

# ГЕНЕТИКА МУКОПОЛИСАХАРИДОЗА III ТИПА (СИНДРОМ САНФИЛИППО) У ДЕТЕЙ ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНА

Ализаде Севда Айдын кызы

К.б.н., Азербайджанский Медицинский Университет,

г. Баку

alizadasevda@yahoo.com

## MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE III (SANFILIPPO SYNDROME) GENETICS FOR CHILDREN FROM AZERBAIJAN

S. Alizada

*Summary.* Enzyme analysis based we were able to identify deficiency of Heparan N-sulfatase and Heparan acetyl-CoA-glucosamine-N-acetyltransferase, which coincide with MPS subtypes as MPS IIIA and MPS IIIC — Sanfilippo syndrome.

Molecular genetic analysis of SGSH and HGSNAT genes identified their mutations. For SGSH gene mutation c.7\_16del (Cys3ProfsTer) was identified, and for HGSNAT there were two mutations found: c.852–1G>A in intron 9 and c.1345dup in exon 13 (p.Asp449Glyfs\*21). All three mutations were in homozygous state. They are known and presented in scientific articles and research.

*Keywords:* Mucopolysaccharidosis type III, enzyme, Sanfilippo syndrome, gene, protein, Heparan N-sulfatase, Heparan acetyl-CoA-glucosamine-N-acetyltransferase.

*Аннотация.* На основании ферментного анализа: удалось выявить дефицит гепаран-N-сульфатазы и гепаран ацетил-КоА-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза, которые соответствуют подтипам МПС IIIA и МПС IIIC болезни Санфилиппо.

Молекулярно-генетический анализ генов SGSH и HGSNAT идентифицировал мутации генов. Для гена SGSH идентифицирована мутация c.7\_16del (Cys3ProfsTer), а для гена HGSNAT идентифицировано две мутации: c.852–1G>A в интроне 9 и c.1345dup в экзоне 13 (p.Asp449Glyfs\*21). Все три мутации были в гомозиготном состоянии. Они известны и ранее описаны в научной литературе.

*Ключевые слова:* мукополисахаридоз III типа, фермент, синдром Санфилиппо, белок, ген, гепаран N-сульфатаза, гепаран ацетил-КоА-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза.

## Введение

**М**укополисахаридозы (МПС) — группа наследственных болезней обмена веществ, связанных с нарушением метаболизма гликозаминогликанов (ГАГ), приводящее к поражению органов и тканей. Данные заболевания обусловлены мутациями генов, контролирующих процесс внутрилизосомного гидролиза макромолекул [1–2].

Синдром Санфилиппо назван в честь доктора Сильвестра Санфилиппо, который в 1963 г впервые описал это заболевание. При синдроме Санфилиппо характерны задержка умственного развития и, как правило, незначительные отклонения в физическом здоровье [3–4].

Мукополисахаридоз III типа (Синдром Санфилиппо) — наследственная лизосомальная болезнь накопления, генетически гетерогенная, обусловленная накоплением гепарансульфата (ГС) и характеризующаяся прогрессирующей умственной отсталостью, умеренными изменениями скелета. На данный момент спец-

ифического лекарства для пациентов с данным заболеванием не разработано, но существует множество разных способов помочь пациентам с МПС преодолеть трудности и получать радость от жизни. Все вышеперечисленные признаки приводят к инвалидизации, а при тяжелом течении болезни — к летальному исходу [5–6].

Установлено четыре подтипа МПС III, каждый из которых возникает с дефицитом ферментов: гепаран-N-сульфатаза (МПС IIIA), гепаран-N-ацетил-D-глюкозаминидаза (МПС IIIB), гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза (МПС IIIC), N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза (МПС IIID). Гены этих ферментов расположены на 8, 12 и 17 хромосомах. Дефицит разных ферментов приводит к накоплению одного или нескольких типов гликозаминогликанов (ГАГ) — гепарансульфата (ГС) [7].

МПС III наследуется по аутосомно-рецессивному типу и является генетически гетерогенным заболеванием. Родители больного ребенка — гетерозиготные носители

Таблица 1. Результаты генетических анализов генов SGSH и HGSNA

МПС III	Ген	Мутация	Белок
МПС IIIA	SGSH: NM_000199.5	c.7_16del	p.Cys3ProfsTer9
МПС IIIC	HGSNAT NM_152419.2	c.852-1G>A интрон 9	-
МПС IIIC	HGSNAT NM_152419.2	c.1345dup Экзон 13	p.(Asp449Glyfs*21)

патологического гена. Частота встречаемости в среднем 1 на 70000–80000 живых новорожденных. Является третьим по частоте встречаемости среди всех известных в настоящее время мукополисахаридозов [8].

Таким образом, учитывая неизученность генетики болезни МПС у населения Азербайджанской Республики, в частности синдрома Санфилиппо (МПС III), целью наших исследований является исследование генетики болезни с использованием комплекса современных молекулярно-генетических методов диагностики.

### Материалы и методы

Начиная с 2018 по 2022 гг, материал был собран в специализированных детских медицинских учреждениях г. Баку, а также в выездных экспедиционных условиях в регионы Республики. Больные отобраны при клиническом осмотре врача-педиатра и врача-генетика. Выявлено 56 пациентов в возрасте от 6 месяцев до 28 лет. Пациенты по половой принадлежности были распределены следующим образом: 31 пациентов мужского и 25 женского пола. Забор кровь пациентов производили на DBS (Dry Blood Sample) карты.

Всем пациентам был проведен ферментный анализ крови на все типы МПС. Для этого были использованы следующие ферменты: альфа-L-идуронидаза (МПС I), идуронат-2-сульфатаза (МПС II), бета-галактозидаза (МПС IVB), гепаран-N-сульфатаза (МПС IIIA), альфа-N-ацетилглицоамидаза (МПС IIIB), ацетил-КоА-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза (МПС IIIC), N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза (МПС IIID), N-ацетил-галактозамин-6-сульфатаза (МПС IVA), арилсульфатаза B (МПС VIB).

Для определения активности ферментов использовали метод флуориметрии, а тестирование мутации проводили NGS (*next generation sequencing*) методом (секвенирование нового поколения).

ДНК, полученную из образца периферической крови пациента, исследовали методом секвенирования нового поколения. «Более 99% кодирующих областей этих генов были изучены с глубиной чтения не менее 50X. Средняя глубина чтения составляет 1559 показаний.

В анализ были включены соединения экзон-интрон ( $\pm 10$  п.н.). Классификацию патогенности полученных данных проводили согласно «Руководству ACMG\*».

### Результаты собственных исследований

Проведенный скрининг с использованием ферментов для диагностики типов МПС III удалось из 56 пациентов у 11 выявить дефицит ферментов: гепаран-N-сульфатаза (3 пациента) и гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза (8 пациента), соответствующие МПС IIIA и МПС IIIC, соответственно.

Дефицит активности фермента гепаран-N-сульфатаза характерен для МПС IIIA, тогда как дефицит активности фермента гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза характерен для МПС IIIC.

У трех пациентов уровень ферментов гепаран-N-сульфатаза (Г.И.) и гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза (Г.И. и Т.М.) были сильно снижены и варьировали в пределах  $< 0,0$  (LOD)  $\mu\text{mol/L/h}$  —  $< 0,2$  (LOD)  $\mu\text{mol/L/h}$ , что характерно для гомозиготного или двойного гетерозиготного состояния заболевания, при норме  $\geq 2,0$   $\mu\text{mol/L/h}$ .

У восьми пациентов уровень активности ферментов гепаран-N-сульфатаза и гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза был снижен почти на половину нормальной активности ферментов  $< 0,8$  (LOD)  $\mu\text{mol/L/h}$  —  $< 0,1$  (LOD), что характерно для гетерозиготного состояния.

Для всех 11 пациентов с измененной активностью ферментов гепаран-N-сульфатаза и гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза проведен молекулярный анализ генов SGSH (N-сульфоглюкозамин сульфогидролаза) и HGSNA (гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза).

Результаты молекулярных анализов генов SGSH и HGSNA для трех пациентов с подозрением на гомозиготное состояние представлен в таблице 1.

Таблица 2. Подтипы МПС III, расположение гена в хромосоме, локус и название фермента

Фенотип	Расположение	Фенотип	Ген	Локус	Фермент
МПС IIIA	17q25.3	252900	SGSH	605270	гепаран-N-сульфатаза
МПС IIIB	17q21.2	252920	NAGLU	609701	альфа-N-ацетил-D-гликозаминидаза
МПС IIIC	8p11.21	252930	HGSNAT	610453	гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза
МПС IIID	12q14.3	252940	GNS	607664	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза

У пациента Б.М., 2017 года рождения, девочки с нулевой активностью фермента гепаран-N-сульфатаза (<0,0 (LOD)  $\mu\text{mol/L/h}$ ) удалось идентифицировать мутацию с.7\_16del гена SGSH: (NM\_000199.5). Наблюдается делеция с 7-го нуклеотида до 16-го нуклеотида включительно. Вследствие мутации происходит терминация на уровне 8-й аминокислоты. Мутация у пациента была в гомозиготном состоянии. Дополнительно у двух лиц также выявлена данная мутация в гетерозиготном состоянии.

Ген SGSH фермента гепаран-N-сульфатаза идентифицирован в 1995 г. Он локализуется на 17 хромосоме в области 17q25.3. Болезнь МПС IIIA составляет 60% от всех подтипов болезни (см.табл.2.).

МПС IIIA — наиболее распространенный подтип. Течение заболевания при этой форме наиболее тяжелое, с ранним началом, наиболее быстрым прогрессированием симптомов и короткой продолжительностью жизни (9).

Эпидемиологические исследования в Британской Колумбии с 1952 по 1986 гг. выявили 4 случая с МПС IIIA, что составило 1 на 324.617 живых новорожденных. Установлена частота встречаемости МПС IIIA у населения Нидерландов 1,16–0,88: на 100000 живых новорожденных (10).

По результатам наших исследований среди 56 случаев с болезнью МПС у трех пациентов удалось идентифицировать ген SGSH: у одного гомозиготное, у двух гетерозиготное состояние мутации.

У двух пациентов идентифицирована мутация в гене в HGSNAT, что характерно для МПС IIIC.

Пациент Г.И., 2006 года рождения, мальчик, имел мутацию с.852–1G>A в интроне 9. Мутация с.852–1G>A гена HGSNAT разрушает высоко консервированный сплайс сайт акцептора экзона 10. В соответствии с HGMD Professional 2019.1. Эта мутация ранее была описана как расстройство, вызывающее МПС IIIC (11,12).

В списке ClinVar эта мутация отмечена как патогенная (клиническое тестирование, ID: варианта 556501). Гомозиготность мутации подтверждена тестированием родителей. Она классифицируется как патогенная (класс 1) соответствие с рекомендациями Centogene и ACMG.

Больной Т.М., 2006 г. рождения, мальчик, у него при генетическом исследовании идентифицирована мутация с.1345dup p.(Asp449Glyfs\*21) в экзоне 13 гена HGSNAT, что создает сдвиг рамки считывания, начиная с кодона 449. Новая рамка считывания заканчивается остановкой кодона 20 В соответствие HGMD Professional 2019.1. Эта мутация ранее была описана как расстройство, вызывающее МПС IIIC (13). В списке ClinVar эта мутация отмечена как патогенная (клиническое тестирование, ID: варианта 1231) и неопределенная (клиническое тестирование, ID: варианта 1231). Она классифицируется как патогенная (класс 1) соответствие с рекомендациями Centogene и ACMG.

Ген болезни МПС IIIC HGSNAT, кодируемый ферментом гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетилтрансфераза, найден в 2006 г. Ген локализуется в хромосоме 8, в области 8p11.1. Он составляет 4% от всех подтипов болезни (см.Табл.2). Эпидемиологические исследования в Западной Австралии с 1969–1998 гг. Выявили 11 случаев с МПС III (1:58000) по 5 больных с МПС IIIA и МПС IIIB, у одного идентифицирован МПС IIIC тип (14).

Khan et al. (2017) при обследовании населения Японии и Швейцарии с 1982 по 2009 гг. обнаружили 467 случаев с МПС. Частота встречаемости составила 1,53 на 100.000 живых новорожденных. Типы МПС были распределены таким образом: МПС II составил 55% всех МПС VII больных с МПС (0,84:100000). Частота МПС I, III, IV, VI и VII составила 15%, 16%, 10%, 1,7% и 1,3% соответственно.

Распространенность синдрома Санфилиппо в разных странах мира весьма вариабельна: примерно 1 на 280000 родившихся в Северной Ирландии до 1 на 66000 в Австралии и 1 на 50000 в Нидерландах. Тип

А наиболее распространен в северо-западной Европе, тип В — в юго-восточной Европе, типы С и D встречаются намного реже (10, 15, 16).

## Выводы

Таким образом, резюмируя наши исследования по выявлению болезни МПС III у населения Азербайджанской Республики, у 11 пациентов из 56 обследованных выявили дефицит ферментов гепаран-N-сульфатаза и гепаран ацетил-КоА: гепаран-глюкозамин-N-ацетил-трансфераза.

Молекулярно-генетический анализ позволил идентифицировать мутации генов *SGSH* и *HGSNAT*. Для гена *SGSH* идентифицирована мутация с.7\_16del (*Cys3ProfsTer*), а для гена *HGSNAT* идентифицировано две мутации: с.852-1G>A в интроне 9 и с. 1345dup в экзоне 13 (р.*Asp449Glyfs\*21*). Все три мутации были в гомозиготном состоянии. Они известны и ранее описаны в литературе.

Обсуждаются пути профилактики болезни МПС IVA типа для населения Азербайджанской Республики в семьях родителей репродуктивного возраста.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Marlies J.V., Sanne N., Hanne T.B. et al. Mucopolysaccharidosis type IIIA: Clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann. Neurol.*, 2010.v.68, iss.6., p.876–887,
2. Benedicte H., Yann M., Roseline F. et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece.// *Am J Med Genet A.*, 2011, v.155A (1), p.58–68.
3. Bhattacharyya, R. Gliddon B., Beccari T. et al. A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase is the basis of MPS IIIA in a spontaneous mouse mutant.// *Glycobiology*, 2001, v.11, p.99–103.
4. Esposito S., Balzano N., Daniele A. Heparan N-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects.// *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, v.1501(1), p.1–11.
5. Valstar M.J., Ruijter G.J.G., van Diggelen O.P. et al. Sanfilippo syndrome: a mini-review. // *J Inherit Metab Dis.*, 2008; v.31(2), p.240–252.
6. Marlies J Valstar, Jan Pieter Marchal, Martha Grootenhuis, Vivian Colland, Frits A Wijburg. Cognitive development in patients with Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome).// *Orphanet Journal of Rare Diseases.*, 2011, v.20, p.6:43.
7. Cleary M.A., Wraith J.E. Management of mucopolysaccharidoses type III. // *Arch Dis Child*, 1993, v. 69(3), p.403–406.
8. B.W. Brian, E.M. Cross, S. Grant, S. Jones, J.E. Wraith, Louise V.M., M. Lomax, J.H. Dougal. An investigation of the middle and late behavioural phenotypes of Mucopolysaccharidosis Type-III.// *J Neurodev Disord.*, 2014; 6(1): 46. <https://doi.org/10.1186/1866-1955-6-46>
9. Khan S.A., Peracha H., Ballhausen D. et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses.// *Molecular Genetics and Metabolism*, 2017, v.121(3), p.227–240.
10. Poorthuis B.J., Wevers R.A., Kleijer W.J. Et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. // *Hum. Genet.*, 1999, v.105(1–2), p.151–156
11. Fedele A.O. et al., Mutational analysis of the *HGSNAT* gene in Italian patients with mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Mutation in brief 959*// *Online. Human Mutation*, 2007, 28(5): 523. <https://doi.org/10.1002/humu.9488>
12. Hui Y. Xiong et al., RNA splicing/ The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease.// *Science*, 2015, 9; 347(6218):1254806. Free PMC article. doi:10.1126/science.1254806
13. Fan X. et al., Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo Disease Type C). // *Am J Hum Genet.*, 2006, v.79(4), p.738–744.
14. John Nelson, June Crowhurst, Bill Carey, Lawrence Greed. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia.// *Am J Med Genet A.*, 2003, v.123A (3), p.310–313,
15. Aronovich E.L., Carmichael K.P., Morizono H. Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds.// *Genomics*, 2000 v.68(1), p.80–84.
16. Lowry R.B., Applegarth D.A., Toone J.R. et al. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia.// *Hum Genet.*, 1990, v.85 (3), p. 389–390.

© Ализаде Севда Айдын кызы ( alizadasevda@yahoo.com ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»