

Особенности спектра мутаций при наследственной тирозинемии I типа в различных популяциях Российской Федерации

Байдакова Г.В.¹, Иванова Т.А.¹, Раджабова Г.М.¹, Сайдаева Д.Х.²,
Джудинова Л.Л.², Ахлакова А.И.³, Гамзатова А.И.³, Меликян Л.П.¹,
Бычков И.О.¹, Михайлова С.В.⁴, Захарова Е.Ю.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический центр», г. Москва

² Перинатальный центр, ГБУ Родильный дом, г. Грозный, Чеченская Республика

³ Республиканский медико-генетический центр, Махачкала Дагестан

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская Детская Клиническая Больница», МЗ РФ, г.Москва, labnbo@yandex.ru

Наследственная тирозинемия (НТ1) или тирозинемия типа 1 — наследственное аутосомно-рецессивное нарушение катаболизма тирозина, вызванное нарушением активности фуарилацетоацетат гидролазы и связанное с мутациями в гене *FAH*. Частота НТ1 оценивается как 1:100 000 — 120 000 живых новорожденных. В некоторых регионах мира зарегистрирована более высокая частота заболевания: в Норвегии, Финляндии и Тунисе частота НТ1 составляет 1:74000, 1:60000 и 1:16000 соответственно. Частота НТ1 в Российской Федерации и отдельных ее регионах неизвестна. Для изучения спектра мутаций, приводящих к НТ1, их частот в Российской Федерации, исследован ряд этносов, принадлежащих к различным лингвистико-географическим регионам. Из 15 мутаций, ассоциированных с НТ1, встречающихся с различной частотой, наибольшую долю (33,3% от всех мутантных аллелей НТ1) составляет специфичная для чеченского этноса мутация с.1025C>T (Pro342Leu). В 296 обследованных образцах крови новорожденных г.Грозного (Чеченская Республика) гетерозиготное носительство выявлено с частотой 0,0236 (частота аллеля — 0,0118), что обуславливает расчётную частоту НТ1 — 1:7152. Такая частота является одной из самых высоких в мире. Среди 201 обследованного образца крови новорожденных из г. Махачкала (Республика Дагестан) данной мутации не обнаружено. У пациентов якутского, бурятского и ненецкого происхождения выявлена в гомозиготном состоянии не описанная ранее мутация с.1090G>C (Glu364Gln). Обнаружение этноспецифичных мутаций по НТ1 в различных популяциях РФ, вероятно, обусловлено эффектом основателя.

Ключевые слова: тирозинемия тип 1, недостаточность фуарилацетоацетат гидролазы, мутация, аллель, этнос.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Peculiarities of the spectrum of mutations in hereditary tyrosinemia type I in various populations of the Russian Federation

Baydakova G.V.¹, Ivanova T.A.¹, Radzhabova G.M.¹, Saydaeva D.Kh.²,
Dzhudinova L.L.², Akhlakova A.I.³, Gamzatova A.I.³, Melikyan L.P.¹,
Bychkov I.O.¹, Mikhaylova S.V.⁴, Zakharova E.Yu.¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

² State Budget Institution Maternity Hospital, Grozny, Chechen Republic

³ National Center of Medical Genetics, Makhachkala, Dagestan

⁴ Federal State Budgetary Institution The Russian Children's Clinical Hospital, Ministry of health, Moscow, Russian Federation, labnbo@yandex.ru

Tyrosinemia type I (TH1) is an inborn autosomal recessive disorder of tyrosine catabolism caused by defective strength of fumarylacetoacetate hydrolase and mutations in *FAH* gene. The frequency of TH1 is approximately one in 100,000 to 120,000 live births worldwide. Several regions of the world have a higher expected frequency of TH1 due to an increased frequency of certain pathogenic variants resulting from the founder effect. In Norway, Finland and province of Quebec (Canada) the birth incidence is estimated as 1:74,000, 1:60,000 and 1:16,000 for live births, respectively. The frequency of TH1 in whole Russia and in its regions is not known. To study the frequency and spectrum of mutations of TH1 in the Russian Federation, a number of ethnic groups belonging to different linguistic and geographical regions were explored. The mutation c.1025 C>T (Pro342Leu) which consist (33.3% of all the mutant TH1 alleles) and is specific to the Chechen ethnic group. Among 296 newborn DBS from Chechen Republic, heterozygous carriers were found at a frequency of 0.0236 (the frequency of the mutant allele is 0.0118), which causes the calculated incidence rate TH1 at 1:7152, one of the most frequent rates worldwide. No single case of mutation of the pool leading to this disease was found among 201 newborn DBS from Dagestan. A previously undocumented mutation c.1090 G>C (Glu364Gln) was found in three Yakut, Buryat and Nenets patients in homozygous state. Detection of the ethno-specific mutations associated with TH1 in different populations of the Russian Federation is probably due to the founder effect.

Key words: tyrosinemia type 1, fumarylacetoacetate hydrolase deficiency, mutation, allele, ethnicity

Введение

Тирозинемия типа 1, гепаторенальная тирозинемия (НТ1) наследственное заболевание, связанное с дефицитом фумарилацетоацетат гидролазы (FAH) — фермента, катализирующего последний этап метаболизма тирозина. Недостаточность фермента, возникающая вследствие мутаций в гене *FAH*, приводит к накоплению метаболитов тирозина (сукцинилацетона и фумарилацетоацетата), которые оказывают токсическое воздействие на гепатоциты и клетки проксимальных почечных канальцев, что приводит к поражению печени и нарушению процессов канальцевой реабсорбции фосфатов [1, 2].

Ген *FAH* картирован на хромосоме 15 (локус 15q23-q25). На сегодняшний день описано более 70 мутаций, которые преимущественно представлены миссенс-заменами [3].

На основании клинических проявлений выделяют две формы заболевания: острую и хроническую, которые различаются по возрасту дебюта и скорости прогрессирования. У всех пациентов наблюдается задержка физического развития, поражение печени вплоть до печеночной недостаточности, рахит. При острой форме НТ1 ведущими в клинической картине является поражение печени, которое развивается стремительно на первых месяцах жизни. При отсутствии специфического лечения большинство пациентов с острой формой заболевания погибают на первом году жизни, а у пациентов с хронической формой формируется печеночная недостаточность или опухоли печени [4].

Для лечения НТ1 успешно применяется нитизинон Nitisinone (Orfadin®) NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione), ингибирующий первый этап распада тирозина, поэтому раннее выявление данного заболевания играет решающую роль в успешном лечении [5, 6]. В некоторых странах проводится массовый скрининг на НТ1, который базируется на определении сукцинилацетона в крови [7].

Целью данного исследования был анализ частоты и спектра мутаций при НТ1 в Российской Федерации.

Материалы и методы

С 2004 по 2016 год методами биохимической и/или ДНК-диагностики диагноз НТ1 был установлен у 30 пациентов. Диагноз был подтвержден всем пациентам на основании выявления специфических для НТ1 биомаркеров — повышения концентрации сукцинилацетона в крови и/или моче, тирозина в крови.

По своему этническому составу выборка разделилась следующим образом: 15 — русские, 10 — чеченцы, 2 — армяне, 1 — якут, 1 — бурят, 1 — ненец.

Анализ аминокислот, ацилкарнитинов и сукцинилацетона проводился с использованием набора «NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit» (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac OY,

Finland) на квадрупольном tandem масс-спектрометре PE Sciex API 2000 (PE Sciex, Онтарио, Канада) с положительной ионизацией в электроспрее. Значения концентраций аминокислот, ацилкарнитинов и сукцинилацетона рассчитывались автоматически с применением внутренних стандартов с помощью программы NeoGram (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac OY, Finland).

Для оценки частоты мутаций исследовано 296 образцов ДНК, выделенных из высушенных пятен крови новорожденных детей из Чеченской Республики и 201 образец ДНК новорожденных из Дагестана. Образцы крови (без идентификации) были предоставлены центрами неонатального скрининга г.Грозный и г.Махачкала. Сбор материала осуществлялся в период с января по сентябрь 2010 г.

Выделение ДНК осуществлялось по протоколу производителя набором для выделения ДНК Diatom-DNA-Prep.

Анализ кодирующей последовательности гена *FAH* проводили со специфическими парами праймеров в подобранных для них условиях реакции (последовательность праймеров может быть представлена по запросу). Секвенирование ПЦР-фрагментов с целью выявления редких мутаций проводилось согласно протоколу фирмы производителя на приборе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems).

Для детекции мутации с.1025C>T (Pro342Leu) был разработан ПЦР-ПДРФ анализ с применением эндонуклеазы рестрикции *MspI* (C⁺CGG), («СибЭнзим», Россия). В норме образуются фрагменты 121 п.н. и 36 п.н., при наличии мутации Pro342Leu сайт рестрикции исчезает. При выявлении изменений, характерных для мутации Pro342Leu проводили секвенирование 12 экзона гена.

Для расчета частоты заболевания применяли формулу Харди—Вайнберга: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, где p^2 — доля гомозигот по доминантному аллелю, p — частота этого аллеля, q^2 — доля гомозигот по рецессивному аллелю и q — частота этого аллеля.

Результаты и обсуждение

30 пациентам из РФ диагноз был установлен на основании характерной клинической картины (поражение печени, рахитоподобные изменения скелета) и выявления специфических для НТ1 биомаркеров — повышения концентрации сукцинилацетона в крови и/или моче, тирозина и метионина в крови. Концентрации биомаркеров, выявленных у пациентов с НТ1 приведены в табл. 1. Всем пациентам был проведен молекулярно-генетический анализ и выявлены мутации в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *FAH*.

НТ1 относится к редким генетическим заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом наследования,

ее частота в среднем оценивается как 1:100 000—120 000 живых новорожденных [8]. В некоторых регионах мира зарегистрирована более высокая частота заболевания: в Норвегии, Финляндии, Тунисе частота НТ1 составляет 1:74 000 [9], 1:60 000 [10] и 1:14 804 [11] соответственно. Самая высокая частота заболевания зарегистрирована в Канаде (провинции Квебек) в районе озера Saguenay-Lac St-Jean — 1:1846 живых новорожденных. Неонатальный скрининг проводится в провинции Квебек с 1970 г. Частота носительства НТ1 в этом регионе составляет 1:66, а в районе Saguenay-Lac St-Jean — 1:16 — 1:20 [12]. В Российской Федерации точная частота данного заболевания неизвестна.

Кроме различий в частоте описаны особенности спектра мутаций в разных популяциях. Наиболее распространенной мутацией у пациентов из Северной Европы, Пакистана, Турции и США является мутация с.1062+5G>A, которая приводит к нарушению сплайсинга. Другая мутация сайта сплайсинга с.554-1G>T преобладает в Центральной и Восточной Европе, а в Испании она составляет 70% всех мутантных аллелей [13]. Преобладание определенных мутаций, обусловленное эффектом основателя, наблюдается в ряде популяций. У финнов 80% мутантных аллелей представлены мутацией с.786G>A (Trp262Term) [10], а у евреев-ашкенази мажорной является мутация с.782C>T (Pro261Leu) [14]. Все пациенты из провинции Квебек являются гомозиготами по мутации сайта сплайсинга с.1062+5G>A [14].

В нашей выборке, представленной пациентами из различных регионов РФ, выявлены 15 мутаций в разных комбинациях, среди которых наиболее частыми были с.554-1G>T, с.1062+5G>A, с.1025C>T (Pro342Leu) и с.1090G>C (Glu364Gln). При этом четко прослеживаются определенные этнические особенности (табл. 2, 3). Так, самой частой в нашей выборке была мутация с.1025C>T (Pro342Leu) (33,3% мутантных аллелей). Она была выявлена в гомозиготном состоянии у 10 пациентов, и все они являются этническими чеченцами (9 из Чеченской Республики и один — из Республики Дагестан). Данная мутация описана ранее в литературе и базе данных по мутациям человека (HGMD CM940753) у пациента из Норвегии в гетеро-

зиготном состоянии. Проведенный функциональный анализ показал снижение ферментативной активности на культуре кожных фибробластов [15]. Оценка мутации с использованием стандартных программ (PolyPhen-2, PROVEAN+SIFT, MutationTaster)) показывает высоковероятную патогенность данной замены. Частота данного аллеля по данным ExAC составляет 0.0000247/3, что является дополнительным подтверждением ее патогенности.

Мутации сайта сплайсинга с.554-1G>T и с.1062+5G>A, относятся к числу наиболее распространенных среди российских пациентов из центральной части России, что сходно с данными, полученными в странах Восточной и Центральной Европы (табл. 3).

На основании полученных результатов было выдвинуто предположение, что в Чеченской Республике частота НТ1 выше, чем в других регионах РФ, а наличие мажорной мутации позволяет провести довольно точно оценку частоты носительства заболевания. Был проведен анализ 296 образцов крови новорожденных из Чеченской Республики и 201 образца крови новорожденных Республики Дагестан. Обнаружено 7 носителей мутации Pro342Leu в выборке из Чеченской Республики, в образцах крови новорожденных Республики Дагестан мутация не обнаружена. Таким образом, частота мутантного аллеля Pro342Leu в Чеченской Республике составила 0,0118 (0,00574—0,0242, при 95%-ном доверительном интервале), а расчетная частота НТ1 (q^2) — 0,00013981 или 1:7152. Эта частота является одной из самых высоких в мире. Поскольку генетически популяции чеченцев и ингушей довольно близки [16], целесообразно провести исследование частоты мутации Pro342Leu в ингушской этнической группе.

Второй интересной находкой является выявление у троих пациентов (якутского, бурятского и ненецкого происхождения) не описанной ранее мутации с.1090G>C (Glu364Gln) в гомозиготном состоянии. Данная замена затрагивает эволюционно-консервативную область белка. Проведенный анализ по программам (PolyPhen-2, PROVEAN+SIFT, MutationTaster) указывает на высокую вероятность патогенности данной замены.

Таблица 1

Биохимические изменения, выявленные у пациентов с тирозинемией типа 1

	Контроль*	Острая форма*	Хроническая форма*
Тирозин (кровь), мкМ/л	81,7 ± 38,8 (3,1-322)	442 ± 136 (352,8-767)	327,1 ± 88,7 (234-618)
Метионин (кровь), мкМ/л	26,8 ± 13,4 (3-198)	515,8 ± 318,8 (18,2-1157)	45,1 ± 44,1 (11,3-171)
Сукцинилацетон (кровь), мкМ/л	0,74 ± 0,3 (0,13-1,9)	32,1 ± 36,2 (5,27-85,2)	9,1 ± 5,9 (2,4-17,5)
Сукцинилацетон (моча), мМ/Мкр.	Не детектируется — < 2	167,3 ± 75,8 (75,4-283)	57,2 ± 33,3 (14-112)
Примечание. * — среднее ± отклонение (минимум — максимум)			

Коллеги из Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова провели ПЦР-ПДРФ анализ 200 образцов анонимных доноров якутского происхождения и выяснили, что частота гетерозиготного носительства данной мутации среди якутов составляет 1%. Эти результаты позволяют предположить, что в данном регионе РФ частота НТ1 также является довольно высокой и может составлять 1:10000 новорожденных [17].

Заключение

Изучение спектра мутаций в экзонах гена *FAH*, приводящего к НТ1, в популяциях Российской Федерации позволило обнаружить этническую специфичность не-

которых мутаций. Из мутаций, приводящих к данному заболеванию, частой (33,3%) оказалась свойственная чеченцам мутация с.1025C>T (Pro342Leu). Расчётная частота НТ1 в этой популяции, достигая уровня 1:7152, является одной из самых высоких в мире. Более того, исходя из данных о генетическом единстве происхождения нахского народа — чеченцев и ингушей, с высокой долей вероятности можно предположить наличие свойственного чеченцам мутантного аллеля также и у ингушей.

Удалось идентифицировать неизвестную ранее мутацию с.1090G>C (Glu364Gln) у больных НТ1, представителей народов Северо-Восточной части России — якутов, бурятов и ненцев. Расчётная частота НТ1 у якутов

Частоты мутаций в гене *FAH* среди пациентов Российской Федерации с тирозинемией типа 1 Таблица 2

Мутация	Частота (%)	Число аллелей
с.1025C>T (Pro342Leu)	33,3	20
с.554-1G>T	18,3	11
с.1062+5G>A	11,7	7
с.1090G>A (Glu364Gln)	10	6
с.520C>T (Arg174Term)	3,3	2
с.782C>T (Pro261Leu)	3,3	2
с.497T>G (Val166Gly)	3,3	2
с.803C>A (Ala268Asp)	1,7	1
с.698A>T (Asp233Val)	1,7	1
с.192G>T (Glu64His)	1,7	1
с.998A>C (His333Pro)	1,7	1
с.455+1G>A	1,7	1
с.2T>A (Met1Lys)	1,7	1
с.1056C>A (Ser352Arg)	1,7	1
с.455G>A (Trp152Term)	1,7	1
Неизвестно	3,3	2

Частоты некоторых мутаций в гене *FAH* в разных этнических группах Таблица 3

Этническая группа	Мутации (число аллелей)			
	с.554-1G>T	с.1062+5G>A	с.1025C>T (Pro342Leu)	с.1090G>C (Glu364Gln)
Русские (n = 15)	36,7 (11)	23,3 (7)	0	0
Чеченцы (n = 10)	0	0	100 (20)	0
Армяне (n = 2)	0	0	0	0
Якуты (n = 1)	0	0	0	100 (2)
Буряты (n = 1)	0	0	0	100 (2)
Ненцы (n = 1)	0	0	0	100 (2)

может составлять 1:10000 новорожденных, также довольно высокая.

Полученные данные свидетельствуют в пользу внедрения в государственную программу скрининга новорожденных НТ1 типа в Чеченской Республике и в других российских популяциях.

Список литературы

1. Endo F, Sun MS. Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. *J Inherit Metab Dis*. 2002;25:227-234.
2. Новиков ПВ. Тирозинемия I типа: клиника, диагностика и лечение. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2012;(S3):1-27.
3. Bergeron A, D'Astous M, Timm DE, Tanguay RM. Structural and functional analysis of missense mutations in fumarylacetoacetate hydrolase, the gene deficient in hereditary tyrosinemia type I. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:15225-15231.
4. van Spronsen FJ, Thomasse Y, Smit GP, Leonard JV, et al. Hereditary tyrosinemia type I: a new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment. *Hepatology*. 1994;20:1187-1191.
5. McKiernan PJ. Nitisinone in the treatment of hereditary tyrosinaemia type I. *Drugs*. 2006;66 (6):743-750.
6. Полякова СИ. Эффективность терапии нитизиномом наследственной тирозинемии I типа. *Российский педиатрический журнал*. 2012;(6):59-60.
7. Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytkevich TH. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(11):1010-1015.
8. Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM. Hyper-tyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw Hill; 2001:1777-1806.
9. Blikrud YT, Brodtkorb E, Backe PH, et al. Hereditary tyrosinaemia type I in Norway: incidence and three novel small deletions in the fumarylacetoacetase gene. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2012;72(5):369-373.
10. St-Louis M1, Leclerc B, Laine J, et al. Identification of a stop mutation in five Finnish patients suffering from hereditary tyrosinemia type I. *Human Molecular Genetics*. 1994;3(1):69-72.
11. Nasrallah F, Hammami MB, Ben Rhouma H, et al. Clinical and Biochemical Profile of Tyrosinemia Type I in Tunisia. *Clinical laboratory*. 2015;61(5-6):487-92.
12. DeBraekeleer MJ, Larochelle J. Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and the Saguenay-Lac-St-Jean. *American journal of human genetics*. 1990;47(2):302-307.
13. Bergman AJ, van den Berg IE, Brink W, et al. Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type I patients in northwestern Europe and Mediterranean countries. *Human mutation*. 1998;12(1):19-26.
14. Elpeleg ON, Shaag A, Holme E, et al. Mutation analysis of the FAH gene in Israeli patients with tyrosinemia type I. *Human mutation*. 2002;19(1):80-81.
15. Rootwelt H, Chou J, Gahl WA, Berger R, Coskun T, Brodtkorb E, Kvittingen EA. Two missense mutations causing tyrosinemia type I with presence and absence of immunoreactive fumarylacetoacetase. *Human Genetic*. 1994; 93(6):615-619.
16. Дибирова ХД, Балановская ЕВ, Кузнецова МА, и др. Генетический рельеф Кавказа: четыре лингвистико-географических региона по данным о полиморфизме хромосомы Y. *Медицинская генетика*. 2010;(10):10-14.
17. Maksimova NR, Gurinova EE, Sukhomyasova AL, et al. A novel homozygous mutation causing hereditary tyrosinemia type I in yakut patient in russia: case report. *Wiadomosci lekarskie*. 2016;69(2 Pt 2):295-298.