

Изучение взаимосвязи генотипов (*PAH*) и фенотипов у больных фенилкетонурией Ростовской области*

Амелина М.А.¹, Зинченко Р.А.^{2,3}, Степанова А.А.²,
Гундорова П.², Поляков А.В.², Амелина С.С.⁴

¹ — Академия биологии и биотехнологии (факультет биологических наук) Южного, Федерального Университета, 344006, г.Ростов-на-Дону, просп. Стачки 194/1, e-mail: samelina@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

⁴ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Ростов-на-Дону

В рамках генетико-эпидемиологического изучения Ростовской области у 131 пациента с фенилкетонурией проанализированы результаты ДНК-диагностики, показатели уровня фенилаланина и зависимость клинических проявлений заболевания от генотипа больных. У 130 пациентов с фенилкетонурией выявлено 40 мутаций (49 различных генотипов) в гене *PAH*, у одного — в гене *PTS*. Проведен анализ гено-фенотипических корреляций, изучена взаимосвязь генотипов и показателей фенилаланина до начала лечения и на фоне проводимой диетотерапии. В процессе исследования получены результаты, которые свидетельствуют о зависимости клинической картины фенилкетонурии от генотипа. Проведенный регрессионный анализ показал наличие значимых отрицательных корреляций между активностью фермента фенилаланин-гидроксилазы и уровнем фенилаланина у больных при ретестировании и в результате диетотерапии.

Ключевые слова: фенилкетонурия, мутация, ген *PAH*, фенилаланин, фено-генокорреляция

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ; ОМIM: #261600) — наследственная аминокислотопатия с аутосомно-рецессивным типом наследования, основным симптомом которой является умственная отсталость, достигающая у большей части пациентов, не получающих диетотерапию, степени имбецильности или идиотии. С первых недель жизни у ребенка с ФКУ могут наблюдаться повышенная возбудимость, блуждающий взгляд, возможны эпилептиформные пароксизмы. К 6 месяцам отмечается выраженная задержка психомоторного развития.

Ген, ответственный за развитие ФКУ — ген фенилаланин-гидроксилазы (phenylalanine hydroxylase, *PAH*; *612349), содержит 13 кодирующих экзонов, локализован на 12 хромосоме (12q23.2), геномные координаты (GRCh38): 12:102,838,320-102,917,602. Продуктом гена *PAH* является фермент фенилаланин-гидроксилаза (ФАГ, EC 1.14.16.1), преобразующий фенилаланин (ФА) в тирозин. ФАГ — один из трех биоптерин-зависимых ферментов, кофакторами которых являются тетрагидробиоптерин (BH4) и негемовое железо [2]. Различные мутации гена *PAH* приводят к образованию нефункциональной или частично функциональной фенилаланин-гидроксилазы [1–3]. Описано 957 патологических вариантов гена *PAH* [1–3]. Степень тяжести клинической картины ФКУ в значительной степени зависит от мутации в гене *PAH* [1].

До настоящего времени классификация форм ФКУ базируется на уровне ФА в крови и не учитывает клинические проявления заболевания [4, 5]:

- 1) классическая ФКУ (кФКУ), уровень ФА в крови выше 1200 мкмоль/л;
- 2) умеренная ФКУ, уровень ФА 900–1200 мкмоль/л;
- 3) мягкая ФКУ, уровень ФА 600–900 мкмоль/л;
- 4) мягкая гиперфенилаланиемия (мГФА), уровень ФА 120–600 мкмоль/л.

Умеренную и мягкую формы ФКУ объединяют в единую и обозначают как мягкую ФКУ (мФКУ) с уровнем ФА 600–1200 мкмоль/л [6, 7].

Изучение функциональной активности ФАГ ведется многими исследователями достаточно давно [8, 9]. Предполагается, что вариабельность клинической картины при ФКУ может быть обусловлена различными причинами, в том числе связана с разной функциональной активностью ФАГ при различных мутациях в гене *PAH* [10]. У компаунд-гетерозигот тяжесть болезни определяет менее «тяжелая» из двух *PAH*-мутаций. В случае двух «тяжелых» мутаций, фенотип пациентов может быть более мягким, чем вызванный каждой из этих мутаций в гомозиготном состоянии [8–10].

Определенный вклад в изучение остаточной активности фермента ФАГ при ФКУ внесен при изучении тетрагидробиоптерина (BH4) [11], который предложен в качестве дополнения к диете или как монотерапия.

* Работа выполнена при частичном финансировании гранта РФФИ 14-04-00525.

Сапроптерин является синтетической формой ВН4, применение которого при лечении ФКУ было основано на предположении, что для некоторых «мутантных» форм фермента, его кофактор может повышать активность ФАГ. Данные исследования предали новый импульс в изучении активности фермента ФАГ при отдельных мутациях [12–14].

Влияние конкретной мутации на активность ФАГ оценивали с использованием различных методов: прямой анализ активности фермента; определение скорости окисления ФА, меченного ^{13}C *in vivo*; исследование экспрессии ФАГ в культивируемых клетках крыс *in vitro* и «виртуальный» метод молекулярного моделирования [12–14]. Данные об активности ФАГ, имеющиеся в литературе (по данным базы данных BIOPKU), представлены в табл. 1.

В предыдущей публикации [15] по изучению ФКУ в Ростовской области (РО) представлен спектр и частоты мутаций в гене *PAH* у пациентов.

Целью настоящего исследования явилась оценка зависимости тяжести фенотипического проявления ФКУ от генотипа больных для возможного прогнозирования течения заболевания.

Материалы и методы

Проведен анализ зависимости тяжести фенотипических проявлений ФКУ от генотипа у 131 пациента из Ростовской области (РО) с диагнозом ФКУ и ГФА. В анализ включены только те пациенты, которые со слов родителей строго соблюдали диету и систематически осуществлялся контроль уровня ФА в крови.

Все пациенты подписали письменное информированное согласие на добровольное участие в обследовании (информированное согласие получено у родителей несовершеннолетних детей), на забор биологического материала (кровь), а также на публикацию данных о них в печати. Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

При анализе мутаций в гене *PAH* использованы следующие методы ДНК-анализа — ПЦР, прямое автоматическое секвенирование, MLPA-анализ. Исследование

проведено сотрудниками лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ».

Расчет остаточной активности ФАГ для конкретных генотипов в гене *PAH* проводился с использованием данных базы BIOPKU (www.biopku.org). Рассчитывалась остаточная активность фермента для генотипа как сумма остаточной активности ФАГ аллеля 1 + аллеля 2, разделенная на 2 [16].

Анализ регрессионной зависимости признаков проведен с использованием программы «Statistica 10» по Пирсону.

Результаты и обсуждение

При проведении подтверждающей ДНК-диагностики у 130 пациента из РО выявлено 40 мутаций в гене *PAH*.

У одного больного с клинической картиной ФКУ не выявлено мутаций в гене *PAH*. У ребенка уровень ФА при неонатальном скрининге составил 19,26 мг%, при ретестировании — 29,24 мг%. Ребенку назначена заместительная диетотерапия, на фоне которой значения ФА снизились в течение месяца до 0,88 мг%. Средний уровень ФА на первом году жизни составил 3,73 мг%, повышение ФА до 11,2 мг% отмечалось на фоне ОРВИ. При ДНК-исследовании обнаружен компаунд-гетерозиготный генотип (N52S/P87S) в гене *PTS*, что позволило поставить диагноз: ГФА ВН4А.

Наиболее частой мутацией в гене *PAH* оказалась R408W (62,31%). Частота других мутаций не превышала 5%. С частотой выше 1% выявлены следующие мутации: 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%). Диагностированы две ранее не описанные мутации — Y268C (0,38%), c.1298dupT (0,38%) [15].

Выявленные мутации в гене *PAH* составили 49 различных вариантов генотипов. В табл. 2 представлены генотипы, остаточная активность ФАГ, рассчитанная для различных генотипов, форма ФКУ (кФКУ, мФКУ и мГФА), число больных и доли больных ФКУ с различными генотипами в РО [3].

Таблица 1

Средние значения активности ФАГ в эукариотических клетках [3]

Мутация гена <i>PAH</i>	Активность PAH (%)*	Мутация гена <i>PAH</i>	Активность PAH (%)*	Мутация гена <i>PAH</i>	Активность PAH (%)*
K274E	100	R408Q	46	V245L	7
D59Y	92	A309V	42	A259T	6
E76G	85	L48S	39	R252Q	3
A322G	75	I65T	33	A259V	2
E390G	62	A342T	26	R408W	2
K398N	55	R243Q	13	R252W	0
F39L	49	R158Q	10	IVS10-11G>A	0

Варианты генотипов, активность ФАГ и формы ФКУ у больных РО

№	Алель 1	Алель 2	Активность ФАГ, %*, **	Итоговая активность ФАГ генотипа	Форма ФКУ	Число больных	Доля больных (%)
1	R408W	R408W	(2+2)/2	2	кФКУ	59	45,38
2	R408W	P281L	(2+2)/2	2	кФКУ/мФКУ	5	3,85
3	R408W	IVS12+1G>A	(2+0)/2	1	кФКУ/мФКУ	4	3,08
4	R408W	EX5del	(2+x)/2	н/д	кФКУ	3	2,31
5	R408W	R158Q	(2+10)/2	6	кФКУ/мФКУ	3	2,31
6	R408W	L48S	(2+39)/2	20,5	мФКУ/кФКУ	3	2,31
7	R408W	R261Q	(2+44)/2	23	кФКУ/мФКУ	3	2,31
8	IVS12+1G>A	IVS12+1G>A	0	0	кФКУ/мФКУ	3	2,31
9	IVS10-11G>A	IVS10-11G>A	(5+5)/2	5	кФКУ/мФКУ	2	1,54
10	R408W	IVS10-11G>A	(2+5)/2	3,5	кФКУ/мФКУ	2	1,54
11	R252W	IVS10-11G>A	(0+5)/2	2,5	кФКУ	2	1,54
12	R408W	R252W	(2+0)/2	1	кФКУ/мФКУ	2	1,54
13	R261Q	R158Q	(44+10)/2	26	мФКУ/кФКУ	2	1,54
14	A300S	R297H	(31+21)/2	26	Нет данных	2	1,54
15	R261X	R261X	(0+0)/2	0	кФКУ	1	0,77
16	R261X	R261Q	(0+44)/2	22	кФКУ/мФКУ	1	0,77
17	R261Q	E280K	(44+2)/2	23	кФКУ	1	0,77
18	R408W	R176X	(2+1)/2	1,5	кФКУ	1	0,77
19	R408W	F299C	(2+3)/2	2,5	кФКУ/мФКУ	1	0,77
20	R158Q	F39del	(10+20)/2	15	кФКУ/мФКУ	1	0,77
21	P281L	R261Q	(2+44)/2	23	мФКУ/кФКУ	1	0,77
22	R408W	Y414C	(2+57)/2	29,5	мФКУ/кФКУ	1	0,77
23	IVS10-11G>A	F39del	(5+20)/2	12,5	мФКУ	1	0,77
24	R408W	R408Q	(2+46)/2	24	мФКУ	1	0,77
25	R408W	I306V	(2+39)/2	20,5	ГФА	1	0,77
26	V245A	S16>XfsX1	(50+0)/2	25	ГФА	1	0,77
27	R408W	A403V	(2+66)/2	34	ГФА	1	0,77
28	R243X	E280K	(0+2)/2	1	Нет данных	1	0,77
29	R408W	IVS7-5T>C	(2+2)/2	2	Нет данных	1	0,77
30	R408W	A342T	(2+26)/2	14	Нет данных	1	0,77
31	R408W	IVS7+1G>A	(2+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
32	R408W	IVS11+1G>C	(2+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
33	R408W	K363>Nfs	(2+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
34	R408W	N133_Q134> Rfs	(2+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
35	R408W	V399V	(2+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
36	R252W	IVS4+5G>T	(0+x)/2	н/д	кФКУ	1	0,77
37	R408W	Y387H	(2+x)/2	н/д	кФКУ/мФКУ	1	0,77
38	IVS10-11G>A	K363>Nfs	(5+x)/2	н/д	кФКУ/мФКУ	1	0,77
39	R408W	IVS10?3C>T	(2+x)/2	н/д	мФКУ/кФКУ	1	0,77
40	R261Q	IVS10?3C>T	(44+x)/2	н/д	мФКУ	1	0,77
41	R408W	T372S	(2+x)/2	н/д	ГФА	1	0,77
42	R408W	IVS2+13T>G	(2+x)/2	н/д	н/д	1	0,77

Таблица 2 (окончание)

№	Алель 1	Алель 2	Активность ФАГ, %*, **	Итоговая активность ФАГ генотипа	Форма ФКУ	Число больных	Частота встречаемости (%)
43	R408W	IVS4+5G>T	(2+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
44	R408W	IVS9+5G>A	(2+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
45	E390G	IVS11+1G>C	(62+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
46	P281L	EX5del	(2+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
47	R158Q	c.1298dupT	(10+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
48	R261Q	Y268C	(44+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
49	R261G	EX5del	(y+x)/2	н/д	н/д	1	0,77
Итого						130	100,00

Примечание. * — расчет активности ФАГ (активность ФАГ аллеля 1 + активность ФАГ аллеля 2, разделенная на 2); ** — x, y — нет данных об активности ФАГ; н/д — нет данных

Таблица 3

Уровень ФА при неонатальном скрининге с учетом генотипа больных

Уровень ФА "нео"	R408W/R408W	R408W/X	X/X	Итого
До 10 мг%	4/9,76	19/46,34	14/56,00	37/34,58
10–20 мг%	35/85,37	21/51,22	11/44,00	67/62,62
20 мг% и более	2/4,88	1/2,44	0	3/2,80
Итого	41/100,00	41/100,00	25/100,00	107/100,00
Нет ФА "нео"	18	3	2	23

Примечание. Для табл. 3, 4, 5: в числителе указано количество больных, в знаменателе — доля больных (%)

Как следует из табл. 2, наиболее частым является генотип R408W/R408W, частота которого составила 45,38%. Среди компаунд-гетерозиготных носителей чаще всего регистрировались генотипы, в которых мутация R408W сочеталась с другими мутациями: P281L (3,85%), IVS12+1G>A (3,08%) и EX5del (2,31%).

Предпринята попытка выявления зависимости между генотипом пациентов и уровнем ФА. С этой целью выделены три группы больных, различающихся по уровню ФА: значения ФА при неонатальном скрининге (ФА «нео»), значения ФА при ретестировании (ФА «ретест») и среднее значение ФА на фоне диетотерапии (ФА «диета»). Две из трех групп (ФА «нео», ФА «ретест») характеризовали уровни ФА до начала лечения и были выделены для возможного прогнозирования биохимического фенотипа заболевания у пациентов.

В зависимости от генотипа также выделены три группы: гомозиготы по мутации R408W (59 больных), компаунды R408W с другими мутациями X (44 больных) и группа детей, генотип которых представлен компаундным состоянием по другим мутациям X/X (27 больных).

Значения уровня ФА при неонатальном скрининге (ФА «нео») с учетом генотипа больных представлены в табл. 3.

При проведении анализа из расчета исключены 22 больных в связи с отсутствием данных об уровне ФА

при неонатальном скрининге. Эти пациенты выявлены до начала проведения программы неонатального скрининга, либо пропущены на первых этапах введения системы скрининга в регионе. Данные табл. 3 показывают, что уровень ФА при неонатальном скрининге у гомозигот по R408W представлен в основном высокими значениями, в то время как в группах компаундных гетерозигот по R408W/X и X/X значения ФА «нео» выше 10 мг% наблюдались у 53,66% и 44% больных соответственно. Значения ФА «нео» выше 20 мг% представлены единичными случаями. Значения ФА «нео» ниже 10 мг% встречались в основном в группах компаундных гетерозигот по R408W/X и X/X (46,34% и 56% соответственно).

Для постановки диагноза ФКУ важной характеристикой является анализ уровня ФА при проведении «ретеста» (табл. 4).

Как видно из данных, представленных в табл. 4, при ретестировании во всех рассматриваемых группах уровень ФА оказался выше 20 мг% у 77,69% больных (91,53%; 70,45%; 59,26% в трех группах в зависимости от генотипа соответственно). Значения ФА ниже 10,0 мг% выявлены только в группах компаундных гетерозигот по R408W/X и X/X, в совокупности составив 4,62%. Значения ФА при «ретесте» в пределах 10–20 мг% также в основном характерны для групп компаундных гетерозигот R408W/X и X/X. В группе го-

Таблица 4

Уровень ФА при ретестировании с учетом генотипа

Уровень ФА "ретест" (мг%)	R408W/R408W	R408W/X	X/X	Всего
До 10 мг%	0	3/6,82	3/11,11	6/4,62
10–20 мг%	5/8,47	10/22,73	8/29,63	23/17,69
Выше 20 мг%	54/91,53	31/70,45	16/59,26	101/77,69
Всего	59/100,00	44/100,00	27/100,00	130/100,00

Таблица 5

Уровень ФА на фоне диетотерапии с учетом генотипа

Уровень ФА "диета"	R408W/R408W	R408W/X	X/X	Итого
До 10 мг%	29/61,70	30/69,78	15/55,55	74/63,25
10–20 мг%	18/38,30	12/27,91	9/33,33	39/33,33
Выше 20 мг%	0	1/2,33	3/11,11	4/3,42
Итого	47/100,00	43/100,00	27/100,00	117/100,00

мозигот по R408W (R408W/R408W) значения ФА при «ретесте» ниже 10 мг% не выявлены. На рис. 1 наглядно отображены выявленные тенденции.

Для сравнения уровней ФА при неонатальном скрининге и при ретестировании проведен корреляционный анализ между показателями ФА «нео» и ФА «ретест». Коэффициент корреляции оказался высоким и составил $r = 0,92 \pm 0,23$. Таким образом, показатели ФА при неонатальном скрининге с высокой достоверностью могут служить прогнозом значений ФА при ретестировании. Однако это не позволяет точно прогнозировать дальнейшее клиническое течение заболевания (в 80% клинические проявления соответствует биохимическому генотипу).

Необходимо отметить, что выявлено шесть пациентов, со следующими генотипами R408W/A403V, R408W/I306V, R408W/T372S, A300S/R297H (2), V245A/S16> XfsX1, у которых уровни как ФА «нео», так и значения ФА при «ретесте» не превышали 10 мг%, что

позволило говорить о мГФА. Пациенты находились на динамическом наблюдении и двум из них после повышения уровня ФА выше 10 мг% (в 1–2 года жизни) назначена диетотерапия. Четверо детей не получают терапию (значения ФА за все время наблюдения не превышали 6 мг%). Умственное развитие всех детей находится в пределах возрастной нормы.

Проанализирован средний уровень ФА на фоне диетотерапии в группах детей с учетом генотипа (табл. 5).

На уровень ФА влияют различные факторы, в числе которых строгое соблюдение больными диеты с ограничением ФА с первых дней после постановки диагноза (особенно в первые 5–8 лет жизни). Четкое соблюдение диеты в большой степени зависит от отношения к диетотерапии в семье. Из данных, представленных в табл. 5, следует, что на фоне диеты 63,25% детей показали хорошее снижение уровня ФА — до 10 мг%. В этой группе больных соблюдалась строгая диета со слов родителей. Среди пациентов, гомозиготных по мутации R408W,

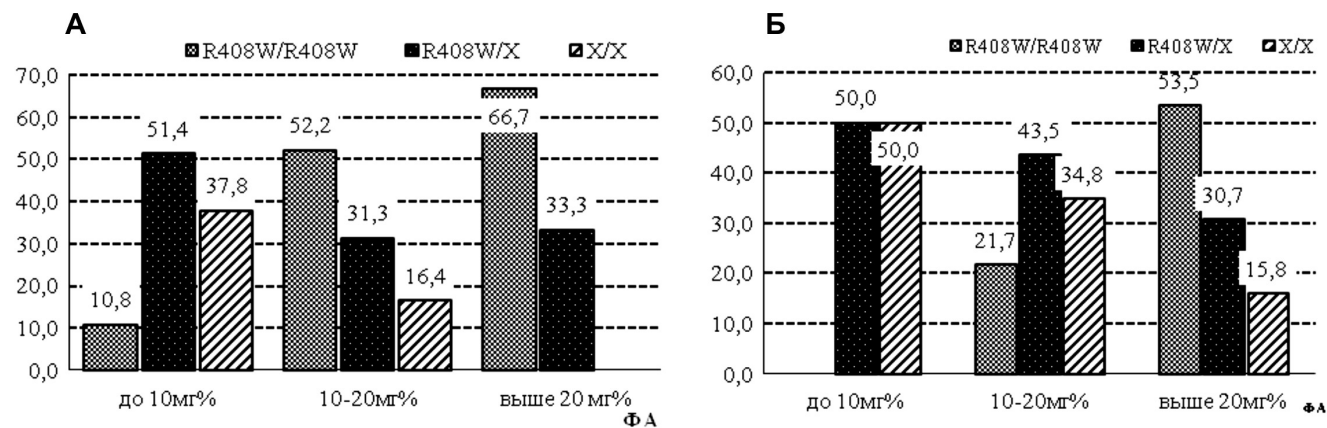


Рис. 1. Уровень ФА с учетом генотипа больных:

А — распределение уровня ФА при неонатальном скрининге; Б — распределение значений ФА при «ретесте».

выявлен только один больной со средней степенью умственной отсталости и эпилепсиями. У всех остальных пациентов этой группы, также как в группах компаундов по R408W и другим мутациям умственное развитие соответствует возрастной норме.

В группе пациентов с уровнем ФА 10–20 мг% со слов родителей диета не нарушалась. Большинство детей систематически проверяли уровень ФА в крови. В этой группе выявлено 7 детей с легкой умственной отсталостью, гомозиготных по мутации R408W и 3 ребенка с задержкой умственного развития с компаундными генотипами.

В третьей группе больных уровень ФА превышал 20 мг%, несмотря на строгое соблюдение диеты (генотипы больных R408W/IVS9+5G>A, R261X/R261X, IVS10-11G>A/IVS10-11G>A, R252W/IVS10-11G>A). У двух пациентов отмечалась легкая умственная отсталость, двое больных по умственному развитию соответствуют возрастной норме. Среди гомозигот по мутации R408W уровень ФА выше 20 мг% не выявлен, что говорит о хорошем биохимическом ответе пациентов на диетотерапию.

Анализ трех групп пациентов (<10 мг%, 10–20 мг%, ≥20 мг%) показал, что во всех группах выявлены дети с задержкой умственного развития, несмотря на строгое соблюдение диеты (со слов родителей). Данный факт может быть обусловлен как влиянием других генов на биохимическое и клиническое течение заболевания или возможную резистентность к диетотерапии, что требует дальнейших исследований.

Для изучения возможной связи тяжести фенотипического проявления заболевания и генотипа больных ФКУ проведен анализ регрессионной зависимости между следующими показателями: остаточная активность ФАГ для генотипа, значения ФА до начала диетотерапии (ФА «нео» и ФА «ретест») и уровень ФА при лечении.

Для оценки корреляций генотип–фенотип больные были разделены на две группы. В первую группу вошли пациенты, генотипы которых имели мутации с известной остаточной активностью фермента ФАГ, во вторую группу — с неизвестной [6; 17]. В первой группе был проведен анализ регрессионной зависимости между показателями.

В изучаемой группе (29 генотипов), с известной остаточной активностью ФАГ для каждой мутации [3], выделены 5 подгрупп в зависимости от известной остаточной активности фермента при определенном генотипе (по данным базы данных ВЮРКУ) (табл. 6). Для каждой из подгрупп подсчитаны средневзвешенные значения. В первую подгруппу включены 14 генотипов, представленные классической формой ФКУ, активность фермента при которых составила от 0–10%, средние значения представлены в табл. 6. Во второй подгруппе (3 генотипа) значения остаточной активности фермента составили 10–20%, в третьей подгруппе из 7 генотипов — 20–25%, в четвертой (4 генотипа) — 25–30%, пятая подгруппа представлена одним генотипом с высокой активностью фермента 34%.

При анализе линейной корреляции сравнивали средние значения активности ФАГ с показателями: ФА «нео», ФА «ретест» и ФА «диета», представленными в табл. 6. Получены значимые высокие коэффициенты корреляции между активностью ФАГ и средними значениями уровня ФА «нео» ($r = -0,88 \pm 0,28$), ФА «ретест» ($r = -0,96 \pm 0,17$) и ФА «диета» ($r = -0,89 \pm 0,32$). Таким образом, можно говорить о наличии обратной пропорциональной зависимости между активностью ФАГ и уровнем ФА. На гистограмме наглядно показано, что чем выше остаточная активность ФАГ, тем ниже уровень фенилаланина (ФА «ретест») (рис. 2).

При анализе регрессионной зависимости между группами ФА«нео»-ФА«диета» и ФА«ретест»-ФА«диета» получены значимые высокие коэффициенты корреляции ($r = 0,86 \pm 0,29$ и $r = 0,66 \pm 0,44$ соответственно). Данный анализ предполагает наличие прямой зависимости между изучаемыми показателями.

Выводы

Целью настоящей публикации была количественная оценка зависимости тяжести фенотипического проявления (на уровне биохимического фенотипа) заболевания от генотипа больных ФКУ в Ростовской области. У 131 больного с клиническими проявлениями ФКУ проведена ДНК-диагностика, определены генотипы — у 130 пациентов с ФКУ выявлено 49 генотипов (40 различных мутаций) в гене *PAH*, у одного в гене *PTS*. На

Таблица 6

Средние значения активности фермента и ФА «нео», ФА «ретест» и ФА «диета»

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

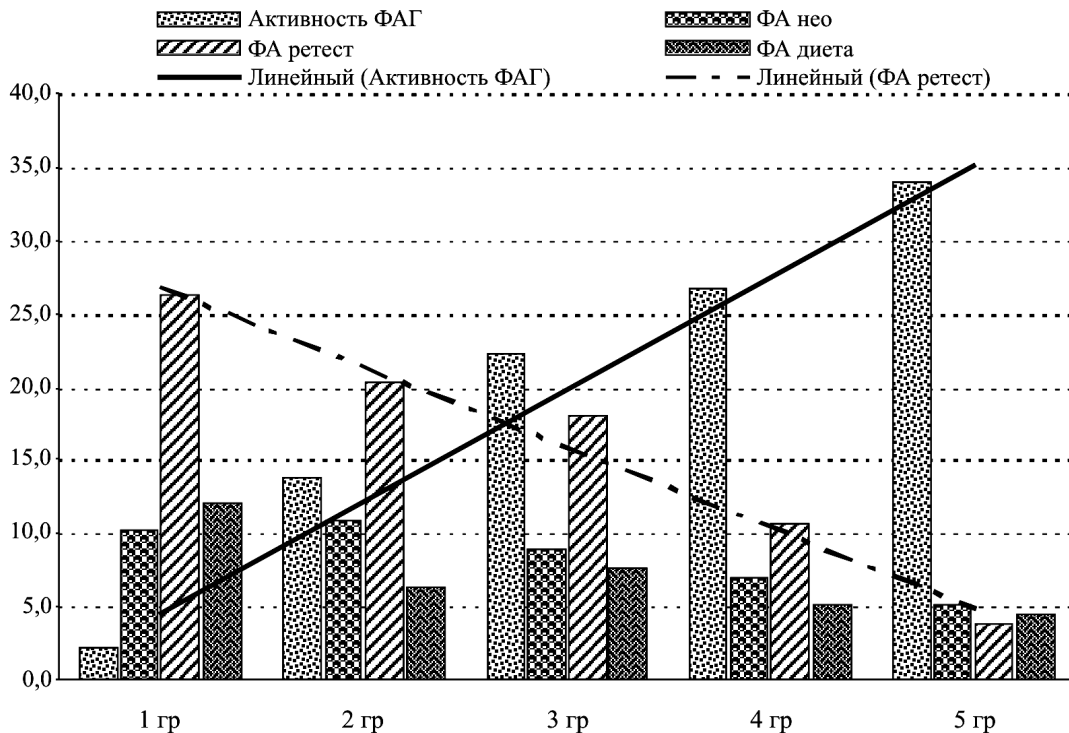


Рис. 2. Зависимость ФА «нео», ФА «ретест» и ФА «диета» от активности фермента в первой группе.

основании базы данных ВЮРКУ рассчитана остаточная активность фермента ФАГ для генотипов в гене *PAH* и проведен анализ гено-фенотипических корреляций между генотипами и показателями ФА до начала лечения (ФА «нео» и ФА «ретест») и на фоне проводимой диетотерапии (ФА «диета»).

Получены результаты, которые свидетельствуют о зависимости биохимического фенотипа ФКУ от *PAH* генотипа. Проведенный регрессионный анализ показал наличие значимых отрицательных корреляций между активностью ФАГ и уровнем ФА до начала лечения и на фоне проводимой диетотерапии. Учитывая, что в большинстве случаев уровень ФА на диете определяет клиническое течение и тяжесть заболевания, проведенный анализ предполагает возможность прогнозирования течения заболевания у вновь выявленных пациентов при медико-генетическом консультировании.

В нашем исследовании 6 пациентов с мГФА оказались компаунд-гетерозиготами и у двоих после двух лет жизни наблюдалось повышение уровня ФА в крови. Принимая во внимание, что мутации в гене *PAH* приводят к различным по степени тяжести клиническим и биохимическим фенотипам, формируя диапазон клинических форм от классической ФКУ до мягкой ГФА, рекомендуется динамическое наблюдение всех пациентов с мГФА и проведение молекулярно-генетического исследования в гене *PAH* с целью оценки состояния здоровья и назначения при необходимости диетотерапии.

Список литературы

1. <http://omim.org/>
2. Fitzpatrick P.F. Allosteric Regulation of Phenylalanine Hydroxylase // Arch. Biochem. Biophys. — 2012. — Mar. 15. — Vol. 519(2). — P. 194–201.
3. <http://www.biopku.org>
4. Mitchell J.J. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency GeneReviews [Internet]. — Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2013. ISSN: 2372–0697.
5. <http://www.espku.org>
6. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now // Hum. Mutat. — 2016. — Feb. 26. doi: 10.1002/humu.22980.
7. <http://ghr.nlm.nih.gov>
8. Kayaalp E., Treacy E., Waters P.J., Byck S. et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a meta-analysis of genotype-phenotype correlations // Am. J. Hum. Genet. — 1997. — Vol. 61. — P. 1309–1317.
9. Scriver C.R., Waters P.J. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria // Trends Genet. — 1999. — Vol. 15. — P. 267–272.
10. Greeves L.G., Patterson C.C., Carson D.J. et al. Effect of genotype on changes in intelligence quotient after dietary relaxation in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia // Arch. Dis. Child. — 2000. — Vol. 82. — P. 216–221.
11. Shen N., Heintz C., Thiel C. et al. Co-expression of phenylalanine hydroxylase variants and effects of interallelic complementation on in vitro enzyme activity and genotype-phenotype correlation // Mol. Genet. Metab. — 2016. — Vol. 117(3). — P. 328–335. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.01.004.
12. DiSilvestre D., Koch R., Groffen J. Different clinical manifestations of hyperphenylalaninemia in three siblings with identical phenylalanine hydroxylase genes // Am. J. Hum. Genet. — 1991. — Vol. 48. — P. 1014–1016.
13. Pey A.L., Stricher F., Serrano L. et al. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic

outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases // *Am. J. Hum. Genet.* — 2007. — Vol. 81(5). — P. 1006—1024.

14. Vernon H.J., Koerner C.B., Johnson M.R., Bergner A., Namosh A. Introduction of sapropterin dihydrochloride as standard of care in patients with phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.* — 2010. — Vol. 100. — P. 229—233.

15. 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 // *Медицинская генетика.* — 2015. — №2. — С. 8—9.

16. Karacic I., Meili D., Sarnavka V., Heintz C. et al. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (*PAH*) deficiency // *Mol. Genet. Metab.* — 2009. — Jul. — Vol. 97(3). — P. 165—171. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.03.009. Epub 2009 Apr. 1.

17. Danecka M.K., Woidy M., Zschocke J. et al. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (*PAH*) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria // *J. Med. Genet.* — 2015. — Vol. 52(3). — P. 175—185. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102621. Epub 2015 Jan 16.

Examine the relationship genotypes (*PAH*) and phenotype in patients with phenylketonuria Rostov region

Amelina M.A.¹, Zinchenko R.A.^{2,3}, Stepanova A.A.², Gundorova P.², Polyakov A.V.², Amelina S.S.⁴

¹ — Southern Federal University, 344049, Rostov-on-Don, Pushkinskaya St., 148, e-mail: samelina@mail.ru

² — Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» Moscow, 115478, e-mail: elchinova@med-gen.ru

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia, e-mail: renazinchenko@mail.ru

⁴ — GBOU WPO RostGMU, 29, Nachitsevanskij, Rostov-on-Don, 344022, e-mail: samelina@mail.ru

In the framework of genetic-epidemiological studies of the Rostov region in 131 patients with phenylketonuria were analyzed for DNA diagnostics, indicators of the level of phenylalanine and according to clinical manifestations of the disease from the genotype of the patients. In 130 patients with phenylketonuria detected 40 mutations (49 different genotypes) in the gene *PAH*, one in the gene *PTS*. The analysis of Geno-phenotypic correlations, studied the relationship between genotypes and indices of phenylalanine before treatment and on a background of spent therapy. During the study, the results obtained suggest that depending on the clinical picture of phenylketonuria from *PAH* genotype. Regression analysis showed a significant negative correlation between the activity of the enzyme phenylalanine hydroxylase and indicators of the level of phenylalanine in patients with repeated analysis and a result of diet.

Keywords: phenylketonuria, mutation, gene *PAH*, phenylalanine, pheno-genotype correlation