XУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
4	11 г	XУ	Хипогонадотропен хипогонадизъм
5	16 г	XXУ	Obs.синдром на Клайнфелтър
6	20 г	XУ	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	XУ	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	XУ	Obs.синдром на Клайнфелтър



Фигура 15

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

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 наличен 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 хромозоми**

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 [Donaghy, 2005]. Очаква се наличие на допълнителни пикове и нетипични съотношения между площите само за маркерите на таргетната хромозома, въввлечена в мозайката. Тези данни може да бъдат съвсем дискретни, като променените съотношения може да бъдат и в границите на нормата, или по-високият пик да бъде на по-дългия алел. Резултатите от прилагането на този анализ при случаи с мозаицизъм или структурни изменения, касаещи половите хромозоми са представени на таблица 14.

Съгласно препоръките на UK Clinical Molecular Genetics Society and Association of Clinical Cytogenetics (2007) при наблюдаване на дискретни, но постоянни отклонения и/или малки допълнителни пикове за маркерите на конкретна хромозома, следва да бъдат изследвани още ДНК маркери от тази хромозома. Обикновено опитният лабораторен специалист може да разграничи генотип на мозайка и смесване на два различни генотипа, както 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.

Таблица 14

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 X	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 У-хромозомата (локус AZFc)	45,X [6] / 46,XY [14]
7	7 г	Профил като при XX, няма данни за У-хромозома	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 У-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 XXX	47,XXX / 46,XX

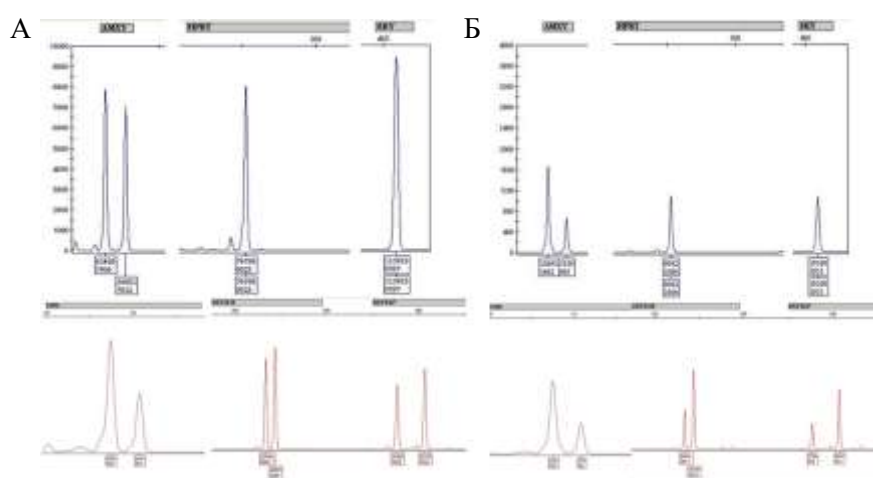
Получените резултати в тази изследвана група са разнообразни и специфични за всеки отделен случай. Представянето на клиничните данни и генетичните находки при два от изследваните случаи (#11 и #13 от таблица 14) следва по-долу.

Клиничен случай с тъканен мозаицизъм с 45,X / 46,ХУ (#11/таблица 14)

Пациентката е 19 годишна и е потърсила консултация с ендокринолог във връзка с менструални нарушения – олигоменорея и вторична аменорея, с предполагаема диагноза синдром на Суайър. На 17 годишна възраст е установен кариотип 46,ХУ 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 (прогнозният е изчислен на 146см). Костната възраст изостава с около 5-6 години спрямо реалната. Пубертетното развитие липсва (млечни жлези – В2), 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 показва различни електрофоретични профили при сравняване на резултатите. Във венозната кръв има данни за наличие на една X и една Y хромозома. При изследването на букалната лигавица обаче се откри наличие на Y хромозома и и променено съотношение в профилите за X хромозомата (фигура 17 и таблица 15). 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 17

QF-PCR профил при тъканен мозаицизъм по половите хромозоми X/XY:

А. ДНК от венозна кръв,

Б. ДНК от букална лигавица.

Таблица 15

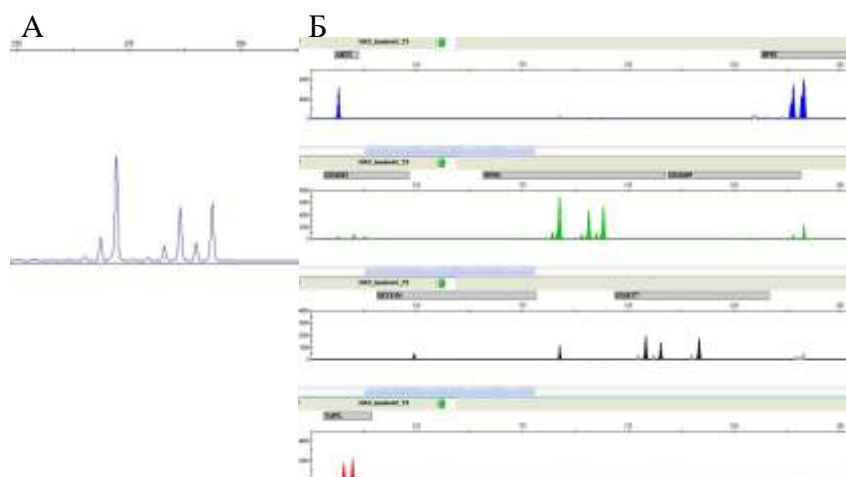
QF-PCR резултати при извършено сравняване на ДНК профилите от букална лигавица и венозна кръв

ДНК маркер	Локализация		Венозна кръв		Букална лигавица		
	Хромозома X	Хромозома Y	Брой алели	Съотношение	Брой алели	съотношение	
1	SRY	-	Yp11.2	Има данни за Y-хромозома	Има данни за Y-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 X-хромозома	-	Има данни за допълнителна X-хромозома	

Клиничен случай с 46,XX / 47,XXX (#13/таблица 14)

Пациентка на 42 години се насочва към клиника по ендокринология във връзка с овариална дисфункция и менструални нарушения (с удължаване на интерменструалните периоди), както и повишаване на андроген-зависимото окосмяване и на телесното тегло. Физикалният преглед установява висок ръст (180 см), обезитет (BMI >30) и леко повишеното окосмяване по вътрешната страна на бедрата, линия 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 ниско нормалните нива на тестостерона 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 18 А), с нетипично съотношение между площта на флуоресцентните им пикове (1.93:1:1.02), насочващо към вероятно наличие на три X-хромозоми. С оглед на това беше извършен допълнителен ДНК анализ за определяне на вида и броя полови хромозоми чрез количествен флуоресцентен PCR анализ (QF-PCR, Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction). Резултатите показаха данни за мозаицизъм, касаещ X-хромозомите – наличие на три X-хромозоми, вероятно в състояние на мозайка с нормална линия XX (фигура 18 Б).

**Фигура 18**

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 овоците 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 визуализирал втори плоден сак и бременността е приета за едноплодна. След УЗ преглед в първия триместър са установени 2 плодни сака и е прието, че става въпрос за двуплодна еднояйчна бременност, възникнала вследствие на последващо разделяне при един от имплантираните успешно ембриони. Нямаме данни дали плацентата е визуализирана като обща на УЗ и дали е имало 2 отделно обособени плодни сака. 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 близък 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.

В 37 седмица от бременността е предприето родоразрешение чрез цезарово сечение. При раждането е присъствал и екип от генетици от МБАЛ „Надежда”, които са взели кръв за извършване на кариотипиране веднага след раждането. Близък 1 е новородено 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. Близък 2 е новородено 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 информации 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 (момиче) 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. Целта на извършения анализ е евентуално установяване/отхвърляне на химеризъм в тъкан с произход, различен от този на хемопоеичната. От родителите е получено подписано писмено информирано съгласие за извършване на тези генетични изследвания.

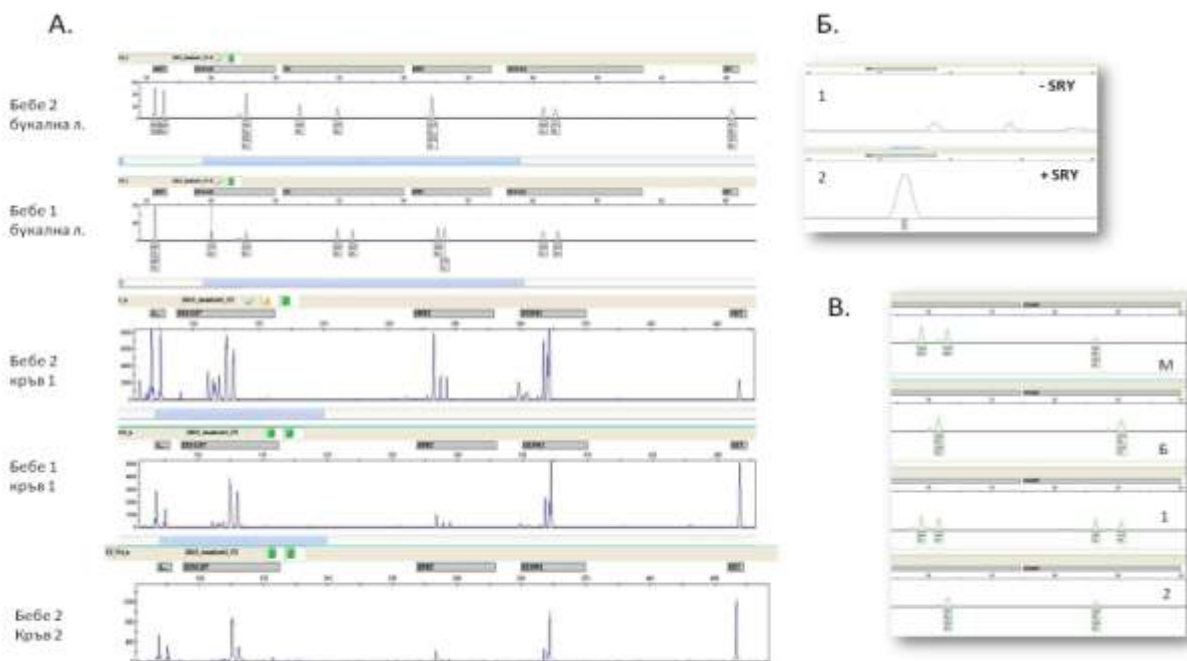
Извършени бяха серия от молекулярно-генетични анализи (таблица 16), вкл и за потвърждаване на дизиготността при близнаците с QF-PCR. При всяко от двете деца се установиха различни ДНК профили (фигура 19). При сравнение с профилите на родителите няма съмнение за унаследяването на алелите от всеки един родител, като се установи, че децата са унаследили по една различна X-хромозома от майка си (таблица 17).

Получените резултати не показват данни за химеризъм в ДНК пробите от букална лигавица, но трябва да се има предвид, че във възможностите на използвания метод не се включва откриване на мозаицизъм с нива под 10-15%.

Таблица 16

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 19

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. Материалите за изследване бяха предоставени от екипа на генетичната лаборатория на МБАЛ „Надежда“. Наблюдаваните електрофоретични профили при изследването на тези проби и при двете деца са в съответствие с получения резултат от цитогенетичния анализ – данните за едновременно наличие на генетични профила на двете деца потвърждават наличието на химеризъм по отношение на хемопоеичната система .

Суспензия от култивирани лимфоцити 6 месеца след раждането отново беше предоставен от екипа на генетичния отдел на МБАЛ „Надежда“ за сравняване с получените досега профили при двете деца. Резултатите при извършените ДНК съвпадат с тези от изследваните лимфоцити, култивирани при раждането. Това е в съответствие и с кариотипния резултат, получен при повторния цитогенетичен анализ на 6 мес-възраст на децата, а именно

при близнак 1 (женски фенотип): chi46,XY[87]/46,XX[13] и при близнак 2 (мъжки фенотип): chi46,XY[86]/46,XX[14] сред анализирани 100 метафазни пластинки, оцветени по GTG метод.

Таблица 17

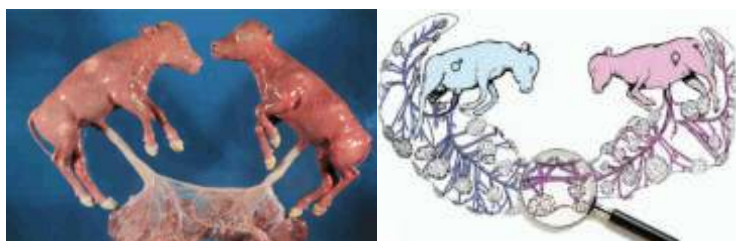
Сравнение между профилите на родителите и децата, чиято ДНК е изолирана от букална лигавица

Маркер	-		Майка		Баща		Близнак Ж		Близнак М	
	X	Y	Алел 1 ^М	Алел 2 ^М	Алел 1 ⁶	Алел 2 ⁶	Алел 1 ⁶	Алел 2 ^М	Алел 1 ^М	Алел 2 ⁶
SRY	-	Yp11.2	-		+		-		+	
AMXY	Xp22.1	Yp11.2	105	105	105	110	105	105	105	110
DXYS218	Xp22.32	Yp11.3	281 bp	285 bp	281 bp	281 bp	281 bp	285 bp	281 bp	281 bp
DXYS267	Xq21.31	Yp11.31	342 bp	342 bp	338 bp	334 bp	338 bp	342 bp	342 bp	334 bp
DXYS156	Xq21.31	Yp11.31	144 bp	-	134 bp	161 bp	134 bp	-	144 bp	161 bp
X22	Xq28	Yqter	218 bp	218 bp	228 bp	195 bp	228 bp	218 bp	218 bp	195 bp
SBMA	Xq11.2-12	-	205 bp	197 bp	203 bp	-	203 bp	197 bp	205 bp	-
DXS6803	Xq12-21.33	-	123 bp	123 bp	120 bp	-	120 bp	123 bp	123 bp	-
DXS6809	Xq	-	252 bp	252 bp	261 bp	-	261 bp	252 bp	252 bp	-
HPRT	Xq26.1	-	277 bp	285 bp	280 bp	-	280 bp	285 bp	277 bp	-
DXS8377	Xq28	-	235 bp	252 bp	230 bp	-	230 bp	252 bp	252 bp	-
TAF9L	Xq13 / 3p24		2 бр X-хромозоми		1 бр X-хромозоми		2 бр X-хромозоми		1 бр X-хромозоми	

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.

През 2000 г за пръв път добре документирано се описват случаи на МоноХориатни ДиЗиготни (МХДЗ) бременност [Viator, 2000, Kühl-Burmeister, 2000]. При справката от Peters, 2017 са разгледани 31 случая кръвен химеризъм при МХДЗ бременности (83.9% от тях - разнополови), описани в 27 статии, като при всички случаи МоноХориатна диамниотична плацента е била документирана чрез УЗ по време на бременността или макроскопски след раждането. Технологии за асистирана репродукция са използвани при 82.1% от случаите, като повече от половината от бременностите са постигнати след IVF/ICSI. Като особено рисков може да бъде разгледан двойният ембриотрансфер: 50.1% (16 случая) са възникнали след класическа IVF процедура (32.1%) или след ICSI (25.0%). При повечето от случаите има потвърден кръвен химеризъм – т.е. за засягане на хемопоеичната тъкан, като степента му варира между 1% и 99%. При 21 от случаите химеризмът е бил изследван и в нехемопоеични тъкани, като при 2 от тях е установен химеризъм при единия близнак и в букална лигавица и кожни фибробласти. Дизиготността в някои от случаите е била установена след NIPT или с ДНК изследване по желание на родителите (напр. заради очевидна външна разлика между децата на възраст 14 мес, какъвто е бил един от случаите) [Umstad, 2012]. При 32.1% от тези случаи той е бил открит случайно, а при останалите 67.9% изследванията са правени заради различен пол на бебетата и наличие на монохорионна плацента, както в описвания в настоящата работа казус.

Първият случай на кръвен химеризъм при човека е съобщен през 1953г [Dunsford, 1953], като по това време явлението вече е добре познато на хората, отглеждащи говеда. Известно е, че вследствие на вътреутробна размяна на кръв между мъжки и женски фетуси на крави се раждат т.нар. freemartin теленца. Те са женските близначета от случаи на двуплодна двуполова бременност на крава (фигура 20). Вследствие на сливане на микрокръвоносни съдове между двете плаценти става смесване на кръвоносния ток между тях. Преносът на АМХ, произведен в организма на мъжкото теленце към организма на женското теленце води до регресия на Мюлеровите й структури. В резултат freemartin теленцето е със стерилна женска полова система, със сляпо завършващо влагалище и липсващи матка и тръби. Поведението на животното е като на кастрирано мъжко говедо (вол). Счита се, че колкото на по-ранен етап на бременността е станала анастомозата, толкова и степента на маскулинизация на женското теленце ще е по-голяма.



Фигура 20

Freemartin теленца

<http://www.thecattlesite.com/articles/975/what-is-a-freemartin/>; Модифицирано по <https://www.mpiwg-berlin.mpg.de/de>

Подобен химеризъм, водещ до генетични различия при засегнатите тъкани може да причини органна дисфункция в различна степен – като например гонадна дисгенезия при различаващи се по пол химерни близнаци. Интересно е, че едва при 15.4% от разнополовите двойки близнаци се съобщава за някаква аномалия при гениталиите на едно от бебетата (2 при момчета и 2 – при момичета) [Peters, 2017]. В литературата има описан случай с липсващи мюлерови структури при доказан кръвен химеризъм на разнополови близнаци [Bogdanova, 2004].

Предполага се, че фузия между бластоцистните мембрани на двата ембриона може да е причина за създаването на единна плацента при двуйчните близнаци. Може и да става въпрос за физически много близко имплантиране на двата ембриона при формирането на единичен бластоцист с двойни *inner masses* клетъчни маси. Това кои органи/тъкани ще бъдат въввлечени в химеризъм и в каква степен, ще зависи от времето и мястото на контакт между двата фетуса. Общата плацента означава и васкуларни анастомози, които са налични при почти всички монохориатни бременности и водят до свързване между кръвообращенията на двете бебета. В резултат на това се наблюдава и кръвния химеризъм, описан в клиничния случай по-горе – състояние, при което в един организъм се наблюдават два вида кръвни клетъчни линии от две генетично различни зиготи .

ОСОБЕНОСТИ НА QF-PCR МЕТОДА - ОБОБЩЕНИЕ

Специфична особеност на QF-PCR анализа е, че **не може да открива вариации** в генома **извън тези, заложи в него** като прицелни. Това означава, че не биха могли да се открият каквито и да било аномалии, касаещи други хромозоми. Този анализ не може да открие и пренареждания и мозаицизъм <15%, касаещи прицелните хромозоми. Получените резултати се отнасят единствено и само до анализираната ДНК проба - те може да не отразяват коректно хромозомния статус на фетуса в случаи на плацентарен мозаицизъм или в случаи на проби за дородова диагностика, замърсени с майчини клетки (както е при амниотичните течности с видимо наличие на кръв).

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 X и Y) 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 вѐси, 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 18 са представени изследваните пациенти с различни клинични състояния от спектъра на 46,XY DSD

Таблица 18

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

<u>46, XY DSD</u>		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 клинична диагноза CAIS - пълна форма на синдрома (познат в миналото и като „синдром на Морис“) и 1 пациент с парциална андрогенна нечувствителност (PAIS). Включени са общо 8 семейства, като едно от тях е представено от 3 засегнати индивида - две сестри и тяхната леля по майчина линия. Всички изследвани пациенти са с кариотип 46,XY, като наличието на една X и една Y-хромозома е потвърдено при всички и с количествена флуоресцентна амплификационна реакция (QF-PCR).

Девет от изследваните пациенти са с женски фенотип, граждански пол и самосъзнание, а един (пациентът с PAIS) е с мъжки граждански пол и двойствени гениталии. Една от изследваните пациентки е с произход от Близкия изход.

Тъй като насочващата диагноза при 9-те момичета беше синдром на андрогенната нечувствителност (AIS), беше пристъпено към анализиране на гена за Андрогенен рецептор (AR). При пациента с PAIS нямаше ясна клинична диагноза. Поставянето на генетичната диагноза беше достигнато след извършване на секвениране от ново поколение с технологията на Illumina и използването на панела *True-Sight Inherited Panel*.

Установени бяха 8 различни мутации в AR гена – 3 нови, несъобщавани и 5 познати от литературата мутации, откривани при пациенти с AIS. Само при едно семейство от изследваните имаше данни за *de novo* произход на открития 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	18 г	6	c.2338C>T	p.Arg780Trp	p.R780W	Майка	Съобщавана
	AR-6.2	8 г						
	AR-6.3	51 г						
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	<i>de novo</i>	Несъобщавана, но има подобна

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).

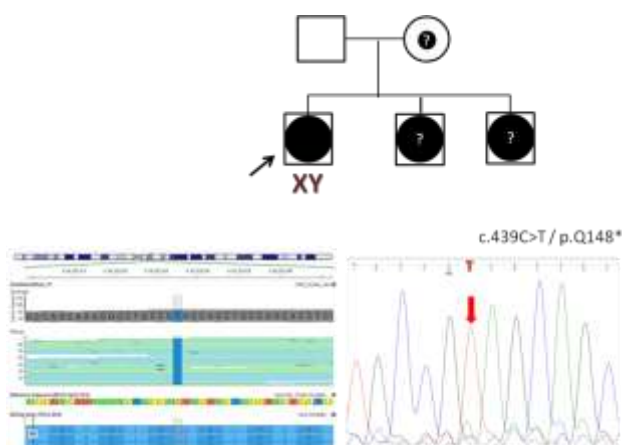
Пациентката е без малформативни и дисморфични стигми. Съобщава, че не е забелязала някаква вирилизация на тялото си по време на пубертета. Липсва аксиларно и пубисно окосмяване, млечните жлези са много добре развити. Няма данни за наличие на Мюлерови структури, съобщава за много високи нива на тестостерон (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 наличието 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 21).

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 андрогенната нечувствителност, описван тук, като ролята на тези две мутации за клиничната проява на състоянието ще бъде разгледана общо по-късно.



Фигура 21

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

СЛУЧАЙ AR-2

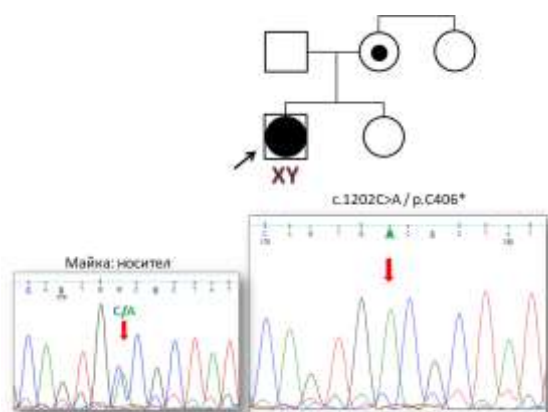
Клинична картина

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 мясото 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 ѝ 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 Sanger 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 22).

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 преждевременен 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 22

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

СЛУЧАЙ AR-3

Клинична картина

Пробандът от семейство 3 към момента на първото си постъпване в педиатрична клиника е на възраст 5 месеца. Детето е 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 от 1/120 (при очакван възрастов риск 1/220). Това, в допълнение с информацията за прекъсната бременност при сестрата на майката заради доказана тризомия 21, налага пристъпването към дородова диагностика на плода. От направените изследвания няма данни за тризомия 21, 18 или 13, установено е наличие на У-хромозома; кариотипът е 46,XY. 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.

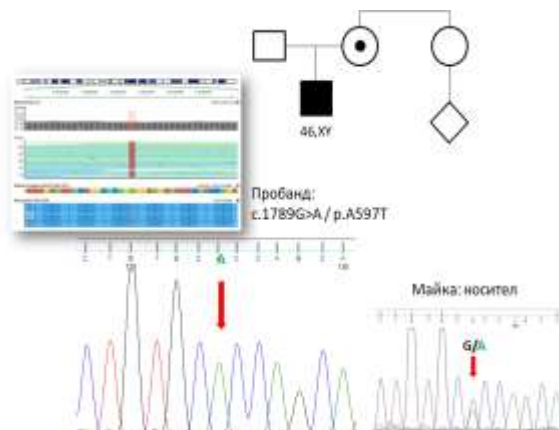
В предоставената от родителите медицинска документация гениталиите на 5-месечна възраст са описани като интерсексуални, без хиперпигментация по хипопластичния и разцепен скротум. Пенисът е хипопластичен, с перинеална хипоспадия, има данни за ингвинално разположени гонади, описвани като нормални за възрастта тестиси. Не е установено наличие на Мюлерови структури, десният бъбрек е с данни за хидронефроза I-ва степен. След около година е извършена двустранна орхидопеския. От проведените хормонални изследвания са установени нормални нива на 17-ОН-прогестерон, LH, FSH и изключително ниски нива на Тестостерон. След стимулационен тест с hCG е отчетено нормално покачване на Тестостерона. Този добър отговор на тестисите (макар и разположени на по-високо от анатомичното им място) показва функционалната им годност. 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 дехидрогеназа. Обсъждан е и възможен тератогенен фактор по време на бременността, който да е довел до задръжката във вирилизацията – хормонален или медикаментозен прием от страна на майката.

Молекулярно-генетичен анализ

Поредица генетични изследвания бяха извършени с оглед подадените от клиницистите клинични данни. Анализът за У-хромозомни микроделеции показва нормален резултат. 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 с набора Intersex 334 не показва 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 23). Откритият вариант води до замяна на аминокиселината Аланин с Треонин на позиция 597 (**p.Ala597Thr/p.A597T**) от ДНК-свърващия район на андрогенния рецептор (DBD – *DNA-binding domain*). При извършеният потвърдителен и сегрегационен анализ в семейството, чрез секвениране по Sanger е верифицирано наличието на мутацията, като се установи унаследяване

от майката на индексния пациент. С оглед планиране на бременност на по-късен етап сестрата на майката прояви интерес за генетичния си статус по отношение на откритата в семейството мутация. Изследванията при нея доказаха, че тя не е носител на фамилната мутация с.1789G>A в гена *AR*.



Фигура 23
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 – *Partial Androgen Insensitivity Syndrome*) 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.

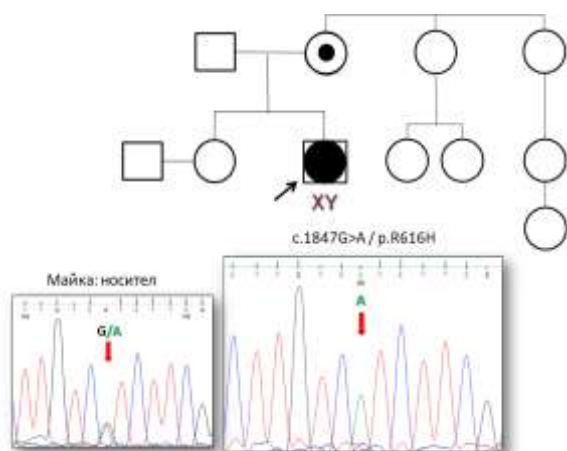
СЛУЧАЙ AR-4

Клинична картина

Съгласно наличните данни след консултация с АГ специалист, се 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. В оперативния протокол се описват формации в областта на левия и десния аднекс като рудиментирани маточни тръби.

Молекулярно-генетичен анализ

При секвенирането по Sanger на кодиращите райони на гена AR в екзон 3 беше установено хемизиготно носителство на мутацията **c.1846G>A**. Вариантът води до замената на аминокиселината Аргинин на позиция 616 с Хистидин (**p.Arg616His / p.R616H**). Мутацията се намира в района, кодиращ ДНК-свърващия домейн (DBD). При майката беше установено хетерозиготно носителство на мутацията, без данни за клинична изява (фигура 24).

**Фигура 24**

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

Майката на индексната пациентка има две сестри, които имат съответно една и две дъщери. Една от братовчедките на индексната пациентка има момиченце. При никоя от роднините по женска линия не се съобщава за гинекологични проблеми, вкл. първична аменорея. На семейството беше предложено извършване на генетичен анализ за установяване на носителския статус при по-голямата сестра на пациентката с оглед планирана при нея бременност, но все още семейството не е потърсило съдействие от нас в тази насока.

Мутацията, открита при индексната пациентка AR 4 се намира в екзон 3 на гена – близо до мутацията, открита при пациента от семейство 3. 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: при 5 от тях има данни за фамилна история, а две от тях са сестри,
- 1 пациент с двойствени гениталии и парциална андрогенна нечувствителност (PAIS)
- 1 пациент с лека форма на андрогенна нечувствителност (MAIS) и инфертилитет.

Интересно е, че на позиция 616 от аминокиселинната последователност на белтъка са описвани и 5 други мутации при пациенти с различна степен на вариации в половото развитие (таблица 19).

Таблица 19

Брой мутации на АК-позиция 616 в AR (<http://androgendb.mcgill.ca/>) :

Нуклеотидна замяна	Кодон	Протеин	Пациенти
c.1847G>A	CGT>CAT	p.Arg616His	9 CAIS, 1 PAIS, 1 MAIS
c.1847G>C	CGT>CCT	p.Arg616Pro	1 CAIS, 1 PAIS
c.1846C>A	CGT>AGT	p.Arg616Ser	CAIS
c.1846C>T	CGT>TGT	p.Arg616Cys	CAIS
c.1846C>G	CGT>GGT	p.Arg616Gly	CAIS
c.1846_1848del	del CGT	p.Arg616del	CAIS

Замяна CGT>CCT 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 двойствени гениталии. Замяна на предходния нуклеотид с кодона (c.1846C) с А, Т 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. Насочена е за изследване от проследяващия детски ендокринолог. Пациентката е родена от първа нормално протекла бременности и раждане. Оперирана е на 11-месечна възраст от ингвинална херния вдясно.

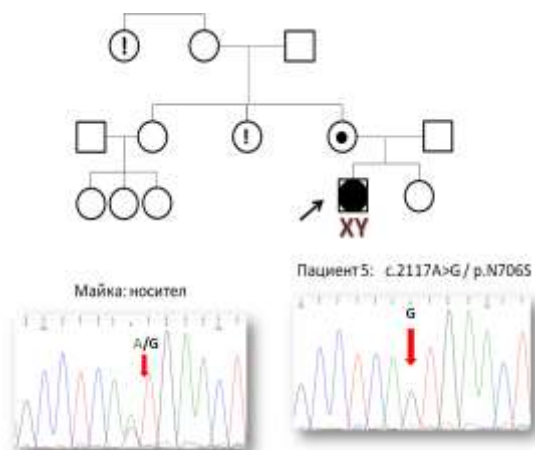
Съгласно предоставената ни медицинска документация при индексната пациентка липсва окосмяване по тялото; пубертет – телархе IV степен, мъховидно пубархе, без аксилархе, без акне; с данни за микрогнатия. Лабиите са описани като „по-хипопластични”. Има фамилни данни за леля (сестра на майката, на 40 год) с първична аменорея, а за сестра на бабата по майчина линия се съобщава, че е със стерилитет. При консултация с акушер-гинеколог са описани нормални гонади и хипопластична матка. Предписан е едномесечен курс с орални контрацептиви, но кървене не е настъпило. 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 ѝ 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 25). 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 в базата данни <http://androgendb.mcgill.ca/> при няколко пациенти с пълна форма на андрогенна нечувствителност (CAIS) и един с парциална (PAIS). Намира се в консервативен район на екзон 4 – първият от кодиращите лиганг-свързващия район (LBD – *Ligand-binding domain*). При част от пациентите 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. АМН се регулира негативно от Т и нивата на АМН са повишени през първата година от живота на детето и след началото на пубертетното развитие.



Фигура 25
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 ѝ 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

При извършеното секвениране по Sanger на гена AR в екзон 6 беше открита мутацията **c.2338C>T**, водеща до замяна на аминокиселината Аргинин с Триптофан на позиция 780 (**p.Arg780Trp/p.R780W**). Тази аминокиселинна позиция лежи в лиганд-свързващия район LBD на Андрогенния рецептор. 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 26).

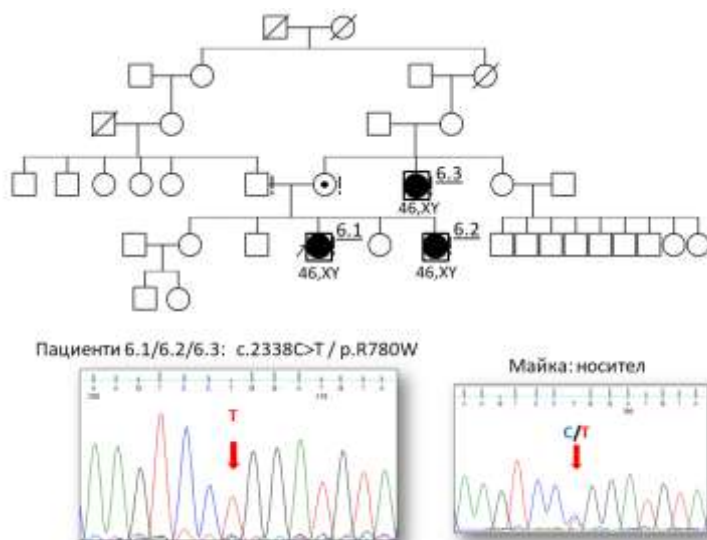
Интересна находка, нямаща пряко отношение към клиничните презентации на изследваните пациентки беше, че при извършване на QF-PCR анализа при трите пациентки и майката, се установиха данни за настъпила рекомбинация между двете X-хромозоми при майката. Индексния пациент (AR-6.1) носи рекомбинирана X-хромозома (района Xq26.1-ter), докато сестра ѝ (AR-6.2), леля ѝ (AR-6.3) и майка ѝ имат еднаква X-хромозома (таблица 20).

Таблица 20

Характеристики на унаследените алели по X-хромозомите в семейството

Маркер	Локализация	Баща	Майка		6.1 (пробанд)	6.2 (сестра)	6.3 (леля)
		46,XY	46,XX		46,XY	46,XY	46,XY
		Алел	алел А	алел Б	алел А / Б	алел Б	алел Б
SRY	Yp11.2	+	-		+	+	+
AMEL	Xp22.1-22.31 / Yp11.2	106 / 112	106	106	106 / 112	106 / 112	106 / 112
AR CAG	Xq11-12		19	26	26	26	26
SBMA	Xq11.2-12	205	188	208	208	208	208
DXS6803	Xq12-21.33	119	112	119	119	119	119
DXS6809	Xq	253	253	253	253	253	253
HPRT	Xq26.1	281	269	289	269	289	289
DXS8377	Xq28	221	221	238	221	238	238

Откритата мутация е неконсервативна замяна, засягаща район в лиганд-свързващия джоб на рецептора [Melo, 2003]. Описвана е в базата данни <http://androgendb.mcgill.ca/> при 7 пациентки с CAIS [Hiort, 1994; Murono, 1995; Sinnecker, 1997; Ahmed, 2000; MacLean, 2004; Melo, 2003; Ledig, 2005]. При две от тях е отбелязана негативна фамилна история. 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 откриваеми 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 26
 Представяне на клиничен случай AR6 – родословие и резултат от генетичния анализ

СЛУЧАЙ AR-7

Клинична картина

Пациентката беше насочена за потвърждаване на клиничната диагноза CAIS, поставена от наблюдаващия детски ендокринолог. 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. Хормоналният статус показва повишени Тестостерон и ЛН. При извършената консултация с гинеколог след УЗ изследване е описани матка и аднекси с нормална структура и големина. При допълнителната консултация с друг АГ-специалист година по-късно е отбелязана липса на окосмяване в андрогензависимите зони; 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 с размер 26/16мм, 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. Диагнозата Метаболитен синдром се обсъжда заради повишен LDL и понижен HDL. Извършеният цитогенетичен анализ показва кариотип 46,XY.

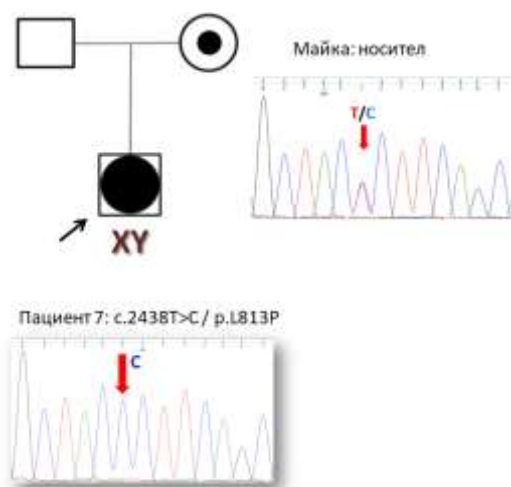
Молекулярно-генетичен анализ

При извършеното секвениране по Sanger в екзон 6 на гена AR се открива мутацията **c.2438T>C**, водеща до замяна на аминокиселината Левцин с Пролин на позиция 813 (**p.Leu813Pro/p.L813P**). Откритата мутация се намира във високо-консервативния C-терминалният 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 27).

Мутацията c.2438T>C е описвана в базите данни <http://androgendb.mcgill.ca/> при пациент с PAIS (мъж с гинекомастия) и при пациентка с CAIS [Yaegashi, 1999; Jaaskelainen, 2006]. При пациентката с пълната форма на AIS в изследваните гонади се откриват основно Сертолиевы клетки и малко количество сперматогонии и гоноцити. В интерстициума се откриват редуциран брой Лайдиговы клетки.

Аминокиселината Левцин на позиция 813 е консервативна сред различни стероидни рецептори и изглежда е необходима за нормалната конформация на AR протеина. Както Левцина, така и Фенилаланина (с който се заменя в резултат на настъпилата мутация) са неутрални, неполярни аминокиселини. Ето защо, вероятно тази замяна не би довела до големи конформационни промени в белтъчната конформация, а вероятно 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 ДНТ. Предполага се, че тази минимална остатъчна активност на AR, в комбинация с високите нива на андрогени биха довели до частично развитие на Волфиевите структури [Jaaskelainen, 2006].



Фигура 27

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 сяпо 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 (AТC) на позиция 842 с аминокиселината Аспаргин (AАC) (p.Le842Asn / 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 28).



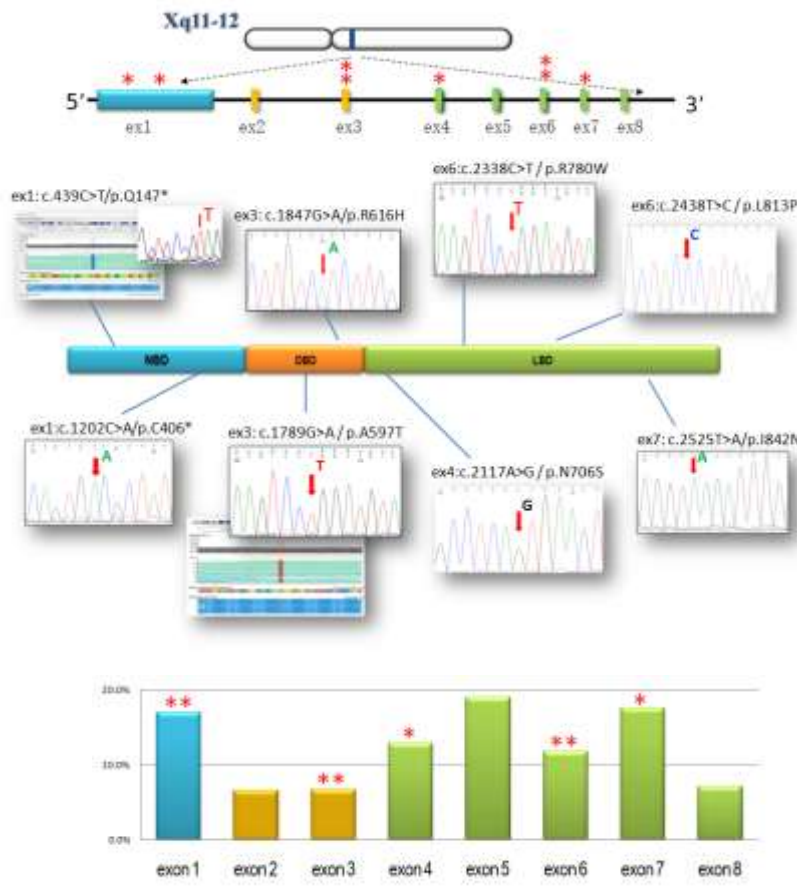
Фигура 28

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

Извършения предикционен софтуерен анализ с алгоритъма на PolyPhen-2 класифицира открития вариант c.2525T>A/p.Le842Asn 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 (AТC>AГC) (c.2525T>G, p.Le842Ser). Описвана е при пациентка с двойствени гениталии [Hiort, 1996].

ОБСЪЖДАНЕ – СИНДРОМ НА АНДРОНЕННАТА НЕЧУВСТВИТЕЛНОСТ

Информацията за структурата и секвенцията на *AR* гена позволява изучаването на молекулните варианти, асоциирани със синдрома на андрогенната нечувствителност AIS. До момента са идентифицирани голям брой генетични варианти в *AR*, като информацията за тях е систематизирана и публикувана на www.androgendb.mcgill.ca [Gottlieb, 2012], като по-голямата част от мутациите са локализирани в лиганд-свързващия домейн (LBD), с по-малка е честотата в ДНК-свързващия домейн (DBD), а в NTD района са най-малко. Мутациите се с голямо разнообразие при клиничния фенотип [Boehmer, 2001], което предоставя възможност да се направи асоцииране между различните мутации и нарушаването на специфични физиологични функции.



А.

Б.

Фигура 29

Обобщено представяне на откритите мутации в гена *AR* при изследваните 10 български пациенти с клинични данни за синдром на андрогенната нечувствителност (А). Честотата на откриване на мутации в различните екзони на гена при CAIS пациентите схематично представена на графиката (Б).

Със * са обозначени позициите на откритите при настоящото изследване мутации.

В настоящото изследване бяха открити общо 8 мутации след изследваните 10 пациенти (три, от които са от едно семейство и носят една и съща мутация) – фигура 29 А. Две от мутациите са в екзон 1 (NBD) и водят до генериране на преждевременен стоп-кодон. Две мутации са в DBD, а останалите 4 – в лиганд-свързващия район (фигура 29 Б.). От откритите мутации 5 са съобщавани в литературата, а три не бяха открити в достъпните бази данни. Само една от мутациите беше доказано нововъзникнала и не е унаследена в семейството.

4.4.2. Генетични изследвания при пациенти с клинични данни за 46,XY DSD и ДЕФИЦИТ НА 5- α -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 състоянието 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.

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 с дълбочина 4 см, а клиторът е увеличен (около 4 см). На УЗ не се визуализират яйчници и матка, като от направените хормонални изследвания няма данни за повишаване на нивата на гонадотропините, но нивата на Тестостерон са силно завишени.

При извършената билатерална гонадектомия са установени два тестиса *in situ* с големина 2/3 см. Хистологичният резултат посочва морфологична картина на препубертетни тестиси. Три години по-късно, когато пациентката е на възраст 16г, се извършва последваща дилатация на влагалището. В диференциален план клинично са обсъждани гонадна дисгенезия и парциална андрогенна нечувствителност (синдром на Рейнфенщайн), като е насочена към Национална генетична лаборатория за генетични изследвания. При извършения цитогенетичен анализ се установи кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

Заради подадената работна диагноза парциална андрогенна нечувствителност (PAIS) от страна на лекуващия клиницист, на първия етап бяха извършени ДНК изследвания за търсене на мутации в гена за *AR*. Наличие на мутация не беше установено, но имаше интересна специфична находка в екзон 1 на гена (фигура 30). Този екзон съдържа два полиморфни района, включващи вариращ брой тринуклеотидни повтора и кодиращи съответно полиглутаминов Gln_n и полиглицинов Gly_n тракт. При изследваната пациентка бяха открити:

- : **37 броя CAG повтора** в полиглутаминовия тракт (**rs193922933**, NM_000044.3:c.172_174CAG(10_36) - при нормални стойности **между 10 и 36** и средна стойност 23;
- **4 на брой вариабилни повтора** в GGC частта на полиглициновия тракт (GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n (**rs587776432**, NM_000044.3:c.172_174(7_37))) - при нормални стойности на повтаряне на вариабилните (GGC)_n повтори **между 7 и 37**, и средна стойност 25;

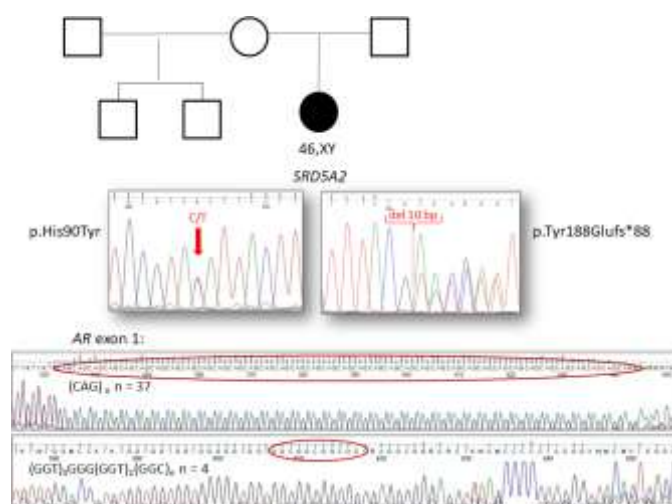
Липсата на мутация в гена *AR* направи диагнозата парциална форма на синдрома на андрогенната нечувствителност малко вероятна, без да я изключва напълно. Заради обсъжданата клинична диагноза гонадна дисгенезия беше секвениран и генът *SRY*, но мутации и там не бяха открити. Данните за повишено окосмяване по тялото и клиторомегалия, в

комбинация с дрезгав глас насочиха генетичните изследвания 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.

Секвенирането по Sanger на 5-те екзона на гена *SRD5A2*, както и на интрон-екзонните граници доведе до откриването на два варианта (фигура 30), неописвани досега в литературата:

- единичната нуклеотидна замяна с.268C>T в екзон 1, p.His90Tyr (p.H90Y) и
- делеция на 10 нуклеотида TATGTTTCTG в екзон 4 - с.562_571del, p.Tyr188Glufs*88 (p.Y188Efs*88).

Замяната C>T на позиция 268 в води до промяна на аминокиселината Хистидин с Тирозин на позиция 90. Втората открита мутация води до промяна на рамката на четене след делетиралите 10 нуклеотида, възникване на стоп-кодон след 87 аминокиселини и скъсен белтък. ДНК от родителите не е налична, за да бъдат извършени потвърдителни анализи за доказване на наличие или липса на скаченост между двете открити мутации. За съжаление семейството отказа извършването на по-нататъшни генетични изследвания, както и получаването на окончателния резултат от ДНК анализа на пациентката. По информация от наблюдаващия клиницист, пациентката е запазила женското си самосъзнание и не е изживявала желание за промяна в гражданския си пол.



Фигура 30

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

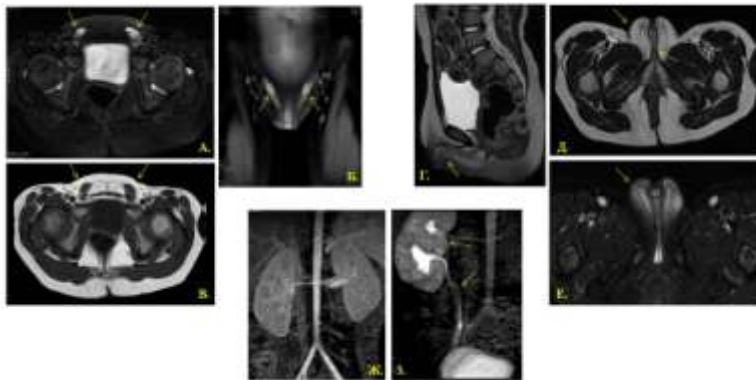
Извършеният ДНК анализ при този клиничен случай доведе до доказването на мутации в гена *SRD5A2* за пръв път при български пациент с нарушения в половото развитие от спектъра на 46,XY DSD.

СЛУЧАЙ SDR5A2 / 2

Клинична картина

Пробанда на второто изследвано семейство е дете на 2 години, родено в 35 г.с. от 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 постепенно увеличаване на клитора. Измерените хормонални нива не показват отклонения за възрастта. След извършения тест с hCG на възраст 2г 10м, е наблюдавано сигнификантно повишение на нивата на Тестостерон, но измерване на нивата на ДНТ не е извършено. Отчетена е реакция на гонадите като тестис. 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 отвор в основата (перинеална хипоспадия). Палпират се образувания в скроталната торбичка - най-вероятно тестиси. На трансабдоминална УЗ диагностика не се визуализира маточно тяло. Цитогенетичния анализ показва кариотип 46,XY и като за водеща клиничната диагноза се приема Синдром на Андрогенната нечувствителност (CAIS).

Ядрено-магнитния резонанс направен при детето с оглед потвърждаване на ултразвуковите находки в малък таз и търсене на евентуални допълнителни аномалии, показва задържани в коремната кухина тестиси и липса на маточно тяло и влагалище (фигура 31). Интересна находка беше наблюдаваното билатерално удвояване на бъбречните артерии, което се счита за вариант на нормата и няма отношение към разглежданата клинична картина.



Фигура 31

Резултати от ЯМР при пациента SRD5A2/2 – има данни за овоидни структури в двата ингвинални канала (А, Б, В), за микрофалус (Г) и уголемени лабии (Д, Е). Наблюдават се билатерални двойни ренални артерии вдясно (Ж,З)

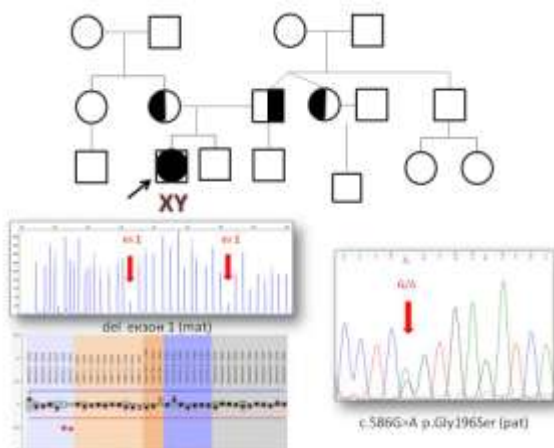
Снимките са любезно предоставени от доц. Хаджидеков, Болница Лозенец

Молекулярно-генетичен анализ

Индексният пациент първоначално беше насочен към Национална генетична лаборатория за изследване на делеции върху Y-хромозомата и водеща клинична диагноза AIS, като такива не бяха открити. 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 Sanger 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 анализирания на ДНК проби от двамата родители беше установено, че хетерозиготен носител на мутацията е бащата на детето. Липсата на втора единична замяна в изследвания ген, както и на макар и минимална вероятност за наличие на делеции в района на гена *SRD5A2*, наложиха пристъпването към изследването на броя копия на различните му екзони. Извършеният MLPA анализ откри хетерозиготно носителство на делеция на екзон 1 при индексния пациент, както и при неговата майка (фигура 32).

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, беше пристъпено към начало на поредица от коригиращи уретрата операции в специализирана клиника, последвани от успешна 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 32

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

На по-късен етап мутацията p.Gly196Ser беше открита в хетерозиготно състояние и при лелята на детето по бащина линия. Това наложи изследване и на партньора ѝ с оглед плановите им за второ дете и бъдеща бременност, но единични нуклеотдни замени, както и малки или големи делеции в гена не бяха открити при него.

СЛУЧАЙ SDR5A2 / 3

Клинична картина

Третият индексен пациент, включен в настоящото изследване на гена *SRD5A2*, 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. Направените изследвания на TSH и FT4 били в норма, майката не е приемала медикаменти в хода на бременността.

На 16 годишна възраст заради съмнения за заклещена ингвинална херния с болки и подутина с в лявата слабинна област пациентката е хоспитализирана в хирургична клиника. При извършената операция е открит ингвинално разположен тестис с по-плътна консистенция на епидидима и хидроцеле, което е пунктирано, но няма западена медицинска документация от този период. Семейството е насочено към ендокринологичен кабинет с оглед по-нататъшно лечение и определяне на пола на индивида. Пациентката е с първична аменорея, външни гениталии с окосмяване от женски тип и хипертрофия на клитора, превалиращо мъжки хабитус на тялото. Гласът се описва в медицинската документация 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. Извършените хормонални изследвания на 35г възраст са в норма за жена на нейната възраст; на 44 годишна възраст е проведен ЯМР на малък таз, при който не се визуализират гонади и матка. Към момента на насочване към Национална генетична лаборатория на 45 годишна възраст пациентката е с данни за остеопороза, въпреки дългогодишната естрогенна терапия. Водещата клинична диагноза е Парциална Андрогенна нечувствителност (PAIS).

Молекулярно-генетичен анализ

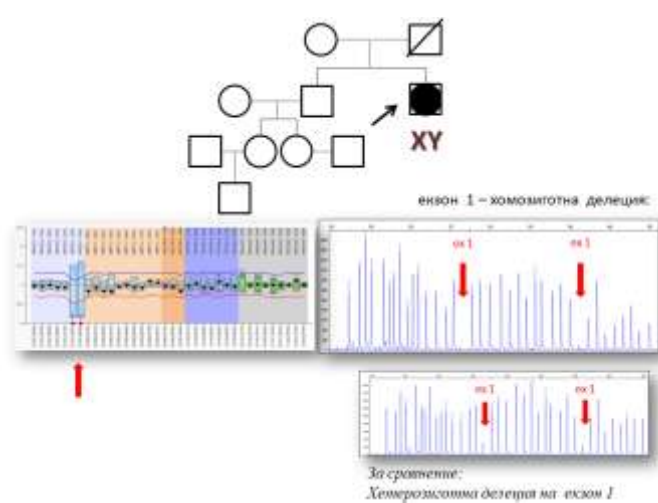
На първия етап от изследванията беше извършен ДНК анализ за определяне на вида и броя полови хромозоми с помощта на QF-PCR - открити бяха данни за една X и една Y-хромозома – в съответствие с кариотипа й 46,XY.

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 – за разлика от винаги

успешната амплификация на няколко паралелно използвани различни ДНК проби като положителни контроли на реакцията. Беше предположено 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 33). 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 33

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

СЛУЧАЙ SDR5A2 / 4

Клинична картина

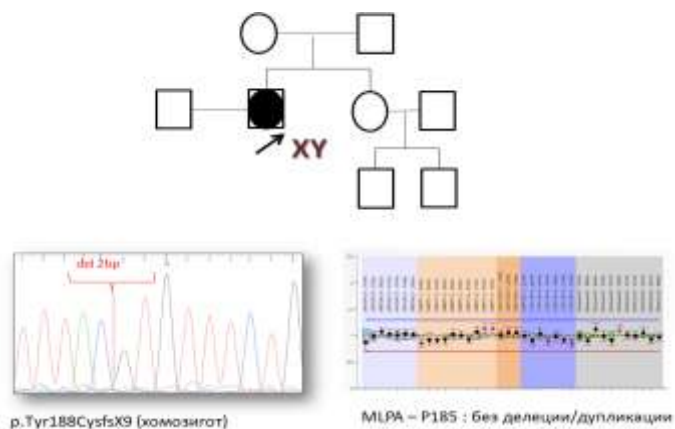
Последния индексен пациент в настоящата група е жена на 36 г, родена от първа, нормално протекла бременност в семейство без данни за родствена връзка. На 14 годишна възраст е насочена към консултация с генетик по повод първична аменорея, липса на развитие на млечни жлези, клиторна хипертрофия и забелязана 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. Има 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. При снемане на анамнезата се 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 серумни 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 Т и ДНТ в чужбина, се установява съотношение Т/ДНТ силно изтеглено към Тестостерона. Тези данни дават основание да бъде 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 ѝ 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 рудиментирани епидидим, *vas deferens* и нарушена сперматогенеза. Пациентката е подложена на хормонално-заместителна терапия с естрогени. Тя не съобщава за колебания в половата си идентичност по време на пубертета и след това, като продължава да бъде отглеждана като момиче в семейството си и да възприема себе си като такава, създавайки свое семейство.

Молекулярно-генетичен анализ

Пациентката беше изследвана за мутации в кодиращите екзони на *SRD5A2* гена. Беше открита хомозиготна делеция на две бази: ТА в кодон 4 (позиция с.563-564del). Тази *frameshift* мутация води до изместване на рамката на четене, с начало промяна на аминокиселината Тирозин с Цистеин и възникване на по-ранен стоп-код след 9 аминокиселини (р.Tyr188Cysfs*9/р.Y188Cfs*9). Пациентката съобщава, че не ѝ е известно да има някаква роднинска връзка между родителите ѝ. 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. С оглед на това беше извършен и MLPA анализ за търсене на носителство на делеция, обхващаща целия *SRD5A2* ген или част от него, включително и екзон 4. Резултатите от анализа показаха нормален профил (фигура 34) и така отпадна вероятността пациентката да бъде съставен хетерозигот по мутацията р.Y188Cfs*9, в комбинация с по-голяма делеция, обхващаща и екзон 4. В литературата обаче има данни за унипарентна дизомия (*uniparental disomy* (UPD)) при 14 годишна пациентка с дефицит на 5-

редуктаза тип 2 и кариотип 46,XY [Chavez et al., 2000]. И двамата родители са хетерозиготни носители съответно на мутациите p.Glu197Asp и p.Pro212Arg, а изследваният пациент е хомозиготен по бащината мутацията p.Glu197Asp, което показва, че са възможни и алтернативни механизми за унаследяване на състоянието. Този механизъм на унаследяване към момента не може да бъде изключен и при пациентката, включена в настоящото изследване.



Фигура 34
 Представяне на клиничен случай SRD5A2/4 – родословие и резултат от генетичния анализ

ОБСЪЖДАНЕ – ДЕФИЦИТ НА 5-А-РЕДУКТАЗА ТИП 2

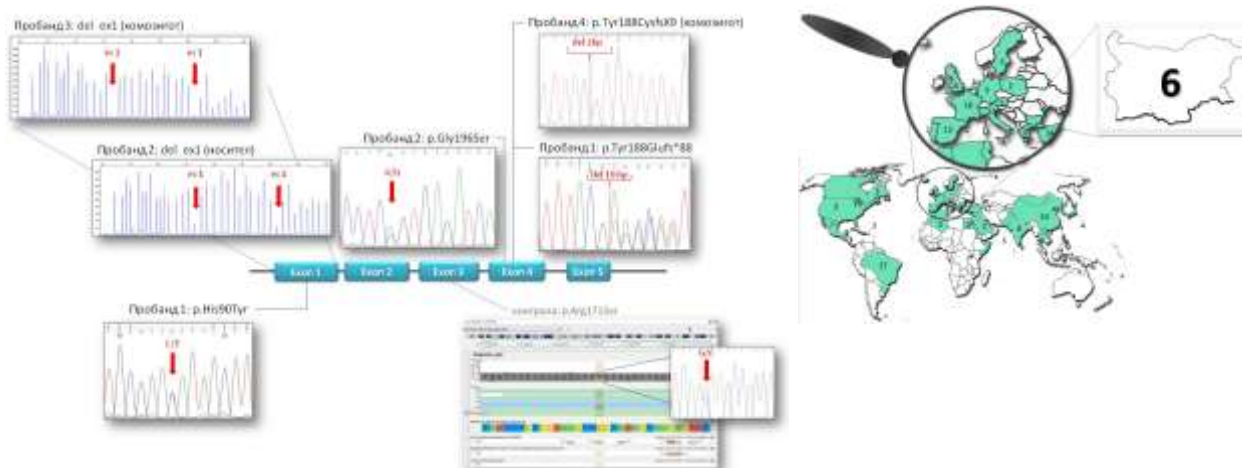
Тъй като дефицитът на 5- α -редуктаза тип 2 е състояние, което е по-слабо познато в България и е без ясна генотип-фенотип корелация, решихме да разгледаме малко по-обстойно характеристиките на молекулните му основи.

През 1961 г Nowakowski & Lenz обозначават като Псевдовагинална перинеоскротална хипоспадия състояние, което засяга индивиди с кариотип 46,XY – описва се фенотип с женски външни гениталии, билатерални тестиси, мъжки уро-генитален тракт с еякулаторни канали, водещи в сляпо-завършващо влагалище. По-късно, изследвания върху опитни животни показват, че вирилизацията на външните гениталии зависи от превърнатия в ДНТ тестостерон в реакция, катализирана от ензима 5- α -редуктаза. Дефицит на този ензим е описан клинично и биохимично по-късно едновременно при 24 индивида от Доминиканската република и при 2 сибси от Северна Америка [Imperato-McGinley, 1974; Walsh, 1974]. При засегнатите индивиди е наблюдавана вирилизация (клинична и психологична) по време на пубертета, без развитие на гинекомастия. И двата екипа определят състоянието като автозомно-рецесивно, дължащо се на невъзможността Тестостерона да бъде превърнат в ДНТ и презентирано при раждането с двойственост в развитието на гениталиите в широки граници и с настъпване на вирилизация по време на пубертета. На по-късен етап е установено, че дефицитът на ензима 5- α -редуктаза тип 2 се дължи на мутации в *SDR5A2* – ген, който се състои от 5 екзона и 4 интрона, като различни варианти се описват по цялата му дължина. Мутации се съобщават при индивиди с различна степен на липсваща вирилизация – от напълно женски външни гениталии до хипоспадия или изолирано микропенис. Описван е и разнообразен фенотип при индивиди, носещи едни и същи *SRD5A2* мутации. Причината за тази фенотипна дивергенция и липсата на връзка генотип-фенотип все още не е ясна. Вероятно има влияние на други фактори, извън остатъчната ензимна активност на 5- α -редуктаза тип 2.

Вече е ясно, че това състояние се открива сред индивиди по целия свят, а не както по-рано се считаше – че има клъстерно разпространение сред индивиди от определени етнически групи. Към момента в литературата има описани повече от 450 случая с клинична диагноза дефицит на 5- α -редуктаза тип 2 от повече от 45 различни държави, в т.ч. вече и в България. Проучване, обединяващо по-голямата част от публикуваните клинични случаи с този дефицит [Batista, Mendonca, 2020] показва, че диагностицираните случаи в неонаталния период са 29.7% от установените. По-голямата част от диагностицирането при останалите пациенти е станало на по-късен етап (средна възраст 12,56 г \pm 8,41), като в детството са били открити 58% от тях, 25% - по време на пубертета и 17% в зряла възраст. В този доклад се обобщават и данните за пола на отглеждане на тези пациенти – 69.4% са отглеждани като момичета, като очаквано се открива асоциация между избрания пол (момче/момиче) и степента на вирилизация на външните

гениталии. Интересни са тези резултати, разгледани след разпределянето им във времето – ако преди 1999 г отглежданите като момчета са били 26,8%, то след 1999г те са вече 42.8%. Като цяло, вече има ясна и стабилна тенденция за отглеждането на индивиди с дефицит на 5- α -редуктаза тип 2 като момчета.

В литературата са описани повече от 130 различни генетични варианта в гена *SRD5A2*, открити при пациенти с клинични данни за дефицит на 5- α -редуктаза тип 2. Повечето са missense мутации, но се откриват и малки делеции, мутации, променящи сплайсинга, стопкодони, малки indels, както и делеции, обхващащи голени райони от гена (напр. един или няколко екзона). Сред всички 254 аминокиселини, които изграждат белтъка, са открити алелни варианти в *SRD5A2*, засягащи 76 от тях. Съгласно публикуваните в данни мутации се откриват в целия ген, но най-често са съобщавани в екзони 1 (33%) и екзон 4 (25%). Това са и екзоните с най-богат спектър различни мутации. Там са и откритите мутации в четирите индексни пациенти, открити в настоящото изследване (фигура 35).



Фигура 35

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].

Обсъжданите като горещи мутационни места екзони 1 и 4 бяха скринирани допълнително за мутации сред 76 индивида от Български произход без роднинска връзка между тях.

Тези контроли бяха включени в две групи:

- 1) секвениране по Sanger на ДНК проби от 22 здрави индивида (11 мъже и 11 жени)

2) обработка на данните, касаещи конкретно *SRD5A2* гена, получени при вече извършено новогенерационно секвениране (панел *TruSight Inherited Disease (Illumina)* с 552 таргетни гени) при 54 индивида; сред тях:

- 15 здрави контроли
- 39 пациенти с редки заболявания, но без клинични данни за нарушения в половото развитие.

От всички изследвани индивиди или техните настойници е получено писмено информирано съгласие. Таргетното новогенерационно секвениране беше извършвано от екипа на Клиника „Малинов“, като данните за настоящия труд бяха предоставени от тях.

Мутациите, открити в индексните пациенти с 5- α -редуктазен дефицит не бяха открити със секвениране по Sanger или с NGS при 151 от анализирани хромозоми на индивидите от Български произход, избрани за контроли. Анализирането на данните за 5-те екзона на гена *SRD5A2* след NGS анализа показва хетерозиготно носителство на една описвана в литературата мутация в екзон 3: p.R171S /c.512G>C при здрав мъж от контролната група. Тази мутация е съобщавана при индивиди със Средиземноморски произход [Fernandez-Cancio, 2011; Thigpen, 1992; Maimoun, 2011; Аксау, 2014].

Около 70% от откритите алелни варианти се съобщават в хомозиготно състояние, останалите 30% са съставни хетерозиготи. Това заключение е в съответствие с наблюдението, че дефицит на 5- α -редуктаза тип 2 се среща с по-висока честота сред затворени популации с високо ниво на близкородствени бракове. Като “hotspot” позиции за възникване на мутации се определят аминокиселинните позиции 196, 227, 235 и 246 - това са около 25% от всички патогенни алелни варианти, открити в *SRD5A2* гена. Интересно е, че някои мутации са описвани сред пациенти с различен етнически и географски произход (напр. p.Arg246Gln е откривана в Индия, Австрия, Бразилия, Италия, Корея, Пакистан, Доминиканската република, Египет, Китай, Саудитска Арабия, Мексико; мутацията p.Gly196Ser се открива в България, Турция, Китай, Италия, Великобритания), докато други мутации остават специфични за конкретни етноси – p.Pro59Arg (Алжир), p.Asn160Asp (Египет), c.188_189insTA (Индия), c.453delC (Италия), p.Gly183Ser (Бразилия), p.Ala65Pro (Турция). Това може да се дължи както на влиянието на миграциите на човешката популация и времето на възникване на мутацията, така и на по-висок процент близкородствени бракове в определени етноси. Значение има и структурата на конкретния участък в кодиращата последователност на *SRD5A2* гена.

Тъй като 5- α -редуктаза тип 2 е мембранно-свързан ензим с ко-фактор NADPH, функционалните изследвания се фокусират основно върху ензимната кинетика и характеризират на ензимната активност чрез V_{max} . Оптимална ензимна активност се отчита при рН 5,5, а измерената K_m към субстрата Тестостерон е 0,7 μ M. Даните показват, че

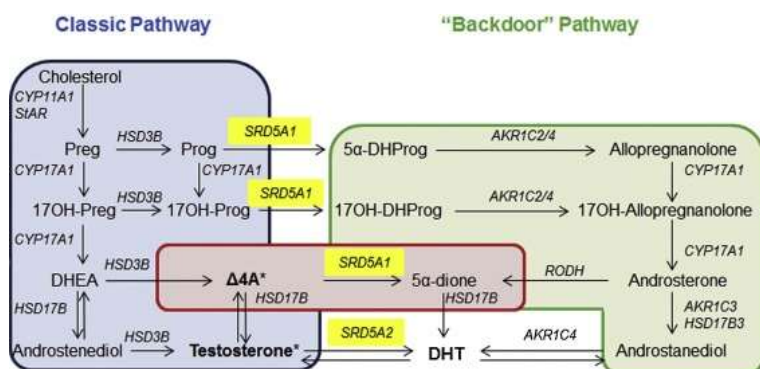
повечето несинонимни варианти в *SRD5A2* повлияват V_{max} на ензима (таблица 21) – част от тях водят до синтезиране на ензим с липсваща активност, докато при останалите тя е силно намалена. [Ramos, 2020].

Таблица 21

Функционално значение на различни алелни варианти, открити в гена *SRD5A2* [Batista, 2020]

Функционално значение	Алелни варианти
1 Премахва/потиска/намалява ензимната активност	p.Gly115Asp, p.Tyr136X, p.Arg145X, p.Thr187Met, p.Gly203Ser, p.Ser210Phe, p.Pro212X,
2 Няма ензимна активност	p.Gln6X, p.Leu55Gln, p.Gln56Arg, p.Pro59Arg, p.Tyr91Asp, p.Gly115Asp, p.Gln126Arg, p.Asp164Val, p.Asn193Ser, p.Glu197Asp, p.Ala207Asp, p.Pro212Arg, p.Leu224Pro, p.Ala228Val, p.His230Pro, p.Arg246Gln, IVS1-2A>G, IVS4+2T>C
3 Намалява афинитета към T	p.Gly183Ser
4 Нарушения в свързването с T	p.Gly34Arg, p.His231Arg
5 Нарушения в свързването с ко-фактора NADPH	p.Arg171Ser, p.Gly183Ser, p.Asn193Ser, p.Gly196Ser, p.Arg246Gln

Установено е, че няма ясна и еднозначна връзка между нивата на остатъчна ензимна активност и фенотипа. Например мутациите p.Leu55Gly и p.Arg246Gln водят до 0% остатъчна функция на ензима, но е наблюдавана различна степен на вирилизация на външните гениталии при пациенти с тези мутации – т.е. възможно е настъпването на някаква вирилизация на гениталиите дори и без остатъчна ензимна активност на 5- α -редуктаза тип 2. Има предположения, че е възможно роля да има действието на изоензима 5- α -редуктаза тип 1, кодиран от *SRD5A1*, през алтернативните пътища за синтез на DHT (фигура 36), но все още няма солидни доказателства в тази насока.



Фигура 36

Места на действие на *SRD5A1* като алтернативен път

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.01.017>

По-голямата част (76%) от откритите генетични варианти в гена *SRD5A2* са в силно консервативни позиции [Batista, 2020]. Алелните варианти, засягащи неконсервативни позиции са основно мутации от типа *indel* (28% спрямо 6% сред консервативните места) и водят до по-

слабо засягане на вирилизацията на външните гениталии, доказвайки по-малкото има значение за структурата и функционирането на ензима. Такива са и мутациите, открити при 2 от нашите пациентки – и двете са на позиция 188: p.Tyr188Glufs*88 (с делеция на 10 bp, съставен хетерозигот с p.His90Tyr) и p.Tyr188Cysfs*9 (с делеция на 2 bp, хомозигот). От друга страна обаче мутациите с делеции/инсерции водят до промяна на рамката на четене и затова обикновено са с негативен ефект, водейки до деградиране на иРНК или до синтезирането на променен белтък, което би обяснило по-слабата вирилизация на външните гениталии. С изключение на мутацията p.Met157del, съобщавана при пациенти от Турция, всички останали малки *indels* в гена водят до преждевременно възникване на стоп-кодон.

Делеции, обхващащи целия ген *SRD5A2*, както и такива, касаещи екзон 1 и екзон 2 са описвани при дефицит на 5- α -редуктаза тип 2 [Anderson, 1991; Fenichel, 2013, Косова, 2019], включително и при 2 от пациентите в настоящата работа. Проучването на механизмите, които са в основата на тези делеции би било важно за изясняване на молекулярните основи на възникване на това състояние. Хромозомният регион, в който лежи генът *SRD5A2* (chr2:31,522,480-31,580,938) е богат на мобилни ДНК елементи, особено LINE-1 последователности (*Long Interspersed Nuclear Elements*) и Alu елементи. Възможността им за мобилизиране и преместване по дължината на генома може да определя вероятното им участие в молекулярните основи на някои наследствени състояния.

Обобщението на наличните в литературата данни, касаещи степента на вирилизация на външните гениталии при пациенти с 5- α -редуктазен дефицит показва, че това е състояние, при което не може да бъде направена ясна генотип-фенотипна констелация. Въпреки отчитаната фенотипна вариабилност, за някои мутации се наблюдава по-ясна връзка с по-силна (като p.Arg246Gln) или по-лека вирилизация (p.Gly183Ser, p.Gln126Arg). Сравнение на вирилизацията на гениталиите при пациенти с хомозиготни и съставно-хетерозиготни генетични варианти не показва значими различия, докато спрямо *indel* вариантите се наблюдава по-ясно повлияване върху вирилизация [Batista & Mendonca, 2020]. Счита се, че наличието на алелни варианти в екзон 4 на *SRD5A2* също повлиява фенотипа в по-голяма степен, вероятно поради присъствието на 57% от консервативните позиции именно в този екзон [Batista & Mendonca, 2020, Katharopoulos, 2019]. Функционалните изследвания при мутации, засягащи аминокиселини в него показват или липсваща остатъчна активност, или засягане на афинитета на ензима към ко-фактора му NADPH.

Наличието на хомозиготни мутации от типа *nonsense* се очаква да са свързани с ясно нарушение на вирилизацията на гениталиите, но има съобщения за пациенти с хомозиготност по мутациите p.Arg227Ter и p.Arg103Ter, които се презентират клинично с хипоспадия и микрофалус. Това подсказва, че фенотипната вариабилност съществува дори и при синтезиран скъсен белтък. Фактът, че вирилизация може да настъпва при пациенти, носители на мутации от типа *nonsense*, при които няма никаква остатъчна ензимна активност предполага, че

вероятно други фактори (като например AR-опосредствана сигнална трандукционна активност, фактори на средата, други андрогени) може да имат значение за фенотипната изява при дефицит на 5- α -Редуктаза.

Интересно е да се отбележи, че са описвани и алтернативни варианти на унаследяването на мутации в гена *SRD5A2* – като унипарентна дизомия [Chavez, 2000], а също и наличие на три мутации в хетерозиготно състояние [Cheng, 2019].

Клинични характеристики при 46,XX индивиди и 5- α -Редуктазен дефицит

Изследване на 5 индивида в кариотип 46,XX са извършени през 1995 г от Milewich, 1995 и Katz, 1995 – жени-сибси на пациенти с 5- α -Редуктазен дефицит. Всяка от изследваните жени е била хомозигот или съставен хетерозигот за патогенни генетични варианти в *SRD5A2*, водещи до загуба на функция на ензима. Всички изследвани жени са били с нормална менструация, нормални бременности и са родили без усложнения общо 24 живи деца. Тези данни потвърждават възприетата концепция, че 5- α -Редуктазата не играе важна физиологична роля при жените. Може да се приеме, че жените, носителки на мутации в *SDR5A2* гена са нещо като „скрит резерв” в популацията за състоянието дефицит на 5- α -редуктаза тип 2.

Промяна в гражданския пол при пациенти с 5- α -Редуктазен дефицит

При хората със състояния от групата 46,XY DSD има вероятност от несъответствие между изявения фенотипен пол и личното им усещане им за принадлежност към даден пол. Въпреки това обаче, промяната на пола е по-скоро изключение, отколкото правило при тези случаи, като дефицитът на 5- α -Редуктаза тип 2 е важно изключение – при индивиди с това състояние промяната на гражданския пол се съобщава при 25 от случаите, като при огромна част се извършва промяна от женски към мъжки пол [Batista & Mendonca, 2020]. При сравняване на средната степен на вирилизация на гениталиите при индивидите, които не променят граждански си пол и тези, които избират да го направят, няма разлика. Не така стоят нещата при сравнението спрямо етническия произход на пациентите – там има значителна разлика (между 16 и 70%), вероятно в силна зависимост от социалните фактори на средата и от културалните различия сред отделните популации. Най-често промяна в гражданския пол се извършва в Бразилия, а най-рядко – в Турция [Batista & Mendonca, 2020]. При пациентите, включени в нашата група и носещи патогенни мутации в *SDR5A2* промяна от женски в мъжки граждански пол беше осъществен само при един от случаите – на най-малкия пациент, при който генетичната диагноза беше поставена на 3 годишна възраст. И трите останали пациентки заявиха, че възприемат себе си с женска идентичност, но и при трите е извършена гонадектомия по време на пубертета.

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	<i>SRY/1</i>	16	c.203T>C	p.Ile68Thr	p.I68T	<i>de novo</i>	Съобщавана
2	<i>SRY/2</i>	17	c.325T>C	p.Phe109Leu	p.F109L	<i>de novo</i>	Съобщавана

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. Детето има оптична корекция за късогледство.

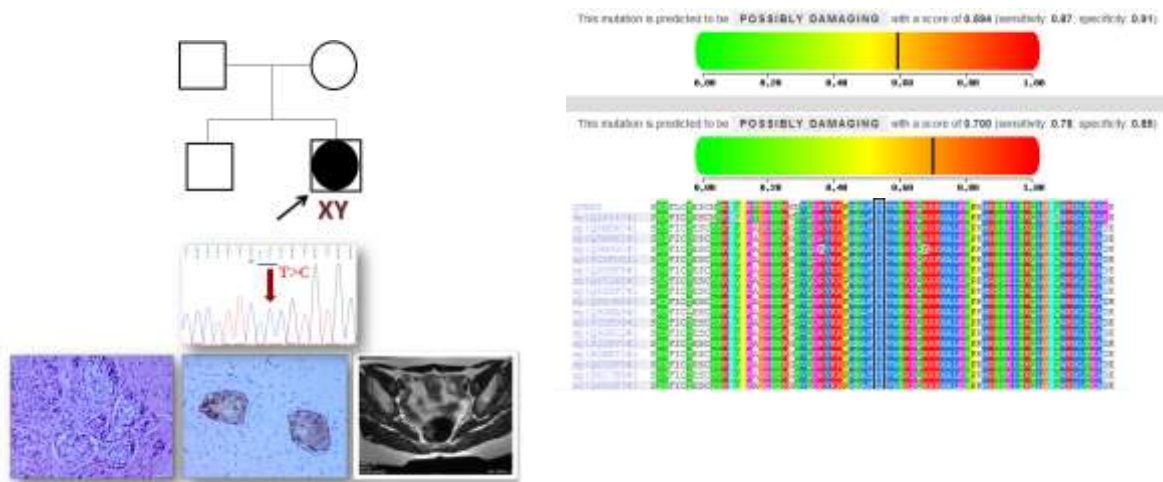
На 15 годишна възраст е установен инсулин-зависим диабет тип 1 без кетоацидоза; лекуващият детски ендокринолог наблюдава много добър гликемичен контрол. Има данни за фамилна обремененост по майчина линия с Метаболитен синдром и Захарен диабет тип 2, с диабет са и нейните родители. При хоспитализация на 16 годишна възраст за контрол на диабетното състояние се открива изоставане в пубертетното развитие, първична аменорея и с високи нива на LH и FSH. Пациентката е с поднормено тегло, адекватно НПП и ниво на интелигентност видимо над средното. Изоставането на костната възраст е със 6 стандартни отклонения. Тъй като в диагностичен план са обсъждани гонадна дисгенезия, ензимен дефект в синтеза на гонадните стероиди, както и анатомични причини за аменорея (като агенезия/хипоплазия на оварии/матка), пациентката е насочена за генетична консултация. При извършеният цитогенетичен анализ е установен кариотип 46,XY.

При последваща диагностична лапароскопия се описват хиполастична матка, инфантилни, лентовидно двустранни маточни тръби и хипопластични яйчници с диаметър <1 см. При направения ЯМР 6 месеца по-късно се установяват хипопластични влагалище и матка с дебелина на миометриума, ненадхвърляща 2 мм. Не се визуализират овоидни структури, наподобяващи гонади в областта на малкия таз и интраабдоминално. Не се изобразяват и овални структури с макроморфология и сигнална характеристика на тестиси. Има данни за изоставане в костната възраст, както и за 4 по-малки акцесорни слезки под долния полюс на слезката. При проведената 1 месец по-късно оперативна лапароскопия е извършена двустранна аднексектомия. Хистологичните заключения от изследвания на аднексите са за „яйчникова тъкан с оскъдни, неправилно развити примордиални фоликули и фиброзирана кортикална строма с части от неправилно развити маточни тръби”. След допълнителна консултацията с втори патологоанатом върху готовите хистологични препарати е извършено имуноно маркиране. Сред плътна, фиброзна строма (подобна на овариалната) се установяват епителни гнезда, съставени от гранулозо-подобни клетки, формиращи на места абортивни Call-Exner телца.

Имунохистохимично клетките интензивно експресират СК AE1-AE3 при умерена по интензитет позитивност за Инхибин. Не се визуализират герминативни клетки: отрицателна експресия за CD117. Дадено е мнение, че морфологичната и фенотипна находки съответстват на ивицеста гонада с епителни cord-like структури.

Молекулярно-генетичен анализ

Подходът за извършване на ДНК изследвания при пациентката следваше фенотипните данни за нарушения в половото развитие, както и данните за краниосиностоза. На първия етап от изследванията беше потвърдено наличието на една X и една Y хромозома в кръвните ѝ клетки чрез QF-PCR анализ. Данните за гонадна дисгенезия дадоха основание да бъде секвениран целия кодиращ района на гена *SRY*, където беше открит варианта **rs104894968**: мутация с.203T>C (ATC>ACC), p.Пe68Thr (фигура 37), описана в литературата по-рано при пациент с 46,XY гонадна дисгенезия [McElreavy, 1992]. Всички пациенти от цитираното изследване са с женски фенотипен пол, 46,XY и пълна форма на гонадна дисгенезия – женски външни полови органи, ивицести гонади и наличие на нормално развити Мюлерови структури (матка и фалопиеви тръби). 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.



Фигура 37

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

Откритата мутация не беше установена при бащата на пациентката и е *de novo* възникнала. Промяната на Изолевцин и Треонин на позиция 68 на протеина е в район, който е вариабилен сред HMG-box протеините. Въпреки това обаче, фактът, че при нашата пациентка (както и при съобщаваната през 1992г) това е нововъзникнала мутация, която не се носи от бащата и освен това се асоциира с еднозначен клиничен фенотип на пълна гонадна дисгенезия

и при двата случая, дава основание да се приеме, че мутацията води до нарушаване на функционалната активност на белтъка SRY.

Във връзка с предположенията на първия екип патолози, работили по случая, за наличие на примордиални фоликули в отстранените аднекси, беше изолирана ДНК и от фиксираната в парафиново блокче тъкан от аднексите. Целта беше да се отхвърли възможен XX-мозаицизъм в гонадната тъкан, който да може да се свърже с обявената предполагаема находка. Различие между ДНК профилите на генома, изолиран от кръвни клетки и и генома, изолиран от парафиново блокче не беше наблюдавано. Повторната хистологична консултация на препаратите с втори екип хистолози потвърди клиничната диагноза 46,XY гонадна дисгенезия, определяйки находката като недиференцирана ивицеста гонада. Това е в съответствие и с откритието на мутация в *SRY* гена.

Почти всички мутации, водещи до гонадна дисгенезия, силно нарушават или напълно премахват специфичната ДНК-свързваща активност на белтъка. Известно е, че ДНК районът, разпознаван за свързване от SRY белтъка е AACAAAG или [T/A]AACAA[T/A] [Südbeck and Scherer, 1997]. В проведено изследване [Wang, 2018] са синтезирани олигонуклеотиди, включващи специфичен за SRY-свързване район (AACAAAT) и е доказано, че мутацията p.Ala66Thr в HMG-box района намалява ДНК-свързващата способност на белтъка. Тези резултати са в съответствие с други изследвания на съседните аминокиселинни позиции – 64, 65, и 67 (p.Met64Arg, p.Asn65Asp, p.Phe67Val), при които също е установено редуциране на ДНК-свързващата способност на SRY-белтъка [Helszer, 2013; Mitchell and Harley, 2002].

СЛУЧАЙ SRY / 2

Клинична картина

Индексният пациент беше 17-годишно момиче с първична аменорея, насочено за клинично уточняване към ендокринолог. Родена от първа бременност в семейство без данни за близко-родствена връзка. Медицинската история е без особени прояви. На 16-годишна възраст при пациентката е била извършена диагностична лапароскопия - описани са хипопластични матка и фалопиеви тръби, както и 4 см формация на мястото на левия яйчник и ивицеста гонада вдясно.

Пубертетното развитие към 17-тата ѝ година е нормално - с пубисно окосмяване Танер V, развитие на млечни жлези B5 с нормална фиброзна структура при УЗ изследване, нормални женски външни гениталии. Костната възраст е оценена като изоставаща и отговаряща на 15 г. Бъбречната морфология и функционалните тестове, касаещи бъбреците са в норма. При извършване на хормонални изследвания е установен първичен хипогонадизъм с повишени нива на LH и FSH; стероидните хормони са в нормални граници за жена. При ЯМР е визуализирана туморна формация с размери 45/40/35 мм на мястото на лявата гонада, като метастази не са открити. Негативни са и всички изследвани към съответния момент туморни маркери.

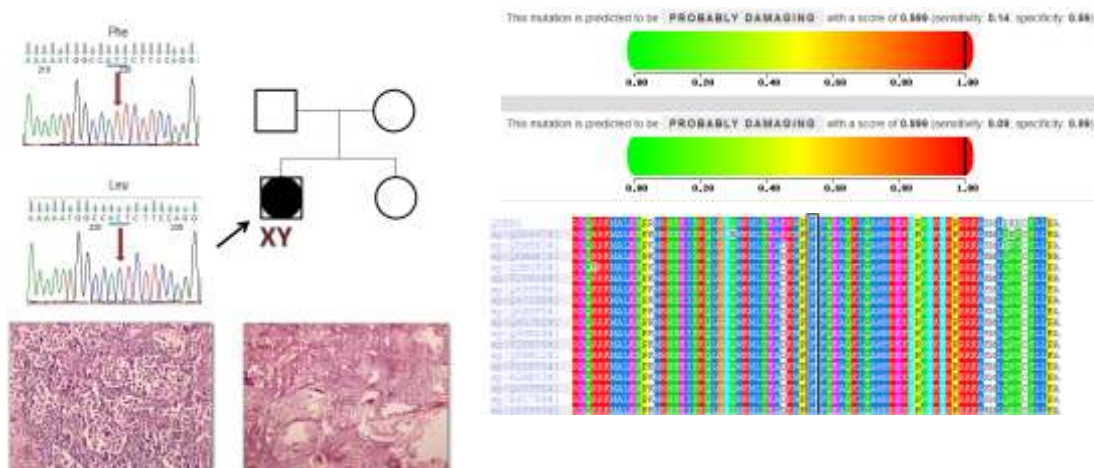
Пациентката е насочена към гинеколог-хирург за оперативно отстраняване на откритата туморна формация. След извършената билатерална гонадектомия хистопатологичният анализ доказва наличието на гонадобластом с дисгермином на мястото на лявата гонада (фигура 38). Препоръчано е извършването на химиотерапия, която семейството не предприема. Една година по-късно с помощта на ЯМР и PET/CT скенер е открита 3 см формация, локализирана под диафрагмата. След хирургичното ѝ отстраняване, с хистологично изследване се потвърждава метастазния ѝ характер. Проведени са 2 курса на химиотерапия. В момента състоянието на пациентката е добро, провежда се перорална ХЗТ.

Молекулярно-генетичен анализ

При извършения ДНК анализ с QF-PCR са открити данни за X и Y хромозома, което е потвърдено и от приключилия по-късно цитогенетичен анализ (46,XY). При секвенирането по Sanger на района, кодиращ SRY гена беше открита нова, непубликувана в базите данни мутация: с.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 38). Случаят е представен в една от публикациите по темата на настоящия дисертационен труд [Andonova, 2015].

За да бъде оценен потенциалният увреждащ ефект на аминокиселинната замяна, бяха използвани 3 алгоритъма за предикция: мутацията беше определена като „Probably damaging” – вероятно патогенна от PolyPhen2, като „Damaging” – патогенна от SIFT и като „Disease causing” – водеща по увреждане от Mutation Tester. Справката в базите данни показва, че аминокиселинната позиция 109 е силно консервативна сред видовете и замяна на това място не е толерирана в еволюцията.

Намерената мутацията p.F109L е локализирана във високо-консервативния HMG-box централен регион на белтъка и вероятно води до такава промяна във функцията му, че да доведе до развитието на 46,XY гонадна дисгенезия и женски фенотип. Откритият вариант не е съобщаван досега в достъпните ни бази данни, както и в Human Genome Mutation Database (HGMD). 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. Замяната p.F109L е във високо-консервативно място и не се толерира сред различните видове в еволюцията, т.е. вероятно е патогенна. През 1992г Jäger и съавтори описват замяна на аминокиселината Фенилаланин (на същата позиция 109 в SRY протеина) със Серин [Jäger, 1992]. Описаната от тях замяна 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 и по подразбиране се приема, че са носени и от 2 починали XY-роднини. Т.е. при 1 от 7 носители на замяната p.F109S в това семейство е наблюдавано нарушение в половото развитие. При извършеното допълнително изследване на 176 неродствени здрави мъже, използвани като контроли не е открита тази замяна. 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. Известно е, че фенотипния ефект на всяка единична мутация зависи именно от генетичния фон, на който тя възниква [Veltman & Brunner, 2012]. В настоящия случай, откритата мутация p.F109L в SRY гена не е открита при бащата на пациентката и е нововъзникнала.



Фигура 38

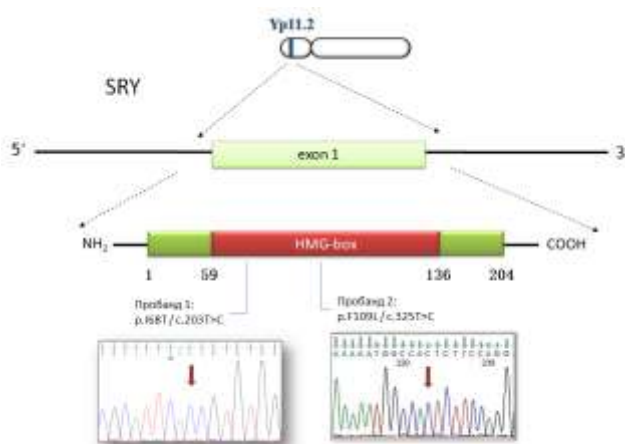
Представяне на клиничен случай SRY 2 – родословие и резултат от генетичния анализ, както и от извънения предикционен анализ с PolyPhen-2 за патогенността на откритата мутация

ОБСЪЖДАНЕ – ГОНАДНА ДИСТЕНЕЗИЯ С МУТАЦИИ В *SRY*

При пациентите с 46,XY пълна гонадна дистенезия има повишен риск от развитие на гонадни тумори [Jorgensen, 2010]. Наличие на хормон-секретиращ тумор може да бъде заподозряно при развитие на млечни жлези и нормални нива на естрадиол при пациентки с 46,XY гонадна дистенезия, на фона на хипергонадотропен хипогонадизъм. При първата ни пациентка, при която беше открит гонадобластом с дигермином обаче всички туморни маркери бяха негативни, за разлика от други съобщавани в литературата случаи [Behtash & Zarchi, 2007; Capito et al., 2011].

На фигура 39 са представени схематично генът *SRY*, неговата локализация, синтезираният продукт, както и откритите мутации при изследваните в настоящия труд пациентки.

В литературата са описвани случаи на семейство с два засегнати сибси и идентична мутация в *SRY* и вероятен герминативен мозаицизъм при бащата. Това е довело до препоръката за скриниране за мутации в *SRY* гена и на клинично здравите сестри на пробанда с оглед превенция срещу развитието на гонадни тумори или евентуален хормонален дисбаланс [Stoppa-Voucher, 2012]. Въз основа на това, по-малката 10-годишна клинично здрава сестра на изследваната пациентка-пробанд също беше изследвана за определяне на вида и броя полови хромозоми след извършена консултация на семейството. QF-PCR анализа показва наличието на 2 X-хромозоми, районът на *SRY* гена не се позитивира.



Фигура 39

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

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 . Изследвани бяха и техните родители. Трима от пациентите (пробанд 1 , пробанд 2 и пробанд 4) се презентираха с двойствени 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*: с.103-4G>T; с.244+1 G>C; с.185G>C(p.Arg62Pro), с.265A>G(p.Arg69Gly) и с.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	<i>NR5A1 / 1</i>	1 г	с.103-4G>T		Майка	Съобщавана	
2	<i>NR5A1 / 2</i>	3 г	с.244+1G>C		<i>de novo</i>	Несъобщавана	
3	<i>NR5A1 / 3</i>	2.5 г	с.185G>C	p.Arg62Pro	p.R62P	Баща	Несъобщавана, има подобна
			с.1063G>A	p.Val355Met	p.V355M	Майка	Съобщавана
4	<i>NR5A1 / 4</i>	1 мес	с.265A>G	p.Arg89Gly	p.R89G	<i>de novo</i>	Несъобщавана

СЛУЧАЙ NR5A1 / 1

Клинична картина

Първият пробанд с открита мутация в *NR5A1* гена беше момченце на 1 година, родено от първа нормално протекла бременност при 28 годишна майка. Насочено е към Национална генетична лаборатория за консултация със съмнения за хипогонадизъм/анорхия/гонадна дисгенезия и двойствени гениталии. В предоставената от клиничния екип документация се описват 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. Двата бъбрека са с нормална структура и функции. Костната възраст отговаря на очакваната. 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

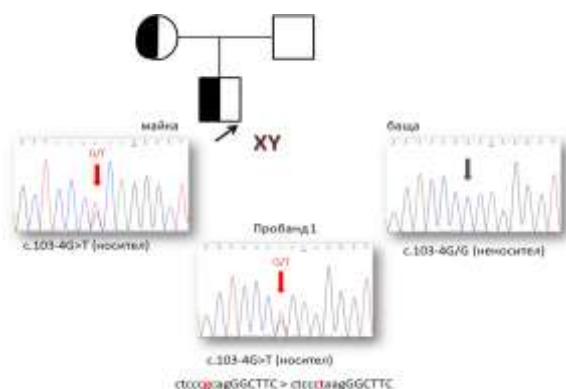
Тъй като клиничната картина при индексния пациент насочваше към съмнения за гонадна дисгенезия, беше пристъпено към секвениране по Sanger на гените *SRY* и *NR5A1*, при които са откривани мутации при пациенти с 46,XY гонадна дисгенезия. Изследването на гена *SRY* не показва наличието на мутации. При 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 ctcccgcagGGCTTC > ctccc~~t~~aagGGCTTC. Мутацията с.103-4G>T беше открита в хетерозиготно състояние и при майката на пробанд 1, бащата беше неносител (фигура 40).

Справка в базата данни EXAC показва, че откритата от нас замяна с.103-4G>T е съобщена при 1 Европейска ДНК проба сред **66 906** изследвани (честота 0.00001495) [<http://exac.broadinstitute.org/variant/9-127265503-C-A>]. Няма обаче подадена информация 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 с.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. Информация за репродуктивните планове на семейството обаче не ни е известна.

Подобна на откритата в индексния ни пациент мутация, но разположена на 3 (а не на 4) бази преди началото на екзон 3 (с.103-3C>A) и засягаща акцепторното сплайс място на интрон

2 (ctccc**g**cagGGCTTC > ctccc**a**agGGCTTC) е съобщена през 2009 г от Kohler. Описваният пациент е новородено дете с микропенис с тежка хипоспадия, недесцендирали ингвинални тестиси (2мл/2мл) и леко хипопластичен скротум с пълна скротална срединна фузия при раждането. Хормоналните изследвания показват ниски нива на Тестостерон, без отговор след стимулиране с hCG (*human chorionic gonadotrophin*), нисък Инхибин В и леко повишени нива на FSH на 7-дневна възраст. При УЗ изследване са изказани съмнения за утериноподобна находка, която при лапароскопско изследване е определена като „*vaginal rest*”. С помощта на софтуер за предсказване на ефекта от възникнали мутации (*Genscan splice prediction software*), 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 индивидуалния фенотип на фона на SF-1 хаплоинсуфициенция.



Фигура 40
Представяне на клиничен случай NR5A1/1 – родословие и резултат от генетичния анализ

СЛУЧАЙ NR5A1 / 2

Клинична картина

Индексния пациент на второто семейство е с турски етнически произход - дете, родено от втора бременност в семейство без данни за близко родство. Беше насочено за генетични изследвания с диагноза Двойнствени гениталии и микропенис, с вероятна парциална андрогенна нечувствителност. Съгласно подадените данни от клинициста, детето е било прието с фебрилитет и левкоцитоза без възпалителна активност. Съобщава се за изразено напълняване след 3-месечната възраст като към момента на насочването то е с генерализирано затлъстяване от I степен.

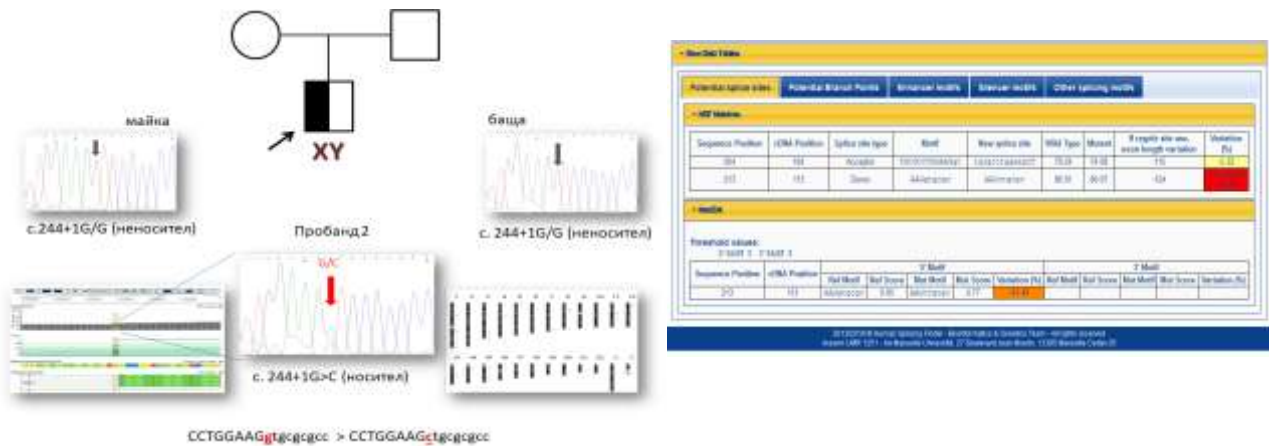
Наблюдават се неопределени гениталии с микропенис, тестиси не се палпират убедително. Детето е с лицев дисморфизъм – хипертелоризъм, тесни очни цепки, къс нос с екстрорвертирани ноздри, плоска основа на носа и малка уста. Има данни за хипотония и изпъкнали париетални тубери. В семейството не се съобщава за други подобни случаи, по-голяма сестричка се развива нормално. Не се предоставя информация за извършвани хормонални или образни изследвания на индексния пациент. Извършеният цитогенетичен анализ показва кариотип 46,XY.

Молекулярно-генетичен анализ

Тъй като детето беше насочено към НГЛ за потвърждаване или отхвърляне на парциална андрогенна недостатъчност, на първата стъпка от изследванията бяха търсени мутации в гена за андрогенен рецептор (*AR*). Не бяха открити нуклеотидни замени; определени бяха 26 броя CAG повтори в екзон 1 на гена, които се определят като нормален брой. Поради описаните данни за малформации при пациента, на следващата стъпка от генетичните изследвания беше пристъпено към микрочипов анализ (*aCGH*). Изследванията бяха извършени в Мюнстер, Германия. Не бяха открити геномни изменения извън бройните полиморфни вариации в копийните повтори, които да могат да бъдат свързани в наблюдавания фенотип.

На следващата стъпка се пристъпи към генетично изследване със секвениране от ново поколение върху платформата Illumina, чрез панела *TrueSight Inherited*. Изследванията бяха извършени от екипа на Клиника „Малинов“. В гена *NR5A1* беше открита замяната **c.244+1 G>C**, разположена в интрон 3 - първата база след края на екзон 3 на гена. Със секвениране по Sanger при пробанда и родителите беше извършен потвърдителен и сегрегационен анализ. При индексния пациент беше доказано наличието на установената с NGS мутация c.244+1 G>C. Тя не беше открита при изследването на ДНК пробите на родителите му, което предполага възникването ѝ *de novo*. (фигура 41).

С използването на он-лайн платформата Human Splicing finder (<http://www.umd.be/HSF3>) открятата замяна беше оценена като вероятно патогенна.



Фигура 41

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

За първи път детето постъпва за клинично уточняване в педиатрична клиника на 1г 7 мес. Родено е в 38 г.с. след 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. Костната възраст при детето леко изостава; кариотипът е 46,XY.

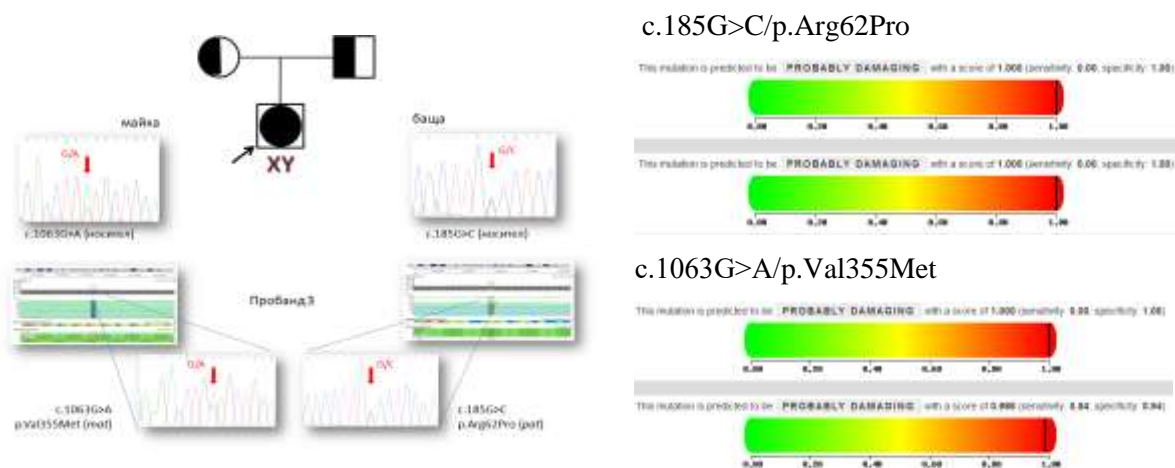
На 2.5 годишна възраст на детето семейството предприема поредица изследвания в клиника в чужбина. При лапарокопия, извършена заради ингвинална херния вдясно, е наблюдавано образуване, наподобяващо вагинален интроитус; двустранно се описва структура със семенни каналчета. В оперативния протокол се отбелязва, че по долната част на тестиса, открит в дясната ингвинална гънка макроскопски се наблюдава напречна линия, като долната част прилича повече на яйчник. Изказани са съмнения за овотестис. В ляво тестисът е позициониран в лабиоскротума, като и тук макроскопски изглежда различен в долния полюс. Епидидимът и на двата тестиса е нормален. Хистологичните изследвания на препарати след биопсия на тестисите показват наличие на нормална тестикуларна тъкан. Извършените там генетични анализи за 5-алфа-редуктазен дефицит не откриват мутации в гена *SRD5A2*.

На 3-годишна възраст при детето е извършен ЯМР на малък таз, където не се визуализира структура с макроморфология на матка. Над перинеума има данни за мекотъкани участък, наподобяващ корена на хипопластичен penis. В двата ингвинални канала се изобразяват овални структури, като недесцендирали тестиси. При последната ни среща, семейството декларира, че предстои емигриране в чужбина с цел осигуряване на проследяване състоянието на момиченцето в специализиран център за деца с нарушения в половото развитие.

Молекулярно-генетичен анализ

Първоначално, пациентката беше насочена от лекуващия клиницист за определяне на функционалност на У-хромозома, при наличен кариотип 46,XY. Изследванията не показаха наличието на микроделеции върху дългото рамо на хромозома У и беше пристъпено към секвениране по Sanger на гена за *SRY*, като мутации не бяха открити. Поради непълната медицинска документация и без налични клинични данни, работата по случая беше временно преустановена. Няколко месеца по-късно към НГЛ беше подадена клиничната документация с молба за извършване на секвениране по Sanger на гена за *AR* - заради водеща към момента работна диагноза Пълна форма на андрогенната нечувствителност (CAIS). Мутации не бяха открити .

С въвеждането на новите технологии за генетични изследвания, 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 ѝ родители. Мутациите бяха открити при детето, а родителите бяха доказани като хетерозиготни носители. При майката имаше носителство на варианта c.1063G>A/p.Val355Met, а при бащата – на варианта c.185G>C/p.Arg62Pro (фигура 42).



Фигура 42

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

Мутацията, носена от бащата: **c.185G>C**, водеща до замяна на аминокиселината Аргинин с Пролин на позиция 62 не е съобщавана в базите данни. Намира се в екзон 3 на гена (в ДНК-свързващия *Zn-finger* регион) и би довела до конформационни промени в структурата на кодиращия белтък. Мутационният предиктор PolyPhen2 определят замяната като „Probably

damaging with a score of **1.000** (sensitivity: **0.00**; specificity: **1.00**)". При всички видове, наличието на Аргинин на позиция 62 е строго консервативно.

На позиция 62 от протеина SF-1 е съобщавана друга замяна (с.184C>T / р.Arg62Cys), открита при пациент с нарушение в половото развитие [Tantawy, 2014]. Описаният в цитираната статия пациент е 1,5 годишно момче с тежка хипоплазия на фалуса (1 см в разгънато състояние), хипоспадия, хипопластичен скротум и непалпируеми гонади. Трансабдоминалното ултразвуково изследване открива два малки тестиси (с диаметър 8-9мм) в съответните ингвинални канали, без данни за Мюлерови структури. Има нарушение в десценденса на тестисите и парциална гонадна дисгенезия с нарушена функция на Лайдиговите и Сертолиевите клетки, изразяваща се в ниски нива съответно на Тестостерона и на инхибин Б и АМН. По време на мини-пубертета на детето са установени ниско-нормални нива на Тестостерон, а след провеждане на стимулационен тест с hCG нивата на Тестостерона остават ниски. При направените допълнителни анализи е установено, че протеинът, носещ мутацията с.184C>T/р.Arg62Cys показва значително понижаване на способността си да стимулира/активира активността на който и да е ген .

Втората мутация, открита в хетерозиготно състояние при индексния ни пациент е с.1063G>A / р.Val355Met, с доказано носителство при майката. Съобщавана е в литературата при момче, родено в 37 г.с. от двуплодна бременност (дизиготи, биамниоти), след терапия за овариална стимулация при майката заради овариектомия вляво и предхождащи 2 спонтанни аборта [Philibert, 2007]. Пробанда в семейството е роден с микропенис и ектопични тестиси – левият не се палпира на 4 месечна възраст, а десният с е много малки размери („колкото грахово зърно“). Други аномалии не се наблюдават. Измерени са повишени нива на FSH и LH, а нива на АМН не се отчитат. Тестостеронът е нисък и не се повишава след стимулация с hCG. След суплементация с Тестостерон се наблюдава добър отговор и нарастване на пениса на детето. При лапароскопска процедура на 2 год възраст в левия ингвинален канал се наблюдава атрофичен канал в близост до стената на пикочния мехур, без данни за тестис и за Мюлерови структури. В десния ингвинален участък две години по-късно се наблюдава нормален канал и атрофирал тестис, който е отстранен на 13 годишна възраст. Хистопатологията не открива тестукуларни структури, а само наличие на фиброзна тъкан. Наблюдава се хипергонадотропен хипогонадизъм, с много ниски нива на Тестостерон и недоловими нива на АМН. Бъбречните функции са нормални. Братът-близък, който се развива нормално, е хетерозиготен носител на мутацията р.V355M, както и майката. Бащата има нормална секвенция за NR5A1.

Замяната на Валин от Метионин на позиция 355 засяга високо-консервативно място на спирала 7 от LBD (лиганд-свърващото място), като се очаква да бъде засегнато свързването на рецептора SF1 с лиганда или с ко-фактора. Тази замяна не влияе чувствително на експресията на рецептора, на ядрената му локализация или на свързването с ДНК, но намалява SF1-

зависимата транскрипционна активност до около 50%, съгласно данни от изследвания на различни клетъчни линии. Въпреки, че има описани мутации в ДНК-свързващия домейн на SF-1, свързани с умерена тестикуларна дисгенезия и видими понижено андрогенизиране на тялото, само един вариант - p.L437Q в LBD района се асоциира в хипоспадия, малки фибротични тестиси и вероятна прогресивна парциална форма на хипогонадотропен хипогонадизъм [Lin, 2007]. Вероятно промени в лиганд-свързващия регион на белтъка могат да повлияват тестикуларната цялост по-сериозно, отколкото функцията на Лайдиговите клетки. Освен това, частичната загуба на функцията на белтъка, която се наблюдава при p.V355M би съответствала на по-лекия фенотип на описвания пациент – микропенис и прогресивна тестикуларна регенерация. Това, че мутации в *NR5A1* се откриват и при здрави, контролни индивиди, се предполага, че активността на SF-1 се модулира от някои ко-фактори и/или ендогенни или екзогенни лиганди. Въпреки, че наличието на хетерозиготна мутация при майката отговаря на модела на полово-свързаното доминантно унаследяване на мутациите при SF-1, което се наблюдава при доста случаи, откриването на носителство на мутацията и при братчето-близък на цитирания пациента е трудно за интерпретация. Хетерозиготното носителство на p.V355M се свързва с частична загуба на функцията (с около 25%). Възможно е генетични или външни модифициращи фактори или епигенетични вариации да влияят на експресията на фенотипа на двамата братя [Philibert, 2007].

Интересно е, че при пробанда, който описваме в настоящата работа има видима липса на андрогенизация 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 Сертолиевы клетки изглежда са функционирали нормално достатъчно дълго време, за да произведат адекватното количество АМН, необходимо за предизвикване на пренаталната регресия на Мюлеровите структури. Намалването на нивата на Инхибин В и АМН на 3-годишна възраст при описвания от Tantawy, 2014 пациент с мутацията p.Arg62Cys е в подкрепа на прогресивното влошаване на функциите на Сертолиевите клетки, описвано по-рано при други пациенти с мутации в *NR5A1* гена [Bashamboo & McElreavey 2010; Tantawy, 2012].

СЛУЧАЙ NR5A1 / 4

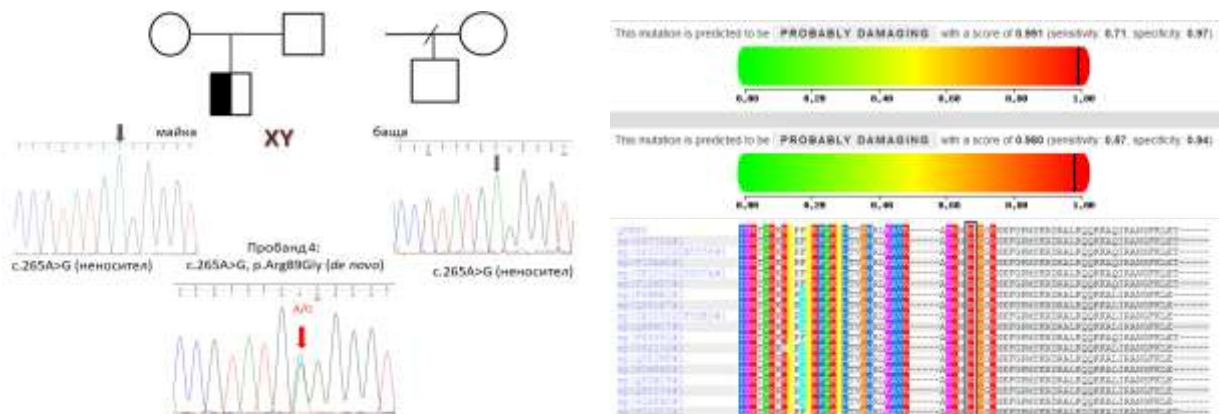
Клинична картина

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 девиран penis, като браздата на *glans penis* е на анатомичното място на *orificium urethrae ext.* Хормоналните изследвания показват Тестостерон 10,1 nmol/l, DHEAS 20.3 ug/dl. Цитогенетичният анализ открива кариотип 46,XY. Съгласно снетата анамнеза, при бащата е извършвана операция във връзка с ингвинална херния, а а по майчина линия се съобщава за захарен диабет тип 2. От предишен брак бащата има син на 21 години без съпътстващи заболявания.

Детето е насочено е към Национална генетична лаборатория за консултация и провеждане на таргетен ДНК анализ за дефекти в половата диференциация.

Молекулярно-генетичен анализ

При извършеното секвениране по Sanger на гена *NR5A1* беше открита замяната с.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 43). Откритият вариант не е съобщаван в достъпните ни бази данни.



Фигура 43

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

ОБСЪЖДАНЕ – ГОНАДНА ДИСФУНКЦИЯ И МУТАЦИИ В NR5A1

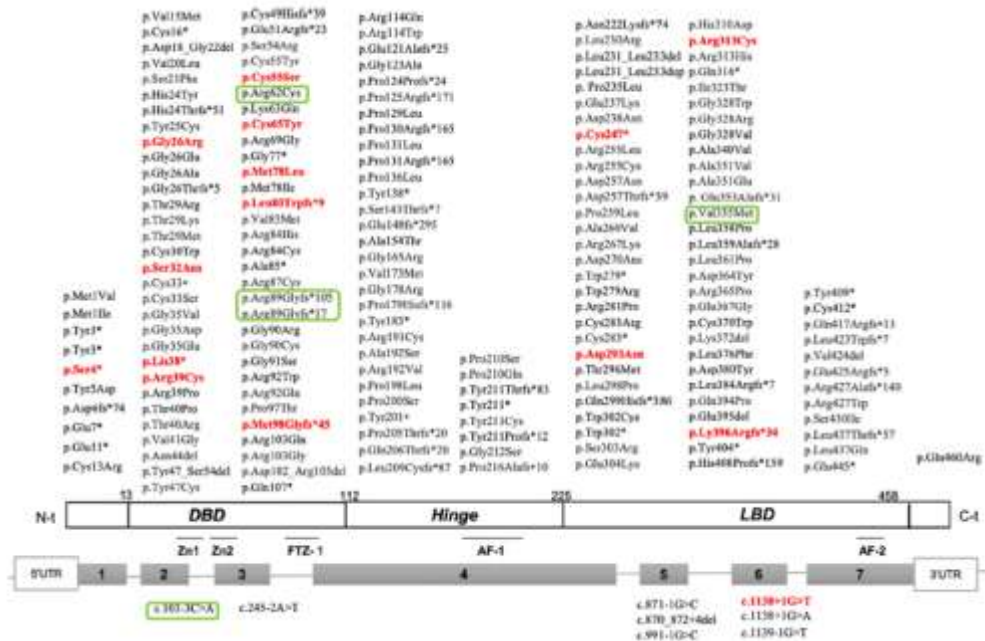
“If the phenotype doesn’t make sense, think of SF-1” [McElreavey & Achermann, 2016]

За пръв път мутация в гена NR5A1 е била описана през 1999 г и от тогава насам спектъра на свързаните със стероидогенния фактор 1 фенотипове значително нарастна. За пръв път този фактор е изолиран през 1992 г при търсенето на транскрипционен фактор, взаимодействащ си с цитохром P450 стероид хидроксилазите. Генът, който го кодира включва 7 екзона, от които първият е некодиращ, а синтезираният ядрен рецептор включва 461 аминокиселини. Структурата му е хомоложна с тази на останалите ядрени рецептори, като включва DBD - ДНК-свързващ домейн с два района *Zink-fingers* - т.нар. Hinge регион ; LBD – лиганд-свързващ домейн и два домейна за функционално активиране (AF-1 и AF-2).

Като ключов регулатор на стероидогенезата и развитието на репродуктивната система при човека SF-1 контролира адреналното и гонадно развитие на няколко етапа. Първоначално се експресира в урогениталния ствол на 46,XY индивидите, водейки до диференцирането на гонадите в тестиси. Във Сертолиевите клетки този транскрипционен фактор регулира експресията на AMH (водещ до регресия на Мюлеровите деривати) и си взаимодейства с DHH, който е нужен за развитието на феталните и зрелите Лайдигови клетки. В самите Лайдигови клетки SF-1 регулира синтезата на много от стероидогените ензими, нужни за производството на Тестостерон, а от там – за вирилизацията на външните гениталии и иницирането на миграцията на тестисите в скротума.

До момента са известни повече от 188 патогенни варианта в NR5A1 гена, описани при 238 клинични случая [Robevska, 2018; Fabbri-Scaliet, 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 45) . Откритите мутации са най-вече от типа *missense* (58%), 24% предствляват малки делеции или инсерции, *nonsense* мутациите са 12.3%, има съобщения и за няколко интронни варианта. Сред събраните от Fabbri-Scaliet, 2019 данни в литературата за 238 пациента само 3% са с хомозиготна мутация, докато всички останали са хетерозиготи (в т.ч. попадат и 4 случая с вероятно съставно хетерозиготно състояние). Унаследяването е доказано при 118/238 случая като при 16 от тях мутацията е с бащин произход, при 41 – с майчин произход, а при 47 е възникнала *de novo*. Повечето от бащите-носители на NR5A1 мутация не са имали абнормен фенотип, но 5 са били с описана хипоспадия; ¼ от майките-носителки са били с данни за преждевременна овариална недостатъчност. Унаследяването на мутациите в NR5A1 не може да бъде разглеждано нито като

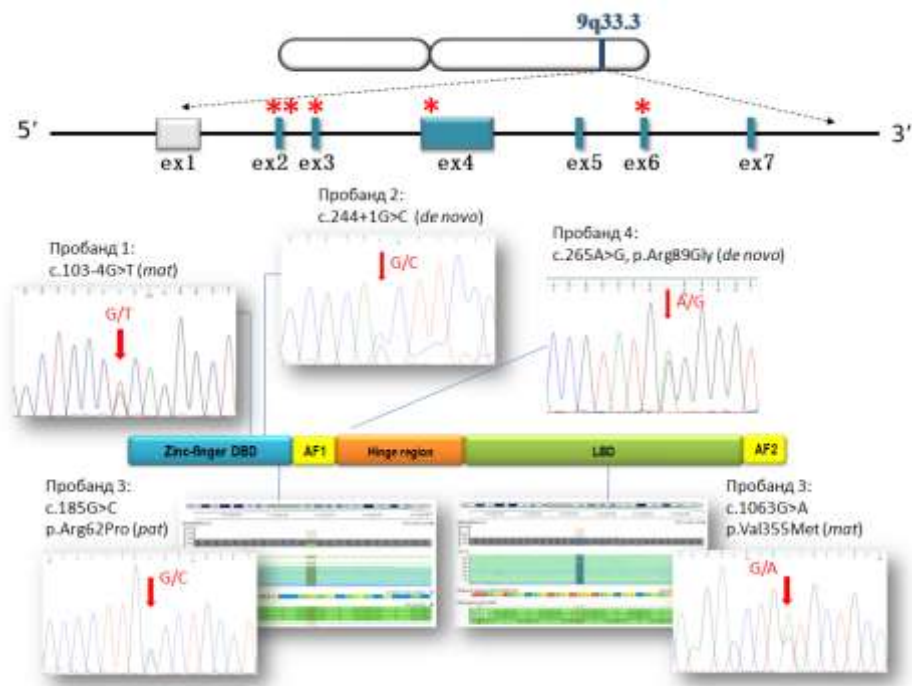
класически автозомно рецесивно, нито като автозомно-доминантно; предполага се, че е по-скоро има доминантен характер с непълна пенетрантност и вероятна връзка с наличието на 46,XY или 46,XX кариотип.



Фигура 44

В червено са мутациите, открити от авторите на статията Fabbri-Scaliet, 2019 сред изследвани от тях пациенти, със зелено са оградени мутациите, на чиито позиции са открити описаните в настоящия труд замени.

При 90% от разглежданите случаи мутации в *NR5A1* гена са били открити при пациенти с кариотип 46,XY – 46% са отглеждани като момичета (докладвана е 1 промяна в гражданския пол момче→момиче), а 54% са отглеждани като момчета (при 15% от тях е имало промяна в гражданския пол момиче→момче). Ясна корелация между откритият патогенен вариант в *NR5A1* и фенотипа на пациента не е открита. Наблюдава се много широк спектър – от напълно женски до напълно мъжки фенотип сред описаните случаи на парциална гонадна дисгенезия (68%), пълна гонадна дисгенезия (10.5%), инфертилитет при мъже (7.6%), преждевременна овариална недостатъчност (6%), овотестикларни DSD (3.4%) и др. Ето защо е трудно да бъде предсказано как мутации, засягащи този транскрипционен фактор биха повлияли експресията на други протеини и да бъде направена корелация с очаквания фенотипен ефект. Има предположения, че по-широкото въвеждане в практиката на пълното екзомно секвениране WES с едновременното анализиране на много кандидат-гени, би позволило изясняването на предполагаемо олигоценно унаследяване на варианти. А това би обяснило различната клинична манифестация на *NR5A1* вариантите и ефекта на гената експресия върху цялостния клетъчен метаболизъм.



Фигура 45

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

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

Случай WT1 / 1

Клинична картина

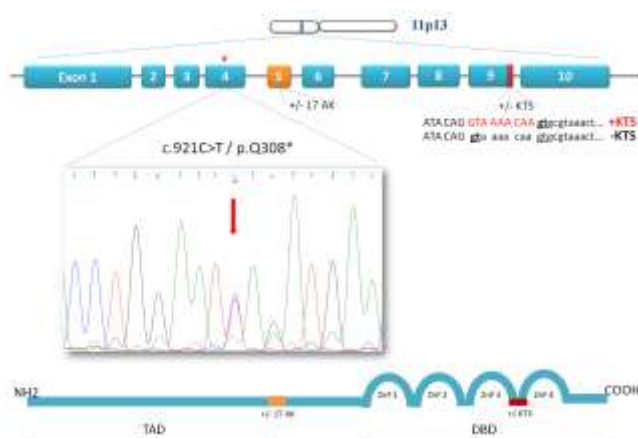
Касае се за момиче на 19г възраст с овариална дисфункция и съмнения за синдром на Денис-Драш. Родена от втора нормално протекла бременност, с нормално физическо и психическо развитие. Съгласно наличната медицинска документаци на 2 годишна възраст е установена бъбречна формация. На 3 год възраст е извършена радикална екстирпация на тумора с десностранна нефректомия, като хистологичния резултат показва данни за тумор на Уилмс, без туморни инфилтрации в околната тъкан и с нормална надбъбречна тъкан. Успешно е проведена химио- и лъчетерапия. 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. Проследяването на бъбреците е правено системно, като десният бъбрек не се представя добре, а левият бъбрек е със запазена топка и дензитет на паренхима, с работна хипертрофия. Не се откриват матка и аднекси с ЯМР. Пациентката се проследява от ендокринолог, който я насочва за генетични изследвания към Национална генетична лаборатория с предполагаема клинична диагноза синдром на Денис-Драш. Консултацията с акушер-гинеколог и УЗ преглед показват хипопластични яйчници, агенезия на матката, ВПО – Прадер, III степен, млечни жлези - Таннер III.

Молекулярно-генетичен анализ

Със секвениране по Sanger бяха анализирани всички 10 екзона и границите интрон-екзон на гена *WT1*. В хетерозиготно състояние беше установена единичната нуклеотидна замяна c.921C>T (p.Q308X / p.Gln308Ter) в екзон 4 на гена (фигура 46). Този генетичен вариант не е съобщаван досега при пациенти със синдром на Дениш-Драш или с тумор на Уилмс в достъпната ни литература. Замяната на С в Т (NM_000378.4:c.922C>T) в кодиращата последователност на гена води до възникване на преждевременен стоп-кодон на позиция 308 **CAG > TAG** (NP_000369.3:p.Gln308Ter, p.Q308X) и терминиране на транскрипцията / трансляцията.

При проверка на достъпните бази данни с резултати от извършвани анализи с новогенерационно секвениране в различни лаборатории по света, беше открито едно съобщение за такава замяна в хетерозиготно състояние (rs865829249). Вариантът е въведен от Y.Samuels,

Израел от екзомно секвениране, но няма информация за пола и възрастта на индивида, при който е открита, както и за клиничния му статус.



Фигура 46

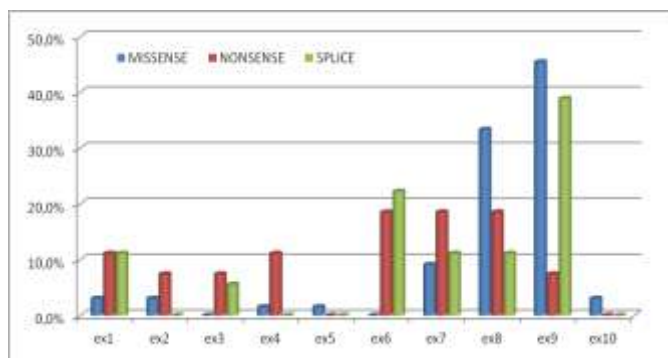
Мутацията в гена *WT1*, открита при изследваната пациентка с клинични данни за нарушения в половото развитие, кариотип 46,XY и синдром на Денис-Драш

Като цяло, *nonsense* мутации при пациенти със синдром на Денис-Драш се описват рядко в литературата – има съобщени по-малко от 30 такива мутации, които се откриват на практика по цялата дължина на гена [Wagner, 2003]. Възникването на преждевременен стоп-кодон води до промяна в дължината на белтъка. В случая, възникването на терминален кодон в екзон 4 ще доведе до пълна загуба на четирите Zn-finger района, кодирани от екзони 7-10. При загуба на тези домейни се стига до нарушаване на ДНК-свързващия капацитет на белтъка и от там – до загубата на функцията му на транскрипционен фактор [Barbosa, 1999]. 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].

При извършения анализ на данните от справка в HGMD относно вида и броя на описаните там мутации в гена *WT1* беше установена познатата тенденция мутации да се откриват най-често в С-терминалния район, където са разположени 4-те *Zn-finger* области, имащи отношение към ДНК-свързването. В екзони 7,8, и 9 се откриват над 70% от всички *missense*, *nonsense* и *splice* мутациите в гена (фигура 47). Мутациите, водещи до преждевременен стоп-кодон обаче се откриват на практика по цялата дължина на гена.

Наличето на хетерозиготна мутация в гена *WT1* е описвано при:

- 1) Повечето от пациентите със синдром на Денис-Драш (мезентериална склероза, асоциирана с 46,XY DSD и/или тумор на Уилмс
- 2) Някои от пациентите с уро-генитални аномалии и тумор на Уилмс
- 3) Някои от пациентите, имащи единствено унилатерален или билатерален тумор на Уилмс, вкл. и фамилен случай [Jeanpierre, 1998]



Фигура 47

Представяне на описваните с литературата мутации в гена *WT1*, разпределени по екзони

Рискът за гонадобластом се счита за нисък при пациенти с *WT1 nonsense* или *missense* мутации и парциална гонадна дисгенезия, но данните са все още недостатъчни за формулирането на алгоритъм в тази насока [Kohler, 2011]. При пациенти с открито носителство на мутация в гена *WT1* е задължително провеждането на мониториране на бъбречната функция през целия им живот, тъй като се очаква развитието или прогресията на нефропатия да започне на по-късен етап в живота.

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*.

Клиничен случай # 1

Пациентката е жена на 40 г, с клинична диагноза синдром на Андрогенната нечувствителност и аднексектомия по време на пубертета. Не разполагаме с придружаваща медицинска документация, касаеща здравния ѝ статус.

Пациентката се насочва за верифицирането на XY статуса ѝ, за който няма никаква документация. Кариотипиране не може да бъде извършено, тъй като към момента на срещата ни с нея тя е след извършена костно-мозъчна трансплантация заради онкохематологично заболяване, като донор е бил нейният брат.

Молекулярно-генетичен анализ

Предложено беше ДНК изследването за определяне на брой и вид полови хромозоми да бъде извършено в ДНК, изолирана от букална лигавица. QF-PCR анализът показа данни за X и Y-хромозома, но изследване за верифициране на клиничната диагноза Синдром на андрогенната нечувствителност или друго от спектъра на 46,XY DSD не беше възможно да бъде извършено, поради оскъдния обем добита ДНК.

Клиничен случай # 2

Пациентката е 16 годишна, родена от втора бременност в семейството, след загуба на първата в 5 л.м.; майката се съобщава, че е с двурога матка. Пациентката е насочена за генетична консултация след извършена лапароскопия с аднексектомия вядно, поради данни за туморна формация. Съобщава се за менархе на 14 г, с последващи нередовни цикли (3 пъти в годината), заради които е проведена консултация с акушер-гинеколог и е установена формация в областта на десните аднекси. Матката се описва с нормални за възрастта форма и размери. При аднексектомията е отстранена туморна формация вядно, която е определена от хистолог като добре капсулиран дисгермином с типична картина, без други гермонативни клетъчни елементи. Изследваните туморни маркери в кръв са в норма. При извършена релапаротомия макроскопската находка на ляв аднекс не отговаря на нормална яйчниковка морфология и структура (размери 2см/0.5см) и е направена биопсия. Хистологичното изследване показва

овариален тип строма с калцификати и гонадобластома-подобни структури, характерни за т.нар. ивицести гонади. На семейството е препоръчано отстраняване на лентовидната лява гонада, с последващ PET-скенер и консултация с детски онкохематолог.

Молекулярно-генетичен анализ

Първата стъпка при извършените генетични изследвания беше да бъде определен генетичния пол при пациентката. Извършеният QF-PCR анализ показва данни за наличие на две полови хромозоми – X и Y. Заради предоставените клинични данни за ивицеста гонада беше пристъпено към търсене на мутации в *SRY* гена, но патогенни генетични варианти там не бяха открити. На следващата стъпка бяха секвенирани гените *NR5A1* и *DHH*, но и там не бяха установени патогенни находки. Проведеният MLPA анализ за търсене на делеции/дупликации в гени, асоциирани с нарушения в половото развитие също не дадоха отклонения.

Нямаме информация за хода на развитие на клиничния случай при тази пациентка в последните 2 години.

Клиничен случай # 3

Пациентката е 20 годишна жена, потърсила консултация с акушер-гинеколог заради аменорея. Няма предоставена документация за извършвани хормонални изследвания. Цитогенетичното изследване показва кариотип 46,XY. Проведената сцинтиграфия на гонади, съчетана с компютърна томография показва визуализиране на съмнителна структура в областта на коремната кухина с размери 14мм/8мм. Допълнително са налице също съмнителни данни за наличие на структура в левия ингвинален канал, непосредствено до пикочния мехур, с размер 9мм/5мм. И за двете структури е затруднена сцинтиграфската оценка за наличие на тестикуларна структура поради разделителната способност на апарата.

При прегледа от гинеколог се външните полови органи са описани като инфантилни, със слабо окосмяване и леко уголемен клитор. В областта на левия ингвинален канал се палпира формация с размер 2.5x2см, болезнена при палпация. Пристъпено е към диагностична лапароскопия. Липсва маточно тяло, като по предната коремна стена има подобие на маточни тръби с дължина 1.5см и 2 см. Липсват лява и дясна гонада.

Молекулярно-генетичен анализ

Тъй като клиничните данни, с които пациентката пристигна в кабинета за генетична консултация бяха оскъдни, а водещата клинична диагноза беше синдром на Андрогенната нечувствителност, беше пристъпено към търсене на патогенни варианти в гена *AR*. Секвенирането по Sanger не откри носителство на мутации. Секвениран беше и генът *SRY*, заради липсата на гонади, но и там мутации не бяха открити.

Извършеният MLPA анализ за търсене на делеции/дупликации, асоциирани с нарушения в половото развитие също не откри отклонения, при сравняване с контролен профил. Оскъдната

клинична информация по случая не позволява да бъде направена оценка към изследването на кои гени, асоциирани с DSD да бъде пристъпено.

Клиничен случай # 4

Касае се за девойка на 19г, с грацилен марфаноиден хабитус, родена от първа бременност в неродствено семейство. Майката и бабата по майчина линия са с по-късно менархе (съответно на 16 и на 18 г). Окосмяването в андроген-зависимите зони се е появило късно, като е оскъдно. Пациентката се обръща към ендокринолог заради липса на развитие на бюста и първична аменорея. При предходно проследяване от гинеколог са описани „недоразвити яйчници и матка“, като гонадотропините са били повишени, а нивата на естрадиол – ниски. При провежданото контрацептивно лечение пациентката е забелязала нарастване на бюста и на клитора; хормоналните изследвания се поддържат с повишени гонадотропини и ниски естрадиол, тестостерон, и силно понижени AMH и Inhibin B. Цитогенетичният анализ показва кариотип 46,XY. Към момента на насочване към Национална генетична лаборатория пациентката е с телархе I ст (не се палпира жлезиста тъкан), пубархе III ст, аксилархе II ст., с нормално изглеждащо влагалище, без клиторомегалия. Ултразвуковото изследване на малък таз показва тубуларна структура на матката и шийка с размери по 24мм. Яйчници не се визуализират. Извършеният ЯМР показва данни за тубуларна структура с вид на рудиментирала матка, без визуализиране на яйчници двустранно.

Молекулярно-генетичен анализ

След проведено обстойно обсъждане с насочващият клиницист-ендокринолог, ДНК изследванията при пациентката бяха насочени към търсене на мутации в гените *SRY* и *NR5A1* гените. Проведените анализи не показаха наличие на патогенни генетични варианти в тези гени, както и извършеният MLPA анализ за търсене на делеции, дупликации, асоциирани с нарушения в половото развитие.

Клинични случаи # 5.1 и # 5.2

Касае се за две сестри – на 18 и на 22 г, които са се обърнали към акушер-гинеколог във връзка с първична аменорея. Не съобщават за съпътстващи заболявания или за фамилна обремененост. Отричат близкородствен брак при родителите. И при двете има нормални женски външни полови органи без клиторомегалия и без вирилизация на тялото. При по-малката сестра, която е семейна няма развити млечни жлези.

Влагалището е широко и дълбоко, а матката и фалопиевите тръби се описват като хипопластични след направената лапароскопска процедура. Гонадите са двустранно хипопластични, като при хистологичното изследване след извършената гонадектомия се описват фиброзирана кортикална строма, без примордиални фоликули. Хормоналните изследвания показват Хипергонадотропен хипогонадизъм с високи нива на LH и FSH.

Молекулярно-генетичен анализ

Цитогенетичният анализ и на двете сестри показва кариотип 46,XY. При провеждане на QF-PCR анализа се установи наличие на Y хромозома и при двете сестри, но X-хромозомата беше различна при двете пациентка – т.е. всяка от тях вероятно е унаследила различна X-хромозома от майка си. Тъй като ДНК от родителите не беше налична, това предположение не може да се докаже или отхвърли. При извършените изследвания по време на специализацията в Мюнстер, Германия бяха изследвани гените *AR*, *SRY*, *NR5A1* и мутации не бяха открити.

Клиничен случай # 6

Пациентката е 12 годишна, родена с вирилизирани гениталии. Цитогенетичният анализ при нея е показал кариотип 46,XY. Клиничната информация, с която разполагахме беше оскъдна – данни за дисгенетични тестиси и ЯМР данни за матка. Други клинични данни не са налични.

Молекулярно-генетичен анализ

Пациентката беше насочена за генетичен анализ конкретно на гените *SRY*, *NR5A1* и *DHH*, мутации при които се асоциират с гонадна дисгенезия. При извършените изследвания не бяха открити генетични варианти – патогенни, вероятно патогенни или такива с неясно значение при секвенирането на екзоните и интрон-екзонните граници на таргетните гени.

Клиничен случай # 7

Този клиничен случай представя новородено в 36 г.с. след бременност, протекла с развитие на олигохидрамнион и увеличени фетални бъбреци – установени в 30 г.с. При раждането бебето е с нормално изглеждащи женски гениталии, с деформации на ръцете и отворени фронтални и сагитални шевове, лицева асиметрия и дисморфизъм, с високо небце. В допълнение се развива пневмоторакс, неонатална церебеларна исхемия, като образите от трансфонтанелната ултрасонография не са ясни заради наличието на мозъчен оток. Има данни за хидронефрозни бъбреци и уголемен черен дроб, като леталния изход настъпва на втория ден след раждането. При извършената аутопсия се откриват допълнителни малформации на вътрешни органи като двурога матка, билатерална надбъбречна хиперплазия, унилатерален тумор на Уилмс вляво, дифузна глумерална и интестициална фиброза, липса на гонади. Цитогенетичният анализ при бебето показва кариотип 46,XY,16qh+ , като този вариант е унаследен от майката. Тези находки насочват към евентуална диагноза синдром на Денис-Драш, въпреки, че обикновено това състояние не се асоциира с периода на новороденото, а в случая има тежка клинична презентация. При синдрома на *Fraser* има „псевдохермафродитизъм” и прогресивна глумеролопатия, но наличието на тумор на Уилмс не е от характерните находки. Липсата на сърдечни и пулмонарни малформации позволяват да се отхвърли синдрома Meacham от клиницистите, а липсата на аниридия – синдрома WAGR.

Молекулярно-генетичен анализ

За извършване на ДНК анализи с цел изясняване на генетичната диагноза при новороденото ни бяха изпратени срези от наличните парафинови блокчета от аутопсионен материал, тъй като кръв не беше налична. Чрез QF-PCR метода беше потвърдено наличието на SRY гена и хромозоми X и Y. Единствен кандидат-ген при обсъжданата клинична диагноза синдром на Денис-Драш беше *WT1*, за който обаче успешна амплификация беше постигната само за екзон 9, където след извършено секвениране по Sanger не бяха открити мутации. Използването на формалин за фиксирането на тъканни проби във FFPA блокчета е познат фактор, водещ до образуването на т.нар. *cross*-връзки между нуклеиновата киселина и белтъците, като вследствие на това се може да се блокира и PCR амплификацията. Фиксиращият процес също така води до фрагментация на ДНК, заради екстремно ниското рН <1. Тези особености при работа с ДНК, изолирана от туморни блокчета в комбинация с недостатъчното количество изходен материал биха могли да обяснят проблемите с анализирането на кодиращите екзони на *WT1*.

Липсата на сигурна генетична диагноза не позволи да бъде дадена ясна прогноза за риска от повторна подобна бременност в семейството (вероятно рискът е нисък). При настъпилата втора бременност в семейството след 18 месеца бяха извършени прецизни и детайлни УЗ проследявания, като беше родено здраво момче без клинични данни за синдром на Денис-Драш.

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. Девет от изследваният баха с пълната форма на синдрома (CAIS) и с женски фенотип и самосъзнание, а 1 – с парциална (PAIS). 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 с данни за **нарушение в половото развитие**. Трима от пациентите (на възраст 1 мес, 1 г и 3 г) 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 автосомно-рецесивно състояние. Използването при тези пациентки на технологиите за генетични изследвания от ново поколение, каквото е например пълното геномно секвениране на първо време, би позволило едновременното изследване на много кандидат-гени, асоциирани или все още суспектни спрямо участие в процесите на половото развитие и детерминацията на пола при човека.

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

Предложение за алгоритъм на работа и използване на молекулярно-генетични подходи в диагностиката на 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, алгоритмите 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 предложението 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 извършване 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 P450_{scc} 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 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 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. Хетерогенната природа на състоянията от спектъра на нарушенията в половото развитие обаче може да доведе до удължаване на времето на анализ с изследване на потенциалните кандидат-гени един по един, а това да направи мъчително чакането за засегнатото семейство. Голямо предимство при търсенето на генетичните основи на изследваните състояния дават **изследванията 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 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 от стъпващите 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 22

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	<ul style="list-style-type: none"> Откриване на анеуплоидии по половите хромозоми Определяне на генетичния (хромозомен) пол 	<ul style="list-style-type: none"> Относително бърз метод 1-2 дена. Първа линия генетични изследвания за определяне насоката за клинична диагноза. 	<ul style="list-style-type: none"> Използва специфични генетични маркери. Трудности с мозайките. Не може да установи хромозомни пренареждания (транслокации)
Кариотипиране	<ul style="list-style-type: none"> Откриване на анеуплоидии по половите хромозоми, в т.ч 45,X или 47,XXY, както и мозаицизъм 	<ul style="list-style-type: none"> Възможност за откриване на анеуплоидии, както и структурни хромозомни аномалии и мозайки. 	<ul style="list-style-type: none"> 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)	<ul style="list-style-type: none"> Откриване на генни делеции и дупликации 	<ul style="list-style-type: none"> Възможност за откриване на делеции и дупликации извън разделителната способност на светлинния микроскоп. Възможност за анализирани на практика на почти всички геномни райони. 	<ul style="list-style-type: none"> 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)	<ul style="list-style-type: none"> Откриване на суб-микроскопски делеции/дупликации, засягащи конкретни гени (напр. CYP21A2, SRD5A2 и др.) 	<ul style="list-style-type: none"> Веднъж въведен в рутинната практика на дадена лаборатория е относително стабилен анализ. Обикновено резултатите са еднозначни. 	<ul style="list-style-type: none"> Анализиране само на конкретни гени. Технологията не е подходяща за откриване на точкови мутации.
Секвениране по Sanger	<ul style="list-style-type: none"> Откриване на точкови мутации и малки делеции/дупликации в конкретни гени (напр. AR, NR5A1, SRY, SRD5A2, HSD17B3, MAMLDI, DAX1, WT1) 	<ul style="list-style-type: none"> Необходимото оборудване, софтуер и апаратура (PCR апарати и автоматичен секвенатор) обикновено са налични във всяка генетична лаборатория 	<ul style="list-style-type: none"> Времеемко и трудоемко при анализирани 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	<ul style="list-style-type: none"> Едновременно анализиране и скриниране за мутации на разширен панел от DSD-свързани гени. Все по-широко се използва в практиката 	<ul style="list-style-type: none"> Възможност за анализиране на много гени едновременно Възможност за откриване на големи делеции/дупликации с количествен анализ на броя ридове в даден район 	<ul style="list-style-type: none"> Трудности в интерпретирането 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	<ul style="list-style-type: none"> 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 	<ul style="list-style-type: none"> Възможност за анализиране на много гени едновременно. Относително лесно биоинформатично модифициране на групата гени, които представляват интерес. При достигане на добра дълбочина на четене – може да се анализират и бройни копийни повтори. 	<ul style="list-style-type: none"> Трудности в интерпретирането 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 връзка с непрекъснато обновяващата се информация в базите данни Етични въпроси, касаещи потенциалното откриване на клинично-важна информация.

Нарастващият опит, натрупан в последните години с находки при работа с технологиите от ново поколение показва, че откритите единични нуклеотидни замени/варианти (SNP) и бройни копийни варианти (CNV) при пациенти с 46,XY DSD не винаги корелират с ендокринологичния профил на конкретния пациент. От друга страна, това може да се отрази в промяна на класическия диагностичен подход за отделни клинични и лабораторни изследвания при DSD състоянията в посока паралелно интегриране на биохимичните (хормонални) изследвания и генетичните, базирани на технологии от ново поколение още при първоначалната клинична оценка на конкретния пациент. 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** (каквото 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 на определени 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 23 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.

Таблица 23

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

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

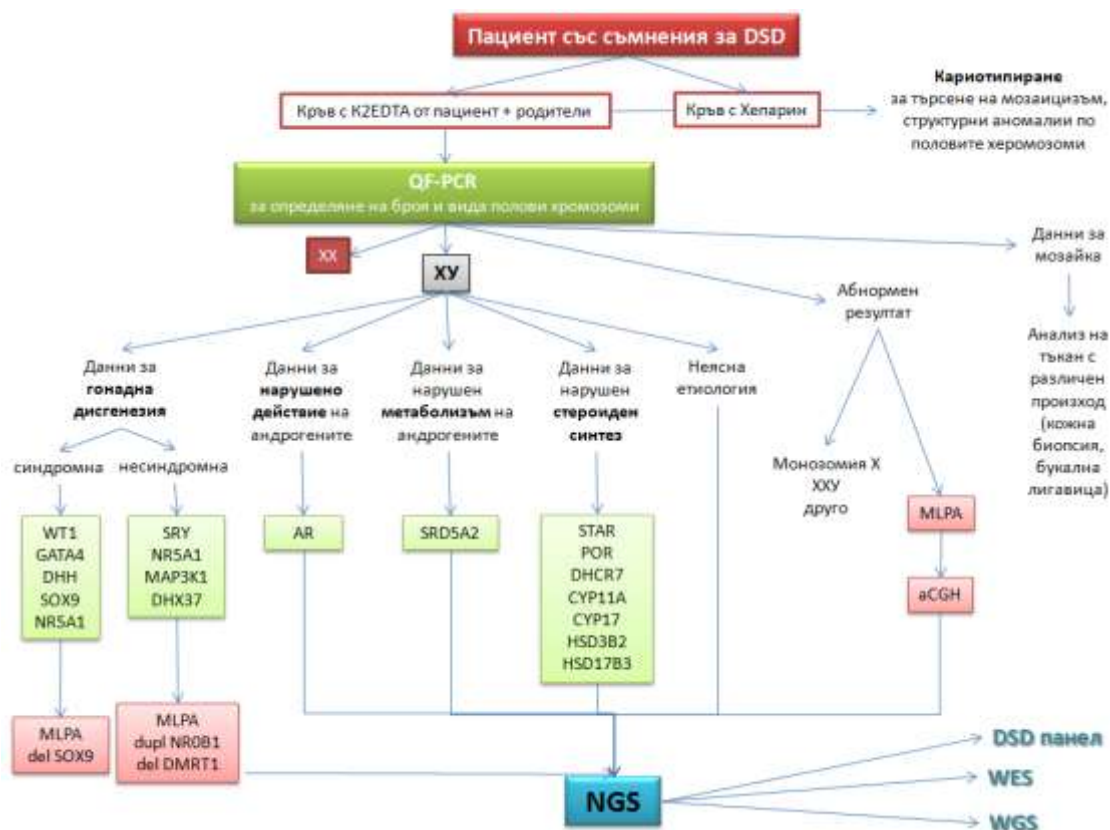
Б. Разширен панел от гени (по азбучен ред), за включване в едновременно генетично изследване, в случаите при които не са открити мутации в гените от листа за първа стъпка (отбелязани тук с *) генетични анализи

<i>AKR1C2</i>	<i>AMH</i>	<i>AMHR2</i>	<i>AR*</i>	<i>ARX</i>	<i>ATRX</i>	<i>BMP4</i>	<i>BMP15</i>	<i>CBX2</i>
<i>CYB5A</i>	<i>CYP11A1</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>CYP17A1</i>	<i>CYP19A1</i>	<i>CYP11A1</i>	<i>CYP21A2*</i>	<i>DHCR7</i>	<i>DHH</i>
<i>DMRT1</i>	<i>DMRT2</i>	<i>EMX2</i>	<i>FGF9</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FOG2</i>	<i>FOXL2</i>	<i>FSHR</i>	<i>GATA2</i>
<i>GATA4</i>	<i>HOXA13</i>	<i>HSD3B2</i>	<i>HSD17B3*</i>	<i>INSL3</i>	<i>LGR8</i>	<i>LHCGR</i>	<i>LHX9</i>	<i>MAMLD1*</i>
<i>MAP3K1</i>	<i>NROB1*</i>	<i>NR5A1*</i>	<i>NOBOX</i>	<i>POR</i>	<i>P450_{scc}</i>	<i>RSPO1</i>	<i>SOX3</i>	<i>SOX9</i>
<i>SOX10</i>	<i>SRD5A2*</i>	<i>SRY*</i>	<i>STAR</i>	<i>TSPYL1</i>	<i>WWOX</i>	<i>WNT4</i>	<i>WT1</i>	

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) позволява

едновременна проверка на трите индивидуални екзома 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.

Независимо от ограниченията си (в т.ч. непълно покритие и все още развиващи се възможности за откриване на вариациите в броя копияни повтори) NGS-базираните изследвания са изключително полезен инструмент за генетични изследвания от първа линия за диагностициране на нарушенията в половото развитие и за търсене на нови гени, асоциирани с тези състояния. Все по-нарастващият брой изследвани клинични случаи позволява хвърлянето на нова светлина върху етиологията на възникването им. Данните, които се трупат биха помогнали за търсенето на нови концепции и модели, в т.ч. разширяване на познанията за евентуалната им мултигенна и/или епигенетична основа.



Фигура 48

Предложение на молекулярно-генетичен подход при изследване на пациенти от групата 46,XY нарушения в половото развитие. Графиката показва потенциалната последователност на 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 организъмът 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 ограничените ни познания по темата и на обработката и осмислянето на масивите от данни, които се генерират при използването на новите технологии.

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

Не бива да се забравя, 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:

1. Получените резултати са приложени при прецизирането на клиничната диагноза и последващото терапевтично поведение при част от пациентите.
2. 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. Dizygotic sex-discordant IVF-ICSI twins with blood but not tissue chimerism; **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, Craniosynostosis and subsequently found Gonadal dysgenesis: 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

1. **Achermann** JC, Domenice S, Bachega TA, Nishi MY, Mendonca BB. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Aug;11(8):478-88.
2. **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.
3. **Akcaay** T, Fernandez-Cancio M, Turan S, Güran T, Audi L, Bereket A. AR and SRD5A2 gene mutations in a series of 51 Turkish 46,XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity. *Andrology*. 2014 Jul;2(4):572-8.
4. **Alhomaidah** D, McGowan R & Ahmed SF. The current state of diagnostic genetics for conditions affecting sex development. *Clinical Genetics* 2017 91 157–162.
5. **Andersson** S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991 Nov 14;354(6349):159-61. doi: 10.1038/354159a0. PMID: 1944596; PMCID: PMC4451825.
6. **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.
7. **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.
8. **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.
9. **Baldinotti** F, Majore S, Fogli A, Marrocco G, Ghirri P, Vuerich M, Tumini S, Boscherini B, Vetri M, Scommegna S, Rinaldi R, Simi P, Grammatico P. Molecular characterization of 6 unrelated Italian patients with 5alpha-reductase type 2 deficiency. *J Androl*. 2008 Jan-Feb;29(1):20-8.
10. **Barbosa** AS, Hadjiathanasiou CG, Theodoridis C, Papanthanasou A, et al. The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Frasier syndrome patients with or without Wilms' tumor. *Hum Mutat*. 1999;13(2):146-53.
11. **Bashamboo** A & McElreavey K. NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary. *Annales d'Endocrinologie* 2010 71 177–182.;
12. **Batista** RL, Mendonca BB. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet*. 2020 Apr 14;13:83-96.
13. **Baxter** RM, Vilain E. Translational genetics for diagnosis of human disorders of sex development. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:371-92.
14. **Behtash** N, Zarchi MK. Dysgerminoma in three patients with Swyer syndrome. *World J Surg Oncol*. 2007; 5:71.
15. **Bianco** B, Nunes Lipay MV, Guedes AD, Verreschi IT. Clinical implications of the detection of Y-chromosome mosaicism in Turner's syndrome: report of 3 cases. *Fertil Steril*. 2008 Oct;90(4):1197.e17-20.
16. **Boehmer** AL, Brinkmann O, Brüggewirth H, et al Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4151-60. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Jul;87(7):3109.
17. **Bogdanova** N, Siebers U, Kelsch R, Markoff A, Röpke A, Exeler R, Tsokas J, Wieacker P. Blood chimerism in a girl with Down syndrome and possible freemartin effect leading to aplasia of the Müllerian derivatives. *Hum Reprod*. 2010 May;25(5):1339-43.
18. **Capito** C, Arnaud A, Hameury F, Fremont B, Lardy H, Leclair MD, Heloury Y. Dysgerminoma and gonadal dysgenesis: the need for a new diagnosis tree for suspected ovarian tumours. *J Pediatr Urol*. 2011; 7(3):367-72.
19. **Carrillo** A, Damian M, Berkovitz G. Disorders of Sexual Differentiation. In: *Pediatric endocrinology 5-th edition*, Ed. F. Lifshitz, Informa Healthcare, New York, 2007, 365-390
20. **Chávez** B, Valdez E, Vilchis F. Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;85(9):3147-50.
21. **Cheng** T, Wang H, Han B, et al Identification of three novel SRD5A2 mutations in Chinese patients with 5α-reductase 2 deficiency. *Asian J Androl*. 2019 Nov-Dec;21(6):577-581.
22. **Cools** M, Nordenström A, Robeva R, Hall J, Westerveld P, Flück C, Köhler B, Berra 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.

23. **Cools M**, Pleskacova J, Stoop H, Hoebeke P, Van Laecke E, Drop SL, Lebl J, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Wolffenbuttel KP; Mosaicism Collaborative Group. Gonadal pathology and tumor risk in relation to clinical characteristics in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jul;96(7):E1171-80.
24. **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.
25. **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.
26. **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.
27. **Donaghue C**, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 2005 Jan;25(1):65-72.
28. **Drash A**, Sherman F, Hartmann W, Blizzard R (1970) A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 76:585–593
29. **Dunfordi**, Bowley C, Hutchison A, Thompson J, Sanger R, Race R. A human blood-group chimera. *Br Med J.* 1953 Jul 11;2(4827):81.
30. **Eggermann T**, Elbracht M, Kurth I, Juul A, Johannsen TH, Netchine I, Mastorakos G, Johannsson G, Musholt TJ, Zenker M, Prawitt D, Pereira AM, Hiort O; European Reference Network on Rare Endocrine Conditions (ENDO-ERN). Genetic testing in inherited endocrine disorders: joint position paper of the European reference network on rare endocrine conditions (Endo-ERN). *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Jun 8;15(1):144.
31. **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.
32. **Fénichel P**, Paris F, Philibert P, Hiéronimus S, Gaspari L, Kurzenne JY, Chevallier P, Bermon S, Chevalier N, Sultan C. Molecular diagnosis of 5 α -reductase deficiency in 4 elite young female athletes through hormonal screening for hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jun;98(6):E1055-9. doi: 10.1210/jc.2012-3893. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23633205.
33. **Fernández-Cancio M**, Audí L, Andaluz P, Torán N, Piró C, Albisu M, Gussinyé M, Yeste D, Clemente M, Martínez-Mora J, Blanco A, Granada ML, Marco M, Ferragut J, López-Siguero JP, Beneyto M, Carles C, Carrascosa A. SRD5A2 gene mutations and polymorphisms in Spanish 46,XY patients with a disorder of sex differentiation. *Int J Androl.* 2011 Dec;34(6 Pt 2):e526-35.
34. **Ganie Y**, Aldous C, Balakrishna Y, Wiersma R. The Spectrum of Ovotesticular Disorders of Sex Development in South Africa: A Single-Centre Experience. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(5):307-314.
35. **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.
36. **Giwerzman** 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.
37. **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.
38. **Gravholt CH**, Fedder J, Naeraa RW, Müller J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3199-202.
39. **Green RC**, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, McGuire AL, Nussbaum RL, O'Daniel JM, Ormond KE et al. CORRIGENDUM: ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine* 2017 19 606.
40. **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.
41. **Haber DA**, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9618-22.
42. **Harley VR**, Layfield S, Mitchell CL, Forwood JK, John AP, Briggs LJ, McDowall SG, Jans DA. Defective import in beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (12):7045-7050.
43. **Hashimoto K**, Horibe YU, Ezaki J, Kanno T, Takahashi N, Akizawa Y, Matsui H, Yamamoto T, Shibata N. Laparoscopically Removed Streak Gonad Revealed Gonadoblastoma in Frasier Syndrome. *Anticancer Res.* 2017 Jul;37(7):3975-3979.

44. **Hawkins JR.** The SRY gene. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4, 328 – 332.
45. **Helszer Z, Dmochowska A, Szemraj J, Słowikowska-Hilczler J, Wieczorek M, Jędrzejczyk S, Kałużewski B.** A novel mutation (c. 341A>G) in the SRY gene in a 46,XY female patient with gonadal dysgenesis. *Gene*. 2013; 526(2):467-470.
46. **Hersmus R, de Leeuw BH, Stoop H, Bernard P, van Doorn HC, Brüggewirth HT, Drop SL, Oosterhuis JW, Harley VR, Looijenga LH.** A novel SRY missense mutation affecting nuclear import in a 46,XY female patient with bilateral gonadoblastoma. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(12):1642-1649.
47. **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.
48. **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.
49. **Holterhus PM, Wiebel J, Sinnecker GH, Brüggewirth 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.
50. **Hughes IA, Werner R, Bunch T, Hiort O.** Androgen insensitivity syndrome. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):432-42.
51. **Hughes IA.** Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(1):119-134.
52. **Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE.** Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 1974;186(4170):1213–1215.
53. **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.
54. **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.
55. **Jeanpierre C, Bérout 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.
56. **Jorgensen PB, Kjartansdóttir KR, Fedder J.** Care of women with XY karyotype: a clinical practice guideline. *Fertil Steril* 2010, 94, 105-113.
57. **Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, Herman GE, Hufnagel SB, Klein TE, Korf BR et al.** Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine* 2017 19 249–255.
58. **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.
59. **Kashimada K, Koopman P.** Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010; 137(23):3921-3930.
60. **Katharopoulos E, Sauter K, Pandey AV, Flück CE.** In silico and functional studies reveal novel loss-of-function variants of SRD5A2, but no variants explaining excess 5 α -reductase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Jun;190:263-272.
61. **Katz MD, Cai L-Q, Zhu YS, et al.** The biochemical and phenotypic characteristics of females homozygous for 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3160–7.
62. **Kocova M, Plaseska-Karanfilska D, Noveski P, Kuzmanovska M.** Novel Genotype in Two Siblings with 5- α -reductase 2 Deficiency: Different Clinical Course due to the Time of Diagnosis. *Balkan J Med Genet*. 2019 Dec 21;22(2):69-76. doi: 10.2478/bjmg-2019-0022. PMID: 31942420; PMCID: PMC6956631.
63. **Köhler B, Biebermann H, Friedsam V, Gellermann J, Maier RF, Pohl M, Wieacker P, Hiort O, Grüters A, Krude H.** Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):E1131-6..
64. **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.
65. **Kühl-Burmeister R, Simeoni E, Weber-Matthiesen K, Milde A, Herwartz C, Neppert J, Suttrop M.** Equal distribution of congenital blood cell chimerism in dizygotic triplets after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000 May;15(5):1200-4. doi: 10.1093/humrep/15.5.1200. PMID: 10783379.
66. **Kutney K, Konczal L, Kaminski B, Uli N.** Challenges in the diagnosis and management of disorders of sex development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2016 Dec;108(4):293-308.

67. **Kyriakou** A, Lucas-Herald A, McGowan R, Tobias E, Ahmed, S. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management, *Advances in Genomics and Genetics* 2015;5:165–177
68. **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.
69. **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.
70. **Lefebvre** J, Clarkson M, Massa F, Bradford ST, Charlet A, Buske F, Lacas-Gervais S, Schulz H, Gimpel C, Hata Y, Schaefer F, Schedl A. Alternatively spliced isoforms of WT1 control podocyte-specific gene expression. *Kidney Int.* 2015 Aug;88(2):321-31.
71. **Lin** L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar;92(3):991-9.
72. **Lindhardt Johansen** M, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, Kjærgaard S, Petersen BL, Skakkebaek NE, Main KM, Juul A. 45,X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function--a retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug;97(8):E1540-9. doi: 10.1210/jc.2012-1388. Epub 2012 May 17. PMID: 22605431.
73. **Looijenga** LH, Hersmus R, Oosterhuis JW, Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP. Tumor risk in disorders of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;21(3):480-95.
74. **Lourenço** D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009 Mar 19;360(12):1200-10.
75. **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
76. **Maimoun** L, Philibert P, Cammas B, et al. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;96(2):296-307.
77. **Mao** Y, Chen S, Wang R, Wang X, Qin D, Tang Y. Evaluation and treatment for ovotesticular disorder of sex development (OT-DSD) - experience based on a Chinese series. *BMC Urol.* 2017 Mar 28;17(1):21.
78. **Matsui** F, Shimada K, Matsumoto F, Itesako T, Nara K, Ida S, Nakayama M. Long-term outcome of ovotesticular disorder of sex development: a single center experience. *Int J Urol.* 2011 Mar;18(3):231-6.
79. **Matsumoto** F, Matsuyama S, Matsui F, Yazawa K, Matsuoka K. Variation of Gonadal Dysgenesis and Tumor Risk in Patients With 45,X/46,XY Mosaicism. *Urology.* 2020 Mar;137:157-160.
80. **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 Paediatrics*, 87(3), 189–190.
81. **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.
82. **Mendonca** BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46, XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009; 70 (2):173-187.
83. **Milewich** L, Mendonca BB, Arnold I, et al. Women with steroid 5 α -reductase 2 deficiency have normal concentrations of plasma 5 α -dihydroprogesterone during the luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3136–9.
84. **Miller** SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
85. **Mitchell** CL, Harley VR. Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Mol Genet Metab.* 2002; 77(3):217-225.
86. **Mullis** K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
87. **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.
88. **Nachtigal** MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 1998 May 1;93(3):445-54.

89. **Nordenskjöld A**, Ivarsson SA. Molecular characterization of 5 alpha-reductase type 2 deficiency and fertility in a Swedish family. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Sep;83(9):3236-8.
90. **Nowakowski H**, Lenz W. Genetic aspects in male hypogonadism. *Recent Prog Horm Res.* 1961;17:53-95.
91. **Ohnesorg T**, Vilain E, Sinclair AH. The genetics of disorders of sex development in humans. *Sex Dev.* 2014;8(5):262-72.
92. **Ostrer H.** 46, XY Disorder of sex development and 46,XY complete gonadal dysgenesis. Updated 2009 Sep 15. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1547/>
93. **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.
94. **Peters HE**, König TE, Verhoeven MO, Schats R, Mijatovic V, Ket JC, Lambalk CB. Unusual Twinning Resulting in Chimerism: A Systematic Review on Monochorionic Dizygotic Twins. *Twin Res Hum Genet.* 2017 Apr;20(2):161-168.
95. **Philibert**, 2007 Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study, *Hum Reprod.* 2007 December ; 22(12): 3255-3261
96. **Pleskacova J**, Hersmus R, Oosterhuis JW, Setyawati BA, Faradz SM, Cools M, Wolffenbutter KP, Lebl J, Drop SL, Looijenga LH. Tumor risk in disorders of sex development. *Sex Dev.* 2010 Sep;4(4-5):259-69.
97. **Pyle LC**, Nathanson KL. A practical guide for evaluating gonadal germ cell tumor predisposition in differences of sex development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2017 Jun;175(2):304-314.
98. **Quigley CA**, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995 Jun;16(3):271-321. Erratum in: *Endocr Rev* 1995 Aug;16(4):546.
99. **Rajender S**, Rajani V, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. SRY-negative 46,XX male with normal genitals, complete masculinization and infertility. *Mol Hum Reprod.* 2006 May;12(5):341-6.
100. **Ramos L**, Vilchis F, Chavez B, Mares L Mutational analysis of SRD5A2: From gene to functional kinetics in individuals with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020 Jun;200:105691.
101. **Richards S**, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015 17 405-424.
102. **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.
103. **Sanchez-Moreno I**, Coral-Vazquez R., Mendez J.P. and Canto P. Full-length SRY protein is essential for DNA binding. *Molecular Human Reproduction*, 2008, Vol.14, No.6 pp. 325-330
104. **Scarpa MG**, Grazia MD, Tornese G. 46,XY ovotesticular disorders of sex development: A therapeutic challenge. *Pediatr Rep.* 2017 Dec 11;9(4):7085.
105. **Schwartz CL**, Christiansen S, Vinggaard AM, Axelstad M, Hass U, Svingen T. Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. *Arch Toxicol.* 2019 Feb;93(2):253-272.
106. **Sinclair AH**, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990 Jul 19;346(6281):240-4.
107. **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.
108. **Stan A**, Dragomir C, Tudor D, Stefanescu TD, Severin E, Savu L Sex Chromosomes Mosaicism Detection by Quantitative Fluorescent PCR Based Technique Feb. 2012, Volume 9, No. 2 (Serial No. 87), pp. 101-106 *Journal of US-China Medical Science*, ISSN 1548-6648, USA
109. **Stoppa-Vaucher S**, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz JM, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL. 46, XY gonadal dysgenesis: new SRY point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet.* 2012; 82(6):505-513.
110. **Südbeck P**, Scherer G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27848-52.
111. **Tantawy S**, Lin L, Akkurt I, Borck G, Klingmuller D, Hauffa BP, Krude H, Biebermann H, Achermann JC & Kohler B. Testosterone production during puberty in two 46,XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations. *European Journal of Endocrinology* 2012 167 125-130.

112. **Thigpen** AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW. Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):799-809. doi: 10.1172/JCI115954. PMID: 1522235; PMCID: PMC329933.
113. **Umstad** MP, Short RV, Wilson M, Craig JM. Chimaeric twins: why monozygosity does not guarantee monozygosity. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2012 Jun;52(3):305-7.
114. **Ungewitter** EK, Yao HH. How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sex Dev.* 2013;7(1-3):7-20.
115. **Veltman** J and Brunner H. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2012, Jul 18,13(8):565-575.
116. **Viëtor** HE, Hamel BC, van Bree SP, van der Meer EM, Smeets DF, Otten BJ, Holl RA, Claas FH. Immunological tolerance in an HLA non-identical chimeric twin. *Hum Immunol.* 2000 Mar;61(3):190-2. Erratum in: *Hum Immunol* 2000 Jul;61(7):720.
117. **Wagner** KD, Wagner N, Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116:1653–1658.
118. **Walsh** PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med.* 1974;291(18):944–949.
119. **Wang** X, Xue M, Zhao M, He F, Li C, Li X. Identification of a novel mutation (Ala66Thr) of SRY gene causes XY pure gonadal dysgenesis by affecting DNA binding activity and nuclear import. *Gene.* 2018 Jan 25. pii: S0378-1119(18)30097-0
120. **Wang** Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, Ma F, Chen T, Li S, Shen Y. 2004. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet* 12:706–712
121. **Wilhelm** D, Yang JX, Thomas P. Mammalian sex determination and gonad development. *Curr Top Dev Biol.* 2013;106:89-121.
122. **Windley** SP, Wilhelm D. Signaling Pathways Involved in Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Sex Dev.* 2015;9(6):297-315.
123. **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.
124. **Wu** Q, Wang C, Shi H, Kong X, Ren S, Jiang M. The Clinical Manifestation and Genetic Evaluation in Patients with 45,X/46,XY Mosaicism. *Sex Dev.* 2017;11(2):64-69.
125. **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.
126. **Yatsenko** SA, Witchel SF. Genetic approach to ambiguous genitalia and disorders of sex development: What clinicians need to know. *Semin Perinatol.* 2017 Jun;41(4):232-243

ДРУГИ ИЗТОЧНИЦИ

[ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy v4 - Original guidelines ratified by the UK Clinical Molecular Genetics Society and Association of Clinical Cytogenetics (2007).]

Siegel M. J. and Coley B. D., *Pediatric Imaging*, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 373.

VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Christos Kopanos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, and Andreas Massouras. *Oxford Bioinformatics*, btY897, 30 October 2018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>

Genetic Steroid Disorders, 2014 Edited by: Maria I. New, Oksana Lekarev, ... Gary D. Hammer, <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68453-7>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Лабораторни протоколи

ПРОТОКОЛ
ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ГЕНОМНА ДНК
ОТ ПЕРИФЕРНА ВЕНОЗНА КРЪВ чрез ИЗСОЛВАНЕ

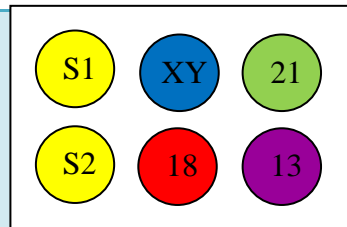
ЛИЗИРАНЕ	в 50 ml стерилна конична пластмасова епруветка се смесват: 3-10 ml венозна кръв, 40 ml студен еритроцит лизиращ буфер.	
ИНКУБИРАНЕ	на ледена баня (4°C) за 30 мин.	
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	15 мин. / 3 000 rpm / 4°C	
СУСПЕНДИРАНЕ	на утайката с 5,0 ml нуклеолизиращ буфер 400,0 µl 20% SDS (натриев додецилсулфат) 30,0 µl протеиназа К (10mg/ml)	
	ВОРТЕКСИРАНЕ	
ИНКУБИРАНЕ	12 часа (цяла нощ) / 37°C	
ВТОРИ ДЕН	2 ml 6M NaCl	ВОРТЕКСИРАНЕ
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	15 мин. / 3 000 rpm / стайна температура	
ОТДЕЛЯНЕ	на супернатантата в 50 ml надписана стерилна епруветка	
ДОБАВЯНЕ	на 2 обема ледено студен 96% етанол	
ПРЕЦИПИТИРАНЕ	на ДНК на кълбо, което изплува на повърхността	
ИЗВАЖДАНЕ	на преципитиралата ДНК със стерилна запоена пастъорка	
ПРОМИВАНЕ	в 70% етанол	
ИЗСЪХВАНЕ	20 мин / стайна температура	
РАЗТВАРЯНЕ	в 300 µl до 1 ml стерилен ТЕ буфер	
НАБЪБВАНЕ	24 часа / стайна температура / клатачка	
СЪХРАНЯВАНЕ	На 4°C (за последващ анализ) или на -20°C (при изчакване)	

ПРОТОКОЛ
ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ГЕНОМНА ДНК
С ТЪРГОВСКИ НАБОР NucleoSpin Tissue на фирма MACHEREY-NAGEL ®

ЛИЗИРАНЕ	в 1,5 ml стерилна епруветка се смесват: 200 µl тъкан / клетки, 180 µl T1 буфер; 30 µl протеиназа К (10mg/ml).		ВОРТЕКСИРАНЕ
ИНКУБИРАНЕ	на 56°C	60 мин.	ВОРТЕКСИРАНЕ
СУСПЕНДИРАНЕ	на утайката с 200 µl В3 буфер за лизиране.		ВОРТЕКСИРАНЕ
ИНКУБИРАНЕ	на 70°C 10 мин.		
СУСПЕНДИРАНЕ	210 µl	96% етанол	ВОРТЕКСИРАНЕ
ПРЕХВЪРЛЯНЕ	на материала в 1,5 ml събираща епруветка с монтирана NucleoSpin Tissue колонка за пречистване		
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	1 мин. / 11 000 x g / стайна темп		
ПРЕХВЪРЛЯНЕ	на колонката в нова 1,5 ml събираща епруветка		X2
ПРОМИВАНЕ	на утайката с 500 µl BW буфер		
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	1 мин. / 11 000 x g / стайна темп		
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	3 мин. / MAX x g / стайна темп (за изсушаване на мембраната)		
ПРЕХВЪРЛЯНЕ	на колонката в нова 1,5 ml надписана епруветка		
ЕЛУИРАНЕ	на ДНК с 100 µl ВЕ буфер (затоплен до 70°C)		
ИНКУБИРАНЕ	3 мин. / стайна темп		
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	1 мин. / 11 000 x g / стайна темп		
СЪХРАНЯВАНЕ	на 4°C (за последващ анализ) / на -20°C (при изчакване)		

ПРОТОКОЛ **ЗА РАБОТА С QF-PCR МЕТОДА**

РАЗРЕЖДАНЕ	Приготвят се ДНК проби с крайна концентрация 10 ng/ul		
СМЕСВАНЕ	<i>Компоненти на реакционната смес</i>	<i>Количество</i>	
	ДНК	2,0 µl	
	PCR микс	2,0 µl	
	Праймерен микс (S1, S2, XY)	8,0 µl	
	dH ₂ O	3,0 µl	
	Краен обем	15,0 µl	
НАМНОЖАВАНЕ	95°C – 15 мин.	95°C – 40 сек.	60°C – 30 мин.
		59°C – 90 сек.	
		72°C – 40 сек.	
		25 цикъла	
ПОДГОТОВКА	1,5 µl	Ампликон S1	или 1,5 µl Ампликон МХУ
	1,5 µl	Ампликон S2	
		0,3 µl	GeneScan™ LIZ 500 (-250)
		30,0 µl	Hi-Di Formamide
ДЕНАТУРАЦИЯ	5 мин. / 94°C → 10 мин. / 4°C		
ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА	Applied Biosystems Data Collection™ Software		
АНАЛИЗИРАНЕ	GeneMapper software		



Режим на размножаване на изследваните полиморфизми при работа с Aneufast™

Начална денатурация	10 цикъла			16 цикъла			Краен синтез
	Денатурация	Хибридизация	Синтез	Денатурация	Хибридизация	синтез	
94°C 5 мин	94°C 40 сек	60°C 40 сек	72°C 60 сек	94°C 40 сек	60°C 40 сек	72°C 60 сек	60°C 20 мин

ПРОТОКОЛ **ЗА РАБОТА С MLPA АНАЛИЗ**

ПОДГОТОВКА	Измерване на концентрацията и чистотата на пробите спрямо ТЕ буфер. Изчислява се разреждането до 100 ng / ul.		
РАЗРЕЖДАНЕ	2,0 µl 3,0 µl	ДНК ТЕ буфер	
ДЕНАТУРАЦИЯ	98°C - 10 мин.	→	25°C - 5 мин.
ХИБРИДИЗАЦИЯ	Към всяка денатурирана проба се добавя		
	1,5 µl	SALSA probe (black)	
	1,5 µl	Buffer (yellow)	
	95°C - 1 мин.		
	60°C - 60 часа	(пауза на 54°C за следващата реакция!)	
	На 54°C (без да се вадят от апарата) се добавя от лизагния микс		
ЛИГИРАНЕ			1x
	1	dH ₂ O	25.0 ul
	2	Лигазен Буфер А	3.0 ul
	3	Лигазен Буфер В	3.0 ul
	4	Лигаза	1.0 ul
		Total	32.0 ul
	54°C - 15 мин.		
	98°C - 5 мин на лед		
PCR НАМНОЖАВАНЕ			1x
	1	SALSA Primer	2.0 ul
	2	SALSA Enz Buffer	2.0 ul
	3	dH ₂ O	3.0 ul
	4	dH ₂ O	5.5 ul
	5	SALSA Polymerase	0.5 ul
		Total	10.0 ul
	96°C – 5 мин.	95°C – 30 сек.	72°C – 20 мин.
		60°C – 30 сек.	
		72°C – 1 мин.	
		33 цикъла	
ПОДГОТОВКА ЗА ABI3130	2,5 µl 12,0 µl 0,4 µl	MLPA проба HiDi Formamide ROX500 Size standard	
АНАЛИЗИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	COFALIZER		

ПРОТОКОЛ **ЗА СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER**

НАМНОЖАВАНЕ	Амплификация на прицелия район 2% агарозен гел – оценка на PCR За секвениране: чисти продукти, без неспецифика																
ПРЕЧИСТВАНЕ	1,5 µl 1,5 µl	PCR продукт ExoSAP + ddH ₂ O (1:1)															
ИНКУБИРАНЕ	37°C - 30 мин.	→	80°C - 15 мин.														
СЕКВЕНИРАНЕ	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Компоненти на реакционната смес</th> <th style="text-align: left;">Количество</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Матрица (пречистен PCR продукт)</td> <td>2,0 µl</td> </tr> <tr> <td>5x Sequencing buffer</td> <td>2,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Big Dye v 3.1. 500 bp (200bp - 700bp)</td> <td>1,3 µl (1,0 µl - 1,5 µl)</td> </tr> <tr> <td>Праймер (F или R) - 5 pM</td> <td>1,0 µl</td> </tr> <tr> <td>dH₂O</td> <td>3,7 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">Краен обем</td> <td>10 µl</td> </tr> </tbody> </table>			Компоненти на реакционната смес	Количество	Матрица (пречистен PCR продукт)	2,0 µl	5x Sequencing buffer	2,0 µl	Big Dye v 3.1. 500 bp (200bp - 700bp)	1,3 µl (1,0 µl - 1,5 µl)	Праймер (F или R) - 5 pM	1,0 µl	dH ₂ O	3,7 µl	Краен обем	10 µl
Компоненти на реакционната смес	Количество																
Матрица (пречистен PCR продукт)	2,0 µl																
5x Sequencing buffer	2,0 µl																
Big Dye v 3.1. 500 bp (200bp - 700bp)	1,3 µl (1,0 µl - 1,5 µl)																
Праймер (F или R) - 5 pM	1,0 µl																
dH ₂ O	3,7 µl																
Краен обем	10 µl																
НАМНОЖАВАНЕ	96°C – 5 мин.	96°C – 20" 55°C – 20" 60°C – 2 мин. 30 цикъла	60°C – 5 мин.														
ПРЕУТАЯВАНЕ	10,0 µl 1,0 µl 80,0 µl	Секвенционна проба 125 mM EDTA 95% етanol.															
ВОРТЕКСИРАНЕ																	
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	20 мин. / 3 500 грт /стайна температура																
ОТДЕЛЯНЕ	на супернатантата																
ПРЕУТАЯВАНЕ	Секвенционна утайка 200 µl 70% етanol																
ВОРТЕКСИРАНЕ																	
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	15 мин. / 3 500 грт / стайна температура																
ОТДЕЛЯНЕ	на супернатантата																
ИЗСУШАВАНЕ	Пробите се сушат на тъмно на стайна температура																
РАЗТВАРЯНЕ	Утайката се разтваря в 14 µl Hi-Di Formamide																
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	1 мин / 14 000 грт /стайна температура (да се събере пробата на дъното)																
ПРЕХВЪРЛЯНЕ	на пробите в 96-ямкова плака																
ЦЕНТРОФУГИРАНЕ	1 мин / 14 000 грт /стайна температура (да се събере пробата на дъното)																

7 Хибридиране

1	Пробата (19.5ul) и съответната контрола(19.5ul) се смесват в една епруветка
2	Към всеки микс проба+контрола (39.0 ul) се добавят
	5 ul Human-Cot1_DNA
	11 ul 10x Blocking Agent
	55 ul Hybridization Buffer ОБЩО = 110 ul
3	Денатуриране: 3 мин / 95 °C -> Хибридиране: 30 мин / 37 °C
5	Подготвят се Gasket-Slide
6	Стъклото се поставя в Gasket-Slide с гумираните ограничители нагоре – ВАЖНО!!!! чете се надписът Agilent
7	Цялото количество проба се нанася като една капка в средата на стъклото. Внимава се да не се получи мехурче – следва да се отстрани, ако има такова!
8	Аналогично се накапват и останалите 3 проби
9	Array-Slide стъклото се поставя внимателно върху долното стъкло, като задължително надписът спазват правилото " Agilent към Agilent "
10	Сглобява се цялата комбинация Gasket-Slide, като се стяга максимално. Не бива да има мехурчета, които не се движат, най-добре е да има 1общ мехур.
11	Гasketите се слагат в предварително затоплена хибридационна камера – ХИБРИДИЗАЦИЯ за 24 часа / 65 °C

8 Записване на слайдовете

Баркод 1_1 1_2 1_3 1_4

9 Промиване на Array-Slides

1	Приготвят се: 2 бр вани с WB1 (1 с държач за стъкла, върху магнитна бъркалка+магнитче) 1 бр вана за WB2 + WB2 (темперирани на 37 градуса), 1 бр вана с Ацетонитил + магнитче
2	Отварят се Gasket-Slide комплектите, стъклата се вадят и се потапят в WB1 (1)
3	Под буфера внимателно с пинсета с отваря сандвича и се оставя стъклото с ограничителната гума да падне на дъното.
4	Array-slide се държи само по ръба на стъклото и се поставя внимателно в стъклените държачи във ваната с WB1 (2)+магнитче върху магнитна бъркалка.
5	Стъклото се подрежда във ваната с WB1 (2) и се включва бъркалката
6	5 мин / r.t. / 400 rpm
7	Докато тече времето, се приготвят темпериранията вана и топлият WB2
8	Стъкленият държач внимателно и бавно се мести във ваната с топъл WB2 + магнитче върху втората бъркалка
9	1 мин / 37 градуса / 400 rpm
10	Стъкленият държач се мести внимателно във ваната с Ацетонитрил
11	Стои 15 сек и много бвно и внимателно се изважда целият стъклен държач със слайдовете. Не бива да остават никакви мехурчета, пращинки, изсъхнали капки.
12	Слайдовете се поставят в черните кутии на скенера и се пускат за сканиране.

10 Сканиране и софтуерен анализ с платформата CytoSure

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Основни характеристики на изследваните гени

AR

Основни характеристики (по Ensemble)

AR (OMIM *313700)

Описание Андрогенен рецептор (Androgen Receptor)
Ген ENSG00000169083 **Транскрипт:** AR-001 ENST00000374690.7
Синоними AIS, DHTR, SMAX1, NR3C4, TFM, HYSYP1, AR8, KD, HUMARA, SBMA
Локализация Xq12

Хромозома X: 67,544,623-67,730,619 - върху правата верига (forward strand).

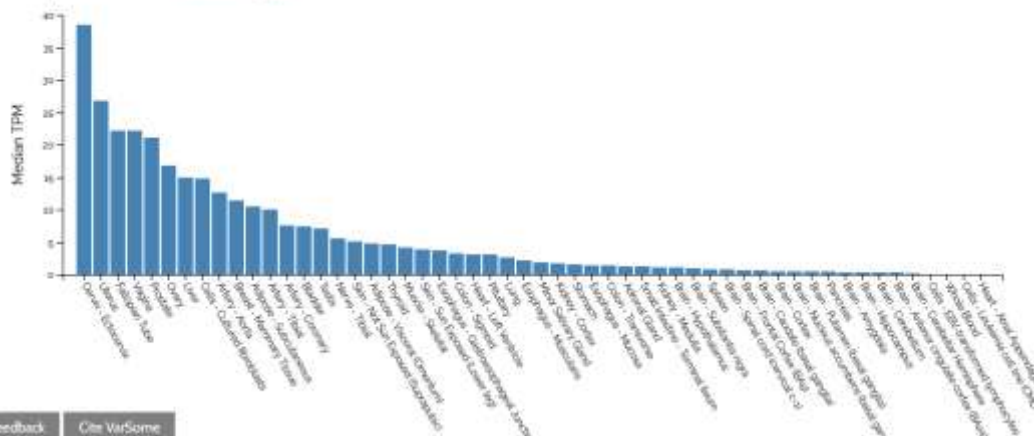
Информация за транскрипта:
Екзони общо: 8 **Дължина на транскрипта:** 10 065 н.дв.,
Кодиращи екзони: 8 **Дължина на протеина:** 920 АК

Основни характеристики на откритите варианти (по VARSOME)

Coding impact	Pathogenic	Likely Pathogenic	Uncertain Significance	Likely Benign	Benign	Total
Synonymous	1	0	4	4	4	13
Missense	299	29	41	3	22	394
Nonsense	27	0	0	0	0	27
Stoploss	1	0	0	0	0	1
Frameshift	33	0	1	0	0	34
Inframe Indel	6	1	7	15	15	44
Splice junction loss	3	1	0	0	0	4
Non-coding	2	0	1	0	0	3
Total	372	31	54	22	41	520
Total	71.5%	5.9%	10.4%	4.2%	7.9%	520

Експресия на AR в различните тъкани (по VARSOME)

Gene expression for AR (View this content on the VARSOME website)



Feedback | Cite Varsome

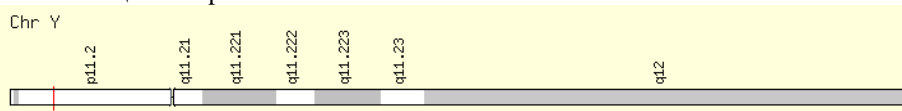
SRY

Основни характеристики (по Ensemble)

SRY (OMIM *480000)

Описание Район от Y-хромозомата, определящ пола (sex determining region Y)
Ген ENSG00000184895 **Транскрипт:** SRY-001 ENST00000383070.1
Синоними SRXY1, TDF, TDY, SRXX1

Локализация: Yp11.2



Хромозома Y: 2,786,855-2,787,699 - върху обратна верига (reverse strand).



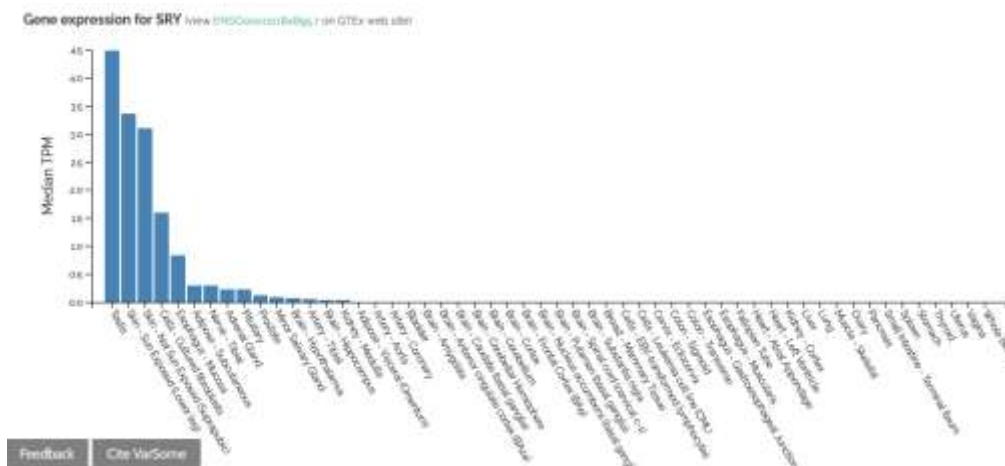
Информация за транскрипта:

Екзони общо: 1, **Дължина на транскрипта:** 845 н.дв.
Кодиращи екзони: 1, **Дължина на протеина:** 204 АК

Основни характеристики на откритите варианти (по VARSOME)

Coding impact	Pathogenic	Likely Pathogenic	Uncertain Significance	Likely Benign	Benign	Total
Synonymous	0	0	0	2	1	3
Missense	50	4	4	0	0	58
Nonsense	10	1	0	0	0	11
Frameshift	5	0	1	0	0	6
Total	65	5	5	2	1	78
Total	83.3%	6.4%	6.4%	2.6%	1.3%	78

Експресия в различните тъкани (по VARSOME)



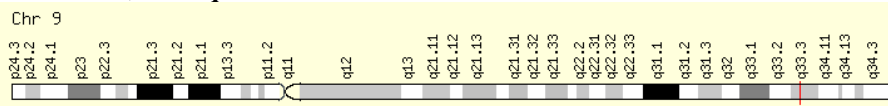
NR5A1

Основни характеристики (по Ensemble)

NR5A1 (SF-1) (OMIM +184757)

Описание nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
Ген ENSG00000136931 **Транскрипт:** NR5A1-001 ENST00000373588.8
Синоними POF7, SF1, SPGF8, SF-1, FTZ1, hSF-1, ELP, SRXY3, FTZF1, AD4BP

Локализация 9q33.3



Хромозома 9: 124,481,237-124,507,430 - върху обратна верига (reverse strand).



Информация за транскрипта:

Екзони общо: 7,

Кодиращи екзони: 6,

Дължина на транскрипта: 3,104 н.дв.,

Дължина на протеина: 461 АК

Основни характеристики на откритите варианти (по VARSOME)

Coding impact	Pathogenic	Likely Pathogenic	Uncertain Significance	Likely Benign	Benign	Total
Synonymous	0	1	1	13	7	22
Missense	53	14	22	0	2	91
Nonsense	5	1	2	0	0	8
Start loss	2	0	0	0	0	2
Frameshift	10	3	0	0	0	13
Inframe Indel	3	2	1	0	0	6
Splice junction loss	0	0	1	0	0	1
Non-coding	0	0	1	1	0	2
Total	73	21	28	14	9	145
Total	50.3%	14.5%	19.3%	9.7%	6.2%	145

Експресия в различните тъкани (по VARSOME)

Gene expression for NR5A1 (www.ensembl.org) on GTEx web site



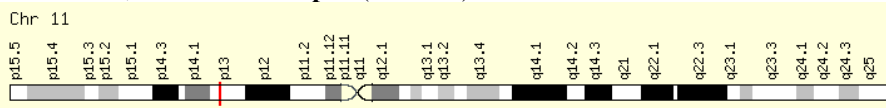
WT1

Основни характеристики (по Ensemble)

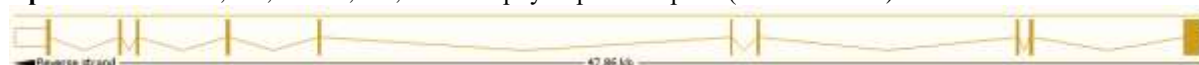
WT1 (OMIM *607102)

Описание Тумор на Уилмс 1 (Wilms tumor 1)
Ген ENSG00000184937 **Транскрипт:** WT1-001 ENST00000332351.7
Синоними NPHS4, GUD, EWS-WT1, WT33, WAGR, WIT-2, AWT1

Локализация 11p13 (Ensembl)



Хромозома 11: 32,387,775-32,435,630 - върху обратна верига (reverse strand).



Информация за транскрипта:

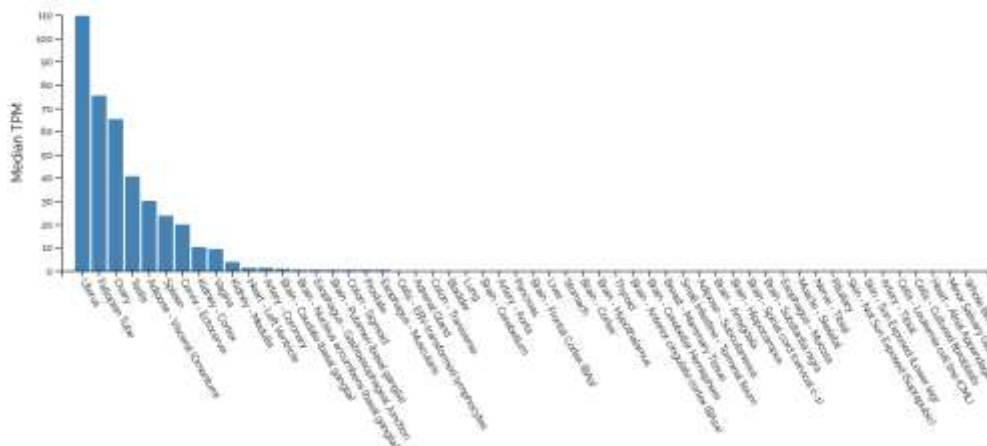
Екзони общо: 10,
Кодиращи екзони: 10,

Дължина на транскрипта: 3 122 н.дв.,
Дължина на протеина: 517 АК

Основни характеристики на откритите варианти (по VARSOME)

Coding impact	Pathogenic	Likely Pathogenic	Uncertain Significance	Likely Benign	Benign	Total
Synonymous	2	0	27	101	11	141
Missense	22	21	195	3	1	342
Nonsense	10	7	3	0	0	20
Frameshift	10	20	1	0	0	31
Inframe Indel	1	0	5	0	0	6
Splice junction loss	0	4	0	0	0	4
Non-coding	6	2	12	18	2	40
Total	51	54	343	122	14	584
Total	8.7%	9.2%	58.7%	20.9%	2.4%	584

Експресия в различните тъкани (по VARSOME)



- 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