

Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика 16 пациентов с пропионовой ацидезией

Галушкин А.С.¹, Пыркова Е.Ю.¹, Куркина М.В.¹, Михайлова С.В.², Воронцова В.П.², Грибов Д.И.³,
Заживихина М.В.², Слатецкая А.Н.², Какаулина В.С.^{3,4}, Печатникова Н.Л.³, Полякова Н.А.³, Варга Н.Д.⁵, Жукова Е.Г.⁶,
Байдакова Г.В.¹, Бычков И.О.¹, Баранова П.В.¹, Иткис Ю.С.¹, Ларшина Е.А.¹, Крылова Т.Д.¹, Захарова Е.Ю.¹

- 1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1
- 2 — Обособленное структурное подразделение «Российская детская клиническая больница»
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России
119571, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 117
- 3 — ГБУЗ г.Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы»
119049, г. Москва, 4-й Добрынинский переулок, д.1/9
- 4 — Институт детской неврологии и эпилепсии им. Святителя Луки
142191, г. Москва, Троицк (Новая Москва), ул. Нагорная, д.5.
- 5 — КГБУЗ «Красноярский краевой медико-генетический центр»
660077, г. Красноярск, ул. Молокова, д. 7
- 6 — Областная детская клиническая больница
460006, г. Оренбург, ул. Рыбаковская, д. 3

Пропионовая ацидемия (ПА) – редкое наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, относится к «классическим», т.е. наиболее часто диагностируемым органическим ацидемиям. В данной работе представлена биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика 16 пациентов с ПА, выявленных в Российской Федерации. У большинства обследованных пациентов первые симптомы проявились в первые месяцы жизни, наиболее частые из них: нарушения вскармливания, судороги, мышечная гипотония, угнетение сознания. При биохимическом исследовании (ГХ-МС и МС/МС) у пациентов было выявлено повышение концентрации 3-гидроксипропионовой кислоты, метилцитрата, пропионил-глицина, СЗ, глицина, которые являются патогномоничными маркерами этой патологии. В результате молекулярно-генетического анализа в генах *PCCA* и *PCCB* было выявлено 6 неописанных ранее вариантов нуклеотидной последовательности (4 варианта в гене *PCCA*, 2 – в гене *PCCB*), один из которых (*PCCB*: c.655-2A>G) имеет высокую частоту (17,2%, 5/29 мутантных аллелей генов *PCCA* и *PCCB*) в исследуемой выборке. Локализация миссенс-вариантов и их влияние на структуру белка были продемонстрированы на 3D-модели фермента пропионил-КоА-карбоксилазы. Выявленным вариантам были присвоены критерии патогенности в соответствии с рекомендациями American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

Ключевые слова: пропионовая ацидемия, биохимия, гены *PCCA*, *PCCB*.

Для цитирования: Галушкин А.С., Пыркова Е.Ю., Куркина М.В., Михайлова С.В., Воронцова В.П., Грибов Д.И., Заживихина М.В., Слатецкая А.Н., Какаулина В.С., Печатникова Н.Л., Полякова Н.А., Варга Н.Д., Жукова Е.Г., Байдакова Г.В., Бычков И.О., Баранова П.В., Иткис Ю.С., Ларшина Е.А., Крылова Т.Д., Захарова Е.Ю. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика 16 пациентов с пропионовой ацидезией. *Медицинская генетика* 2021; 20(7): 3–14.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.3-14

Автор для корреспонденции: Галушкин А.С.; e-mail: labnbo@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 23.06.2021.

Biochemical and genetic characterization of 16 patients with propionic acidemia

Galushkin A.S.¹, Pyrkova E.Y.¹, Kurkina M.V.¹, Mihajlova S.V.², Vorontsova V.P.², Gribov D.I.², Zazhivihina M.V.², Slatetskaja A.N.³, Kakaulina V.S.^{3,4}, Pechatnikova N.L.³, Poljakova N.A.³, Varga N.D.⁵, Zhukova E.G.⁶, Bajdakova G.V.¹, Bychkov I.O.¹, Baranova P.V.¹, Itkis Y.S.¹, Larshina E.A.¹, Krylova T.D.¹, Zakharova E.Y.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics

1, Moskvorechie str., Moscow, 115478, Russian Federation

2 — The Russian Children's Clinical Hospital

117, Leninskiy prospect, Moscow, 119571, Russian Federation

3 — Morozov Children's Municipal Clinical Hospital of the Moscow City Health Department

1/9, 4th Dobryninskiy pereulok, Moscow, 119049, Russian Federation

4 — Svt. Luka's institute of Child Neurology and Epilepsy

5, Nagornaya str., Moscow, Troitsk, 142191 Russian Federation

5 — Krasnoyarsk Regional Center of Medical Genetics

7, Molokova str, Krasnoyarsk, 660077 Russian Federation

6 — Regional Clinical Children's Hospital

3, Rybakovskaya str., Orenburg, 460006, Russian Federation

Propionic acidemia is a rare autosomal recessive metabolic disorder, characterized as classic organic acidemia. The article represents biochemical and molecular characterization of 16 patients diagnosed with propionic acidemia in Russia. Symptoms appeared during the first months after birth in most cases. Poor feeding, seizures, hypotonia, lethargy were the most frequent symptoms. Biochemical tests (GC-MS and MS/MS) showed elevated 3-hydroxypropionic acid, methylcitrate, propionylglycine, C3 in patients blood. Six undescribed earlier variants were found as a result of *PCCA* & *PCCB* (4 variants – *PCCA*, 2 – *PCCB*) genes DNA-tests. Variant c.655-2A>G in *PCCB* is the most frequent in this group (17.2%). Localization of missense variants and their effect on protein was demonstrated using propionyl-CoA carboxylase 3D model. New variants were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines.

Keywords: propionic acidemia, biochemistry, *PCCA*, *PCCB*.

For citation: Galushkin A.S., Pyrkova E.Y., Kurkina M.V., Mihajlova S.V., Vorontsova V.P., Gribov D.I., Zazhivihina M.V., Slatetskaja A.N., Kakaulina V.S., Pechatnikova N.L., Poljakova N.A., Varga N.D., Zhukova E.G., Bajdakova G.V., Bychkov I.O., Baranova P.V., Itkis Y.S., Larshina E.A., Krylova T.D., Zakharova E.Y. Biochemical and genetic characterization of 16 patients with propionic acidemia. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(7): 3-14. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.3-14

Corresponding author: A.S. Galushkin; **e-mail:** labnbo@yandex.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 23.06.2021

Введение

Пропионовая ацидемия (ацидурия) (код МКБ-10: E71.1; МИМ 606054) (ПА) — редкое наследственное заболевание из группы органических ацидезий, обусловленное дефицитом митохондриального фермента пропионил-КоА-карбоксилазы (ПКК), который участвует в метаболизме аминокислот (метионина, валина, треонина, изолейцина), жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов и холестерина. Патогенные варианты в генах, кодирующих субъединицы митохондриальной ПКК, приводят к ее недостаточности в печени, почках, сердце, фибробластах и лейкоцитах. Выделяют два варианта ПА: тип I (мутации в гене *PCCA*) и тип II (мутации в гене *PCCB*), которые клинически не различаются. Заболевание характеризуется острой манифестацией в первые дни жизни (при неонатальной форме), реже — в первые ме-

сяцы жизни (при младенческой форме), протекает приступообразно. Стратегия лечения больных ПА заключается в терапии, направленной на снижение образования пропионатов, предупреждение развития кетоацидоза, гипераммониемии, поражения головного мозга и внутренних органов. Раннее выявление и лечение ПА приводит к снижению рисков развития метаболических кризов, улучшению качества и продолжительности жизни пациентов [1–3].

Генетика и эпидемиология

Ген *PCCA* кодирует альфа-субъединицу ПКК (72 кДа), картирован в локусе 13q32. Ген *PCCB* кодирует бета-субъединицу ПКК (58 кДа), картирован в локусе 3q22. *PCCA* содержит 24 кодирующих экзона, *PCCB* — 15 кодирующих экзонов.

ПА относится к числу редких наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Частота среди новорожденных в Японии 1:18000, Саудовской Аравии 1:27000, США 1:129000 и Германии 1:250000 [2, 4, 5]. В Российской Федерации точная частота заболевания неизвестна, поскольку массовый скрининг на это заболевание не проводится. В международной базе данных мутаций человека (HGMD) на данный момент описано 165 мутаций в гене *PCCA* и 146 мутаций в гене *PCCB* [6].

Патогенез

ПКК — биотин-зависимый фермент, локализуемый в матриксе митохондрий и участвующий в первом этапе синтеза сукцинил-КоА из пропионил-КоА. ПКК является додекамером, состоит из 12 субъединиц (6 альфа- и 6 бета-субъединиц). Альфа-субъединица содержит домен биотинкарбоксилазы (БК), домен связывания с биотином (БС), и биотин-переносящий (БП) домен. Бета-субъединица содержит домен транс-карбоксилазы (ТК). Домен БП играет ключевую роль во взаимодействии альфа- и бета-субъединиц. Домен БК содержит АТФ-связывающий домен и катализирует реакцию АТФ-зависимого карбоксилирования биотина. Домен БП взаимодействует с доменом ТК, который расположен в бета-субъединице и выполняет функцию переноса карбоксильной группы от биотина к α -атому

углерода пропионил-КоА. На первом этапе биотин, связанный с подвижным доменом БС, карбоксилируется в активном сайте домена БК, далее домен БС транспортирует молекулу биотина в домен ТК, где происходит перенос карбоксильной группы с биотина на молекулу пропионил-КоА.

Патогенные варианты в генах *PCCA* и *PCCB* приводят к недостаточности ПКК и последующему накоплению пропионовой кислоты и её метаболитов (пропионилкарнитин, метилцитрат, пропионилглицин), а также изолейцина, валина, метионина, треонина, кетонов, длинноцепочечных жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, тиглилглицина (рис. 1). Накапливающиеся метаболиты вызывают метаболический кетоацидоз, вторичную гиперамонию, гипогликемию и оказывают токсическое действие на различные ткани, приводя к жировой дистрофии печени, дегенерации различных отделов головного мозга, угнетению функции костного мозга [1, 7]. Токсическое действие метаболитов заключается в нарушении митохондриального гомеостаза вследствие истощения запасов клеточной энергии, торможения переноса электронов дыхательной цепи и ингибирования ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Недостаточность окислительного фосфорилирования и дефицит цитохром-*bcl*-комплекса в печени, мышечных тканях и почках были описаны у пациентов с ПА [7].

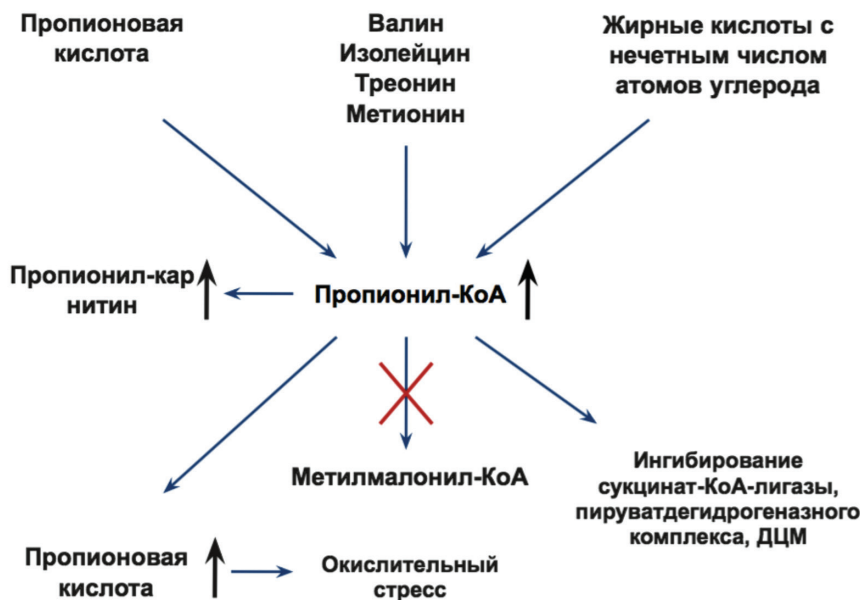


Рис. 1. Метаболические нарушения при ПА; ДЦМ – дыхательная цепь митохондрий.

Клинические проявления и лечение ПА

В большинстве случаев ПА имеет острое кризовое течение: рвота, дегидратация, отказ от еды, дыхательные расстройства, генерализованная мышечная гипотония, вялость, нарушения сознания, то есть клинические проявления токсической энцефалопатии. Летальность в период криза достигает 40%. В некоторых случаях ПА может протекать в виде хронической формы, которая манифестирует позже и проявляется задержкой психомоторного развития, мышечной гипотонией, судорогами, двигательными расстройствами, рвотой. К известным осложнениям относятся умственная отсталость, нейропатия зрительного нерва, кардиомиопатия, синдром удлиненного интервала QT, панкреатит, дерматит и нарушение функции иммунной системы [8, 9].

При магнитно-резонансном томографическом исследовании головного мозга у пациентов выявляют корково-подкорковую атрофию, повышение интенсивности сигнала в T2-взвешенном изображении в области базальных ганглиев.

В период криза терапия должна быть направлена на коррекцию метаболического ацидоза и нормализацию функции пораженных органов. Для последующего поддержания стабильного состояния пациента необходима диетотерапия: ограничение натурального белка, высококалорийные продукты, ограничение изолейцина, валина, метионина и треонина. Также назначают препараты для снижения уровня аммония в крови [1].

Лабораторная диагностика ПА

В период метаболического криза развивается тяжелый метаболический кетоацидоз, сопровождающийся гипераммониемией, гиперглициемией, снижением уровня глюкозы, лейко- и тромбоцитопенией [2, 7, 9].

При анализе в пятнах высушенной крови или плазме аминокислот (Ак) и ацилкарнитин (Ац) методом тандемной-масс-спектрометрии (МС/МС) при ПА наблюдается повышение концентрации пропионилкарнитина (C3), а также метилмалонил-/сукцинилкарнитина (C4DC). Сходные биохимические изменения наблюдаются при метилмалоновой ацидурии (МА), поэтому на основании анализа спектра Ак и Ац невозможно дифференцировать эти два заболевания [10-12]. Анализ мочи на органические кислоты методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) позволяет дифференцировать МА от ПА. Повышение концентрации N-пропионилглицина, N-тигиллглицина, 2-метил-3-оксвалериановой кислоты, 3-гидрокси-2-метилбутановой кислоты, 2-метил-3-оксобутановой кислоты, 3-гидрокси-п-валериановой кислоты в моче

характерно только для ПА, в то время как метилцитрат и 3-гидроксипропионовая кислота могут повышаться как при ПА, так и МА [2, 3, 7]. При анализе спектра Ак и Ац также наблюдается повышение концентрации глицина и лизина, но эти изменения не высокоспецифичны. Диагноз ПА подтверждают определением активности ПМК в лимфоцитах и/или фибробластах или проведением ДНК-диагностики генов *PCCA* или *PCCB* [4, 7, 13].

Методы*Пациенты*

Пациенты были направлены в лабораторию наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ МГНЦ для исключения органических ацидурий и/или аминокислотопатий из различных лечебных учреждений Российской Федерации (всего 15 неродственных пробандов и один сибс). Возраст пациентов с установленным диагнозом ПА составил от 1 недели до 13 месяцев, среди них 11 пациентов женского пола (69%) и 5 мужского пола (31%). По этнической принадлежности 14 пациентов русские, 1 узбек и 1 азербайджанец. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике (протокол № 5/10 заседания этического комитета при ФГБНУ «МГНЦ» от 12 ноября 2018 года). Родители пациентов дали информированное согласие на участие детей в исследовании и на публикацию результатов.

Анализ органических кислот мочи методом ГХ-МС

Анализ органических кислот проводили в образцах утренней порции мочи, которые хранились до исследования при -20°C. Органические кислоты анализировали методом ГХ-МС. Подготовка образцов к ГХ-МС анализу состояла из следующих этапов: получение оксимов органических кислот, жидкостно-жидкостная экстракция оксимов органических кислот, получение триметилсилиловых эфиров органических кислот. ГХ-МС анализ выполнялся на газовом хроматографе 7890A (Agilent, США) с масс-спектрометрическим детектором 5975C (Agilent, США) на капиллярной колонке HP-5MS (30м*0,25мм*4мкм, Agilent, США) в режиме температурного градиента. Количественное определение органических кислот выполняли методом внутреннего стандарта. Определение уровня креатинина мочи проводили колориметрическим методом Яффе на спектрофотометре EnSpire 2300 (Perkin Elmer, США).

Анализ Ак и Ац методом МС/МС

Для анализа Ак и Ац использовалась капиллярная или венозная кровь, собранная на стандартную

карточку-фильтр №903. Высушенные образцы крови хранились при +4°C. Подготовка образцов пятен высушенной крови проводилась с использованием набора NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit (Perkin Elmer, Финляндия). Анализ АК и Ац проводился на tandemном масс-спектрометре 3200 QTrap (AB Sciex, США). Для ионизации образцов использовали источник ионизации электрораспылением. Детектировали ионы положительной полярности в режиме регистрации выбранных ионных переходов. Концентрации АК и Ац рассчитывались автоматически путем сравнения интенсивности пиков анализируемых соединений с интенсивностью внутренних стандартов с помощью программ NeoGram (Perkin Elmer Life and Analytical Science, Wallac OY, Финляндия) и ChemoView (AB Sciex, США).

Молекулярно-генетический анализ

Биологический материал для проведения ДНК-диагностики был доступен от 16 пациентов из 15 неродственных семей.

Геномную ДНК выделяли из цельной или высушенной на фильтрах крови, используя набор реактивов Diatom DNA Prep (ООО Биокон, Россия) по рекомендованной изготовителем методике. Исследование генов *PCCA* и *PCCB* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием по Сэнгеру. Секвенирование проводилось согласно протоколу фирмы производителя на приборе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Праймеры были подобраны на основании референсной последовательности гена *PCCA*: NM_000282.3, гена *PCCB*: NM_000532.4; исследовали все кодирующие экзоны генов и прилегающие к ним участки интронов. Выявленные варианты обозначали в соответствии с номенклатурой HGVS [14] и валидировали при помощи сервиса Mutalyzer [15].

Оценка патогенности выявленных мутаций

Проверка выявленных вариантов нуклеотидной последовательности проводилась с использованием баз данных по мутациям человека: The Human Gene Mutation Database [6] и ClinVar [16]. Для оценки возможных нарушений сайта сплайсинга применяли программу Human Splicing Finder [17]. Оценка патогенности ранее неописанных миссенс-вариантов выполнялась с использованием ресурсов SIFT [18], PolyPhen-2 [19] и MutationTaster [20]. Оценка частоты неописанных замен проводилась с помощью базы данных gnomAD [21].

Результаты и обсуждение

Диагноз ПА был подтвержден 16 пациентам на основании результатов молекулярно-генетического анализа, 15 из них были проведены биохимические исследования методами ГХ-МС и МС/МС. Одному пациенту биохимическая диагностика не проводилась из-за отсутствия биоматериала, но на основании клинических проявлений и данных ДНК-анализа диагноз был подтвержден.

Биохимическая диагностика

При исследовании органических кислот в моче пациентов были выявлены следующие изменения: превышение концентрации 3-гидроксипропионовой кислоты у 12 пациентов из 15 (80%), метилцитрат у 13 пациентов из 15 (87%), пропионилглицина у 8 пациентов из 15 (53%). Были выявлены изменения в спектре АК и Ац в крови: повышение концентрации СЗ у 13 из 15 пациентов (87%), глицина у 8 пациентов из 15 (53%). У некоторых пациентов только один из исследуемых маркеров превышал норму (**табл. 1**). Подобные случаи, при которых у пациентов с ПА уровни метилцитрата и 3-гидроксипропионовой кислоты не превышали норму, но наблюдалось повышение СЗ, ранее уже были описаны в литературе [22, 23]. Поэтому при подозрении на органические ацидурии, в том числе на ПА, следует применять оба биохимических теста: анализ мочи на органические кислоты и анализ крови на спектр АК и Ац.

В нашем исследовании у пациентов с ПА наблюдалось значительное повышение концентрации 3-гидроксипропионовой кислоты (в среднем – 1000%), превышение концентрации глицина не превысило 30% от нормы (**табл. 1**). 3-гидроксипропионовая кислота не является патогномичным маркером ПА, т.к. ее уровень также повышается при МА, однако в меньшей степени относительно повышения метилмалоновой кислоты, поэтому дифференцировать эти заболевания между собой можно по изменению общего профиля органических кислот мочи (**рис. 2**).

Молекулярно-генетическая диагностика

Молекулярно-генетическая диагностика была проведена 16 пациентам из 15 неродственных семей. У 8-ми пациентов выявлены варианты в гене *PCCA*, у 7-ми пациентов, не считая одного сибса, – в *PCCB*.

В гене *PCCB* выявлено 6 вариантов (14 аллелей), из которых 4 были описаны ранее, 2 обнаружены впервые: с.850dup; р.(Asp284Glyfs*7), с.655-2A>G. Вариант с.655-2A>G является наиболее частым у российских пациентов и составляет 16,7% (5/29) от всех му-

тантных аллелей при ПА и 35,7% (5/14) от мутантных аллелей в гене *PCCB*. Данный вариант приводит к разрушению акцепторного сайта сплайсинга, активации скрытого сайта в интроне 6 и инсерции 107 п.н. в подавляющем большинстве соответствующих транскриптов. Все пациенты с данным вариантом — русские. Вариант с.850dup; p.(Asp284Glyfs*7) приводит к сдвигу рамки считывания гена и образованию преждевременного стоп-кодона.

В гене *PCCA* выявлено 9 вариантов (15 аллелей), из которых 5 были описаны ранее (с.1288C>T; p.(Arg430Term), с.1195C>T; p.(Arg399Trp), с.1899+4_1899+7delAGTA, с.1284+2insT; p.(Asp404_Gly428del, с.1495delA; p.(Ile499Serfs*19)), 4 обнаружены впервые (с.183+4del4, с.217delG; p.(Glu73Lysfs*31), с.468+1G>A, с.689G>C; p.(Arg230Pro)). Большинство выявленных мутаций (7/9) расположены в домене БК. У пациента ИЕА был обнаружен один вариант (*PCCA*: с.183+4del4) в гетерозиготном состоянии, однако диагноз был установлен на основании клинических и лабораторных данных.

Неописанная ранее делеция с.217delG; p.(Glu73Lysfs*31) приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Варианты с.1195C>T; p.(Arg399Trp), с.468+1G>A являются наиболее частыми и составляют 20% каждый от всех 15 мутантных аллелей гена *PCCA*.

У представителей европеоидной расы в гене *PCCA* не описаны частые мутации. В Японии три мутации в гене *PCCA* являются наиболее часто встречающимися (более 50% от изученных аллелей): с.922_923insT; p.(Leu308Phefs*35), IVS19-6C>G, с.1196G>A; p.(Arg399Gln). В гене *PCCB* мутации с.1218del14ins12; p.(Gly407Hisfs*14), с.1172_1173insT; p.(Val392Cysfs*2), с.502G>A; p.(Glu168Lys), с.1228C>T; p.(Arg410Trp) являются частыми для представителей европеоидной расы [4]. Мутации с.1172_1173insT; p.(Val392Cysfs*2), с.502G>A; p.(Glu168Lys) в гене *PCCB* также часто встречаются в Испании и Латинской Америке, а мутации с.1283C>T; p.(Thr428Ile), с.1228C>T; p.(Arg410Trp), с.1534C>T; p.(Arg512Cys) являются наиболее частыми для представителей монголоид-

Таблица 1

Концентрации биохимических маркеров у 16 пациентов с ПА из России

Код пациента	Пол	Возраст, дней	3-гидроксипропионовая кислота, ммоль/моль креатинина Норма: 3-10 ммоль/моль креатинина	Метилцитрат, ммоль/моль креатинина Норма: 0-12 ммоль/моль креатинина	Пропионилглицин, ммоль/моль креатинина Норма: 0-2 ммоль/моль креатинина	Тиглилглицин, ммоль/моль креатинина Норма: 0-12 ммоль/моль креатинина	Глицин, мкмоль/л Норма: 95-945 мкмоль/л	Пропионилкарнитин, мкмоль/л Норма: 0.16-6.5 мкмоль/л
МКА	Ж	87	310,5	135,2	18,9	178,5	1191,9	30,7
ШМЕ	Ж	7	67,6	141,9	н.в.	н.в.	393,5	0,4
ЗВАо	М	17	3,6	н.в.	н.в.	н.в.	1210,7	20,1
КМД	М	10	241,5	87,4	80,1	н.в.	419,0	12,5
НРР	М	81	321,6	278,8	168,3	н.в.	911,4	12,6
ОМР	Ж	241	597,2	374,2	н.в.	2797,2	1009,8	10,8
ХАС	Ж	371	94,3	70,3	850	н.в.	615,2	6,3
КПА	Ж	200	20,1	57,5	н.в.	9,4	750,7	12,3
ИСА	Ж	142	758,7	35,1	29,3	н.в.	989,7	19,7
КВК	Ж	46	11,1	193,2	н.в.	25,5	1148,8	13,1
БГА	М	10	114,2	425,5	н.в.	н.в.	419,3	12,0
БСА	Ж	174	2734,3	722,1	302,9	1882,5	150,1	8,8
ИЕА	Ж	287	50	н.в.	1	н.в.	1150,3	32,3
АЛВк	Ж	19	3,1	28,6	н.в.	14,8	1001,4	8,9
ТКЗ	Ж	309	Биохимическое исследование не проводилось					
ТМА	М	211	13,9	155,3	10,11	н.в.	952,4	35,8

Примечание: н.в. — не выявлено (вариант нормы).

ной расы [5, 6]. Однако ни один из этих вариантов не был обнаружен в ходе настоящего исследования.

Анализ обнаруженных миссенс-вариантов

Для анализа влияния выявленных миссенс-вариантов на белок была построена 3D-модель ПКК на основе имеющийся кристаллографической структуры [24], на которой были обозначены функциональные домены и локализация выявленных замен. Вариант в гене *PCCA* с.1195C>T приводит к замене аргинина на триптофан в позиции 399 в участке домена БК. Варианты в гене *PCCB* с.562G>A; (p.Gly188Arg), с.613G>T; p.(Val205Phe) и с.1274C>G; p.(Pro425Arg) затрагивают высоко консервативный домен ТК.

Вариант с.689G>C; p.(Arg230Pro) расположен в высоко консервативном регионе АТФ-связывающего домена белка (рис. 4).

Был также проведён биоинформатический анализ обнаруженных миссенс-вариантов с использованием сервисов PolyPhen-2, SIFT (PROVEAN Protein) и MutationTaster (табл. 3).

На основании имеющихся данных вариантам были присвоены критерии патогенности в соответствии

с рекомендациями American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG (табл. 4).

Клиническая характеристика

Для исследования были доступны клинические данные 12 пациентов из 11 семей (табл. 5). У 4 пациентов была неонатальная форма, у 8 – младенческая форма ПА.

В 6 из 11 семей были случаи смерти старших siblings, но они не проходили обследование у врача-генетика.

Первые симптомы заболевания проявлялись у пациентов в возрасте до 8-ми месяцев, соответствуя типичной клинической картине ПА: энцефалопатия с различными уровнями нарушения сознания, судорожный синдром, отказ от еды, многократная рвота и метаболический ацидоз. У пациента с самой ранней манифестацией (1-е сутки жизни) также наблюдались диспноэ, мышечная гипотония и гепатомегалия. У 1 пациента диагноз был установлен по результатам селективного скрининга до развития метаболического криза. Наиболее частым клиническим симптомом является угнетение сознания различной степени (вплоть до комы) – у 9 па-

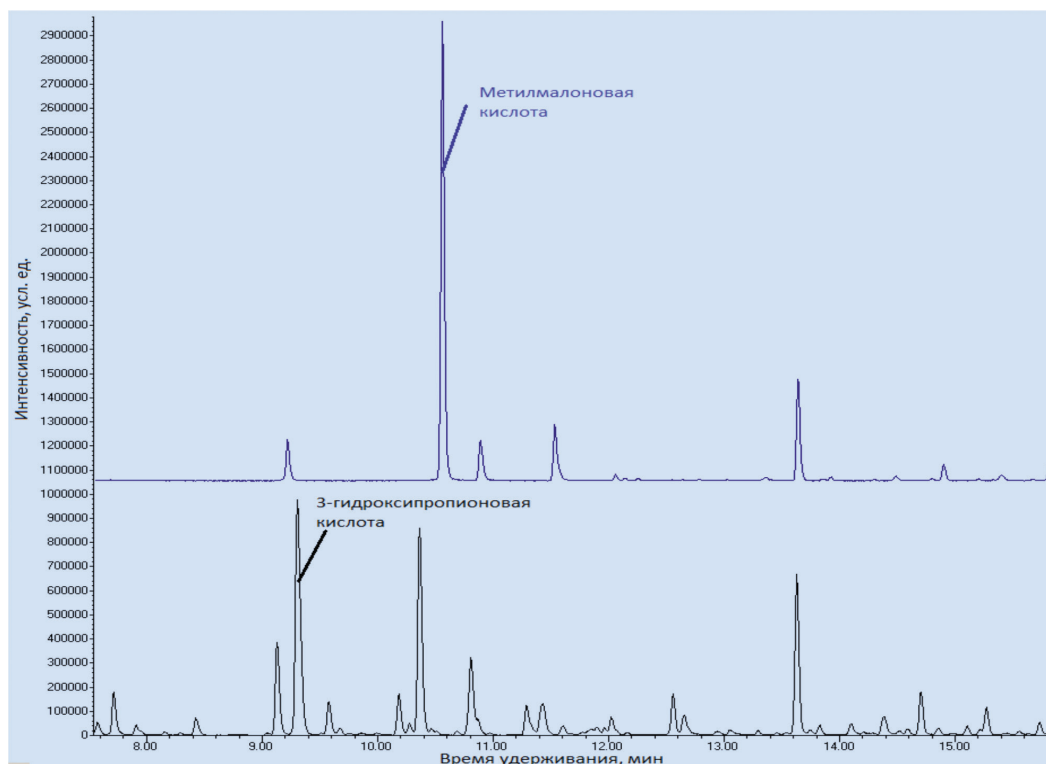


Рис. 2. Сравнение профилей органических кислот мочи пациентов с МА (верхняя хроматограмма) и ПА (нижняя хроматограмма). При МА наблюдается повышение метилмалоновой кислоты. 3-гидроксипропионовая кислота может повышаться при обеих ацидемиях, но чаще её повышение наблюдается при ПА. Приведены хроматограммы по полному ионному току, полученные на ГХ-МС системе 7890A/5975C (Agilent, США).

Генотипы 15 пациентов с ПА из России

Ген	Код пациента	Вариант в кДНК Аллель 1 Аллель 2	Эффект на уровне белка Аллель 1 Аллель 2	Тип варианта Аллель 1 Аллель 2	Ссылка
PCCA	ШМЕ	c.468+1G>A ² в гомозиг. сост.	p.(Val139_Leu156del)	Сплайсинг	[24]
PCCA	КМД	c.1284+2dupT c.1288C>T	p.(Asp404_Gly428del) p.(Arg430*)	Сплайсинг Нонсенс	[24] / CM139564
PCCA	ОМР	c.1495delA в гомозиг. сост.	p.(Ile499Serfs*19)	Делеция	CD1816798
PCCA	КПА	c.468+1G>A ² c.1899+4del4	p.(Val139_Leu156del) p.(Cys616_Val633del) [4]	Сплайсинг Сплайсинг	CD972377
PCCA	КВК	c.689G>C ² c.1195C>T	p.(Arg230Pro) p.(Arg399Trp)	Миссенс Миссенс	662772
PCCA	БГА	c.217delG ² в гомозиг. сост.	(Glu73Lysfs*31)	Делеция	-
PCCA	БСА	c.1195C>T в гомозиг. сост.	p.(Arg399Trp)	Миссенс	662772
PCCA	ИЕА	c.183+4del4 ² в гетерозиг. сост.; второй аллель не выявлен	p.(His36_Lys61del) Второй аллель не выявлен	Сплайсинг -	[24] 554669
PCCB	МКА	c.655-2A>G ^{1,2} в гомозиг. сост.	Asp219Profs*13	Сплайсинг	[24]
PCCB	ЗВАо	c.562G>A в гомозиг. сост.	p.Gly188Arg	Миссенс	558327
PCCB	НРР	c.655-2A>G ^{1,2} в гомозиг. сост.	Asp219Profs*13	Сплайсинг	[24]
PCCB	ХАС	c.655-2A>G ^{1,2} c.850dupG ²	Asp219Profs*13 Asp284Glyfs*7	Сплайсинг Инсерция	[24]
PCCB	ИСА	c.1199-2A>G в гомозиг. сост.	p.(Gly400_Lys433del);	Сплайсинг	CS034147
PCCB	АЛВк	c.613G>T в гомозиг. сост.	p.(Val205Phe)	Миссенс	CM1110008
PCCB	ТКЗ	c.1274C>G в гомозиг. сост.	p.(Pro425Arg)	Миссенс	-

Примечание: ¹ – вариант находится внутри сайта сплайсинга; ² – ранее неописанный вариант нуклеотидной последовательности.

Таблица 3

Результаты биоинформатического анализа миссенс-вариантов.

Вариант	PolyPhen-2 (оценка; классификация)	MutationTaster (вероятность; классификация)	SIFT (PROVEAN Protein) (оценка; классификация)
PCCB, c.562G>A; p.(Gly188Arg)	1,000; патогенный	0.99999999980819; патогенный	-7,585; патогенный
PCCB, c.1274C>G; p.(Pro425Arg)	1,000; патогенный	0.99999999977574; патогенный	-8,424; патогенный
PCCB, c.613G>T; p.(Val205Phe)	1,000; патогенный	0.99999999951044; патогенный	-4,802; патогенный
PCCA, c.1195C>T; p.(Arg399Trp)	1,000; патогенный	0.9999997428833; патогенный	-7,584; патогенный
PCCA, c.689G>C; p.(Arg230Pro)	1,000; патогенный	0.99999995223977; патогенный	-6,495; патогенный

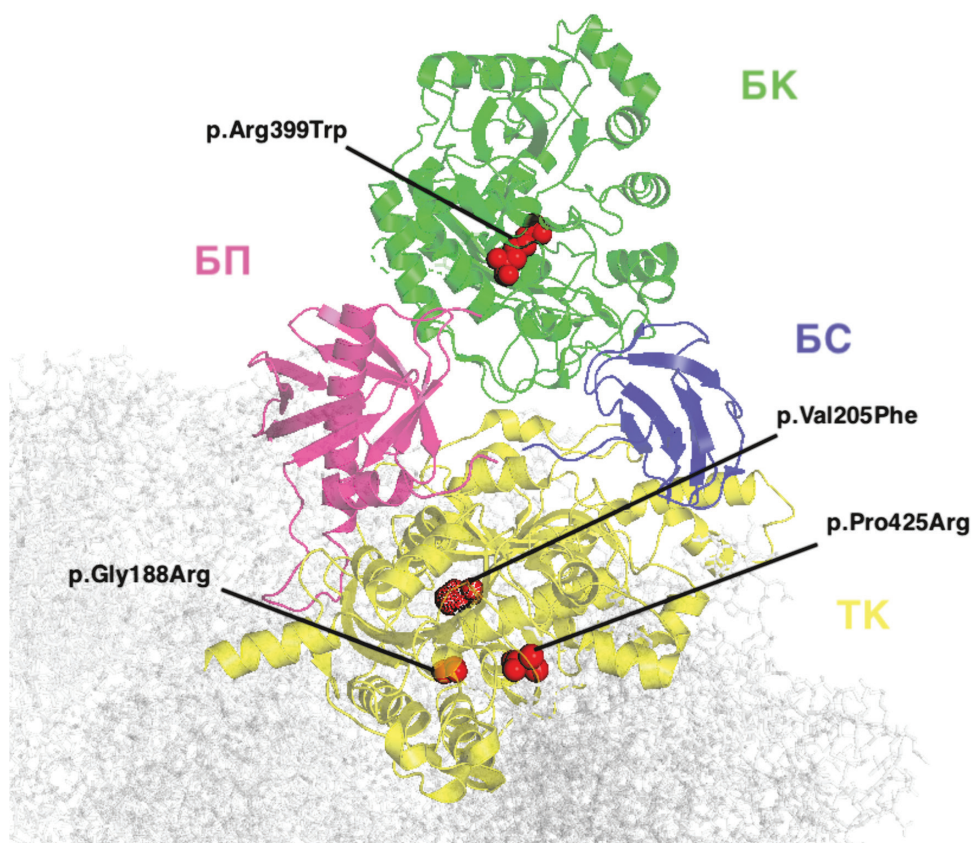


Рис. 3. Расположение выявленных миссенс-мутаций на 3D-модели пропионил-КоА-карбоксилазы. БК – домен биотинкарбоксилазы; БП – биотин-переносящий домен; БС – домен связывания с биотином; ТК – домен транс-карбоксилазы.

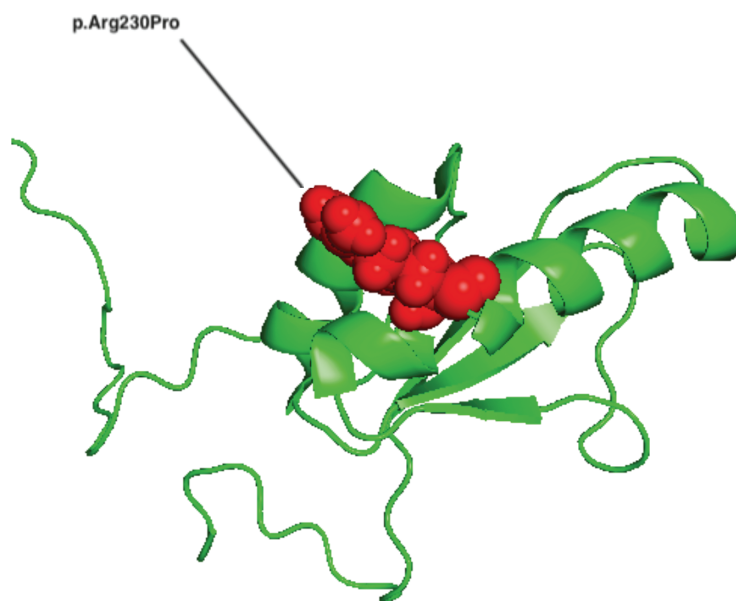


Рис. 4. АТФ-связывающий домен пропионил-КоА-карбоксилазы.

Классификация выявленных впервые вариантов согласно рекомендациям ACMG

Вариант	Критерии ACMG	Классификация
PCCA, c.468+1G>A	PVS1, PP4, PM2	патогенный
PCCA, c.689G>C	PP4, PP3, PM2, PM1, PM3	вероятно патогенный
PCCA, c.217delG	PVS1, PP4, PM6	патогенный
PCCA, c.183+4_183+7del	PS3, PM2, PP3, PP4	вероятно патогенный
PCCB, c.655-2A>G	PVS1, PM2, PM3, PP4	патогенный
PCCB, c.850dup	PVS1, PM2, PP4	патогенный

Клиническая характеристика 12 пациентов с ПА

Пациент	Наследственный анамнез	Возраст дебюта заболевания	Первые клинические симптомы	Результаты лабораторных обследований	Результаты инструментальной диагностики	Направительный диагноз
МКА	Не отягощен	5 мес	Судорожный приступ с нарушением дыхания, вялость, отказ от еды	Метаболический ацидоз	Гепатоспленомегалия, диффузные изменения почек, поджелудочной железы	Митохондриальная энцефалопатия (синдром Ли)
БСА	Смерть сибса в семье (в возрасте 2,5 лет, диагноз МА/ПА)	7 мес	Судорожный синдром, отказ от еды, кома	Умеренное повышение АсАТ, метаболический ацидоз	Пиелозктазия слева. Поликистоз яичников (?)	НБО
НРР	Смерть сибса в возрасте 1 года	Первые сутки жизни	Угнетение сознания, кома	Гипераммониемия	Нет данных	НБО
БГА	Смерть сибса в возрасте 9 суток, диагноз: врожденный иммунодефицит	Первые сутки жизни	Диспноэ, мышечная гипотония, угнетение сознания	Метаболический ацидоз	Гепатомегалия	НБО, врожденный иммунодефицит
ХАС	Смерть сибса в возрасте 10 суток, диагноз: острая пневмония	2 мес	Вялость, угнетение сознания, кома, отказ от еды, судорожный синдром	Метаболический ацидоз	Гепатомегалия	НБО
ТКЗ	Нет данных	1 мес 2 дня	Угнетение сознания, мышечная гипотония	Метаболический ацидоз	Без особенностей	Гипоксически-ишемическая метаболическая энцефалопатия
ЗВАо	Не отягощен	1 мес	Частые срыгивания, повторные рвоты	Анемия 1 степени	Без особенностей	ПА
ИЕА	Не отягощен	8 мес	Слабость, сонливость, угнетение сознания, многократная рвота	Повышение глицина и пропионилкарнитина	Нет данных	НБО
КВК	Смерть первого сибса в возрасте 5 дней (диагноз: врожденная пневмония), смерть второго сибса в возрасте 2,5 мес (диагноз: сепсис)	6 мес	Угнетение сознания	Повышение печеночных трансаминаз, гипергликемия (до 14,2 ммоль/л), метаболический ацидоз	Нет данных	Сахарный диабет неуточненного генеза (стрессовый/1 тип), декомпенсация с кетоацидозом, иммунодефицитное состояние
АЛВк	Не отягощён	Пятые сутки жизни	Кома, обильные срыгивания, отказ от еды	Метаболический ацидоз	Без особенностей	Внутриутробная инфекция, НБО
КМД	Смерть сибса в возрасте 21 дня жизни с диагнозом: внутриутробная инфекция	Пятые сутки жизни	Угнетение сознания, судорожный синдром	Метаболический ацидоз, повышение печеночных трансаминаз	Без особенностей	Органическая ацидурия
КПД	Не отягощён	5 месяцев	Мышечная гипотония, задержка психомоторного развития	Без особенностей	Гепатомегалия	НБО

циентов из данной выборки (60% пациентов), у 5 наблюдался отказ от еды (33%), рвота, судорожный синдром были у 4 пациентов (27% пациентов). Метаболический ацидоз выявили у 8 пациентов (53%).

На фоне метаболического криза и стремительно развивающейся полиорганной недостаточности наблюдается высокий процент летального исхода при отсутствии надлежащей терапии: 5 пациентов из данной выборки умерли, причем 3 из них в возрасте до 10 суток. По имеющимся данным состояние семерых пациентов (ЗВАо, ИЕА, МКА, ТКЗ, КМД, КПА, АЛВк) удалось стабилизировать и добиться положительной динамики благодаря комбинации симптоматической терапии и диетотерапии.

У пациентов сохраняется высокий риск развития метаболических кризов на фоне интеркуррентных инфекций. Наиболее частыми осложнениями после перенесённого криза являются поражения нервной системы (задержка психомоторного и речевого развития, симптоматическая эпилепсия), желудочно-кишечного тракта (нарушения кишечного всасывания, гипотрофия, панкреатит), иммунологической и гематологической систем (трехростковая цитопения), сердечно-сосудистой системы (нарушения ритма сердца).

Заключение

Это первое исследование в нашей стране, обобщающее данные по молекулярно-генетической и биохимической диагностике редкой формы органических ацидурий — ПА у российских пациентов.

Объективные трудности биохимической диагностики ПА связаны с тем, что требуется применение нескольких биохимических методов (ГХ-МС и МС/МС) при подозрении на ПА, поскольку не всегда наблюдается изменение всех патогномоничных маркеров и также требуется дифференциальная диагностика ПА с МА.

При проведении молекулярно-генетического исследования показано, что большинство выявленных в ходе работы мутаций располагались в домене БК гена *PCCA* и представляли собой миссенс-замены; обнаружено и охарактеризовано 6 неописанных ранее вариантов нуклеотидной последовательности, которые с высокой вероятностью являются патогенными. При анализе спектра мутаций выявлены особенности, которые не были описаны ранее в литературе. В выборке, представленной преимущественно русскими, обнаружены частые мутации: доля с.655-2A>G составила 35,8% от всех мутантных аллелей в гене *PCCB* (5/14), а мутаций с.1195C>T; p.(Arg399Trp)

и с.468+1G>A — по 20% от мутантных аллелей в гене *PCCA* (3/15 каждая).

Благодарности

Авторы выражают благодарность пациентам, семьям пациентов за согласие на участие в проводимом исследовании, предоставлении клинических данных.

Литература

1. Новиков П.В., Николаева Е.А., Боровик Т.Э. и др. Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по оказанию медицинской помощи больным пропионовой ацидемией, 2013, 24 с. <http://www.rare-diseases.ru/images/Article/science-base/acidemiya.pdf>
2. Deodato F., Boenzi S., Santorelli F.M. et al. (2006, May). Methylmalonic and propionic aciduria. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics 2006;142(2): 104-112.
3. Sass J.O., Hofmann M., Skladal D. et al. Propionic acidemia revisited: a workshop report. Clinical pediatrics 2004;43(9):837-843.
4. Kraus J.P., Spector E., Venezia S. et al. Mutation analysis in 54 propionic acidemia patients. Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2012;35(1):51-63.
5. Tahara T., Kraus J.P., Ohura T. et al. Three independent mutations in the same exon of the *PCCB* gene: Differences between Caucasian and Japanese propionic acidemia. Journal of inherited metabolic disease 1993;16(2):353-360.
6. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
7. Villani G.R., Gallo G., Scolamiero E. et al. «Classical organic acidurias»: diagnosis and pathogenesis. Clin Exp Med 2017;17(3):305-323.
8. Фоминых Л.Д., Соловьева Г.В., Вязникова М.Л. и др. Пропионовая ацидурия у ребенка в возрасте 5 месяцев. Педиатрическая фармакология 2014;11(1):52-54.
9. Filipowicz H.R., Ernst S.L., Ashurst C.L. et al. Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. Molecular genetics and metabolism 2006;88(2):123-130.
10. Kuhara T., Ohse M., Inoue Y. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric newborn screening for propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples. Journal of inherited metabolic disease 2002;25(2):98-106.
11. Алексеева С.Н., Сухомясова А.Л., Софронова Г.И. и др. Клинический случай пропионовой ацидемии. Якутский медицинский журнал 2018;3(63):99-101.
12. Куркина М.В., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю. Молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика изолированной метилмалоновой ацидурии у российских пациентов. Медицинская генетика 2016;15(9):17-28.
13. Perez B., Desviat L.R., Rodriguez-Pombo P. et al. Propionic acidemia: identification of twenty-four novel mutations in Europe and North America. Molecular genetics and metabolism 2003;78(1): 59-67.
14. <https://varnomen.hgvs.org/>
15. <https://mutalyzer.nl/>
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
17. <https://www.genomnis.com/access-hsf>
18. <http://provean.jcvi.org/index.php>
19. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
20. <http://www.mutationtaster.org/>

21. <https://gnomad.broadinstitute.org/>
22. Lefevre M.F., Verhaeghe B.J., Declerck D.H. et al. Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Single and Multicolumn Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 1989;27(1):23-29.
23. Cappuccio G., Atwal P.S., Donti T.R. et al. Expansion of the phenotypic spectrum of propionic acidemia with isolated elevated propionylcarnitine. *JIMD Reports* 2016;35:33-37.
24. Huang C., Sadre-Bazzaz K., Shen Y. et al. Crystal structure of the $\alpha\beta$ 6holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature* 2010;466:1001–1005.
9. Filipowicz H.R., Ernst S.L., Ashurst C.L. et al. Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. *Molecular genetics and metabolism* 2006;88(2):123-130.
10. Kuhara T., Ohse M., Inoue Y. et al. Gas chromatographic–mass spectrometric newborn screening for propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples. *Journal of inherited metabolic disease* 2002;25(2):98-106.
11. Alekseeva S.N., Sukhomyasova A.L., Sofronova G.I. et al. Klinicheskiy sluchay propionovoy atsidemii [Clinical case of propionic acidemia]. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal [Yakut Medical Journal]* 2018; 3 (63):99-101. (In Russ.)
12. Kurkina M.V., Baydakova G.V., Zakharova E.Yu. Molekulyarno-geneticheskaya i biokhimicheskaya kharakteristika izolirovannoy metilmalonovoy atsidurii u rossiyskikh patsiyentov [Molecular and biochemical characteristics of the isolated methylmalonic aciduria in Russian patients]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]* 2016;15(9):17-28. (In Russ.)
13. Perez B., Desviat L.R., Rodriguez-Pombo P. et al. Propionic acidemia: identification of twenty-four novel mutations in Europe and North America. *Molecular genetics and metabolism* 2003;78(1):59-67.
14. <https://varnomen.hgvs.org/>
15. <https://mutalyzer.nl/>
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
17. <https://www.genomnis.com/access-hsf>
18. <http://provean.jcvi.org/index.php>
19. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
20. <http://www.mutationtaster.org/>
21. <https://gnomad.broadinstitute.org/>
22. Lefevre M.F., Verhaeghe B.J., Declerck D.H. et al. Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Single and Multicolumn Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 1989;27(1):23-29.
23. Cappuccio G., Atwal P.S., Donti T.R. et al. Expansion of the phenotypic spectrum of propionic acidemia with isolated elevated propionylcarnitine. *JIMD Reports* 2016;35:33-37.
24. Huang C., Sadre-Bazzaz K., Shen Y. et al. Crystal structure of the $\alpha\beta$ 6holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature*, 2010;466:1001–1005.
1. Novikov P.V., Nikolayeva Ye.A., Borovik T.E. et al. Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii (protokoly) po okazaniyu meditsinskoy pomoshchi bol'nym propionovoy atsidemiiyey [Federal clinical guidelines (protocols) for the provision of medical care to patients with propionic acidemia]. 2013, 24 p. (In Russ.) <http://www.rare-diseases.ru/images/Article/science-base/acidemiya.pdf>
2. Deodato F., Boenzi S., Santorelli F.M. et al. (2006, May). Methylmalonic and propionic aciduria. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 2006;142(2):104-112.
3. Sass J.O., Hofmann M., Skladal D. et al. Propionic acidemia revisited: a workshop report. *Clinical pediatrics* 2004;43(9):837-843.
4. Kraus J.P., Spector E., Venezia S. et al. Mutation analysis in 54 propionic acidemia patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism* 2012;35(1):51-63.
5. Tahara T., Kraus J.P., Ohura T. et al. Three independent mutations in the same exon of the *PCCB* gene: Differences between Caucasian and Japanese propionic acidemia. *Journal of inherited metabolic disease* 1993;16(2):353-360.
6. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
7. Villani G.R., Gallo G., Scolamiero E. et al. «Classical organic acidurias»: diagnosis and pathogenesis. *Clin Exp Med* 2017;17(3):305-323.
8. Fominykh L.D., Solovyeva G.V., Vyaznikova M.L., Muratova N.G., Serebrenikova T.E., Kostyuchek E.A. Propionovaya atsiduriya u rebenka v vozraste 5 mesyatsev [Propionic aciduria in a 5-month-old child]. *Pediatriceskaya farmakologiya [Pediatric pharmacology]* 2014;11(1):52-54. (In Russ.) <https://doi.org/10.15690/pf.v11i1.895>

References