

АМЕЛИНА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ФЕНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНИЛКЕТОНУРИИ
В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» и в Федеральном Государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Южный федеральный университет» академии биологии и биотехнологии

Научный руководитель:

Зинченко Рена Абульфазовна, доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:

Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Акуленко Лариса Вениаминовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Демикова Наталия Сергеевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской генетики с курсом пренатальной диагностики Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита диссертации состоится «__»_____2016 года на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.016.01 при Федеральном Государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул.Москворечье, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

Автореферат разослан «__»_____2016

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 001.016.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор

**Зинченко
Рена Абульфазовна**

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Фенилкетонурия (ФКУ) – одно из наиболее изученных наследственных заболеваний обмена веществ. На модели ФКУ показано, как нарушение одного из звеньев метаболизма только одной аминокислоты приводит к формированию характерного симптомокомплекса, с поражением центральной нервной системы, и как лечение, заключающееся в ограничении поступления в организм данной аминокислоты, позволяет предотвратить клинические проявления заболевания. Разработка и массовое внедрение в практическое здравоохранение большинства стран мира скрининга новорожденных на ФКУ и назначение диетического лечения позволили значительно сократить количество детей с умственной отсталостью (Scriver C.R., 2007; Williams R.A. et al., 2008; Harms E., Olgemöller B., 2011; Berry S.A. et al., 2013; Blau N., 2016).

Частота ФКУ варьирует у населения разных регионов и стран мира, в среднем составляя 1:10000 (Mitchell J.J., 2013). Наибольшие показатели частоты ФКУ зарегистрированы в Турции (1:2600) и Иране (1:3627) (Ozalp Y. et al., 1986; Zare-Karizi Sh. et al., 2011), наименьшие в Финляндии (1:100000) (Scriver C.R. et al., 2001) и Японии (1:120000) (Okano Y. et al., 2011). В Российской Федерации частота ФКУ колеблется от 1:3000 в Карачаево-Черкессии до 1:18000 в Республике Тыва, в среднем по стране составляя 1:7142 (Ондар Э.А. и др., 2005; Новиков П.В., Ходунова А.А., 2012; Гундорова П. и др., 2015).

В 97-98% случаев развитие ФКУ связано с мутациями в гене *PAH* (612349), кодирующем фермент фенилаланингидроксилазу (ФАГ), идентифицированные в 80-х годах прошлого столетия (Kwok S.C.M. et al., 1985; DiLella A.G. et al., 1986). Ген *PAH*, локализованный на хромосоме 12 (12q23.2), содержит 13 кодирующих экзонов (<http://omim.org/entry/612349>). В настоящее время в гене *PAH* описано 955 различных мутаций (по состоянию на май 2016 года), которые неравномерно распределены по всему гену формируя «горячие участки» в каталитическом домене (Mitchell J.J., 2013; Donlon J. et al., 2014).

С внедрением молекулярно-генетических методов определены спектр и частоты мутаций в гене *PAH* в различных популяциях мира. Данные исследования показали наличие региональных и этнических особенностей. В средиземноморских популяциях частой мутацией является IVS10-11G>A, в Дании и Англии - IVS12+1G>A, в Скандинавии - Y414C. Вариант I65T является частым в Западной Европе, а R408W гаплотип 1 - часто выявляется на Британских островах, в то время как гаплотип 2 характерен для Восточной Европы и Балтийских стран (Tansek M.Z. et al., 2015). В России наиболее частыми являются мутации: R408W (61,4%), P281L (4,95%), IVS10-11G>A (4,1%), R261Q (3,3%), IVS12+1G>A (2,3%), R252W (1,82%), R158Q (1,65%) (Степанова А.А., 2005). Показано, что спектр мутаций, характерный для отдельных регионов, является результатом сочетания основных факторов популяционной динамики, включающих миграционные процессы, эффект основателя, генетический дрейф, и, вероятно, преимущество гетерозигот (Tansek M.Z. et al., 2015).

Мутации в гене *PAH* приводят к различным по степени тяжести клиническим и биохимическим фенотипам, формируя диапазон клинических форм от тяжелой ФКУ до

умеренной ГФА. Выделяют мутации, которые приводят к более тяжелой форме ФКУ в связи с их более значимым влиянием на структуру и функцию фермента. Результаты исследований демонстрируют корреляцию между характером мутаций и тяжестью заболевания у значительного числа больных. В большинстве случаев возможно прогнозирование фенотипа исходя из знаний о генотипе (Kayaalp E. et al., 1997; Guldborg P. et al., 1998; Daniele A. et al., 2007; Blau N. et al., 2010; Blau N., 2016). Тем не менее, корреляция между генотипом и фенотипом у больных ФКУ не является абсолютной, и пациенты с аналогичными генотипами в некоторых случаях могут иметь различные формы ФКУ (Scriver C. R., 2007).

Успехи в области молекулярной генетики и проведение неонатального скрининга позволили выявить и описать атипичные формы ФКУ. Рядом исследователей было показано, что в основе патогенеза вариантных форм лежит дефицит тетрагидробиоптерина, который является кофактором фермента фенилаланингидроксилазы. За время проведения скрининга на ФКУ описаны единичные случаи гиперфенилаланинемии, обусловленные нарушением обмена тетрагидробиоптерина, составляющие не более 1 - 3% от всех пациентов с повышенным уровнем ФА (Scriver, C.R., 2007; Blau N. et al., 2011; Werner E. et al., 2011).

До настоящего времени остаются актуальными изучение частоты и молекулярно-генетическое обследование больных ФКУ в конкретных регионах с целью выявления различных форм, прогнозирование тяжести заболевания по генотипу для обеспечения персонализированного подхода в лечении больного ФКУ, установления территориальной и этнической специфичности распространения мутаций в гене *PAH*, в том числе в Ростовской области.

Цель исследования: Изучить фено-генетические особенности и эпидемиологию фенилкетонурии в Ростовской области.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту ФКУ в Ростовской области по данным неонатального скрининга.
2. На основании молекулярно-генетического исследования определить частоту и спектр мутаций в гене *PAH* у пациентов с ФКУ, а также при необходимости в генах тетрагидробиоптеринового обмена. Изучить спектр и частоты мутаций в гене *PAH* у пациентов с ФКУ различных этнических групп в РО.
3. Оценить частоту гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH* для населения РО среди здорового населения области по данным неонатального скрининга и скрининга мутации R408W среди здорового населения области.
4. Изучить частоту и спектр генотипов и фенотипов у больных ФКУ. Изучить особенности клинических форм ФКУ (кФКУ, мФКУ, ГФА) у пациентов РО. Исследовать взаимосвязь генотипов в гене *PAH* и фенотипов у пациентов ФКУ.

Научная новизна исследования.

Впервые проведено комплексное генетико-эпидемиологическое обследование пациентов с ФКУ в Ростовской области. На основании скрининга новорожденных (1997-2014 гг.) определена частота ФКУ, которая составила 1:6077 новорожденных. Анализ

вариации значений частоты ФКУ в разные годы за период проведения скрининга не выявил статистически значимых отличий.

Впервые исследованы спектр и частоты мутаций в гене *PAH* с использованием методов ДНК анализа (ПЦР, секвенирование по Сенгеру и MLPA анализ) в группе пациентов с классической ФКУ, мягкой ФКУ и гиперфенилаланиемией (ГФА), позволившее выявить 40 различных мутаций. Наиболее частыми определены мутации R408W (62,31%), IVS12+1G>A (3,85%), IVS10-11G>A(3,85%), R261Q (3,85%), P281L (2,69%), R158Q (2,69%), R252W (1,92%), EX5DEL (1,92%) R261X (1,20%). Обнаружены две ранее не описанные мутации - Y268C (0,38%), c.1298dupT (0,38%). Информативность составила 100%.

Впервые проведенный анализ спектра и частот мутаций в гене *PAH* с учетом национальной принадлежности больных ФКУ РО показал наличие этнических особенностей. Для русского населения РО самыми частыми являются мутации: R408W (аллельная частота составила 69,47%), IVS12+1G>A (3,46%), R261Q (2,69%) и R158Q (2,31%). Мутация R408W в гомозиготном состоянии выявлена у 54,95% русских больных. Среди больных ФКУ армянской национальности частыми оказались мутации IVS10-11G>A (40,0% среди армян) и R252W (20,0% у армян). У больных ФКУ турок-месхетинцев мутация R408W и IVS10-11G>A встречаются на 40,0% хромосом каждая.

Впервые, оценена частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH*, на основании закона Харди-Вайнберга по данным неонатального скрининга, которая составила 2,60% (1:39 человек), и частота мутации R408W при ДНК-тестировании здоровых индивидов (анализ 940 хромосом), проживающих в различных районах области, которая составила 2,13% (1:47).

Впервые проведен анализ гено-фенотипических корреляций, изучена взаимосвязь между генотипом (49 различных генотипов) и показателем (ФА) до начала лечения и на фоне проводимой диетотерапии. Установлены статистически значимые коэффициенты корреляции, свидетельствующие о наличии генотип-фенотип корреляции у большинства пациентов с диагнозом ФКУ (классической, мягкой и гиперфенилаланиемией), обратной зависимости между активностью фермента и показателями уровня ФА и прямой зависимости между уровнями ФА до лечения и на диетотерапии у больных.

Практическая значимость исследования

Проведено медико-генетическое консультирование семей с различными формами ФКУ (классической, мягкой и гиперфенилаланиемией). На основании подтверждающей ДНК-диагностики и идентифицированных мутаций в 7 семьях с ФКУ проведена пренатальная диагностика.

Создана база данных больных ФКУ, включающая генеалогические данные, описание клинических симптомов, данные биохимических, инструментальных и молекулярно-генетических исследований, которая послужит основой для регионального регистра, позволяющего осуществлять активный мониторинг отягощенных семей.

Полученные данные о высоких значениях гено-фенотипической корреляции обеспечивают как прямые, так и косвенные свидетельства о наличии взаимосвязи между генотипом и фенотипом у большинства пациентов с диагнозом ФКУ и требуют

персонализированного подхода при терапии больных с различными формами ФКУ (классической, мягкой).

Впервые в РО у пациента с повышением уровня ФА в крови выявлены мутации N52S и P87S в гене *PTS*, что позволило поставить диагноз ГФА ВН4А и назначить патогенетическую терапию препаратом саптоптерин дигидрохлорид (КУВАН).

Положения, выносимые на защиту:

1. По данным неонатального скрининга (1997-2014 гг) частота ФКУ в РО составляет $0,16 \pm 0,01\%$ (1:6077). Статистически значимых различий в значениях частоты ФКУ в разные годы проведения скрининга не выявлено.
2. Диагностическая эффективность ДНК-диагностики у больных с ФКУ РО при применении методов ПЦР, секвенирование по Сенгеру и MLPA-системы составила 100%. Выявлено 40 различных мутаций в гене *PAH*, в том числе 8 частых для РО: R408W (62,31%), IVS10-11G>A (3,85%), IVS12+1G>A (3,85%), R261Q (3,85%), P281L (2,69%), R158Q (2,69%), EX5del (1,92%) и R252W (1,92%).
3. Установлены этнические различия, как в спектре мутаций в гене *PAH*, так и в аллельных частотах. У русских больных ФКУ определены 4 мажорные мутации для РО (R408W – 69,47%, IVS12+1G>A – 3,46%, R261Q – 2,69% и R158Q – 2,31%), у армян – IVS10-11G>A (40%) и R252W (20%), у турок-месхетинцев - R408W (40%), IVS10-11G>A (40%), у даргинцев - R261X (75%).
4. Частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH*, рассчитанная исходя из частоты ФКУ среди новорожденных по данным неонатального скрининга, составила 2,60% (1:39 человек). Частота гетерозиготного носительства мутации R408W, оцененная путём ДНК-скрининга здоровых индивидов составила 2,13% (1:47 человек).
5. Определена обратная регрессионная зависимость между активностью фермента ФАГ и средними значениями уровня ФА в группах ФА «скрининг» ($r = -0,88 \pm 0,28$), ФА «ретест» ($r = -0,96 \pm 0,17$) и ФА «диета» ($r = -0,89 \pm 0,32$).
6. Доля больных с тяжелыми формами классической ФКУ в РО составляет 77,69%, мягкой ФКУ - 16,92%, ГФА - 5,39%. Эффективность заместительной диетотерапии – 97%.

Степень достоверности результатов

Основные положения диссертационной работы базируются на материалах первичной документации и полностью им соответствуют. Результаты, полученные автором вследствие генетико-эпидемиологического анализа и клиничко-молекулярно-генетических данных, свидетельствуют о решении поставленных задач. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, основных научных положений диссертации определяются достаточно большим объемом материала: вся Ростовская область (265 пациентов). Для сравнительного анализа привлечено достаточное количество данных отечественной и зарубежной литературы (более 200 источников). Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

В соответствии с формулой специальности «03.02.07 - Генетика (медицинские науки)», охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни».

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации доложены: на VI съезде Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010; European Human Genetics Conference 2013, June 8-11, 2013, Paris, France; European Human Genetics Conference 2014, May 31-June 3, 2014, Milan, Italy; V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013; European Human Genetics Conference 2015, June 3-9, 2015, Glasgow, Scotland; на Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва, 19 марта 2015; XI Международная (XX Всероссийская) на XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва, 17 марта 2016; на VII съезде Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015; в стендовом докладе, на «European Conference of Human Genetics», May 21-24, 2016, Barcelona, Spain.

Работа прошла экспертную комиссию и рекомендована к защите на заседании Ученого совета ФБГНУ «МГНЦ».

Личный вклад автора в выполнение исследования

Автор непосредственно участвовала в разработке самой идеи, организации и проведении всех этапов исследования, при формулировании цели и задач, выборе методов исследования, обработке медицинского и статистического материала, анализе и интерпретации полученных данных, а также в подготовке публикаций по диссертационной теме. Автор принимала участие в планировании и проведении экспедиционных работ с целью выявления семей с ФКУ. Автором лично проведен осмотр больных ФКУ и членов их семей в Ростовской области, осуществлен забор биологического материала, заполнение медицинских карт. Автор лично формировал регистр больных с ФКУ и осуществлял мониторинг семей с назначением заместительной диетотерпии с учетом персонализированного подхода. Автором досконально изучена и проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, проведен математический анализ данных, сформулированы результаты и выводы. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах и доложены на научных конференциях.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 15 печатных работ соискателя, в том числе 5 статей – в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук.

Структура и объём диссертации

Диссертация имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения. Работа представлена на 130 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 20 рисунков. Библиографический указатель включает 212 наименований, из них 43 отечественных и 169 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование проводилось на территории Ростовской области, охватывая все население, проживающее во всех городах и районах области. В РО, по данным ГБУ РО «МИАЦ» на 1 января 2015 г., проживало 4242080 (<http://www.miacrost.ru/>). Национальный состав населения РО, по данным Всероссийской переписи населения 2010 года, на 90,3% представлен русскими - (3795,6 тыс. человек), всего зарегистрировано более 150 представителей различных национальностей (<http://rostov.gks.ru/>).

Объектом исследования являются пациенты с ФКУ/ГФА, проживающие на территории РО и зарегистрированные в областной базе данных ФКУ. В настоящее время в регистре содержится информация о 265 пациентах из 248 семей.

Из 265 пациентов зарегистрированных в базе данных ФКУ, 61 больной выявлен при проведении селективного скрининга и 204 при проведении неонатального скрининга, что составило 23,02% и 76,98% соответственно. При проведении неонатального скрининга с диагнозом ФКУ выявлено 140 больных (68,63%) и с ГФА - 64 ребенка (31,37%). Соотношение больных ФКУ и ГФА составило 2,19:1. В группе наблюдается незначительное преобладание лиц мужского пола – 136 (51,32%) против 129 лиц женского пола (48,68%), соотношение М:Ж – 1,1:1.

Все семьи были приглашены на прием к врачу-генетику для проведения молекулярно-генетического исследования. На приглашение откликнулись 120 семей (131 больной). На каждого больного заполнялась генетическая карта с обязательным составлением родословной. При составлении родословной учитывали сведения о местах рождения родителей пробандов, их национальной принадлежности, наличие кровнородственных браков, а также информацию о заболеваниях и причинах смерти членов родословной. Этническая принадлежность пробанда регистрировалась с учетом национальности обоих родителей и прауродителей.

При обследовании, все пациенты подписали письменное информированное согласие (в случае несовершеннолетних детей информированное согласие получено у их родителей) на добровольное участие в исследовании, на забор биологического материала (кровь) и на публикацию в печати. Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Материалом для исследования служили бланки с кровью или венозная кровь.

Методы исследования

Биохимическое исследование - определение уровня фенилаланина у больных ФКУ (в динамике) осуществляли в клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ РО «Перинатальный Центр» флуориметрическим методом. Исследование проводили с применением набора реагентов для количественного определения фенилаланина в сухих пятнах крови (Россия) на приборе «Victor-2» (Wallac Oy/Perkin Elmer Life Sciences (Финляндия)).

Молекулярно-генетические методы исследования проведены в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» (зав. лабораторией д.б.н., профессор А.В. Поляков). Проводилось исследование мутаций в гене *PAH*, при отсутствии мутаций поиск осуществляли в генах ответственных за формирование ГФА ВН4.

Выделение геномной ДНК, из лейкоцитов периферической крови пациентов, выполнялось с помощью набора реактивов для выделения DNA Prep100 (DIAtom™) в соответствии с протоколом производителя.

Поиск 8 наиболее частых мутаций в гене *PAH* (R408W, R252W, P281L, R158Q, R261Q, IVS4+5G>T, IS10-11G>A, IVS 12+1G>A) проводили методом аллельспецифичной мультиплексной лигазной реакции (MLPA). Метод полимеразной цепной реакции применялся для выявления других точечных мутаций. Амплификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводилась по методу ПЦР, с помощью программируемого термоциклера МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Определение образцов нуклеотидной последовательности, для которых не выявлены мутации на первом этапе, проводились методом прямого секвенирования продукта ПЦР, как с прямого, так и с обратного праймера, на основе ферментативного сиквенса по Сенгеру. Для проведения сиквенса, в качестве матрицы, использовались фрагменты, полученные после проведения ПЦР (Степанова А.А., 2005). Поиск крупных делеций в гене *PAH* осуществляли с применением количественной мультиплексной лигазной реакции (MLPA) на программируемом термоциклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Оценка гетерозиготного носительства среди здоровых доноров по мутации R408W гена PAH

Для определения частоты мутации R408W в РО проведен скрининг здоровых неродственных индивидов из пяти районов области. Исследование было добровольным. Во всех случаях получено информированное согласие о проведении данного исследования. Все доноры выбраны с учетом проживания на территории РО не менее 3-х поколений.

Группа здоровых доноров в основном представлена старшеклассниками общеобразовательных школ и колледжей - 88%, остальные 12% - взрослые доноры станции переливания крови. В общей сложности обследовано 470 индивидов из следующих районов области: Миллеровский – 108, Цимлянский – 96, Волгодонской – 93, Целинский – 92, Родионово-Несветаевский – 81. Молекулярно-генетическое исследование по определению мутации R408W в гене *PAH* проведено в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» под руководством проф. Полякова А.В.

Генетико-статистические методы исследования

В ходе исследования использовались стандартные методики статистического анализа.

Частота ФКУ рассчитана как отношение больных, выявленных при проведении неонатального скрининга к общему числу новорожденных в РО:

$$p = p_1/n = (p_1/n) \cdot 1000$$

$$p + q = 1 \quad p + q = 1000$$

где p_1 – число наблюдений с заданным признаком (число детей с ФКУ),

n – общее число наблюдений, то есть размер обследованной выборки.

Среднюю ошибку выборочной доли S_p рассчитывали по следующей формуле:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} = \sqrt{\frac{pq}{n}} \quad \text{или} \quad S\% = \sqrt{\frac{p(1000-p)}{n}} = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

При проведении расчета популяционной частоты ФКУ в РО использовались данные областного комитета статистики, содержащие информацию о количестве новорожденных детей (для каждого города и района) (<http://www.miacrost.ru/>).

Расчет гетерозиготного носительства мутаций в гене *РАН* проведен на основании закона Харди-Вайнберга по формулам:

1. $p + q = 1$; где p - частота одного аллеля,

q - частота второго аллеля.

2. $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

где p^2 - доля гомозигот по одному из аллелей,

q^2 - доля гомозигот по альтернативному аллелю,

$2pq$ - доля гетерозигот.

Средневзвешенные значения ФА для каждого больного отдельно и в группе в целом рассчитывались для сравнения значений ФА в группах пациентов.

Коэффициент корреляции Пирсона, который характеризует степень линейной зависимости между переменными, использован для сравнения значений уровня ФА, оцениваемых в двух выборках (Животовский Л.А., 1991).

Оценка взаимосвязи клинических проявлений от генотипа в гене *РАН*

Относительная активность ФАГ в генотипе рассчитывалась на основании данных базы ВЮРКУ (www.biorku.org), как сумма остаточной активности ФАГ 1 аллеля и 2 аллеля, деленная на 2 (Karacić I. et al., 2009). Активность ФАГ выражена в процентах к ФАГ «дикого типа», исследование экспрессии ФАГ проводилось рекомбинантным методом в различных клеточных системах (по данным базы ВЮРКУ (www.biorku.org)).

Все необходимые вычисления выполнены с использованием пакета программ Statistica for Windows 7.0, программа Excel. Все применяемые статистические методы хорошо описаны и представлены в современной литературе (Герасимов А.Н., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота ФКУ в Ростовской области

В рамках проведения комплексного генетико-эпидемиологического исследования (данные неонатального скрининга, и самостоятельного генетико-эпидемиологического

исследования) по изучению моногенной патологии изучены фено-генетические особенности и эпидемиология ФКУ в РО.

Неонатальный скрининг на ФКУ в РО проводится с 1.01.1993 г. С 1997 г. процент охвата новорожденных скринингом составил - 97,52%. За период 1997-2014 гг. в общей сложности обследовано 747487 из 759750 новорожденных (98,36%) и выявлено 178 детей с повышенными значениями ФА, из них 123 больных ФКУ и 55 детей с ГФА.

Данные неонатального скрининга позволили определить частоту ФКУ в РО, которая за период максимального (98,36%) охвата 1997-2014 гг. составила - 1:6077 ($0,16 \pm 0,01\%$). На графике (рис. 1) представлены показатели частоты ФКУ в РО (1993-2014 г.).

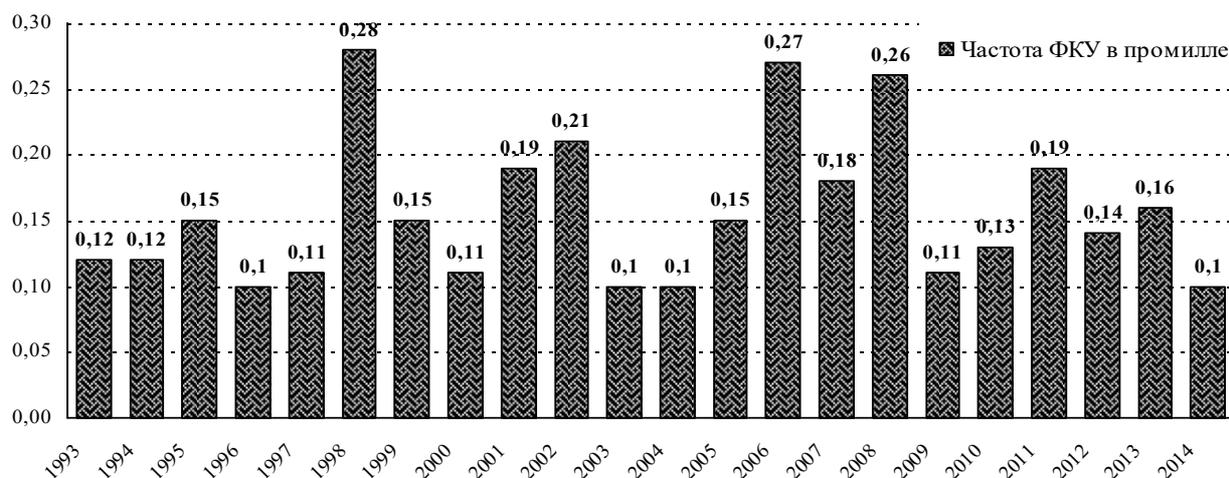


Рис. 1. Частота ФКУ в РО по данным неонатального скрининга (1993-2014 гг.).

Анализ частоты ФКУ за период проведения скрининга (в разные годы) не выявил статистически значимых отличий от среднего значения по области. Определенные значения частоты ФКУ в РО соответствуют средним показателям частоты ФКУ по России (1:7142) и Европы (1:8034).

Спектр мутаций в гене *PAH* у пациентов с ФКУ в Ростовской области

Молекулярно-генетическое обследование с целью поиска мутаций в гене *PAH* проведено 130 пациентам (260 хромосом) из 120 семей, из них 124 больных ФКУ и 7 детей с ГФА. Средний возраст детей в группе составил $12,3 \pm 4,7$, лиц женского пола 67 (51,54%), что несколько больше, чем лиц мужского пола 63 (48,46%), соотношение по полу составило 1:0,94, что соответствует по области в целом 1:0,86.

ДНК-исследование выявило 40 мутаций в гене *PAH*, диагностическая эффективность составила 100%. В ходе исследования определены 2 ранее не описанные мутации в гене *PAH* – Y268C и c.1298dupT (частота составила 2,50% и 2,50% от общего числа выявленных мутаций и 0,38% и 0,38% от общего числа исследованных хромосом, соответственно).

В таблице 1 представлены спектр, частота и тип каждой выявленной мутации в гене *PAH*, а также остаточная активность ФАГ для каждой мутации по данным базы BIOPKU (www.biopku.org).

При анализе локализации и типу выявленных мутаций определено, что в РО чаще встречаются миссенс мутации (21 мутация-52,50% от общего числа выявленных мутаций/81,54% от общего числа исследованных хромосом), локализованные в каталитическом домене.

Таблица 1. Спектр мутаций в гене *PAH*, выявленных у больных РО

№ п/п	Название мутации	Системное название мутации	Число хромосом	Частота (%)	Тип мутации	Активность ФАГ (%) ¹
1.	R408W	c.1222C>T	162	62,31	миссенс	2
2.	IVS10-11G>A	c.1066-11G>A/IVS10-11G>A	10	3,85	сайта сплайсинга	5
3.	IVS12+1G>A	c.1315+1G>A	10	3,85	сайта сплайсинга	н/д
4.	R261Q	c.782G>A	10	3,85	миссенс	44
5.	P281L	c.842C>T	7	2,69	миссенс	2
6.	R158Q	c.473G>A	7	2,69	миссенс	10
7.	EX5del	c.442-? 509+?del	5	1,92	крупная делеция	н/д
8.	R252W	c.754C>T	5	1,92	миссенс	0
9.	R261X	c.781C>T	3	1,15	нонсенс	0
10.	L48S	c.143T>C	3	1,15	миссенс	39
11.	A300S	c.898G>T	2	0,77	миссенс	31
12.	E280K	c.838G>A	2	0,77	миссенс	2
13.	F39del	c.115 117delTTC	2	0,77	делеция	20
14.	K363>Nfs	c.1089delG	2	0,77	делеция	н/д
15.	R297H	c.890G>A	2	0,77	миссенс	21
16.	IVS4+5G>T	c.441+5G>T	2	0,77	сайта сплайсинга	н/д
17.	IVS10-3C>T	c.1066-3C>T	2	0,77	сайта сплайсинга	н/д
18.	IVS11+1G>C	c.1199+G>C	2	0,77	сайта сплайсинга	н/д
19.	A342T	c.1024G>A	1	0,38	миссенс	26
20.	A403V	c.1208C>T	1	0,38	миссенс	66
21.	c.1298dupT	c.1298dupT	1	0,38	инсерция	н/д
22.	E390G	c.1169A>G	1	0,38	миссенс	62
23.	F299C	c.896T>G	1	0,38	миссенс	3
24.	I306V	c.916A>G	1	0,38	миссенс	39
25.	IVS2+13T>G	c.168+13T>G	1	0,38	сайта сплайсинга	н/д
26.	IVS7+1G>A	c.842+1G>A	1	0,38	сайта сплайсинга	н/д
27.	IVS7-5T>C	c.843-5T>C	1	0,38	сайта сплайсинга	2
28.	IVS9+5G>A	c.969+5G>A	1	0,38	сайта сплайсинга	н/д
29.	N133 Q134>Rfs	c.398 401delATCA	1	0,38	делеция	н/д
30.	R176X	c.526C>T	1	0,38	нонсенс	1
31.	R243X	c.727C>T	1	0,38	нонсенс	0
32.	R261G	c.781C>G	1	0,38	миссенс	н/д
33.	R408Q	c.1223G>A	1	0,38	миссенс	46
34.	S16>XfsX1	c.47 48delCT	1	0,38	делеция	0
35.	T372S	c.1114A>T	1	0,38	миссенс	н/д
36.	V245A	c.734T>C	1	0,38	миссенс	50
37.	V399V	c.1197A>T	1	0,38	миссенс	н/д
38.	Y268C	c.803A>G	1	0,38	миссенс	н/д
39.	Y387H	c.1159T> C	1	0,38	миссенс	н/д
40.	Y414C	c.1241A>G	1	0,38	миссенс	57
Всего:			260	100,00		

Примечание: ¹ - остаточная активность ФАГ для каждой мутации в гене *PAH* по данным базы BIOPKU (www.biopku.org).

Известно, что миссенс и нонсенс мутации, мутации сайта сплайсинга, большинство делеций и инсерций приводят к значительному снижению активности ФАГ (Lüleyap H.U. et al., 2006; Pey A.L et al., 2007; Scriver C. R., 2007; Gersting S.W. et al., 2008; Cerreto M. et al., 2011; Réblová K. et al., 2015). Учитывая, что у больных ФКУ РО 81,54% выявленных миссенс мутаций находятся в каталитическом домене можно ожидать большое число тяжелых форм ФКУ.

Наиболее частой в РО, как и в большинстве регионов России, является миссенс мутация 12 экзона гена *PAH* R408W, частота которой составила 62,31% от общего числа мутантных аллелей (рис. 2).

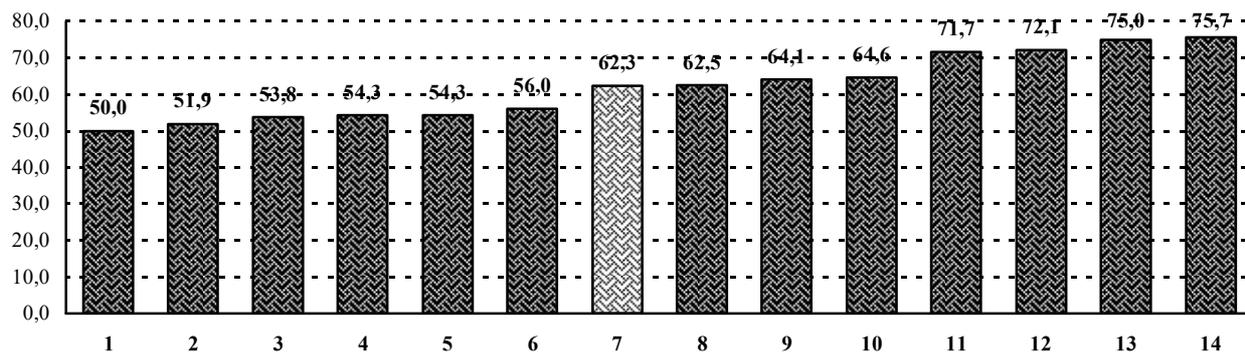


Рис. 2. Частота мутации R408W в регионах России.

Примечание: Регионы: 1. Самарская область, 2. Краснодарский край, 3. Кемеровская область, 4. Республика Башкортостан, 5. Московская область, 6. Новосибирская область, 7. Ростовская область (данное исследование), 8. Вологодская область, 9. Воронежская область, 10. Архангельская область, 11. Курская область, 12. Санкт-Петербург, 13. Республике Удмуртия, 14. Свердловская область.

Полученные в ходе данного исследования результаты позволили оценить спектр и частоту встречаемости мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ в РО. Показано, что, как и в большинстве регионов России, «мажорной» мутацией является R408W, частота которой составила 62,31%. Сравнительный анализ показал, что, несмотря на выраженные региональные и этнические особенности, данная мутация является частой в популяциях Восточной Европы и Балтии. В других регионах Европы и странах Азии R408W не является частой или практически не встречается, что в свою очередь говорит о возможном эффекте основателя и генетическом дрейфе в европейских популяциях (Tansek M.Z. et al., 2015).

К другим частым мутациям, составляющим «ядро» спектра мутаций, выявленных у больных ФКУ в Ростовской области, относятся IVS10-11G>A (3,85%), IVS12+1G>A (3,85%), R261Q (3,85%), P281L (2,69%), R158Q (2,69%), EX5del (1,92%) и R252W (1,92%).

Спектр мутаций в гене *PAH* с учетом национальности пациентов

Проведенный анализ спектра и частот мутаций в гене *PAH* с учетом национальной принадлежности больных ФКУ, показал, что выявлены определенные особенности частот и спектра мутаций в разных этнических группах. Для русского населения наиболее частыми мутациями определены: R408W (частота мутации 69,47%), IVS12+1G>A (3,46%); R261Q (2,69%), и R158Q (2,31%). У армян, больных ФКУ частыми

определены мутации IVS10-11G>A (40% у армян) и R252W (20% у армян). У тюрк-месхетинцев больных ФКУ частыми выявлены мутация R408W (40% у тюрк-месхетинцев), IVS10-11G>A (40% у тюрк-месхетинцев). Для даргинцев частой определена мутация R261X (75% у даргинцев).

Оценка гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAN* в РО

Частота гетерозиготного носительства, по результатам скрининга здоровых индивидов на носительство мутации R408W в обследованной выборке составила 2,13% (1:47 человек). Поскольку определенная в ходе данного исследования доля мутации R408W у пациентов в РО составляет 62,31%, тогда суммарная частота носительства всех мутаций в гене *PAN* составляет 3,41% или 1:29 человек. Соответственно суммарная частота всех форм заболевания, включая ГФА составляет 1:3364 новорожденных.

По результатам неонатального скрининга частота ФКУ в РО составила 1 на 6077 новорожденных. Отсюда, по закону Харди-Вайнберга, частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAN* составляет 2,60% или 1:39 человек.

Различия в полученных значениях частоты гетерозиготного носительства, вероятно, объясняются тем, что в соответствии с клиническими рекомендациями (2014), детям с ГФА не требовалось проведение подтверждающей ДНК-диагностики и динамическое наблюдение врачом-генетиком. Частота гетерозиготного носительства, полученная из популяционной частоты мутации R408W включает все формы заболевания, в том числе и ГФА.

Изучение взаимосвязи генотипов в гене *PAN* и фенотипов у пациентов с ФКУ в РО

1. Спектр генотипов в гене *PAN*, выявленных у пациентов с ФКУ РО

В настоящее время описано более 955 мутаций в гене *PAN*, обуславливающих большое разнообразие генотипов. Проведенное молекулярно-генетическое исследование позволило описать 49 различных вариантов генотипов у обследованных больных. Генотипы в гомозиготном состоянии определены у 65 больных по 4 мутациям: R408W – 59 больных (90,76%), IVS12+1G>A – 3 больных (4,62%), IVS10-11G>A – 2 (3,08%), R261X – 1 больной (1,54%). В двух случаях гомозиготное состояние по мутациям IVS12+1G>A и R261X в русской и даргинской семьях обусловлено инбредным браком.

Генотипы в компаунд гетерозиготном состоянии, также выявлены у 65 больных ФКУ. В большинстве случаев (27 генотипов у 44 больных (67,69%)), представлены сочетанием мутации R408W со следующими вариантами: P281L (3,85%), IVS12+1G>A (3,08%), R158Q (2,31%), L48S (2,31%), EX5del (2,31%), R261Q, (2,31%), R252W (1,54%) и IVS10-11G>A (1,54) и другими единичными мутациями, которые составили в общей сложности 14,61%. Другие генотипы (n=18) в компаунд гетерозиготном состоянии отмечены у 21 больного, что составляет суммарно 16,15%. В общей сложности генотипы с гомозиготным и компаунд гетерозиготным состоянием по различным мутациям в гене *PAN* разделились 1:1.

В ряде работ отмечено, что спектр генотипов характерный для отдельных регионов является результатом сочетания основных факторов популяционной динамики,

включающих эффект миграции, основателя и генетический дрейф (Peu A.L. et al, 2007; Tasek M.Z. et al., 2015).

2. Изучение генотип-фенотип корреляций у пациентов с ФКУ в РО

Принимая во внимание, что мутации в гене *PAH* приводят к различным по степени тяжести клиническим и биохимическим фенотипам, формируя диапазон клинических форм от тяжелой ФКУ до ГФА, предпринята попытка выявления зависимости между уровнем ФА и генотипом. После внедрения программы неонатального скрининга, классический патологический фенотип ФКУ у пациентов практически не встречаются, в связи с этим при изучении генотип-фенотип корреляции целесообразнее использовать концентрацию ФА в крови у пациента, как одну из категорий фенотипа («биохимический» фенотип), и генотип в гене *PAH* (Scriver C.R., Waters P.J., 1999; Daniele A. et al., 2007).

При проведении анализа выделены две группы пациентов по уровню ФА до начала лечения: 1. ФА «скрининг» - уровень ФА по результатам неонатального скрининга, 2. ФА «ретест» - уровень ФА при ретестировании и третья группа пациентов - по уровню среднего значения ФА на фоне диетотерапии - ФА «диета».

В зависимости от генотипа также выделены три группы: 1. 59 пациентов с гомозиготным генотипом по мутации R408W; 2. 44 пациента с генотипами в компаунд гетерозиготном состоянии, обусловленные сочетанием мутации R408W с другими мутациями R408W/X; 3. 27 пациентов с другими сложными генотипами в компаунд гетерозиготном состоянии другим мутациям X/X.

При проведении анализа значений неонатального ФА с учетом генотипа из расчета исключены 23 пациента, в связи с отсутствием данных неонатального ФА (табл. 2).

Таблица 2. Значения уровня неонатального фенилаланина с учетом генотипа

по уровню ФА «скрининг» (мг%)	R408W/R408W	R408W/X	X/X	итого
≥2, но <10	4 (9,76%)	19 (46,34%)	14 (56%)	37 (34,58%)
≥10, но <20	35 (85,37%)	21 (51,22%)	11 (44%)	67 (62,62%)
≥20	2 (4,88%)	1 (2,44%)	0	3 (2,80%)
итого	41 (100%)	41 (100%)	25 (100%)	107 (100%)
ФА «скрининг» нет данных	18	3	2	23

Полученные данные показывают, что уровень неонатального ФА у пациентов гомозигот по R408W представлен в основном высокими значениями, составив 90,25%, в то время как в группах R408W/X и X/X значения ФА «скрининг» выше 10 мг% составили 51,22% и 44,00%, соответственно

Анализ уровня ФА «ретест» при проведении ретестирования в анализируемых группах (табл. 3) показал, что уровень ФА «ретест» выше 20 мг% выявлен в максимальном числе случаев, независимо от генотипа, и составил суммарно 77,69%. Уровень ФА «ретест» ниже 10,0 мг% отмечен только в группах R408W/X и X/X и

составил в общей сложности 4,62%. Значения ФА «ретест» от 10 мг% до 20 мг% выявлены в основном в группах R408W/X и X/X.

Таблица 3. Значения уровня фенилаланина при ретестировании с учетом генотипа

по уровню ФА «ретест» (мг%)	R408W/R408W	R408W/X	X/X	всего
≥2, но <10	0	3 (6,82%)	3 (11,11%)	6 (4,62%)
≥10, но <20	5 (8,47%)	10 (22,73%)	8 (29,63%)	23 (17,69%)
≥20	54 (91,53%)	31 (70,45%)	16 (59,26%)	101 (77,69%)
всего	59 (100%)	44 (100%)	27 (100%)	130 (100%)

При проведении анализа выявлено шесть пациентов, со следующими генотипами R408W/A403V, R408W/I306V, R408W/T372S, A300S/R297H (2), V245A/S16>XfsX1 у которых уровни, как ФА «скрининг», так и ФА «ретест» не превышали 10 мг%, что позволило говорить о ГФА.

Два пациента гомозиготных по мутации R408W и пять пациентов с генотипами в компаунд гетерозиготном состоянии (R408W/L48S, R408W/IVS11+1G>C, R408W/P281L, R408W/Y414C, R261Q/R158Q) при определении неонатального уровня ФА показали значения ниже 10 мг%, а при проведении ретестирования значения не превысили 20 мг%, что дало основание думать о мФКУ.

Проведен анализ средних значений ФА на диетотерапии в группах детей с учетом генотипа (табл. 4). Необходимо отметить, что из анализа исключены 5 пациентов с ГФА, так как диетотерапия с ограничением ФА им не проводилась и 8 пациентов из 4 семей, родители которых отказались от проведения диетотерапии. Из представленных данных следует, что на фоне диетотерапии 63,25% детей показали хорошее снижение уровня ФА. Средний уровень ФА составил в группе гомозигот по R408W - 10,61 мг%, в группах R408W/X и X/X - 8,48 мг% и 10,57 мг% соответственно.

Таблица 4. Значения уровня фенилаланина на диетотерапии с учетом генотипа

по уровню ФА «диета» (мг%)	R408W/R408W	R408W/X	X/X	итого
≥2, но <10	29 (61,70%)	30 (69,78%)	15 (55,55%)	74 (63,25%)
≥10, но <20	18 (38,30%)	12 (27,91%)	9 (33,33%)	39 (33,33%)
≥20	0	1 (2,33%)	3 (11,11%)	4 (3,42%)
итого	47 (100%)	43 (100%)	27 (100%)	117 (100%)

Исследование корреляционных связей, при изучении генотип-фенотип корреляций, осуществляли между следующими показателями - активность фермента ФАГ, средневзвешенные значения ФА до начала диетотерапии (ФА «скрининг» - уровень ФА по результатам неонатального скрининга и ФА «ретест» - уровень ФА при ретестировании) и средневзвешенные значения ФА «диета» - уровень среднего значения ФА на фоне диетотерапии. Исследование связи между количественными признаками осуществляли с помощью коэффициента корреляции по Пирсону.

Для оценки генотип-фенотип корреляции пациенты ранжированы на две группы.

В первую группу вошли пациенты, генотипы которых включали мутации с известной активностью фермента ФАГ, во вторую группу - с неизвестной активностью

ФАГ (Karacić I. et al., 2009; Danecka M.K. et al., 2015). В первой изучаемой группе (29 генотипов), с известной активностью ФАГ для каждой мутации, выделены 5 подгрупп в зависимости от активности фермента (табл. 5).

Таблица 5. Средние значения активности ФАГ и ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета» в первой группе

Подгруппа	Среднее значение активности ФАГ	Среднее значение ФА «скрининг»	Среднее значение ФА «ретест»	Среднее значение ФА «диета»
1 подгруппа	2,14%	10,27 мг%	26,24 мг%	12,02 мг%
2 подгруппа	13,83%	10,90 мг%	20,43 мг%	6,30 мг%
3 подгруппа	22,29%	8,94 мг%	18,18 мг%	7,68 мг%
4 подгруппа	26,63%	7,01 мг%	10,65 мг%	5,28 мг%
5 подгруппа	34,00%	5,10 мг%	3,80 мг%	4,50 мг%

Для каждой из подгрупп рассчитаны средневзвешенные значения ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета». В первую подгруппу включены 14 генотипов, представленные классической формой ФКУ, активность фермента составила от 0 до 10% от активности ФАГ «дикого типа». Во второй подгруппе (3 генотипа) средние значения активности фермента составили 10-20%, в третьей подгруппе (7 генотипов) – 20-25%, в четвертой (4 генотипа) с активностью ФАГ - 25-30%, пятая подгруппа представлена одним генотипом с активностью фермента, составляющей 34%.

При проведении анализа линейной корреляции сравнивали средние значения активности ФАГ с группами: ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета». Получены значения коэффициентов корреляции между активностью фермента и средними уровнями уровня ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета», которые составили $r=-0,88\pm 0,28$, $r=-0,96\pm 0,17$ и $r=-0,89\pm 0,32$, соответственно. Таким образом, можно говорить о наличии обратной пропорциональной зависимости между активностью ФАГ в выявленных генотипах и уровнем ФА.

При попарном сравнении средних значений ФА между группами ФА «скрининг» и ФА «ретест», ФА «скрининг» и ФА «диета», ФА «ретест» и ФА «диета» получены значимые высокие коэффициенты корреляции $r=0,95\pm 0,19$, $r=0,86\pm 0,29$ и $r=0,66\pm 0,44$, соответственно, что показывает наличие прямой зависимости между данными показателями.

На диаграмме наглядно показано, что чем выше активность фермента, тем ниже уровень фенилаланина (ФА «ретест») и наоборот (рис. 3).

Генетическое многообразие возможных вариантов генотипов, составленных из мутаций в гене *PAH*, а также отсутствие в настоящее время данных об активности ФАГ для большинства генотипов затрудняют предсказание фенотипических проявлений ФКУ, прогноз течения заболевания и возможности индивидуального лечения.

Во второй изучаемой группе с неизвестной активностью фермента предпринята попытка прогнозирования фенотипа в зависимости от уровня ФА «ретест», показавшим высокий коэффициент корреляции.

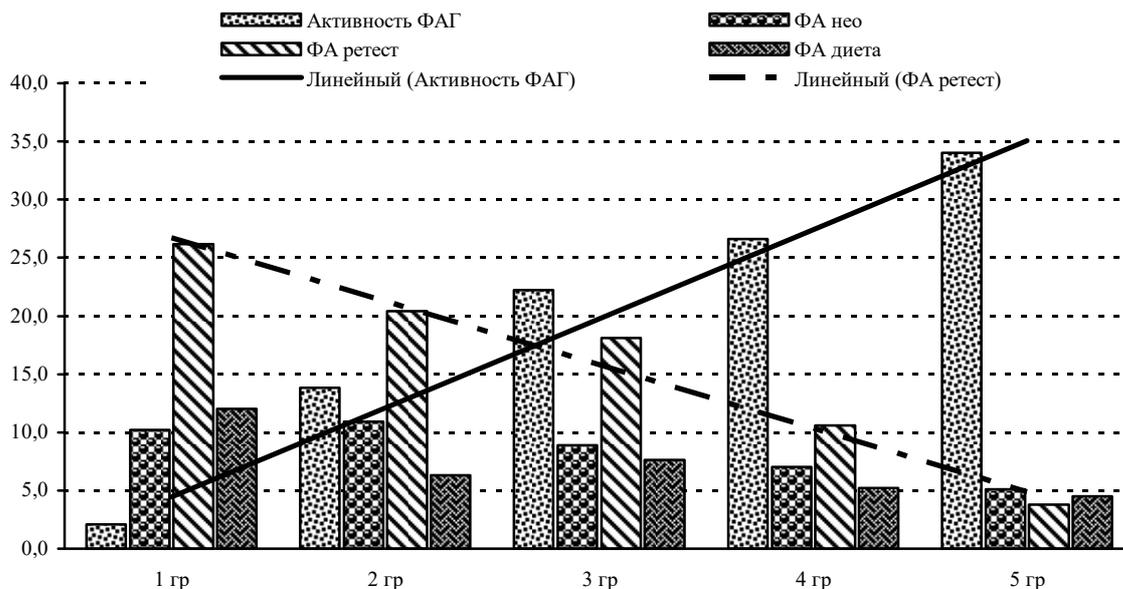


Рис. 3. Зависимость ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета» от активности ФАГ в первой группе.

В данной группе также выделены 5 подгрупп (табл. 6).

Таблица 6. Средние значения ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета» во второй группе

Подгруппа	Среднее значение ФА «скрининг»	Среднее значение ФА «ретест»	Среднее значение ФА на лечении
1 подгруппа	3,60 мг%	7,10 мг%	4,70 мг%
2 подгруппа	9,46 мг%	11,94 мг%	6,64 мг%
3 подгруппа	13,40 мг%	24,11 мг%	9,60 мг%
4 подгруппа	13,39 мг%	37,27 мг%	11,69 мг%
5 подгруппа	18,30 мг%	43,60 мг%	16,40 мг%

В первой подгруппе один генотип со значением ФА «ретест» ниже 10 мг%. Вторая подгруппа представлена 5 генотипами с уровнем - 10-20 мг%, в третьей подгруппе - 8 генотипов с уровнями ФА 20-30 мг%, в четвертой - 5 генотипов со значения ФА 30-40 мг%. Пятая подгруппа представлена одним генотипом, значение ФА «ретест» выше 40 мг%.

При проведении корреляционного анализа во второй группе попарно сравнивали значения ФА «ретест» с другими значениями ФА. Коэффициент корреляции между уровнем ФА «ретест» и ФА «скрининг» составил $r=0,92\pm 0,23$, между значениями ФА «ретест» и ФА «диета» – $r=0,97\pm 0,14$. Коэффициент корреляции между уровнем ФА «скрининг» и средними значениями ФА «диета» составил $r=0,95\pm 0,18$. Полученные результаты анализа показали наличие прямой зависимости между данными показателями и позволяют спрогнозировать не только активность фермента при данных генотипах, но и степень тяжести ФКУ.

Первая подгруппа с минимальными значениями ФА «ретест» представлена генотипом R408W/T372S, и в данном случае можно прогнозировать высокую остаточную активность ФАГ при данном генотипе и соответственно ГФА.

Во второй подгруппе выделены следующие генотипы R408W/IVS11+1G>C (кФКУ), R408W/IVS10-3C>T и R261Q/IVS10-3C>T (мФКУ), а так же генотипы R158Q/c.1298dupT и E390G/IVS11+1G>C, для которых в базе данных ВЮРКУ степень тяжести течения ФКУ не определена. Полученные результаты позволяют думать о мягкой форме заболевания.

Третья подгруппа представлена кФКУ со следующими генотипами R408W/IVS7+1G>A, IVS10-11G>A/K363>Nfs, R252W/IVS4+5G>T, R408W/p.N133_Q134>Rfs. В этой же подгруппе для генотипов R261G/DEL EX5, R408W/IVS2+13T>G, R408W/IVS9+5G>A, R261Q/Y268C форма ФКУ в базе данных ВЮРКУ также не определена, но выявленные у пациентов высокие значения ФА «скрининг» и ФА «ретест» позволяют предполагать кФКУ.

В четвертой подгруппе практически все генотипы можно отнести к классической форме ФКУ: R408W/Y387H, R408W/K363>Nfs, R408W/DEL EX5, R408W/IVS4+5G>T, P281L/DEL EX5. Соответственно в 5 подгруппе с максимальным значением ФА можно предполагать низкую остаточную активность ФАГ при генотипе R408W/V399V. На диаграмме наглядно показана прямая зависимость между изучаемыми показателями (рис. 4).

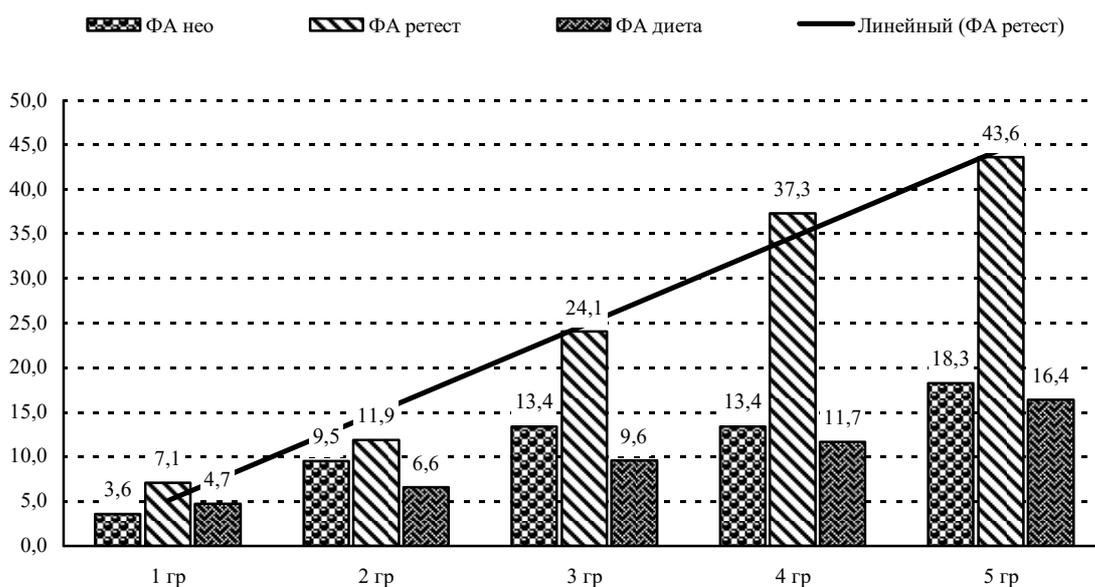


Рис. 4. Зависимость ФА «скрининг» и ФА «диета» от ФА «ретест» во второй группе.

На сегодняшний день значение генотипирования для прогнозирования вариантных фенотипов у пациентов с дефицитом фенилаланингидроксилазы является предметом большинства дискуссий и проведения исследований.

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о наличии обратной пропорциональной зависимости между активностью фермента и показателями уровня ФА и прямой зависимости между уровнями ФА у пациентов. Полученные данные обеспечивают как прямые, так и косвенные свидетельства о наличии генотип-фенотип корреляции у большинства пациентов с диагнозом ФКУ. Общие закономерности в генотипе связаны с биохимическими особенностями.

Низкая активность ФАГ до 10% связана с классической формой ФКУ и высокими значениями ФА до начала лечения. А при высокой активности фермента (выше 20%) наблюдались низкие значения ФА, что позволяет говорить о мягкой форме ФКУ, либо о ГФА. Полученные результаты позволяют рассчитывать лечебное питание и своевременное назначение диетотерапии.

Клинические формы ФКУ у пациентов РО

Проведенный выше корреляционный анализ показал наличие связи между генотипом и фенотипом. Однако корреляция между генотипом и фенотипом у больных ФКУ не является абсолютной, и пациенты с аналогичными генотипами могут иметь различные формы ФКУ (Scriver C. R., 2007).

Современная клиническая классификация ФКУ, согласно которой, определяют степень тяжести заболевания, основана на уровне ФА в крови больного и не учитывает толерантность к ФА. В связи с этим на основании современной классификации ФКУ, в сочетании с данными о переносимости ФА конкретным больным, фенотипы пациентов отнесены к одной из трех категорий. Выделены 3 формы в зависимости от степени тяжести заболевания: 1. классическая - кФКУ, уровень ФА в крови ≥ 20 мг% и переносимость ФА менее 20 мг/кг/сутки; 2. мягкая мФКУ, уровень ФА ≥ 10 , но < 20 мг% и переносимость ФА 25-50 мг/кг/сутки; 3. ГФА, уровень ФА ≥ 2 , но < 10 мг%, диетотерапии не придерживаются.

Проведенный анализ показал, что в общей сложности из 130 пациентов у 101 (77,69%) болезнь протекает в тяжелой форме (кФКУ), у 22 (16,92%) можно говорить о мягкой форме (мФКУ) и у 7 (5,39%) - о гиперфенилаланинемии (ГФА). Формы мФКУ и ГФА в общей сложности составляют 22,31%.

Классическая и мягкая формы ФКУ у пациентов РО

Классическая форма ФКУ у большинства больных (78/77,23%), выявленных при проведении неонатального скрининга и получающих диетотерапию с ограничением ФА в полном объеме, не сопровождается нейропсихологическими проблемами. Умственная отсталость легкой степени, с разной степенью нарушения поведения, отмечена у 23 больных (22,77%). Из них у 16 больных, выявленных в возрасте от года до четырех лет, методом селективного скрининга, назначенная поздно диетотерапия проводилась в неполном объеме. Родители 8 пациентов из 4 семей отказались от проведения диетотерапии.

В данном исследовании, в группе пациентов (59) с генотипом R408W/R408W, кФКУ выявлена у 56 больных (94,92%), ФКУ – у 2 (3,39%) и ГФА у 1 пациента (1,69%).

В базе данных ВЮРКУ в настоящее время нет информации о форме ФКУ для 12 генотипов, выявленных у пациентов в РО (<http://www.biorku.org/>). В данном исследовании, у пациентов с кФКУ выявлены 5 генотипов в компаунд гетерозиготном состоянии, обусловленные сочетанием мутации R408W с другими мутациями A342T, IVS2+13T>G, IVS4+5G>T, IVS7-5T>C, IVS9+5G>A и 3 сложных генотипа в компаунд гетерозиготном состоянии с другим мутациям R243X/E280K, R261Q/Y268C, P281L/DEL EX5. У пациентов с мФКУ выявлены следующие генотипы R158Q/c.1298dupT, E390G/IVS11+1G>C и R261G/DEL EX5, и с ГФА - A300S/R297H.

Полученные данные показывают, что большинство пациентов с ФКУ являются сложными компаунд гетерозиготами, что может частично объяснить большую фенотипическую изменчивость. Однако необходимо учитывать и другие возможные механизмы, влияющие на степень тяжести клинических проявлений ФКУ – в частности гены модификаторы, которые при данном заболевании изучены пока недостаточно.

Гиперфенилаланинемия у пациентов РО

При проведении неонатального скрининга в РО с диагнозом ГФА выявлено 64 ребенка, что составило 31,37% от общего числа выявленных при скрининге.

В данном исследовании приняли участие 7 детей с ГФА, у которых определены следующие генотипы: R408W/R408W, A300S/R297H (2), V245A/S16>XfsX1, R408W/A403V, R408W/T372S, R408W/p.I306V.

Ранее, в соответствии с клиническими рекомендациями, дети с ГФА наблюдались врачом-генетиком до 2 лет. После внедрения в России ДНК-исследования некоторые пациенты, с целью подтверждения диагноза, проводили исследование на коммерческой основе на 8 частых мутаций в гене *PAH*. В их числе 7 детей с ГФА, у которых был определен только один аллель, и которые отказались продолжить исследование по ДНК-диагностике и принять участие в настоящей работе. Проведенное молекулярно-генетическое исследование в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» выявило у этих детей мутации в гене *PAH* в гетерозиготном состоянии R408W (4), P281L (2) и R252W (1).

Возможно, при проведении обследования с использованием современных молекулярно-генетических методов у данных пациентов были бы найдены и другие мутации в гене *PAH*.

Для пациентов с мФКУ и ГФА в качестве препарата выбора рекомендуется сапроптерин гидрохлорид (van Spronsen F.J., 2011; Hanley W.B., 2011; Blau N. et al., 2015). В последнее время, большое число исследований посвящено оценке чувствительности к сапроптерину гидрохлориду пациентов с ФКУ, который может быть предложен в качестве дополнения к диете или как монотерапия (Vernon H.J. et al., 2010; Leuders S. et al., 2014; Danecka M.K. et al., 2015; Jeannesson-Thivisol E. et al., 2015; Scala I. et al., 2015; Aldámiz-Echevarría L. et al., 2016).

Группе детей с мФКУ и ГФА, проживающим в РО, может быть рекомендовано тестирование с целью определения чувствительности к сапроптерину гидрохлориду. Анализ группы больных с кФКУ выявил 18 детей со сложными генотипами в компаунд гетерозиготном состоянии, которым может быть рекомендовано тестирование с целью определения чувствительности к сапроптерину.

Таким образом, среди пациентов ФКУ в РО потенциальными «ВН4-ответчиками» могут быть 34 пациента, что составляет 26,15%. Полученные результаты согласуются с данными литературы, о том, что около трети пациентов в регионе могут быть чувствительными к терапии сапроптерином (Bercovich D. et al., 2008; Zurflüh M. R. et al., 2008; Trefz F.K. et al., 2009; Feillet F. et al., 2010; Heintz C. et al., 2013; Camp K.M. et al., 2014; Leuders S. et al., 2014; Scala I. et al., 2015; Anjema K. et al., 2016; Blau N., 2016).

Гиперфенилаланинемия ВН4 А в РО

Наследственные гиперфенилаланинемии (ГФА) связаны с дефицитом тетрагидробиоптерина (ВН4) и являются генетически гетерогенной группой прогрессирующих неврологических расстройств, вызванных мутациями в генах, которые кодируют ферменты, участвующие в синтезе и регенерации ВН4 (Thöny В., Blau N., 2006; Blau N. et al., 2011).

Клинический случай. Ребенок, проживающий в одном из районов РО, русский, из двойни, выявлен при проведении неонатального скрининга с уровнем ФА 19,26 мл%, при ретестировании ФА - 29,24 мл%. Назначена диетотерапия, на фоне которой значения ФА снизились в течение месяца до 0,88 мл%. Средний уровень ФА на первом году жизни составил 3,73 мг%, отмечалось повышение уровня ФА до 11,2 на фоне инфекции. Психомоторное развитие соответствовало возрасту.

При проведении молекулярно-генетической диагностики различными методами мутаций в гене *PAH* не выявлено. В связи, с чем продолжен поиск мутаций в генах, которые кодируют ферменты, участвующие в синтезе и регенерации ВН4. В гене *PTS* обнаружен компаунд-гетерозиготный генотип (N52S/P87S), что позволило поставить диагноз: ГФА ВН4А. После установления окончательного диагноза, пациенту назначен препарат саптоптерина дигидрохлорида (КУВАН). При введении препарата в дозе 5мг/кг отмечалось резкое снижение уровня ФА, в связи, с чем диета с ограничением ФА отменена.

Данный пример показывает, что даже при положительном эффекте на проводимую диетотерапию и при отсутствии мутаций в гене *PAH* пациентам необходимо проводить ДНК диагностику в других генах (*PTS* и *QDPR*) для исключения атипичных форм ФКУ. Кроме того, это свидетельствует и о клиническом полиморфизме биоптеринзависимых форм ГФА.

ВЫВОДЫ

1. Частота ФКУ по данным неонатального скрининга составляет 1:6077 (0,16±0,01%). Не выявлено статистически значимых вариаций значений частоты ФКУ за 1997-2014 гг.

2. Подтверждающее ДНК исследование, проведенное 130 больному с ФКУ, выявило 40 различных мутаций в гене *PAH*. К частым мутациям в гене *PAH* в РО, относятся R408W (62,31%), IVS10-11G>A (3,85%), IVS12+1G>A (3,85%), R261Q (3,85%), P281L (2,69%), R158Q (2,69%), EX5del (1,92%) и R252W (1,92%). Диагностическая эффективность составила 100%.

3. Проведен анализ спектра и частот мутаций в гене *PAH* с учетом национальной принадлежности пациентов с ФКУ. Установлено, что у русских больных ФКУ частыми являются мутации R408W (частота 69,47%), IVS12+1G>A (3,46%), R261Q (2,69%) и R158Q (2,31%), у армян - IVS10-11G>A (40%) и R252W (20%), у турок-месхетинцев - R408W (40%), IVS10-11G>A (40%), у даргинцев - R261X (75%).

4. При молекулярно-генетическом исследовании 8 пациентов с ГФА у 7 больных выявлены мутации в гене *PAH* в гомозиготном и в компаунд гетерозиготном состоянии (R408W/R408W, R408W/A403V, R408W/T372S, R408W/p.I306V, A300S/R297H (2),

V245A/S16>XfsX1). В одном случае диагностирована ГФА ВН4А (ген *PTS* генотип N52S/P87S).

5. Частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH*, рассчитанная исходя из частоты ФКУ среди новорожденных по данным неонатального скрининга, составила 2,60% (1:39 человек). Частота гетерозиготного носительства мутации R408W, оцененная путём ДНК-тестирования здоровых индивидов (анализ 940 хромосом), составила 2,13% (1:47 человек).

6. Установлена обратная регрессионная зависимость между активностью фермента ФАГ (рассчитанная на основании рекомбинантного метода) и средними значениями уровня ФА в группах ФА «скрининг», ФА «ретест» и ФА «диета». Коэффициенты корреляции составили $r=-0,88\pm 0,28$, $r=-0,96\pm 0,17$ и $r=-0,89\pm 0,32$, соответственно.

7. Доля больных с тяжелыми формами классической ФКУ в РО составляет 77,70%, мягкой ФКУ - 16,92%, ГФА - 5,38%. Оценена эффективность заместительной диетотерапии, по уровню ФА в крови больных ФКУ на диете, которая составила 97%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. При выявлении в процессе неонатального скрининга ребенка с уровнем ФА в крови выше 2мг% рекомендуется молекулярно-генетическое исследование с целью поиска мутаций в гене *PAH* для прогнозирования степени тяжести заболевания и персонализированного подхода к терапии.

2. Рекомендуется осуществлять диспансерное наблюдение пациентов с диагнозом ГФА в объеме и с периодичностью, установленными с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 22 ноября 2005 г. № 250 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным фенилкетонурией» с целью оценки их состояния здоровья и своевременного назначения диетотерапии при его изменении.

3. Рекомендуется создание баз данных больных ФКУ и ГФА (региональных и российских), включающих генеалогические, клинические, биохимические и молекулярно-генетические показатели и позволяющие осуществлять активный мониторинг отягощенных семей, для оценки качества медико-генетической помощи и эффективности персонализированной терапии.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Ветрова Н.В., Амелина М.А., Петрин А.Н., Амелина С.С. Эпидемиология наследственных болезней среди детского населения 12 районов Ростовской области. Отягощенность наследственных болезней и генетическая структура популяции // Медицинская генетика. - 2013. - Т.12. - №5. - С. 21-28.
2. Амелина С.С., Ветрова Н.В., Пономарева Т.И., Амелина М.А., Ельчинова Г.И., Петрин А.Н., Михайлова Л.К., Петрова Н.В., Васильева Т.А., Хлебникова О.В., Поляков А.В., Зинченко Р.А. Популяционная генетика наследственных болезней в 12 районах Ростовской области. Нозологический спектр моногенных наследственных болезней // Валеология. - 2014. - №2. - С. 35-42.

3. **Амелина М.А.**, Степанова А.А., Поляков А.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Спектр и частота встречаемости мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией Ростовской области // Медицинская генетика. - 2015. - Т.14. - №8. - С. 3-8.
4. **Амелина М.А.**, Зинченко Р.А., Степанова А.А., Гундорова П., Поляков А.В., Амелина С.С. Изучение взаимосвязи генотипов (*PAH*) и фенотипов у больных фенилкетонурией Ростовской области // Медицинская генетика. 2016. - Т.15. - №6. - С. 3-10.
5. **Амелина М.А.**, Амелина С.С., Зинченко Р.А., Степанова А.А., Гундорова П.А., Поляков А.В. Частота и отягощенность ФКУ у детского населения Ростовской области // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4; URL:<http://www.science-education.ru/article/view?id=24946>

Список публикаций в других изданиях

6. **Амелина М.А.** Ветрова Н.В. Фенилкетонурия в Ростовской области // В сб.: «Обмен веществ при адаптации и повреждении». Ростов-на-Дону. - 2009. - С.101.
7. **Amelina M.**, Ponomareva T., Vetrova N., Amelina S., Petrin A., Zinchenko R. Prevalence and diversity of monogenic hereditary pathology among the children of Rostov region (Russia) / European Human Genetics Conference 2013, June 8-11, 2013, Paris, France // European Journal of Human Genetics, - 2013. - Vol. 21. - S. 2. - P. 395.
8. Vetrova N., **Amelina M.**, Amelina S., Senyuta O., Zinchenko R. Frequency of mutations in the *PAH* gene in PKU patients in Rostov Region // European Human Genetics Conference 2013, June 8-11, 2013, Paris, France // European Journal of Human Genetics, - 2013. - Vol. 21. - S. 2. - P. 397.
9. **Амелина М.А.**, Амелина С.С., Зинченко Р.А. Мутации в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией в Ростовской области // Материалы V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013 г. Ростов-на-Дону: СКНЦ ВШ ЮФУ, - 2013. - С.218-219.
10. **Амелина М.А.**, Амелина С.С., Зинченко Р.А. Спектр мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией в Ростовской области / IX Международная Пироговская научной медицинской конференция студентов и молодых ученых. Москва, 16 мая 2014 года. - Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2014. - №2. - С. 215.
11. **Амелина М.А.**, Степанова А.А., Поляков А.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Спектр и частота мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией Ростовской области / Тезисы VII съезда Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015г. и 3-й Всероссийской конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы», Санкт-Петербург, 19-20 мая 2015г. // Медицинская генетика. - 2015. - 14(2).- С. 8-9.
12. **Амелина М.А.**, Зинченко Р.А. Распространенность фенилкетонурии среди населения Ростовской области / X (XIX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. Москва, 19 марта 2015 // Вестник Российского медицинского университета, - 2015. - №2. - С. 633-634.

13. **M.A. Amelina**, S.S. Amelina, A.A. Stepanova, A.V. Polyakov, S.I. Kutsev, R. A. Zinchenko. Phenylketonuria frequency and PAH gene spectrum mutations in Rostov Region / European Human Genetics Conference 2015, June 3-9, 2015, Glasgow, Scotland //European J. of Hum.Gen. - 2015. - V.23, S.1. - P.403.

14. **Амелина М.А.**, Амелина С.С., Степанова А.А., Поляков А.В., Куцев С.И., Зинченко Р.А. Анализ частот отдельных мутаций в гене PAH в разных этнических группах Ростовской области // XI Международная (XX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. 17 марта 2016 // Вестник Российского медицинского университета, - 2016. - С.339-340.

15. **Amelina M.A.**, Amelina S.S., Stepanova A.A., Polyakov A.V., Kutsev S.I., Zinchenko R.A. The *PAH* mutations in different ethnic groups from Rostov region (Russia) / European Human Genetics Conference 2016, May 21-24, 2015, Barselona, Spain. 2016. E-P06.27.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

OMIM	- Online Mendelian Inheritance in Man
РО	- Ростовская область
РФ	- Российская Федерация
ФГБНУ «МГНЦ»	- ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
ФКУ	- Фенилкетонурия
ГФА	- Гиперфенилаланинемия
ФА	- Фенилаланин
<i>PAH</i>	- Ген фенилаланингидроксилазы
ФАГ	- Фенилаланингидроксилаза
ФА «скрининг»	- Значения фенилаланина при неонатальном скрининге
ФА «ретест»	- Значения фенилаланина при ретесте
ФА «диета»	- Значения фенилаланина при приеме диеты
ВН4А	- Дефицит тетрагидробиоптерина