

Нярайн скрининг шинжилгээгээр төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон дээжинд *TSHR* генийн R450H мутацийг илрүүлсэн дүн

Т.Номиндэлгэр¹, М.Номунбилэг¹, Ө.Элбэрэлт², Г.Эрдэнэтуяа³, Б.Мөнхцэцэг¹

¹АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим

²АШУҮИС, Био-Анагаахын хүүрэлэн

³АШУҮИС, Анагаах Ухааны сургууль, Хүүхдийн анагаахын тэнхим

Цахим шуудан: nomindelger@mnu.edu.mn, Утас: 99806018

Түлхүүр үг:

Төрөлхийн анхдагч
гипотиреоз
Хатаасан цус
TSHR
p.R450H
Огтлогдсон хэрчмийн
уртын полиморфизм

Товч утга

Үндэслэл: Төрөлхийн анхдагч гипотиреоз (ТАГ) нь бамбай булчирхайн үйл ажиллагаа хэсэгчлэн эсвэл бүрэн алдагдсанаас болж цусан дахь бамбай булчирхайн даавруудын хэмжээ багасах буюу огт ялгарахгүй болсны улмаас олон эрхтэн тогтолцооны өөрчлөлтөөр илэрдэг эмгэг юм. Дэлхийд ТАГ нь 3000-4000 амьд төрөлтөд 1 тохиолддог. ТАГ-ын эмнэлзүйн шинж тэмдгүүд эхэндээ бүдэг, ихэвчлэн төрснөөс нэг сарын дараа илэрдэг бөгөөд оношилгоо, эмчилгээ оройтсон тохиолдолд бие бялдар, сэтгэц хөгжлийн хоцрогдолд хүргэж улмаар хөгжлийн бэрхшээлд хүргэх аюултай өвчин. Уг өвчний шалтгаан нь бүрэн тодорхойгүй ч эхийн иодын дутагдал болон нярайн бамбай булчирхайн хөгжлийг хариуцдаг генийн (*TSHR*, *PAX8*, *NKX2-1*, *FOXE1* транскрипцийн хүчин зүйлүүд) мутаци нөлөөлдөг гэж үздэг. *TSHR* генийн 40 гаруй төрлийн мутаци нь ТАГ үүсгэж байна. Япон, БНХАУ, Тайвань улсад хийсэн судалгаагаар *TSHR* генийн p.R450H мутаци нь ТАГ үүсэх эрсдэлт хүчин зүйл болдог байна. Монгол улсад 2021 онд хийгдсэн судалгаагаар ТАГ-ын тархалт 2091 амьд төрөлтөд 1 буюу шинэ тохиолдлын тоо дэлхийн дунджаас өндөр байсан ба манай оронд энэ өвчний молекул генетикийн судалгааны ажил хомс байна. **Зорилго:** Нярайн скрининг шинжилгээгээр төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон дээжинд *TSHR* генийн R450H мутацийг тодорхойлох. **Арга, аргачлал:** Судалгаанд Монгол-Япон, АШУҮИС-ийн төв эмнэлэгт 2012-2024 оны хооронд нярайн скрининг шинжилгээгээр төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон 17 хүүхдийн хатаасан цусыг ашиглав. Бид хатаасан цуснаас ДНХ ялгах аргыг тодорхойлохын тулд нийт 5 аргыг туршин ДНХ гарц, цэвэршилт өндөртэй аргаар ДНХ ялган *TSHR* генийг ПГУ-аар олшруулав. *TSHR* генийн p.R450H мутацийг илрүүлэхдээ ПГУ-ын бүтээгдэхүүн дээр *FauI* рестрикцийн эсгэг нэмэн ДНХ-ийг зүсч, гель электрофорезоор үр дүнг үнэлэв. **Үр дүн:** Бидний судалгаагаар хатаасан цуснаас 1, 2-р аргаар ДНХ ялгахад гарц, цэвэршилт өндөр байсан тул төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон 17 хүүхдийн дээжнээс ДНХ ялган *TSHR* генийг ПГУ-аар олшруулав. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гель электрофорезоор гүйлгэж шалгахад 14 дээж ПГУ-аар олширсон. Үүний дараа *TSHR* генийн p.R450H мутацийн генотипийг огтлогдсон хэрчмийн уртын полиморфизмоор тодорхойлоход 11 (78.6%) сорьцод G/G генотип, 2 (14.3%) сорьцод G/A генотип, 1 (7.1%) сорьцод A/A генотип тус тус илэрсэн. **Дүгнэлт:** 2012-2024 оны хооронд нярайн скрининг шинжилгээгээр оношлогдсон төрөлхийн анхдагч гипотиреозтой хүүхдийн дунд *TSHR* генийн p.R450H гомозигот, гетерозигот мутаци 21.4% тус тус тодорхойлогдлоо.

Үндэслэл: Төрөлхийн анхдагч гипотиреоз нь булчирхайн даавруудын хэмжээ багасах буюу огт (ТАГ) бамбай булчирхайн үйл ажиллагаа хэсэгчлэн эсвэл бүрэн алдагдсанаас болж цусан дахь бамбай булчирхайн даавруудын хэмжээ багасах буюу огт ялгарахгүй болсны улмаас олон эрхтэн тогтолцооны өөрчлөлтөөр илэрдэг эмгэг юм.¹ Дэлхий дахинд ТАГ

нь 3000-4000 амьд төрөлтөд 1 тохиолддог бөгөөд улс орон бүрд харилцан адилгүй байна.² Жишээлбэл, Испани (1600-д 1) болон Австрали (2421-д 1), БНХАУ (1089-1494-д 1), АНУ (2500-д 1), Азид (2380-д 1) тус тус байна. Хүйсийн хувьд эрэгтэйчүүдтэй харьцуулахад эмэгтэйчүүдэд их тохиолддог (1:1.5-2) бөгөөд ихэр төрөлт, олон төрөлт, ахимаг настай эхээс төрсөн, дутуу төрсөн нярайд илүү тохиолддог.^{3,4} Оношилгоо, эмчилгээ оройтсон тохиолдолд бие бялдар, сэтгэц хөгжлийн хоцрогдолд хүргэж улмаар хөгжлийн бэрхшээлд хүргэх аюултай өвчин юм.⁵

Төрөлхийн гипотиреозыг анхдагч, хоёрдогч буюу төвийн гаралтай гэж ангилдаг. Төрөлхийн анхдагч гипотиреоз нь бамбай булчирхайн хөгжлийн алдагдал (бамбай булчирхайн дисгенез) эсвэл бамбай булчирхайн дааврын биосинтезийн алдагдлаас (дисгормоногенез) шалтгаантай.⁶ ТАГ-ын дийлэнх нь бамбай булчирхайн дисгенезээс (80%) шалтгаантай болохыг судлаачид тогтоосон байдаг. Бамбай булчирхайн дисгенезийн ихэнх тохиолдол нь шинэ мутациар үүсдэг бөгөөд 2-5% нь аутосомын рецессив хэлбэрээр удамшдаг. Бамбай булчирхайн дисгенезийн шалтгаант ТАГ-ын 5-10% генетикийн шалтгаантай, *TSHR* ген, бамбай булчирхайн өсөлт хөгжилтөд оролцдог транскрипцийн хүчин зүйлийг кодогдог генүүд (*NKX-2/TF1*, *PAX8*, *FOXE1/TF2*, *NKX2-5*, *GLIS3*)-ийн мутацийн улмаас үүсдэг гэжээ.⁷

Хүний *TSHR* ген нь 14q31 хромосом дээр байрладаг ба трансмембран Gq, Gs гэсэн хосолсон уургийн рецепторыг кодогдог бөгөөд бамбайн булчирхайн өсөлт, хөгжил, дааврын нийлэгжлийн дохиог дамжуулдаг.⁸ *TSHR* генийн 40 гаруй төрлийн мутаци нь ТАГ-ыг үүсгэж байна.⁹ Япон, БНХАУ, Тайвань улсад хийсэн судалгаагаар *TSHR* генийн p.R450H мутаци нь төрөлхийн анхдагч гипотиреоз үүсэх эрсдэлт хүчин зүйл болдог.¹⁰⁻¹² p.R450H (c.1349G>A) мутаци нь БСД рецепторын эхний трансмембранд байрлах 450 дахь кодонд аргинин (CG-C)-ыг гистидин (CAC)-ээр солих мутаци бөгөөд үүний үр дүнд БСД-тай холбогдох, БСД-т цАМФ-ын хариу урвал, *TSHR* генийн эсийн гадаргуугийн экспрессийг тус тус бууруулдаг.¹³

Нярайн скрининг шинжилгээ гэдэг нь илэрхий шинж тэмдэггүй төрөлхийн ба удамшлын өвчнийг энгийн, хурдан, аюулгүй аргаар баталгаатай технологи ашиглан, нярайн эрт үед илрүүлэн оношилж, эмчилгээнд хамруулах зорилготой шинжилгээ юм. Тус шинжилгээг өсгийнөөс таван дусал цус авч цаасан фильтрт шингээн 2-4 цаг хатаан лабораторид шинжилдэг. Цусыг хатаадаг учраас удаан хугацаанд хадгалах боломжтой. Мөн орон нутгийн иргэд хот хооронд хүүхдээ зөөж явах шаардлагагүй зэрэг олон давуу талтай. Монгол улсад 2021 онд хийсэн судалгаагаар ТАГ-ын тархалт 2091 амьд төрөлтөд 1 буюу шинэ тохиолдлын тоо дэлхийн дунджаас өндөр байсан ба манай оронд энэ өвчний молекул генетикийн судалгааны ажил хомс байна.¹⁴

Зорилго: Нярайн скрининг шинжилгээгээр төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон, хатаасан цусны дээжинд *TSHR* генийн R450H мутацийг тодорхойлох.

Арга, аргачлал: Бид АШУҮИС-ийн Монгол-Япон, Төв эмнэлэгт 2012-2024 онд нярайн скринингийн шинжилгээ хийгдсэн дээжнээс төрөлхийн анхдагч гипотиреоз оношлогдсон 17 хатаасан цусны дээжийг судалгаанд хамруулав. ДНХ ялгах аргыг суурилуулахын тулд 2012 оноос хадгалсан эрүүл 19 хатаасан цусны дээжид туршилт хийв. Бид *TSHR* генийн R450H мутацийг ПГУ-ОХУП арга ашиглан гүйцэтгэв.

Хатаасан цуснаас ДНХ ялгасан аргачлал: Бид судалгаандаа 2012-2024 онд хадгалсан хатаасан цуснаас ДНХ-ийг амжилттай ялгахын тулд нийт 5 аргыг туршин Nanodrop1000 спектрофотометрт (Thermo Fischer Scientific) уншуулж ДНХ-ийн гарц цэвэршилтийг тодорхойлсон.

1. Aslam M (2023) нарын судлаачдын арга: 98°C Фосфат буферт давсны уусмалд өсгөвөрлөх¹⁵
2. Ramos Diaz R (2015) нарын судлаачдын арга: 75°C 0.2 M NaOH-д өсгөвөрлөх¹⁶
3. Choi EH (2014) нарын судлаачдын арга¹⁷
4. ZANASPEX цомог
5. QIAGEN Dneasy blood and tissue kit (каталог дугаар 69504)

Полимеразийн гинжин урвалаар (ПГУ) *TSHR* генийн хэсгийг олшруулахдаа хүснэгт 1-т харуулсан дараалал бүхий праймерыг ашиглан, хүснэгт 2-т харуулсан ПГУ-ын холимог бэлтгэж, хүснэгт 3-т харуулсан дулааны нөхцөлийн дагуу ПГУ-ыг хийж бай дарааллыг олшруулав. Үр дүнг 1.5%-ийн агарозын гель ашиглан гель электрофорезийн аргаар баталгаажуулав.

Хүснэгт 1. ПГУ-ын праймерын дараалал

	Дараалал	Tm°C	GC%	Урт
Шууд праймер	5'-CTG GGC AAT GTC TTT GTC CTG CT-3'	68.3	52.2	23 х.н
Урвуу праймер	5'-GGT ATC TTT GTC CCC TGG GT TG-3'	65.7	54.5	22 х.н

Товчлол: Tm°C, хайлах температур, GC%, гуанин ба цитозиний эзлэх хувь

Хүснэгт 2. ПГУ-ын уусмалын найрлага

Урвалж	Хэрэглэгдэх концентраци (мкл)	Эзэлхүүн
Taq polymerase 2x master mix	10	
5 пмол/мкл Primer F1	3	0.5 мкл
5 пмол/мкл Primer R1	3	0.5 мкл
Sterile D.W	2	-
50 нг/мкл Дээж	2	
Нийт хэмжээ	20	

Хүснэгт 3. ПГУ явагдах дулааны нөхцөл

ПГУ-ын үе шат	Хугацаа	Температур	Циклийн тоо
Эхний денатураци	2 минут	95°C	1 цикл
Денатураци	30 секунд	94°C	
Праймер холбогдох	30 секунд	58°C	35 цикл
Уртсах	1 минут	72°C	
Эцсийн уртсах	5 минут	72°C	1 цикл

TSHR генийн мутацийг (p.R450H) илрүүлэхдээ ПГУ-ын бүтээгдэхүүн дээр Faul рестрикцийн эсгэг (зүсэх сайт CCCGC) нэмж 55°C-т 2 цаг 30 минут, 65°C-д 20 минутын турш инкубацилан ДНХ-ийг зүсэв. 1.5%-ийн агарозын гель электрофорез дээр гүйлгэн огтлогдсон ДНХ-ийн хэрчмийг тодорхойлов. Гель электрофорез дээр харагдаж буй ДНХ-ийн хэмжээгээр нь *TSHR* генийн p.R450H с.1349 G/G бол эрүүл (506 х.н, 67 х.н), G/A (573 х.н, 506 х.н, 67 х.н) бол гетерозигот, A/A (573 х.н) бол гомозигот гэж үнэлэв. Статистик боловсруулалтыг Microsoft excel программ ашиглан хийв.

Ёс зүйн зөвшөөрөл: АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2024 оны 11 сарын 20, 2025 оны 4 сарын 8-ны өдрийн хурлаар тус тус хэлэлцүүлж, судалгаа хийх ёс зүйн зөвшөөрлийг авсан. (протокол №24-25/02, протокол №24-25/07-02)

Үр дүн: Бид 2012-2024 онд хадгалсан хатаасан цуснаас ДНХ амжилттай ялгахын тулд нийт 5 аргыг давтан туршин ДНХ-ийн гарц, цэвэршилтийг тодорхойлов. Нийт ялгасан ДНХ-д ПГУ явуулж, гель электрофорез гүйлгэж шалгахад 98°C-т фосфат буферт давсны уусмалд өсгөвөрлөх арга болон 75°C 0.2M NaOH-д өсгөвөрлөх аргаар ялгасан ДНХ-д ПГУ-ын үр дүн амжилттай гарсан бол бусад аргуудад үр дүн багатай байв. Тиймээс бид ТАГ оношлогдсон нийт 17 хатаасан цуснаас ДНХ гарц өндөртэй, ПГУ-ын үр дүн амжилттай гарсан арга 1, 2-оор ДНХ-ийг ялган, *TSHR* генийг ПГУ-аар олшруулж, гель электрофорезоор гүйлгэж шалгахад 14 дээж ПГУ-аар олширсон. Үүний дараа *TSHR* генийн p.R450H мутацийн генотипийг Faul рестрикцийн эсгэгээр зүсэн ОХУП-ын аргаар тодорхойлоход 11 (78.6%) сорьцод G/G генотип, 2 (14.3%) сорьцод G/A генотип, 1 (7.1%) сорьцод A/A генотип тус тус илэрлээ (Зураг 1).

Хүснэгт 4. *TSHR* генийн p.R450H мутацийг илрүүлсэн дүн

Мутаци	Генотип	Тохиолдол (%) (n=14)
p.R450H	AA	1 (7.1)
	GA	2 (14.3)
	GG	11 (78.6)



Зураг 1. ОХУП-ын аргаар *TSHR* генийн p.R450H мутацийг тодорхойлсон гель электрофорезийн зураг

Тайлбар: ТАГ оношлогдсон 14, эрүүл 2 хатаасан цуснаас ялгасан ДНХ-ийг ПГУ-аар олшруулж, *TSHR* генийн p.R450H мутацийн гомозигот (573 х.н) генотипыг улаан сумаар, гетерозигот (573 х.н, 506 х.н) генотипыг шар сумаар тус тус харуулав.

Хэлцэмж: Монгол улсад 2021 онд Ц.Алтантуяа нарын хийсэн судалгаагаар ТАГ-ын тархалт 2091 амьд төрөлтөд 1 буюу шинэ тохиолдлын тоо дэлхийн дунджаас өндөр байна. Тус судалгаагаар ТАГ-той 93 нярайг бамбай булчирхайн хэт авиан шинжилгээнд хамруулахад 76.3% нь бамбай булчирхайн дутуу хөгжилтэй, 15.1% нь бамбай булчирхайн уйланхай агуулсан дутуу хөгжилтэй, 4% нь бамбай булчирхай хэвийн бүтэц хөгжилтэй, харин 3.2% нь бамбай булчирхай үүсээгүй, 1.1% нь буруу байрлалтай байжээ.⁹ Иймээс Монгол улсад ТАГ-ын шалтгааны дийлэнх хувийг бамбайн булчирхайн дутуу хөгжил эзэлж байна. ТАГ-ын хүндрэлээс сэргийлэхийн тулд дэлхийн 75 улсын 400 гаруй лабораторид ТАГ-ыг илрүүлэх нярайн скрининг шинжилгээ хийж байгаа ба зарим өндөр хөгжилтэй орнууд нярайд 50 гаруй төрлийн эмгэгийг илрүүлэх скрининг шинжилгээ хийж байна.¹⁸ Манай улсад 2010 оноос ТАГ-ыг нярайн скрининг шинжилгээгээр эрт илрүүлж эхэлсэн. Тус шинжилгээгээр бамбай сэдээх дааврын хэмжээ 20 МОУН/мл-ээс өндөр гарсан тохиолдолд давтан шинжилгээнд хамруулах ба энэ үед БСД-ын хэмжээ 16 МОУН/мл-ээс их, сийвэн дэх нийт Т4 66 нмол/л-ээс бага, БСД-ын хэмжээ 10 МОУН/мл-ээс их бол төрөлхийн анхдагч гипотиреоз гэж оношилно.¹⁹

Wang F (2017) нарын судалгаагаар нярайн скрининг шинжилгээ (НСШ)-ээр оношлогдсон 100 ТАГ-той хүүхдэд Illumina болон Сангерийн аргаар шинжлэхэд 6 хүүхдэд *NKX2.1*, *FOXE1*, *PAX8*, *NKX2.5*, *TSHR* генийн мутацийг тус тус илрүүлжээ. БСД ихэссэн, ББД хэвийн, бага зэрэг гипоплазитай бамбай булчирхайтай 3 өвчтөнд *TSHR* генийн p.R450H илэрсэн. Тус судалгаагаар *TSHR* генийн мутаци нь *NKX2.1*, *FOXE1*, *NKX2.5*, *PAX8* генийн мутациудтай харьцуулахад ТАГ-той өвчтөнүүдэд их байгааг илрүүлсэн.²⁰

Улс орон бүрд ТАГ-той хүүхдүүдийн дундах *TSHR* генийн мутацийн давтамж харилцан адилгүй байна. Zhang HY (2024) нарын судалгаанд 367 ТАГ-той хүүхдүүдийн дунд бүх экзоны дараалал тогтоох

аргаар *TSHR* генийн 17 мутацийг илрүүлсэн. Үүний үр дүнд *TSHR* мутацийн тархалт (45/367) 12.3% байсан ба биаллель гомозигот ба нийлмэл гетерозигот p.R450H нь хамгийн өндөр давтамжтай (2.7%) байжээ.²¹ Хуе Р (2021) нарын судалгаанд 125 ТАГ-той хүнд NGS аргаар *TSHR* генийн мутацийг тодорхойлсон. Үүний үр дүнд 14 хүнд *TSHR* генийн 11 миссенс мутаци илэрсэн ба *TSHR* генийн мутацийн дотор p.F525S (4/14) нь 0.016 аллель хамгийн их давтамжтай байсан бол дараа нь p.R450H (3/14) 0.012 аллелийн давтамж өндөр байна.¹² Shreder EV (2023) нарын судалгаанд ТАГ-той 95 хүнд Illumina NGS аргаар *TSHR* генийн мутацийг тодорхойлсон. Үүний үр дүнд 5.3% (5/95)-д *TSHR* генийн мутаци тодорхойлогдсон. Эдгээрийн хоёр хүүхдэд *TSHR* генийн гетерозигот p.R450H ба p.D487N хувилбар, хоёр хүүхдэд p.S49Afs хувилбарын хувьд гомозигот, нэг хүүхдэд гетерозигот (p.A485D ба p.R450H) илэрсэн.²² Харин Тайваньд НСШ-ээр оношлогдсон хэвийн болон гипоплазитай бамбай булчирхайтай 71 ТАГ-той хүний дунд *TSHR* генийн гомозигот p.R450H (с.1349A/A) мутацийн давтамж 1.4% (1/71), гетерозигот p.R450H (с.1349G/A) мутацийн давтамж 5.6% (4/71) байв.¹¹ Иймээс *TSHR* генийн мутациудаас Азид хамгийн нийтлэг тохиолдож байгаа нь p.R450H мутаци байна.

Narumi S (2009) нарын судалгаагаар НСШ-ээр 353000 нярайгаас ТАГ оношлогдсон 102 нярайд NGS аргаар *TSHR* генийн мутацийг тодорхойлсон. Тус судалгаанд биаллелийн гомозигот *TSHR* мутаци (1/70) болон гетерозигот *TSHR* мутаци (2/70) дунд болон хүнд хэлбэрийн ТАГ-той өвчтөнүүдийн ойролцоогоор 4.3%-ийг эзэлж байсан. Харин хөнгөн хэлбэрийн ТАГ-той өвчтөнүүдийн дунд моноаллель гетерозигот мутаци 9.4% (3/32) байна.¹⁰ Харин Zhang HY (2024) нарын судалгаанд биаллель *TSHR* генийн R450H гомозигот (2/18), p.G132R/p.R450H нийлмэл гетерозигот (2/18) мутацитай өвчтөнүүдэд хөнгөн хэлбэрийн ТАГ байсан. Харин биаллель p.R450H/p.F525S нийлмэл гетерозигот мутацитай өвчтөнүүд (2/18) дунд хэлбэрийн ТАГ-той байжээ.²¹

TSHR генийн R450H мутацийн үйл ажиллагааны талаар Tsunekawa K (2014) нарын судалгаагаар p.R450H (с.1349Г>А) мутаци нь БСД-ын рецепторын эхний трансмембранд байрлах 450 дахь кодонд аргинин (ЦГЦ)-ыг гистидин (ЦАЦ)-ээр солих мутацийн үр дүнд БСД-тай холбогдох, БСД-ын циклик аденозин монофосфатын (цАМФ) хариу урвал, *TSHR*-ийн эсийн гадаргуугийн экспрессийг тус тус бууруулдаг.¹³ Narumi S (2009) нарын судалгаагаар *in vitro* *TSHR* генийн 4 өөр мутацийн үйл ажиллагааг үнэлэхэд D403N болон R450H мутацийн үед цАМФ-ын нийлэгжил 80% (p=0.05) болон 78% (p=0.001) буюу хамгийн ихээр буурч байжээ.¹⁰

Харин тус мутацийн удамшлын хувьд авч үзэхэд Narumi S (2009) нарын судалгаагаар өвчтөнүүдийн эцэг эх, төрсөн дүү нарт генетикийн шинжилгээ хийхэд 2 өвчтөний гэр бүлд p.R450H-ийн хувьд гетерозигот дөрвөн хүнийг илрүүлсэн. Эдгээр дөрвөн хүний ийлдэс дэх БСД-ын түвшин (3.4–4.1 мОУН/л) бүгд хэвийн, бамбай булчирхайн өвчлөлийн эрсдэлт хүчин зүйлгүй байсан.¹⁰ Zhang HY (2024)

нарын судалгаанд *TSHR* генийн R450H биаллелийн хоёр өвчтөний эцэг эхийг шинжилгээнд хамруулахад гомозигот пробандын эцэг эх аль аль нь гетерозигот байсан. Харин нийлмэл гетерозигот (p.G132R, p.R450H) пробандын эцэг нь гетерозигот G132R, ээж нь гетерозигот R450H байжээ.²¹ Иймд *TSHR* генийн p.R450H мутаци нь аутосомын рецессивээр удамшдаг. Бидний судалгаагаар нярайн скрининг шинжилгээгээр ТАГ оношлогдсон хатаасан цусанд Азийн орнуудад нийтлэг тохиолдох *TSHR* генийн p.R450H мутацийг тодорхойлсон бөгөөд үүний үр дүнд гетерозигот генотип G/A 2 (14.3%) сорьцод, 1 (7.1%) сорьцод A/A генотип тус тус илэрсэн.

Дүгнэлт: 2012-2024 оны хооронд нярайн скрининг шинжилгээгээр оношлогдсон төрөлхийн анхдагч гипотиреозтой хүүхдийн дунд *TSHR* генийн p.R450H гомозигот, гетерозигот мутаци 21.4% тус тус тодорхойлогдлоо.

Ном зүй:

1. Klosinska M, Kaczynska A, Ben-Skowronek I. Congenital Hypothyroidism in Preterm Newborns - The Challenges of Diagnostics and Treatment: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:860862.
2. Deladoëy J, Ruel J, Giguère Y, Van Vliet G. Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Québec. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(8):2422-2429.
3. Waller DK, Anderson JL, Lorey F, Cunningham GC. Risk factors for congenital hypothyroidism: An investigation of infant's birth weight, ethnicity, and gender in California, 1990–1998. *Teratology*. 2000;62(1):36-41.
4. Hinton CF, Harris KB, Borgfeld L, et al. Trends in incidence rates of congenital hypothyroidism related to select demographic factors: data from the United States, California, Massachusetts, New York, and Texas. *Pediatrics*. 2010;125 Suppl 2:S37-47.
5. Hashemipour M, Hovsepian S, Ansari A, Keikha M, Khalighinejad P, Niknam N. Screening of congenital hypothyroidism in preterm, low birth weight and very low birth weight neonates: A systematic review. *Pediatrics and neonatology*. 2018;59(1):3-14.
6. Lau CS, Joseph R, Aw TC. Screening for Congenital Hypothyroidism. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 2020;49(12):934-936.
7. Wassner AJ. Congenital Hypothyroidism. *Clinics in Perinatology*. 2018;45(1):1-18.
8. Jeziorowska A, Pniowska-Siark B, Brzezińska E, Pastuszek-Lewandowska D, Lewiński A. A novel mutation in the thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor gene in a case of congenital hypothyroidism. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2006;16(12):1303-1309.
9. Persani L, Calebiro D, Cordella D, et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;322(1-2):72-82.
10. Narumi S, Muroya K, Abe Y, et al. *TSHR* mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(4):1317-1323.
11. Chang WC, Liao CY, Chen WC, et al. R450H TSH receptor mutation in congenital hypothyroidism in Taiwanese children. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(11-12):1004-1007.
12. Xue P, Yang Y, Yun Q, Cui Y, Yu B, Long W. Variant of *TSHR* is Not a Frequent Cause of Congenital Hypothyroidism in Chinese Han Patients. *International journal of general medicine*. 2021;14:4135-4143.
13. Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, et al. Frequency and clinical implication of the R450H mutation in the thyrotropin receptor gene in the Japanese population detected by Smart Amplification

- Process 2. *BioMed research international*. 2014;2014:964635.
14. Алтантуяа Ц. Төрөлхийн анхдагч гипотиреозыг нярайн тандалт шинжилгээгээр илрүүлж, эмнэлзүйн хэлбэрүүдийг тогтоох нь [Анагаах ухааны докторын зэрэг горилсон нэг сэдэвт бүтээл]. Улаанбаатар: Хүүхдийн анагаах ухаан, Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний их сургууль; 2021.
 15. Aslam M, Naeem F, Seher R, Zubair Shabbir M, Shehzad W, Imran M. Effect of storage temperature and duration on direct PCR amplification of various feather types and DBS matrices. *Gene*. 2023;854:147116.
 16. Ramos-Díaz R, Gutiérrez-Nicolás F, Nazco-Casariago GJ, González-Perera I, Pérez-Pérez JA. Validation of a fast and low-cost alkaline lysis method for gDNA extraction in a pharmacogenetic context. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2015;75(5):1095-1098.
 17. Choi EH, Lee SK, Ihm C, Sohn YH. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong public health and research perspectives*. 2014;5(6):351-357.
 18. Cherella CE, Wassner AJ. Congenital hypothyroidism: insights into pathogenesis and treatment. *International journal of pediatric endocrinology*. 2017;2017:11.
 19. Tsevee A, Batjargal K, Munkhchuluun T, et al. First Experiences with Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism in Ulaanbaatar, Mongolia. *International journal of neonatal screening*. 2021;7(2).
 20. Wang F, Liu C, Jia X, et al. Next-generation sequencing of NKX2.1, FOXE1, PAX8, NKX2.5, and TSHR in 100 Chinese patients with congenital hypothyroidism and athyreosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;470:36-41.
 21. Zhang HY, Wu FY, Li XS, et al. TSHR Variant Screening and Phenotype Analysis in 367 Chinese Patients With Congenital Hypothyroidism. *Annals of laboratory medicine*. 2024;44(4):343-353.
 22. Shreder EV, Vadina TA, Solodovnikova EN, et al. [Pathogenic TSHR variants in children with thyroid dysgenesis]. *Problemy endokrinologii*. 2023;69(1):76-85.

Detection of the R450H mutation in the *TSHR* gene in neonates diagnosed with congenital primary hypothyroidism through neonatal screening

Nomindelger T¹, Nomunbileg M¹, Elberelt U², Erdenetuya G³, Munkhsetseg B¹

¹Department of Molecular biology and Genetics, School of Bio-Medicine, MNUMS

²Institute of Biomedical sciences, MNUMS

³Department of Pediatrics, School of Medicine, MNUMS

E-mail: nomindelger@mnum.edu.mn, Tel: +976-99806018

Abstract:

Background: Congenital hypothyroidism (CH) is a condition characterized by a decrease in the amount of thyroid hormones in the blood or a complete lack of thyroid function due to a decrease in the amount of thyroid hormones in the blood or a complete lack of thyroid hormones. CH occurs in 1 per 3000-4000 live births worldwide. The clinical symptoms of CH are initially subtle, usually appearing within a month of birth, and if diagnosis and treatment are delayed, it can lead to physical and mental developmental delays and eventual disability. The cause of the disease is not fully known, but it is believed to be influenced by maternal iodine deficiency and mutations in genes responsible for neonatal thyroid development (*TSHR*, *PAX8*, *NKX2-1*, and *FOXE1* transcription factors). More than 40 types of *TSHR* gene mutations are causing CH. Studies conducted in Japan, China, and Taiwan have shown that the p.R450H mutation in the *TSHR* gene is a risk factor for CH. In Mongolia, a newborn screening analysis of congenital hypothyroidism revealed a rate of 1 case per 2091 live births in 2021, which is higher than the global average. However, there is a lack of molecular genetic research on this condition in the country.

Aim: To identify of p.R450H mutation in the *TSHR* gene among neonates diagnosed with congenital hypothyroidism through neonatal screening

Materials and Methods: The study used dried blood spots from 17 children diagnosed with congenital hypothyroidism at Mongolian-Japanese University hospital and Central Hospital of MNUMS from 2012 to 2024. To identify an optimal method for DNA extraction from dried blood samples, we evaluated five different protocols. DNA was extracted using the method that yielded the highest quantity and purity, and the *TSHR* gene was subsequently amplified by PCR. Detecting the p.R450H mutation of the *TSHR* gene, the PCR product was cut with *FauI* restriction enzyme and the results were evaluated by gel electrophoresis.

Results: In our study, DNA isolation from dried blood using methods 1 and 2 had high yield and purity, so we isolated DNA from samples of 17 children diagnosed with congenital primary hypothyroidism and amplified the *TSHR* gene by PCR. When the PCR products were run through gel electrophoresis, 14 samples were amplified by PCR. After that, the genotype of the p.R450H mutation of the *TSHR* gene was determined by fragment length polymorphism analysis, and 11 (78.6%) samples were found to have the G/G genotype, 2 (14.3%) samples were found to have the G/A genotype, and 1 (7.1%) sample was found to have the A/A genotype, respectively.

Conclusion: Among children with congenital hypothyroidism diagnosed through newborn screening test between 2012 and 2024, the p.R450H homozygous and heterozygous mutation in the *TSHR* gene was 21.4%.

Keywords: Congenital hypothyroidism, Dried blood spot, *TSHR* Gene, p.R450H mutation, Fragment Length Polymorphism Analysis