

## ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ VAL89LEU ГЕНА SRD5 $\alpha$ 2 ТА ГЕНА SRY У ПАЦІЄНТІВ З ПОРУШЕННЯМ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТАТІ

Аномалії статевої диференціації – це збірна група патології, яка включає генетично зумовлені порушення детермінації статі на різних рівнях. Відомо, що при порушеннях статевої диференціації можуть бути різноманітні варіанти інтерсексуальної будови зовнішніх геніталій та явища інфантилізму внутрішніх статевих органів, що затруднює правильне визначення статі і вимагає комплексного обстеження [1].

Генетичні фактори визначають статеву диференціацію ембріона і плода [2, 3]. Ключова роль у розвитку яєчок належить чоловічій статевій Y-хромосомі, а точніше, фактору, який відповідає за диференціацію яєчок (тестикул). Фактор диференціації тестикул кодується геном *SRY* (*Sex Determining Region of Y Chromosome*). Ген *SRY* розташований на короткому плечі Y-хромосоми (*Yq11*) і є відповідальним за диференціацію біпотенційних (індиферентних) гонад у процесі ембріогенезу. Мутації в гені *SRY* супроводжуються широким діапазоном клінічних та фенотипових проявів – від повної реверсії статі до недорозвинутих чоловічих гонад [4–6].

5-альфа-редуктаза – фермент людини, що бере участь у стероїдогенезі. Цей фермент перетворює чоловічий статевий гормон тестостерон в андроген дигідротестостерон, а також бере участь в утворенні нейростероїдів. У результаті мутацій гена 5 $\alpha$ -редуктази (SRD5 $\alpha$ 2) організм не може ефективно конвертувати тестостерон у дигідротестостерон у репродуктивних тканинах. Дефіцит 5 $\alpha$ -редуктази порушує формування зовнішніх статевих органів до народження. Особи з дефіцитом 5-альфа-редуктази генетично чоловіки (каріотип 46, XY), але при народженні зовнішні статеві органи не є чітко чоловічі чи жіночі (неоднозначні геніталії) [7, 8]. При статево-му дозріванні мутації гена SRD5 $\alpha$ 2 викликають псевдовагінальну перінеоскротальну гіпоспадію, при якій у осіб, які мають жіночі первинні статеві ознаки, починається мутація голосу, оволошення проявляється за чоловічим типом, а клітор сильно збільшується.

Ген SRD5 $\alpha$ 2 знаходиться на другій хромосомі (2p22-23), складається з 254 амінокислот та містить п'ять екзонів [9]. Зниження активності фермента асоціюється з поліморфізмом Val89Leu (rs523349) гена SRD5 $\alpha$ 2. Генотип Leu/Leu відповідає значному зниженню фермента 5-альфа-редуктази та імовірно може впливати на формування неоднозначних зовнішніх статевих органів [10–14].

Тому метою нашої роботи є проведення молекулярно-генетичного дослідження гена *SRY*, мікроделецій AZF регіону Y-хромосоми та встановлення частоти алелів поліморфного локусу Val89Leu гена 5-альфа-редуктази у новонароджених дітей з порушенням диференціації статі.

### Матеріали і методи

Досліджувану групу склали 20 новонароджених дітей з порушенням диференціації статі. Всі особи досліджуваної групи проходили обстеження в ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолування [15]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції [16]. Специфічність ПЛР-продуктів визначали послідовністю специфічних праймерів, температурою відпалу та складом реакційного буфера. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, РФ).

Наявність гена *SRY* та мікроделеції AZF регіону Y-хромосоми визначали за допомогою двох мультилокусних ПЛР, у кожній з яких ампліфікували фрагменти трьох AZF (AZFa, AZFb та AZFc) регіонів, ген *SRY*. Досліджували мікроделеції Y-хромосоми AZF регіону в таких STS локусах: sY14, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 [17].

Для ідентифікації поліморфного варіанту Val89Leu гена SRD5 $\alpha$ 2 застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних

послідовностей [18]. У роботі використовували ендонуклеазу рестрикції *Rsa I* виробництва фірми «Fermentas» (Вільнюс). Інкубацію рестрикційної суміші проводили при температурі 37 °С у термостаті фірми «БІОКОМ» (РФ).

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2% агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15.M» (VILBER LOURMAT, ФР). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, РФ). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

### Результати та обговорення

У дітей з порушенням диференціації статі спостерігалися такі клінічні прояви: порушення диференціації статі, аномалії сечостатевої системи, вроджені вади статевих органів, крипторхізм, гіпоплазія яєчок, гіпоспадія, відсутність яєчок, інтерсексуальний тип будови статевих органів, гермафродитизм.

Зважаючи на те, що ген *SRY* відіграє роль у диференціації статі, у дітей досліджуваної групи проведено молекулярно-генетичне дослідження гена *SRY*. З метою з'ясування генетичних порушень Y-хромосоми в даній вибірці проведено молекулярно-генетичний аналіз мікрodelецій AZF регіону Y-хромосоми.

Для цього дослідження проводили дві мультилокусні реакції для трьох AZF регіонів та гена *SRY*. Мультилокусна реакція А дозволяє аналізувати такі локуси: *SRY* (472 п.н.), *sY254* (400 п.н.), *sY86* (320 п.н.), *sY127* (274 п.н.). Мультилокусна реакція В дозволяє аналізувати локуси *SRY* (472 п.н.), *sY84* (326 п.н.), *sY134* (301 п.н.), *sY255* (126 п.н.). Відсутність на електрофореграмі певних фрагментів свідчила про наявність мікрodelецій у відповідних локусах. У цій роботі детекція гена *SRY* служила для визначення наявності Y-хромосоми.

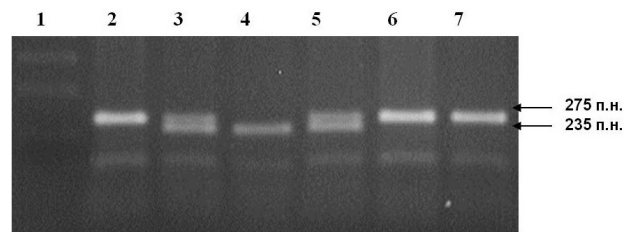
У результаті проведення молекулярно-генетичного дослідження гена *SRY* та мікрodelецій Y-хромосоми у 20 осіб з порушенням диференціації статі встановлено, що усі особи досліджуваної групи мають наявну Y-хромосому. Результати молекулярно-генетичних досліджень трьох AZFa, AZFb та AZFc регіонів показали, що в цій

досліджуваній групі мікрodelецій у відповідних локусах не виявлено.

Отже, чоловічу стать встановлено у 20 новонароджених дітей з порушенням диференціації та відсутністю генетичних порушень в AZF регіоні Y-хромосоми.

Встановлено, що усі особи досліджуваної групи генетично чоловіки, але зовнішні статеві органи не є чітко чоловічі чи жіночі. Тому актуальним видавалося дослідження поліморфного локусу Val89Leu гена *SRD5a2*, який пов'язаний зі зниженням активності фермента 5-альфа-редуктази, у новонароджених дітей з порушенням диференціації статі.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів Val89Leu (*RsaI*) гена *SRD5a2* (номер поліморфізму в базі даних NCBI – rs523349). Досліджувані варіанти гена: Val89Leu (заміна амінокислоти валіну на амінокислоту лейцин у положенні 89). У результаті ПЛП реакції синтезуються Val89Leu генотипи: ValVal(GG)-генотип 275 п.н., ValLeu(GC)-генотип 275 п.н., 235 п.н. та 40 п.н., LeuLeu(CC)-генотип 235 п.н. та 40 п.н. відповідно (рис.).



**Рис.** Електрофореграма рестрикційного аналізу продуктів ПЛП поліморфізму Val89Leu (*RsaI*) гена *SRD5a2* (2% агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги; 2, 6, 7 – Wild-type GG-генотип (275 п.н.); 3, 5 – GC-генотип (275 п.н., 235 п.н., 40 п.н.); 4 – CC-генотип (235 п.н., 40 п.н.)

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу ДНК у 20 осіб дослідної групи встановлено генотип щодо поліморфного локусу Val89Leu (*RsaI*) гена *SRD5a2*. Однонуклеотидний поліморфізм зумовлений заміною амінокислоти валіну на амінокислоту лейцин у положенні 89, який зумовлює зміну сайту рестрикції для рестриктази *RsaI*. Можливі генотипи були: ValVal, ValLeu, LeuLeu для *RsaI*, де Val позначає відсутність, а Leu присутність сайту рестрикції. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу Val89Leu (*RsaI*) гена *SRD5a2* у досліджуваній групі дітей з порушенням диференціації статі наведено у табл.

**Частоти генотипів та алелів локусу Val89Leu гена SRD5α2 у дослідній групі дітей з порушенням диференціації статі**

Генотипи/алелі SRD5α2 Val89Leu (RsaI)	Частоти алелів та генотипів, %			
	n	фактична частота	теоретично очікувана частота (HWE)	p
ValVal (GG)	1	5	9	0,3943
ValLeu (GC)	10	50	42	
LeuLeu (CC)	9	45	49	
Val (G)	12	30	–	
Leu (C)	28	70	–	

Примітки: n – кількість спостережень, HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) – рівновага Харді-Вайнберга.

Встановлений розподіл генотипів за поліморфним варіантом Val89Leu (RsaI) гена SRD5α2 в дослідній групі вірогідно не відрізняється від теоретично очікуваного щодо рівноваги Харді-Вайнберга (табл.).

Як свідчать результати, наведені в табл., серед осіб досліджуваної групи в однієї особи з крипторхізмом встановлено генотип ValVal (GG), що асоціюється з нормальною активністю фермента 5-альфа-редуктази, у 45% виявлено гомозиготний генотип LeuLeu (CC), який асоціюється з дефіцитом 5-альфа-редуктази. У половини осіб досліджуваної групи виявлено гетерозиготний генотип ValLeu (GC) поліморфного локусу Val89Leu гена SRD5α2.

Дефіцит 5α-редуктази порушує формування зовнішніх статевих органів до народження. Тому результати дослідження поліморфного локусу Val89Leu гена 5-альфа-редуктази-2 у новонароджених дітей з порушенням диференціації статі можуть вказувати на те, що гомозиготний генотип LeuLeu (CC) поліморфного локусу Val89Leu може бути одним з імовірних генетичних чинників порушення диференціації статі.

Як вказують дані досліджень Nanis S. Marzuki та співавт. (2013), гомозиготний генотип LeuLeu у поєднанні з мутаціями поліморфного локусу Arg227Gln гена SRD5α2 є найбільш частим у осіб з порушенням диференціації статі [10]. Отже, дослідження осіб з порушенням диференціації статі є актуальними і потребують подальшого вивчення.

**Висновки**

Проведено молекулярно-генетичний аналіз гена SRY та мікроделецій AZF регіону Y-хромосоми у новонароджених дітей з порушенням диференціації статі. Чоловічу стать встановлено у 20 новонароджених дітей з порушенням диференціації та відсутністю генетичних порушень в AZF регіоні Y-хромосоми.

Встановлено розподіл генотипів та алелів поліморфного варіанту Val89Leu гена SRD5α2 серед дітей з порушенням диференціації статі.

Гомозиготний генотип LeuLeu поліморфного локусу Val89Leu гена SRD5α2 може бути одним з імовірних генетичних чинників порушення диференціації статі.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Фоменко Н.М., Синовєрська О.Б. Статевий диморфізм у дітей та підлітків. Диференційна діагностика. Сучасні підходи до лікування та соціальної реадaptaції хворих. Методичні рекомендації. – Івано-Франківськ, 2015. – 44 с.
2. Мошчак П.С. Медицина дитинства. – К.: Здоров'я, 1994. – С. 349–355.
3. Наследственная патология человека. Руководство в 2-х т. / Под ред. Ю.Е. Вельтищева, Н.П. Бочкова. – М.: Медицина, 1991. – 480 с.
4. Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2006. – 477 с.
5. Волосовець О.П., Кривопустов С.П., Криворук І.М., Черній О.Ф. Навчальний посібник з дитячої ендокринології. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 496 с.
6. Потемкин В.В. Эндокринология. – М.: Медицина, 1987. – С. 207–411.
7. Labrie F., Sagimoto Y., Luu-The V., Simard J., Lachance Y., Bachvarov D., Leblanc G., Durocher F., Paquet N. Structure of human type II 5α-reductase gene // Endocrinology. – 1992. – 131, № 3. – P. 1571–1573.
8. Jaffe J., Malkowicz B., Walker A., MacBride S., Peschel R., Tomaszewski J., Arsdalen K., Wein A., Rebbeck T. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors // Cancer Res. – 2000. – 60, № 6. – P. 1626–1630.
9. Wisniewski A.B. Gender Development in 46,XY DSD: Influences of Chromosomes, Hormones, and Interactions with Parents and Healthcare Professionals // Scientifica. – 2012. – 15 p.

10. Marzuki N., Suciati L., Idris F., Tridjaja B. Clinical presentations and molecular characterization of Indonesian children with 5 alpha-reductase deficiency Journal List Int J Pediatr Endocrinol. – 2013. – Suppl 1.– P. 292–299.
11. Sahu R., Boddula R., Sharma P., Bhatia V., Greaves R., Rao S., Desai M., Wakhlu A., Phadke S., Shukla M., Dabadghao P., Mehrotra R., Bhatia E. Genetic analysis of the SRD5A2 gene in Indian patients with 5alpha-reductase deficiency // J Pediatr Endocrinol Metab. – 2009. – 22, № 3. – P. 247–254.
12. Kalfa N., Philibert P., Baskin L., Sultan C. Hypospadias: interactions between environment and Genetics // Molecular and Cellular Endocrinology, Elsevier. – 2011. – 335, № 2. – 89 p.
13. Akcay T., Fernandez-Cancio M., Turan S., Guran T., Audi L., Bereke 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. – 2, № 4. – P. 572–578.
14. Wang R., Dong Z., Wang W., Xiao Y., Ni J., Wang D. Mutation analysis of the SRD5A2, AR and SF-1 genes in 52 Chinese boys with hypospadias // J Pediatr Endocrinol Metab. – 2013. – 26, № 9–10. – P. 887–893.
15. Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Чорна Л.Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заяв. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. № 8.
16. Person M., Quirke P., Taylor G. PCR a Practical Approach. Oxford University press. – New York: Oxford University press, 1993. – 253. – 22 p.
17. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions // International Journal of Andrology. – 2004. – 27. – P. 240–249.
18. Izmirli M., Arıkan B., Bayazit Y., Alptekin D. Polymorphisms of HPC2/ELAC2 and SRD5A2 (5 $\alpha$ -Reductase Type II) Genes in Prostate Cancer // Balkan J Med Genet. – 2011. – 14, № 1. – P. 31–36.

#### **TYRKUS M., MAKUKH H., TENETA M., SHUVARSKA V., ZASTAVNA D.**

*Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences,  
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua*

#### **GENETIC ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF VAL89LEU OF SRD5 $\alpha$ 2 AND SRY GENES IN PATIENTS WITH DISORDERS OF SEX DIFFERENTIATION**

**Aim.** 5 $\alpha$ -reductase is an enzyme that converts testosterone to 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) in peripheral tissues. Deficiency of the enzyme 5 $\alpha$ -reductase causes a disturbance of the formation of the external genitalia before birth. The polymorphism Val89Leu of SRD5 $\alpha$ 2 gene is associated with decreased activity of the enzyme 5-alpha-reductase-2. **Methods.** DNA from probands blood samples was isolated using a modified salting out method. Microdeletions of Y-chromosome AZF region and SRY gene were analyzed using two multiplex PCR. The PCR products were digested with the restriction enzyme Rsa I and analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel. **Results.** In 20 newborn children with violation of sex differentiation was set male and found no genetic disorders in region of AZF Y-chromosome. Among men in the our study group homozygous genotype LeuLeu (CC) polymorphic loci Val89Leu of SRD5 $\alpha$ 2 gene was found in 45%, which is associated with a deficiency of 5-alpha-reductase. **Conclusions.** The results of the study polymorphic loci Val89Leu of 5-alpha-reductase-2 gene in patients with violation of sex differentiation showed that homozygous genotype LeuLeu (CC) polymorphic loci Val89Leu be a probable genetic differentiation factors violation sex.

**Keywords:** Y-chromosome, polymorphism, sex determination, SRD5 $\alpha$ 2 gene.