

**ЭТНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ВЫСОКОГО УРОВНЯ
МЛАДЕНЧЕСКОЙ СМЕРТНОСТИ У ДЕТЕЙ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ
КРАЙНЕГО СЕВЕРА: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА МОДЕЛИ
НАСЛЕДУЕМОГО ДЕФИЦИТА КАРНИТИН ПАЛЬМИТОИЛТРАНСФЕРАЗЫ,
ТИП 1А (CPT1A)**

Терещенко С.Ю.¹, Смольникова М.В., Горбачева Н.Н., Шубина М.В.

¹*Руководитель проекта*

² *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия*

child@impn.ru

Классический вариант дефицит карнитин пальмитоилтрансферазы 1А типа (CPT-1A) – редкое, врожденное, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу нарушение бета-окисления жирных кислот, относящееся к группе генетически детерминированных митохондриальных болезней. Дефицит карнитин пальмитоилтрансферазы 1А типа впервые был описан в 1981 году P.F. Bougneres с соавторами [1].

Последующими исследованиями было установлено, что дефектный ген локализован на хромосоме 11q13 с точной локализацией между позициями 13.1 и 13.2. Большинство описанных в литературе мутаций (общим числом более 20), приводящих к дефициту CPT-1A являются частными (“private mutations” – редкие и очень редкие мутации, обычно описываемые в пределах одной семьи) и представляют собой missense, nonsense, insertion и deletion варианты. К началу 2000-х годов в литературе было описано всего около 30 случаев этого наследственного заболевания.

В 2001 году N.F. Brown с соавторами описали клинический случай часто рецидивирующих эпизодов мышечных спазмов, рвоты и потери сознания у мужчины, принадлежащим к одной из народностей коренного населения Крайнего Севера [2]. Анализ ферментного профиля пациента показал крайне низкую активность карнитин пальмитоилтрансферазы 1А типа в культуре фибробластов, а генетический анализ показал, что мужчина был гомозиготным по мутации с.1436С/Т, характеризующейся заменой пролина на лейцин в позиции 479 (P479L).

В 2008 году наличие такого же метаболического дефекта, ассоциированного с мутацией P479L, было описано С.Р. Greenberg с соавт. у 7 детей двух семей коренного населения (инуиты) различных регионов Северной Канады [3]. Этими же авторами были обследованы 422 новорожденных в регионе, где проживала одна из семей. Неожиданно для самих авторов 294 ребенка оказались гомозиготами по P479L, 103 – гетерозиготами и только 25 из обследованных были гомозиготами по “нормальному”, дикому для других ранее обследованных популяций гену [3]. При этом у подавляющего большинства гомо- и гетерозигот клинические проявления, характерные для классического варианта CPT-1A дефицита, отсутствовали. Авторы сочли эти находки “парадоксом коренных народностей Севера”, а этот вариант метаболического дефекта впоследствии назвали “арктическим вариантом CPT-1A дефицита”.

Несмотря на отсутствие симптомов классического CPT-1A у большинства обследованных, последующее наблюдение за этими детьми позволило установить, что 7 гомозигот умерли в раннем возрасте (7/294), а среди гетерозигот смертность составила 3 из 103. Характерно, что в целом смертность среди грудных детей инуитов в три раза выше, чем общая

смертность детей Канады. Дальнейшие популяционные исследования показали высоковероятную причинно-значимую связь мутации P479L с высоким риском младенческой смертности у детей коренного населения Арктических регионов [4]. Таким образом, хотя большинство случаев “арктического варианта” CPT-1A дефицита протекают бессимптомно, у некоторой части детей генетический дефект может приводить к метаболическому кризу на фоне банальных инфекций или голодания, что сопряжено с высоким риском летального исхода.

В последующие годы большим количеством исследований была показана высокая распространенность мутации P479L среди различных популяций коренного населения арктических регионов, что не всегда коррелировало с результатами неонатального скрининга, проведенного с помощью метода tandemной масс-спектрометрии сухих пятен крови. Так, исследовательская группа под руководством профессора David Koeller выявила, что среди 633 детей коренных национальностей было 26.1% гомозигот и 34.4% гетерозигот по P479L [4]. При этом ни в одном случае гомозиготное носительство гена не было ассоциировано с метаболическим дефектом, оцененным с помощью tandemной масс-спектрометрии периферической крови (при использовании стандартной точки разделения). Характерно, что не во всех северных территориях была выявлена высокая частота “арктического варианта” CPT-1A дефицита: исследование S.A. Collins с соавторами показало, что гомозиготное носительство P479L было зарегистрировано у новорожденных Юкона в 0%, в Северо-западных регионах Аляски – в 3 %, в территории Нунавут (Nunavut) – в 64 % [5]. Такие различия могут быть связаны с различным этническим составом исследованных территорий. Высокая (0.73) частота носительства мутации P479L была выявлена также и у инуитов Гренландии [6].

Высокая распространенность мутации P479L среди отдельных народностей коренного населения Арктических регионов, практически означающая, что для этих популяций такой вариант является геном “дикого типа”, наводит на мысль о наличии факторов селекционного отбора, приведших к доминированию P479L генотипа. Обсуждается несколько гипотез механизма такого отбора.

Традиционная диета коренных народностей Арктических регионов состоит из мяса морских млекопитающих, рыбы и небольшого количества лиственных растений. 80-85 % общей калорийности такой диеты приходится на жиры, 15-20 % – на протеины, незначительное количество составляют углеводы. Указанные пропорции жиров, белков и углеводов составляют основу так называемой “кетогенной диеты”, которая иногда используется в современной медицине, в частности, для лечения некоторых форм эпилепсии. Таким образом, можно сказать, что в течение многих веков представители коренных северных народностей находились на постоянной “кетогенной диете” с высоким уровнем кетогенеза, при котором нет необходимости в высокой активности ферментов, участвующих в окислении жирных кислот.

Предполагается, что мутация P479L приводит к такой конформации молекулы карнитин пальмитоилтрансферазы 1A, которая, с одной стороны, позволяет сохранять его относительно высокую резидуальную активность, а с другой снижает чувствительность фермента к изменению концентрации малонил-КоА (физиологический сигнал, через который происходит супрессия окисления жирных кислот при достаточном количестве углеводов в организме в постпрандиальную фазу). Снижение чувствительности CPT-1A к супрессивным стимулам приводит к тому, что фермент находится в перманентно активированном состоянии (формируя состояние перпетуального эндогенного кетоза даже в фазу насыщения организма) и это балансирует его низкую каталитическую способность.

Возможно также, что омега-3 жирные кислоты, которыми богата традиционная диета аборигенов Арктики, также прямо стимулируют CPT-1A, поддерживая его активность.

Таким образом, организм носителей мутации P479L защищается от чрезмерно высоких уровней окислации жирных кислот и кетогенеза в условиях постоянной “кетогенной диеты”. Малое количество углеводов в пище при наличии вышеописанного механизма перпетуального кетоза позволяло носителям мутации P479L черпать основное количество необходимой организму энергии из жиров и тем самым выживать в суровых условиях Арктики, сохраняя высокий уровень физической активности.

В современных условиях диета коренных народностей кардинально изменилась в сторону общепринятых в большинстве современных популяций стереотипов – снизилось количество жиров и резко увеличилось количество углеводов, что делает бесполезным эволюционно сформированное преимущество носителей мутации P479L. Более того, срыв этого тонко настроенного метаболического механизма под влиянием внешних факторов (голодания, инфекции) может приводить к характерным проявлениям CPT-1A дефицита – гипокетонемической гипогликемии с высоким риском летального исхода.

Вторая гипотеза состоит в том, что носители мутации P479L обладают особенностями терморегуляции и обмена подкожного жира, что позволяет им выживать в условиях экстремально низких температур.

Наконец, можно предполагать, что существуют сцепленные с геном CPT-1A генетические детерминанты, которые оказывали эволюционно обусловленный селективный эффект.

В настоящее время обсуждаются ассоциации арктического варианта CPT-1A дефицита с различными клиническими состояниями, как у детей, так и у взрослых.

Так, B.D. Gessner с соавторами (группа профессора D. Koeller) показали, что P479L гомозиготы чаще страдают инфекциями нижних дыхательных путей и средним отитом в раннем возрасте при сравнении с гетерозиготами и носителями “нормального генотипа” [7]. Авторы предполагают, что это может быть связано с более частыми госпитализациями вследствие более тяжелого течения банальных инфекций у носителей P479L мутации. Частые госпитализации, в свою очередь, могут приводить к бактериальной колонизации верхних дыхательных путей с последующим развитием указанных осложнений. Кроме того, возможно прямое влияние P479L генотипа на метаболизм лимфоцитов и противоинфекционную защиту.

Описана вероятная ассоциация арктического варианта CPT-1A дефицита с формированием HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) и AFLP (acute fatty liver of pregnancy) синдромов у беременных [8].

Предполагается, что высокая активность CPT-1A обладает протективным эффектом в отношении формирования неалкогольной жировой болезни печени (неалкогольного стеатогепатоза), соответственно, низкая активность CPT-1A может предрасполагать к этому заболеванию [9]. Кроме того, в экспериментах на животных было показано, что нарушения в метаболической оси “малонил-КоА – CPT-1A” играет большую роль в регуляции аппетита и массы тела. Предполагается, что носители мутации P479L при переходе на высокоуглеводную пищу подвержены риску ожирения и диабета 2-го типа [7]. Характерно, что распространенность этих заболеваний резко возросла за последние годы, как среди детского, так и среди взрослого населения коренных народностей Крайнего Севера.

Интересным представляется, что арктический вариант CPT-1A дефицита может обладать и протективным эффектом в отношении некоторых заболеваний. Так, C. Rajakumar с соавторами обследовав 1111 взрослых инуитов Гренландии не только выявили высокую

(0.73) частоту носительства мутации Р479L при полном отсутствии характерных для СРТ-1А дефицита симптомов, но и показали, что носительство Р479L ассоциировано с высокими уровнями аполипопротеина А1 и холестерина высокой плотности, которые, как известно, обладают протективным действием в отношении формирования атеросклероза [6]. Эти данные согласуются с известным эпидемиологическим феноменом низкой распространенности атеросклероза у коренного населения Крайнего Севера.

Таким образом, арктический вариант врожденного дефицита карнитин пальмитоилтрансферазы 1А типа очень широко распространен среди коренного населения Крайнего Севера, чаще всего имеет бессимптомное течение, однако в сочетании с современными стереотипами питания может быть сопряжен с высоким риском младенческой смертности, а также с вероятной предрасположенностью к бактериальным инфекциям респираторного тракта, ожирению, диабету 2-го типа, стеатогепатозу и осложненному течению беременности.

К настоящему времени исследований, посвященных изучению распространенности генетического дефекта СРТ1А у детей коренных национальностей Российских арктических территорий проведено не было, несмотря на повышенный уровень младенческой смертности в этих популяциях и значительную вероятность выявления высокой распространенности дефицита СРТ1А, аналогично арктическим регионам США и Канады.

Цель исследования: оценка распространенности мутации гена карнитин пальмитоилтрансферазы СРТ1А, с.1436С/Т (гомозигота Р479L, известная как “арктический вариант”) у новорожденных коренного населения Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска (изучаемые национальности – долганы, нганасаны, ненцы, русские).

Материалы и методы: В процессе реализации исследовательского проекта нами была произведена выборка 398 проб сухой капли крови новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края, родившихся в 2010-2013 гг., из банка КГУЗ «Красноярский краевой консультативно-диагностический центр медицинской генетики». Проведен первичный анализ демографических данных выборки новорожденных. Среди отобранных проб было 208 (52,3 %) проб мальчиков и 190 (47,7 %) проб девочек. В качестве контроля были отобраны 198 проб сухой капли крови новорожденных, родившихся в г. Красноярске, преимущественно европеоидов (определено по паттерну фамилии матери), из них 102 (51,5 %) мальчика и 96 (48,5 %) девочек.

Выделение ДНК из проб сухой капли крови было осуществлено с помощью тест систем D1Atom™ DNA Prep (ООО «Центр молекулярной генетики», Москва). Генотипирование аллельных вариантов гена карнитин пальмитоилтрансферазы СРТ1А, с.1436С/Т (rs 80356779) было проведено методом рестриктного анализа продуктов амплификации (ПДРФ анализ) специфического участка генома. Амплификация с помощью ПЦР проведена с использованием специфических праймеров (5'-СТGGCCAGGTTTGGATTTT-3' и 5'-TCCAGGATGAAGCAGAGAGG-3') и стандартных параметров температурных циклов (температура отжига 60°C). Для рестрикции полученных ампликонов была использована эндонуклеаза рестрикции BstMC I («Сибэнзим», Новосибирск). Продукты рестрикции были разделены с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием и визуализированы в УФ-свете. Для аллельного варианта Т после разделения в геле характерен фрагмент 252 пар оснований, для аллеля С – фрагменты 169 и 83 пар оснований.

Было выделено 398 образцов ДНК новорожденных коренного населения Таймыра и 198 образцов ДНК новорожденных-европеоидов г. Красноярск, что позволило создать достаточный для анализа банк ДНК новорожденных различных этнических групп и регионов Красноярского края.

Результаты и обсуждение: Проведено генотипирование аллельных вариантов гена карнитин пальмитоилтрансферазы CPT1A (с.1436C/T) методом рестриктного анализа продуктов амплификации специфического участка генома у 398 новорожденных.

Выявлено следующее распределение генотипов обследованных образцов среди новорожденных коренных национальностей: СС – 391 образец (98.24 %), ТС – 7 образцов (1,76 %), ТТ – 0 образцов (0%).

Среди новорождённых г. Красноярск (преимущественно европеоидов) все 100 % генотипов принадлежали к “дикому типу” (СС), т.е. не было выявлено ни одной гетерозиготы/гомозиготы с аллельным вариантом Т по мутации гена карнитин пальмитоилтрансферазы CPT1A (с.1436C/T).

Для выявления этнических различий в распространённости мутации было выделено 2 группы новорожденных коренных национальностей: 1-я – из поселков с преимущественным долган-нганасанским населением (108 новорожденных поселки Сындасско, Катарык, Новая, Левинские пески; 91 % коренных жителей – долган-нганасан) и 2-я – с преимущественно ненецким населением (125 новорожденных; поселки Носок, Тухард; 85 % коренных жителей – ненцев).

Оказалось, что все семь выявленных гетерозигот принадлежали к популяции долган-нганасан (7/108; 0.07; 95% доверительный интервал: 0.03-0.13), а в популяции ненцев не было выявлено ни одного случая мутации, ($p(\text{Хи-квадрат})=0.006$). Таким образом, распространённость редкой Т-аллели в популяции долган-нганасан, рассчитанная по формуле Hardy-Weinberg составляет 0.03, а ожидаемая частота гомозиготного носительства в этой популяции коренных народностей Российского Крайнего Севера, составляет не менее 1 на 1000 новорожденных.

Заключение: Таким образом, все 7 выявленных гетерозигот по мутации с.1436C/T (rs 80356779), являющейся маркерной для врожденного метаболического дефекта, связанного с нарушением окисления жирных кислот – CPT1A дефицита, были выявлены в популяции долган-нганасан, что, по нашему мнению, имеет высокую научно-клиническую значимость, поскольку не менее 1 на 1000 новорожденных указанных этнических групп будет страдать этим врожденным митохондриальным заболеванием.

Очевидным представляется, что для детей долган и нганасан в дополнение к общероссийскому стандартному набору болезней неонатального скрининга необходимо введение обследования на наличие CPT1A дефицита. В то же время, точные метаболические последствия указанного генетического дефекта, характерные для детей Российских арктических регионов, как и оптимальные режимы профилактики, все еще остаются не изученными и определяют настоятельную необходимость продолжения исследований в этом направлении.

Необходимо отметить, что распространённость CPT1A дефицита среди долган-нганасан значительно превышает частоту других генетических дефектов метаболизма, на выявление которых уже сейчас направлены программы генетического скрининга (галактоземия – 1 на 16000 новорожденных, фенилкетонурия – 1 на 8000-15 000 новорожденных, муковисцидоз – 1 на 10000 новорожденных).

У детей двух других обследованных нами популяций Красноярского края (европеоидов и ненцев) не было выявлено ни одного случая мутации, что делает нецелесообразным массовый генетический скрининг на наличие CPT1A дефицита в этих этнических группах.

Список литературы:

1. P.F. Bougneres, J.M. Saudubray, C. Marsac, O. Bernard, M. Odievre, J. Girard. *The Journal of pediatrics*, 1981, **98**, 742-46.
2. N.F. Brown, R.S. Mullur, I. Subramanian, V. Esser, M.J. Bennett, J.M. Saudubray, A.S. Feigenbaum, J.A. Kobari, P.M. Macleod, J.D. McGarry, J.C. Cohen. *Journal of lipid research*, 2001, **42**, 1134-1142.
3. B.D. Gessner, M.B. Gillingham, S. Birch, T. Wood, D.M. Koeller. *Molecular genetics and metabolism*, 2009, **96**, 201-207.
4. B.D. Gessner, M.B. Gillingham, M.A. Johnson, C.S. Richards, W.E. Lambert, D. Sesser, L.C. Rien, C.A. Hermerath, M.R. Skeels, S. Birch, C.O. Harding, T. Wood, D.M. Koeller. *The Journal of pediatrics*, 2011, **158**, 124-129.
5. S.A. Collins, G. Sinclair, S. McIntosh, F. Bamforth, R. Thompson, I. Sobol, G. Osborne, A. Corriveau, M. Santos, B. Hanley, C.R. Greenberg, H. Vallance, L. Arbour. *Molecular genetics and metabolism*, 2010, **101**, 200-204.
6. C. Rajakumar, M.R. Ban, H. Cao, T.K. Young, P. Bjerregaard, R.A. Hegele. *Journal of lipid research*, 2009, **50**, 1223-1228.
7. B.D. Gessner, M.B. Gillingham, S. Birch, T. Wood, D.M. Koeller. *Pediatrics*, 2010, **126**, 945-951.
8. U.A. Schatz, R. Ensenauer. *Journal of inherited metabolic disease*, 2010, **33**, 513-520.
9. M. Stefanovic-Racic, G. Perdomo, B.S. Mantell, I.J. Sipula, N.F. Brown, R.M. O'Doherty. *American journal of physiology, endocrinology and metabolism*, 2008, **294**, 969-977.