

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ У ПАЦИЕНТОВ ИЗ ГРУЗИИ

© 2019 г. П. Гундорова¹*, И. А. Кузнецова¹, Д. Агладзе², Л. Маргвелашвили³, Е. Квдиашвили⁴,
О. Квливидзе^{4, 5}, С. И. Куцев¹, А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 Россия

²Исследовательский институт клинической медицины, Тбилиси, 0112 Грузия

³Детская новая клиника, Тбилиси, 0159 Грузия

⁴Нью Вижен университет, Тбилиси, 0159 Грузия

⁵Грузинский фонд генетических и редких заболеваний, Тбилиси, 0162 Грузия

*e-mail: p_gundorova@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.12.2018 г.

После доработки 11.03.2019 г.

Принята к публикации 19.03.2019 г.

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование полного спектра мутаций при фенилкетонурии (ФКУ) у пациентов из Грузии. Частота ФКУ по данным неонатального скрининга за 15 лет составила 1 : 6111 новорожденных. Обследованы 140 пробандов с входящим диагнозом “фенилкетонурия”. Использованы методы поиска 25 частых мутаций гена *PAH*, высокопроизводительное секвенирование генов *PAH*, *PTS*, *GCH1*, *PCBD1*, *QDPR*, *SPR* и *DNAJC12*, метод поиска крупных делеций и дупликаций MLPA. Наиболее частые патогенные варианты, выявленные в ходе исследования: p.Pro281Leu (33.7%), IVS10-11G>A (21.1%), p.Arg261* (8.6%). Мутации обнаружены на 97.8% исследованных хромосом. Два патогенных варианта обнаружены у 135 пробандов (96.4%), подтвержден диагноз “фенилкетонурия”. По результатам предсказания потенциального ответа на терапию сапроптерином, исходя из генотипа, 70% пробандов не будут отвечать на лечение. В ходе исследования не выявлено пациентов с ВН4-зависимыми формами гиперфенилаланинемии.

Ключевые слова: гиперфенилаланинемия, сапроптерин, ВН4, NGS, ВПС.

DOI: 10.1134/S001667581908006X

Гиперфенилаланинемии — группа наследственных заболеваний, главной характеристикой которых является повышение в крови или других жидкостях организма уровня фенилаланина (ФА). Фенилкетонурия (МИМ# 261600) — наследственная патология обмена веществ, обусловленная дефицитом фермента фенилаланин-гидроксилазы (ФАГ). Мутации в гене *PAH*, кодирующем белок ФАГ, — причина 98% всех случаев фенилкетонурии (ФКУ) и гиперфенилаланинемии (ГФА) [1]. Заболевания наследуются аутосомно-рецессивно. Повреждение генов синтеза и обмена тетрагидробиоптерина (ВН4), кофактора фермента ФАГ, также вызывает схожие симптомы заболевания. Эта группа патологий носит название ВН4-дефицитных ГФА, к развитию этих форм ГФА приводят мутации в генах *PTS*, *QDPR*, *GCH1*, *SPR*, *PCBD1* [2]. Также выделяют не-ВН4-ГФА, причиной которой являются мутации в гене *DNAJC12* (МИМ# 617384) [3], кодирующем белок, участвующий в фолдинге ФАГ.

ФКУ выявляют на неонатальном скрининге новорожденных с целью раннего начала лечения. Диетотерапию применяют для лечения пациентов с РАН-обусловленной ФКУ. Лечение фармакологическим аналогом ВН4 сапроптерином применяют у пациентов с ВН4-дефицитными ГФА, не-ВН4-ГФА [4], а также у пациентов с ВН4-чувствительной РАН-обусловленной ФКУ [5]. В последнем случае это возможно если хотя бы одна из двух мутаций гена *PAH* является мягкой, т.е. остаточная активность белка ФАГ больше 10%. Пациенты с двумя тяжелыми мутациями ФАГ не отвечают на терапию сапроптерином [6]. Таким образом, по генотипу пациента можно предсказать потенциальный ответ на лечение сапроптерином. В России более 55% пациентов с ФКУ потенциально не отвечают на терапию аналогами ВН4 [7].

Неонатальный скрининг введен в Грузии с 1992 г. С 1992 по 2004 г. охват новорожденных на скрининге составлял 40%. С 2004 по настоящий момент охват составляет 100%. На сегодняшний день в рамках Государственной программы лече-

ние получают 156 пациентов с ФКУ и ГФА, общее число пациентов с ФКУ и ГФА в Грузии составляет 342 человека (данные на сентябрь 2018 г.).

Молекулярно-генетическое обследование пациентов с ФКУ и ГФА из Грузии ранее не проводилось. Неизвестна доля пациентов с ВН4-чувствительной ФКУ (потенциально отвечающих на терапию сапроптерином) и доля ВН4-зависимых ГФА среди пациентов с ГФА из Грузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая выборка

Биологический материал (венозная кровь или сухие пятна крови на фильтре) был получен от 151 пациента с направляющим диагнозом “фенилкетонурия”. Пациенты или их законные представители подписали письменное информированное согласие на проведение исследования и публикацию данных. Также были собраны данные о национальности пациентов до третьего поколения, данные о соблюдении диеты, значения уровня ФА в крови на неонатальном скрининге, ре-тесте, максимальные значения в течение периода наблюдения врача, текущие значения.

В исследовании участвовал 151 пациент из 139 семей. Одна из обследованных семей состояла из трех больных братьев и сына одного из них. В выборку пробандов включен один из братьев и его сын. При подсчете частот мутаций учитывали обе хромосомы отца и одну из хромосом сына, полученную от матери-носительницы ФКУ. Таким образом, в выборку вошло 279 хромосом от больных с ФКУ. Общее число пробандов принято за 140, при этом двое из них являются членами одной семьи.

Поиск частых мутаций PAH

Всем пациентам был выполнен поиск частых мутаций гена *PAH*, являющийся рутинной процедурой при диагностике пациентов с ГФА и ФКУ из России в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ” [8]. Поиск 25 частых мутаций гена *PAH* (p.Ser16* (c.47_48delCT), p.Leu48Ser, IVS2+5G>A, IVS2+5G>C, p.Arg111*, IVS4+5G>T, EX5del4154ins268, p.Arg158Gln, p.Asp222* (c.664_665delGA), p.Arg243Gln, p.Arg243*, p.Arg252Trp, p.Arg261Gln, p.Arg261*, p.Glu280Lys, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Ile306Val, p.Ser349Pro, IVS10-11G>A, p.Glu390Gly, p.Ala403Val, p.Arg408Trp, p.Tyr414Cys, IVS12+1G>A) выполнен методом аллель-специфичной MLPA.

Методика основана на технологии MLPA и осуществляется в трех реакциях. Мультиплексная лигазная реакция (MLPA) для детекции частых точковых замен гена *PAH* проводилась на программируемом термоциклере MC2 фирмы “ДНК-технология” (Россия) в два этапа. На пер-

вом этапе оригинальные олигонуклеотиды отжигали с исследуемой денатурированной ДНК в присутствии термостабильной ДНК-лигазы в течение одного часа в объеме 5 мкл реакционной смеси следующего состава: 10–50 нг геномной ДНК; по 0.16–10 фмоль/мкл каждого олигонуклеотида (Евроген, Россия); 0.4 единицы активности Pfu-DNA-лигазы (Хеликон, Россия); буфер для лигирования (20 ммоль Tris-HCl, pH 7.5, 20 ммоль KCl, 10 ммоль MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 ммоль гАТФ, 1 ммоль DTT); 20–30 мкл минерального масла. На втором этапе проводили стандартную ПЦР с олигопраймерами, комплементарными участкам последовательностей, специально синтезированным в олигонуклеотидах. В смесь, в которой предварительно провели лигазную реакцию, добавляли реакционную смесь для ПЦР в объеме 15 мкл (по 0.25 мкмоль каждого оригинального олигопраймера (Евроген); по 200 мкмоль каждого нуклеозидтрифосфата (Хеликон); 1.0 единица активности ДНК-полимеразы Biotaq (“БиоМастер”); буфер для ПЦР (67 ммоль Tris-HCl, 16.6 ммоль (NH₄)₂SO₄, 0.01% Twin-20, pH 8.8)). Результаты исследования оценивали с помощью вертикального электрофореза (20 × 20 см) в 9%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия и регистрацией с помощью документирующей системы GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Высокопроизводительное секвенирование

Анализ методом высокопроизводительного секвенирования (ВПС) проведен с использованием пользовательской панели “PKU” AmpliSeq™, покрывающей кодирующие последовательности и экзон-интронные соединения генов *PAH*, *PTS*, *GCH1*, *PCBD1*, *QDPR*, *SPR* и *DNAJC12*. Использовалось программное обеспечение производителя. Панель включает два пула ПЦР праймеров с общим числом 68 и средней длиной ампликонов 158 пн. Для каждого образца была создана библиотека при помощи коммерческого набора Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы помечали уникальными баркодами (Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit, Life Technologies), а затем объединяли в эквимоллярных концентрациях. Подготовку библиотек к секвенированию проводили в автоматическом режиме на приборе Ion Chef™. ВПС проводили на приборе Ion S5™. Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого TermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk. Покрытие генов составило: *PAH* – 100%, *PTS* – 98%, *GCH1* – 87.2%, *PCBD1* – 94%, *QDPR* – 100%, *SPR* – 82.3%, *DNAJC12* – 100%.

Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов проводилась на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами ВПС [9].

Количественный анализ

Дополнительно проводился поиск протяженных делеций/дупликаций гена *PAH* с использованием набора SALSA MLPA P055-050R *PAH* probemix (MRC-Holland, Нидерланды). Реакцию проводили по протоколам фирмы-производителя. Для точного количественного анализа данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Coffalyser V8, предоставляемого компанией-разработчиком.

Секвенирование по Сенгеру

Определение нуклеотидной последовательности проводили методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру продукта ПЦР с прямого и обратного праймеров. В качестве матрицы для сиквенса использовали фрагменты, полученные амплификацией методом ПЦР. Секвенирование проводилось по протоколу фирмы-производителя на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота фенилкетонурии в Грузии

Запрошены данные из Центра неонатального скрининга Грузии по выявляемости новорожденных с фенилкетонурией. Для расчета частоты заболевания ФКУ использованы данные о числе новорожденных и числе выявленных ФКУ в 2004–2018 гг., когда охват скрининга составлял 100%. За 2018 г. приведены данные скрининга с января по октябрь включительно. За 15 лет скрининга выявлено 129 новорожденных с ФКУ из 788349 рожденных детей. Частота ФКУ составила 1 : 6111 новорожденных или 0.16 ± 0.01 на 1000 новорожденных (табл. 1).

Генотипирование больных фенилкетонурией

ДНК 140 пробандов была исследована по следующему алгоритму: 1) поиск 25 частых мутаций гена *PAH*; 2) поиск мутаций в генах *PAH*, *PTS*, *GCH1*, *PCBD1*, *QDPR*, *SPR* и *DNAJC12* с использованием панельного ВПС; 3) поиск крупных делеций и дупликаций гена *PAH*.

Методом поиска 25 частых мутаций гена *PAH* были выявлены патогенные варианты на 241 хромосоме из 279 (87.5%) исследованных. Оба патогенных варианта выявлены у 108 пробандов

Таблица 1. Данные неонатального скрининга в Грузии в 2004–2018 гг.

Год	Число новорожденных	Число выявленных ФКУ	Частота заболевания	Частота заболевания в расчете на 1000 человек, ‰
2004	40388	8	1 : 5049	0.20 ± 0.07
2005	43574	8	1 : 5447	0.18 ± 0.06
2006	44965	11	1 : 4088	0.24 ± 0.07
2007	47464	6	1 : 7911	0.13 ± 0.05
2008	53519	13	1 : 4117	0.24 ± 0.07
2009	59053	6	1 : 9842	0.10 ± 0.04
2010	60021	6	1 : 10004	0.10 ± 0.04
2011	55271	9	1 : 6141	0.16 ± 0.05
2012	56464	11	1 : 5133	0.19 ± 0.06
2013	56845	9	1 : 6316	0.16 ± 0.05
2014	58777	8	1 : 7347	0.14 ± 0.05
2015	60408	10	1 : 6041	0.17 ± 0.05
2016	56149	6	1 : 9358	0.11 ± 0.04
2017	52799	10	1 : 5280	0.19 ± 0.06
2018	42652	8	1 : 5332	0.19 ± 0.07
Итого	788349	129	1 : 6111	0.16 ± 0.01

(77.1%), один патогенный вариант – у 25 (17.9%). У семи пробандов (5%) не выявлено частых мутаций гена *PAH*.

Наиболее частой мутацией среди пациентов из Грузии является вариант *p.Pro281Leu*, его аллельная частота составила 33.7%. Другие распространенные варианты: *IVS10-11G>A* – 21.1%, *p.Arg261** – 8.6%, *p.Leu48Ser* – 4.3%, *p.Arg261Gln* – 3.6%, *p.Arg408Trp* – 3.2%.

ДНК 32 пробандов, у которых не были выявлены патогенные варианты на обоих аллелях, была исследована методом ВПС с использованием кастомной панели “PKU”. Обнаружены мутации на 32 из 38 исследуемых хромосом. Все выявленные варианты, а также их аллельные частоты, патогенность и остаточная активность ФАГ представлены в табл. 2.

Подтверждена первая и обнаружена вторая мутация у 22 пробандов, подтверждена первая и не обнаружена вторая мутация у трех пробандов, два патогенных варианта выявлены у пяти пробандов, один патогенный вариант выявлен у одного пробанда, патогенных вариантов не обнаружено у одного пробанда.

Из всех выявленных в ходе исследования вариантов 34 являются патогенными, три – вероятно патогенными. Вариантов неопределенного клинического значения, а также ранее неописанных вариантов не выявлено. Пациентам с двумя патогенными или с одним патогенным и одним вероятно патогенным вариантом диагноз “фенилкетонурия” молекулярно-генетическими методами подтвержден – всего 134 пробанда (95.7%).

Пробандам, у которых не выявлены мутации на одном или двух аллелях, проведен поиск крупных делеций и дупликаций методом MLPA. Редких крупных перестроек в гене *PAH* не обнаружено.

Таким образом, по результатам всех этапов диагностики две мутации в гене *PAH* обнаружены у 135 пробандов (95.7%), одна мутация – у четырех (2.9%) пробандов, мутаций не обнаружено у одного пробанда (0.7%). С помощью всех представленных в работе методов мутации выявлены на 97.8% исследованных хромосом.

Материал больных сибсов был исследован методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру отдельных экзонов гена *PAH* с целью детекции вариантов, выявленных у пробандов из этой семьи. У больных сибсов подтверждены варианты, обнаруженные ранее у обследованных пробандов.

Особенности выборки

В ходе диагностики выявлена семья с больным отцом, матерью-носителем и больным сыном. При расчете учитывались обе хромосомы отца и одна из хромосом сына, унаследованная от

матери, вследствие чего общее число хромосом в выборке нечетное – 279.

При анализе методом ВПС у одного пробанда выявлены три патогенных варианта *p.Ser70Pro(;)Val177Met(;)Pro281Leu* в гене *PAH*. Все три варианта верифицированы методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру. Биологический материал для уточнения цис-транс-положения родители пробанда предоставить отказались, но был получен материал от здорового сибса, у которого не выявлено ни одного из трех вариантов. Для данного пациента не удалось установить взаимного расположения мутаций на хромосомах. Все три варианта указаны в табл. 2, но общее число хромосом включает две хромосомы от данного пробанда. Таким образом в табл. 2 приведено всего 280 мутантных аллелей, но расчет частот произведен на 279 хромосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности спектра мутаций гена PAH

Спектр мутаций в исследуемой выборке включает распространенные в РФ частые мутации гена *PAH*, но распределение частот мутаций различается. Наиболее часто встречается вариант *p.Pro281Leu* – аллельная частота 33.7%. В соседних с Грузией странах вариант *p.Pro281Leu* имеет значительно более низкую частоту: в России 2.9%, в Армении 5.8%, в Иране от 5 до 11% [10–12], в популяции азербайджанцев Ирана не встречается [13]. Ни в одной популяции вариант *p.Pro281Leu* не встречается с такой высокой частотой, как у грузин.

Второй по распространенности среди пациентов из Грузии вариант *IVS10-11G>A* (21.1%) в России имеет частоту 2.5%, наиболее широко он распространен в Турции (24.6%) [14] и в Армении (25%) [15].

Третий по распространенности патогенный вариант *p.Arg261** наиболее часто выявляется в популяциях, населяющих регионы Кавказа. Среди коренного населения Карачаево-Черкесской республики он является наиболее частым (76.1%) патогенным вариантом в гене *PAH* [16]. У пациентов из Республики Дагестан аллельная частота *p.Arg261** составляет 9.5%, среди пациентов из Чечни *p.Arg261** также встречается чаще (неопубликованные данные лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ”). Вариант *p.Arg261** с аллельной частотой 4.9% встречается в выборке пациентов с ФКУ из Ирана [11].

Вариант *p.Leu48Ser* также встречается у грузин чаще, чем у пациентов из РФ: 4.3 и 1% соответственно. Мутация является мягкой, пациенты с

Таблица 2. Варианты, выявленные в гене *PAH* среди больных ФКУ из Грузии

Позиция в кДНК	Позиция в белке	Число хромосом с мутацией	Аллельная частота, %	Патогенность варианта	Остаточная активность ФАГ, %
c.842C>T	p.Pro281Leu	94	33.7	п	2
c.1066-11G>A	p.Gln355_Tyr356ins GlyLeuGln (IVS10-11G>A)	59	21.1	п	5
c.781C>T	p.Arg261*	24	8.6	п	—
c.143T>C	p.Leu48Ser	12	4.3	п	39
c.782G>A	p.Arg261Gln	10	3.6	п	44
c.1222C>T	p.Arg408Trp	9	3.2	п	2
c.809G>A	p.Arg270Lys	7	2.5	п	11
c.1169A>G	p.Glu390Gly	7	2.5	п	62
c.168+5G>C	IVS2+5G>C	6	2.2	п	—
c.838G>A	p.Glu280Lys	4	1.4	п	11
c.592_613del22	p.Tyr198Serfs*136	4	1.4	п	—
c.754C>T	p.Arg252Trp	3	1.1	п	15
c.898G>T	p.Ala300Ser	3	1.1	п	65
c.441+1G>A	IVS4+1G>A	2	0.7	п	—
c.442-2913_509+1173del 4154ins268	EX5del4154ins268	2	0.7	п	—
c.727C>T	p.Arg243*	2	0.7	п	—
c.1089delG	p.Lys363Asnfs*37	2	0.7	п	—
c.1162G>A	p.Val388Met	2	0.7	п	28
c.611A>G	p.Tyr204Cys	2	0.7	п	—
c.166delT	p.Phe55Leufs*6	2	0.7	п	—
c.843-5T>C	IVS7-5T>C	2	0.7	п	2
c.728G>A	p.Arg243Gln	1	0.4	п	14
c.473G>A	p.Arg158Gln	1	0.4	п	10
c.1045T>C	p.Ser349Pro	1	0.4	п	1
c.1315+1G>A	IVS12+1G>A	1	0.4	п	—
c.441+5G>T	IVS4+5G>T	1	0.4	п	—
c.331C>T	p.Arg111*	1	0.4	п	—
c.355C>T	p.Pro119Ser	1	0.4	ВП	—
c.722G>A	p.Arg241His	1	0.4	п	23
c.631C>A	p.Pro211Thr	1	0.4	п	72
c.1249T>A	p.Tyr417Asn	1	0.4	ВП	—
c.1159T>C	p.Tyr387His	1	0.4	п	—
c.511G>A	p.Gly171Arg	1	0.4	п	—
c.208T>C	p.Ser70Pro	1	0.4	п	20
c.529G>A	p.Val177Met	1	0.4	ВП	—
c.970-1G>T	IVS9-1G>T	1	0.4	п	—
c.533A>G	p.Glu178Gly	1	0.4	п	39
Не обнаружено		6	2.2		
Всего		280	100.0		

Примечание. п – патогенный вариант, вп – вероятно патогенный вариант.

Таблица 3. Спектр клинических проявлений ФКУ у пациентов из Грузии и потенциальный эффект от лечения сапроптерином

Клиническая форма ФКУ	Все генотипы		Потенциально нечувствительные		Потенциально чувствительные		Неизвестный эффект	
	число человек	доля, %	число человек	доля, %	число человек	доля, %	число человек	доля, %
Классическая ФКУ	95	67.9	79	80.6	14	38.9	2	33.3
Среднетяжелая ФКУ	25	17.9	10	10.2	13	36.1	2	33.3
Мягкая ФКУ	8	5.7	1	1.0	6	16.7	1	16.7
Мягкая ГФА	4	2.9	0	0.0	3	8.3	1	16.7
Не определена	8	5.7	8	8.2	0	0.0	0	0.0
Всего	140	100.0	98	100.0	36	100.0	6	100.0

этой мутацией отвечают на терапию сапроптерином. Также отвечают на терапию пациенты с мутацией p.Arg261Gln, которая в выборке грузин и больных из РФ с ФКУ встречается с аллельной частотой 3.6 и 5.8% соответственно.

Наиболее частая у российских больных (51.8%) мутация p.Arg408Gtr встречается у грузин с низкой частотой 3.2%.

Патогенный вариант p.Arg270Lys встречается в исследуемой выборке с частотой 2.5%, в то время как в выборке пациентов РФ практически не встречается (частота 0.03% – неопубликованные данные лаб. ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ”).

Система поиска частых мутаций гена *PAH*, изначально предназначенная для диагностики пациентов с ФКУ из РФ, оказалась высоко эффективна для молекулярно-генетической диагностики пациентов из Грузии. Несмотря на то что наиболее частые варианты гена *PAH* у пациентов из Грузии совпадают с таковыми для российских больных, частоты мутаций различаются коренным образом. Уникальное распределение частот мутаций отражает такие характеристики исследуемой популяции как высокая генетическая и демографическая однородность, частичная изолированность. В то же время распространенные варианты также встречаются у популяций, проживающих на приграничных территориях, что отражает наличие в прошлом миграционных потоков между этими территориями.

Предсказание потенциального ответа на лечение сапроптерином исходя из генотипа

На основании генотипа *PAH* можно предсказать потенциальный ответ на лечение сапроптерином у пациентов с ФКУ (табл. 3). Если хотя бы на одном аллеле обнаружена мягкая мутация, пациент является потенциальным ответчиком на лечение сапроптерином. У пациентов с двумя тя-

желыми мутациями проводить нагрузочные тесты препаратом не имеет смысла. Потенциальными ответчиками на лечение являются 35 (25%) пробандов, не будут отвечать на лечение 98 (70%) пробандов, невозможно предсказать эффект от лечения у семи (5%) пробандов.

Высокая доля пациентов, которые не будут отвечать на лечение, обусловлена высокой суммарной аллельной частотой тяжелых мутаций – 82.4%. Наиболее распространенные среди грузин варианты являются тяжелыми. Варианты были классифицированы как тяжелые в случае если остаточная активность ФАГ составила меньше 10%, или если по данным литературы мутации “нечувствительны” к терапии сапроптерином. Также в эту группу были отнесены мутации, приводящие к изменениям сайтов сплайсинга, образованию стоп-кодона, в том числе делеции и инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также крупные делеции. Доля мягких мутаций составила 14%. К мягким были отнесены варианты, остаточная активность ФАГ при которых больше 10% или они описаны в литературе как “чувствительные” к терапии сапроптерином.

Доля пациентов, которые потенциально не будут отвечать на лечение, в Грузии (70%) превышает таковую для России (56.9%) [17], которая в свою очередь является выше, чем в странах Западной Европы [18, 19].

Спектр клинических проявлений и гено-фенотипические корреляции

Проанализированы значения ФА в крови исследуемых пациентов, на основании чего классифицирован их клинический диагноз. Данные анализа представлены в табл. 3. Классическая ФКУ зафиксирована у 95 пробандов (67.9%), среднетяжелая ФКУ – у 25 (17.9%), мягкая ФКУ – у восьми (5.7%), мягкая ГФА – у четырех (2.9%). У

восьми пробандов не удалось установить клиническую форму ФКУ ввиду недостаточных данных. Высокая доля тяжелых клинических форм – классической и среднетяжелой ФКУ – объясняется высокой суммарной аллельной частотой тяжелых мутаций. Среди больных с двумя тяжелыми мутациями гена *PAH*, потенциально нечувствительных к сапроптерину, 90.8% имеют тяжелые клинические проявления. Данные гено-фенотипические корреляции согласуются с представлениями о работе фермента ФАГ [17]: отсутствие остаточной активности белка выражается, с одной стороны, в тяжелой клинической картине, с другой – в отсутствии эффекта от лечения сапроптерином.

Среди пациентов с хотя бы одной мягкой мутацией гена *PAH* (потенциально чувствительных к терапии сапроптерином) наблюдается большее разнообразие клинических проявлений. Вопреки распространенному мнению среди таких пациентов помимо мягких клинических форм присутствует значительная доля классической и среднетяжелой ФКУ. Это обусловлено тем, что некоторые мягкие мутации, например *p.Arg261Gln*, вызывают формирование тяжелого фенотипа. В физиологических условиях мутантная *p.Arg261Gln* ФАГ не работает, но при введении дополнительного количества ВН4 проявляет остаточную активность. Таким образом, пациенты с мутацией *p.Arg261Gln* демонстрируют тяжелый фенотип, но являются чувствительными к препаратам сапроптерина.

Национальный состав выборки

Из 140 обследованных пробандов 115 (82.1%) являются грузинами по национальности вплоть до третьего колена. Девять человек – метисы от браков грузин с представителями других этносов. У трех пробандов бабка или дед русские, у одного – осетины, при этом остальные предки являются грузинами. Также в выборке есть одна греко-грузинская семья, одна армяно-грузинская, три грузино-осетинские семьи.

В шести семьях азербайджанского происхождения можно наблюдать различия в спектре мутаций *PAH*: у пробандов не встречается мутация *IVS10-11G>A*, мутация *p.Pro281Leu* выявлена только у одного пробанда в гомозиготном состоянии. В шести семьях армянского происхождения у пробандов мутация *IVS10-11G>A* встречается на трех хромосомах, мутация *p.Pro281Leu* – на одной хромосоме. Одна из семей идентифицирует себя с национальностью “ассирийцы”, пробанд имеет гомозиготный генотип *p.Pro281Leu*. Одна семья в выборке иранского происхождения. Для двух семей нет данных о национальности.

В результате комплексного обследования пациентов с фенилкетонурией из Грузии определена частота фенилкетонурии в Грузии 1 : 6111 новорожденных, описан полный спектр мутаций, характерный для исследуемой популяции для данной нозологии. Выявлены наиболее распространенные варианты гена *PAH*: *p.Pro281Leu* (33.7%), *IVS10-11G>A* (21.1%), *p.Arg261** (8.6%).

Выявлены следующие особенности исследуемой популяции в отношении заболевания ФКУ:

1) спектр мутаций гена *PAH* представлен в основном повторяющимися вариантами с высокой частотой, что позволяет применять экономичные системы поиска частых мутаций для диагностики больных;

2) крупные делеции гена *PAH* представлены только одним распространенным вариантом, который в свою очередь входит в панель частых мутаций, что позволяет отказаться от методики поиска крупных делеций/дупликаций гена *PAH*;

3) доля потенциально чувствительных к терапии ВН4 пациентов из Грузии составила 25%, доля нечувствительных – 70%; ввиду высокой доли нечувствительных пациентов рекомендуется проводить предварительное генотипирование пациентов в целях экономии ресурсов, требующихся для проведения нагрузочного теста ВН4.

Примененный в работе диагностический подход оказался высокоэффективным по соотношению полученного результата и затраченных материальных и временных ресурсов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blau N., Shen N., Carducci C.* Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2014. V. 14. № 6. P. 655–671. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.923760>
2. *Economou-Petersen E., Henriksen K.F., Guldberg P. et al.* Molecular basis for nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia // *Genomics.* 1992. V. 14. № 1. P. 1–5.

3. van Spronsen F.J., Himmelreich N., Rufenacht V. et al. Heterogeneous clinical spectrum of DNAJC12-deficient hyperphenylalaninemia: from attention deficit to severe dystonia and intellectual disability // *J. Med. Genet.* 2017. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104875>
4. de Sain-van der Velden M.G.M., Kuper W.F.E., Kuijper M.A. et al. Beneficial effect of BH4 treatment in a 15-year-old boy with biallelic mutations in DNAJC12 // *JIMD Rep.* 2018. https://doi.org/10.1007/8904_2017_86
5. Kure S., Hou D.C., Ohura T. et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency // *J. Pediatr.* 1999. V. 135. № 3. P. 375–378.
6. Muntau A.C., Roschinger W., Habich M. et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 347. № 26. P. 2122–2132. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021654>
7. Гундорова П., Степанова А.А., Бушурева Т.В. и др. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов Российской Федерации с целью определения чувствительности к препаратам BH4 // *Генетика.* 2017. Т. 53. № 6. 732–739.
8. Гундорова П., Степанова А.А., Щагина О.А. и др. Результаты использования новых медицинских технологий “Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” и “Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” в ДНК-диагностике фенилкетонурии // *Мед. генетика.* 2016. Т. 15. № 2. С. 29–36.
9. Рыжкова О.П., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Мед. генетика.* 2017. Т. 7. С. 4–17.
10. Biglari A., Saffari F., Rashvand Z. et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria // *Springerplus.* 2015. V. 4. P. 542. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1309-8>
11. Razipour M., Alavinejad E., Sajedi S.Z. et al. Genetic study of the *PAH* locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes // *Metab. Brain. Dis.* 2017. V. 32. № 5. P. 1685–1691. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0048-7>
12. Alibakhshi R.P., Moradi K.M., Biglari M.M. et al. Spectrum of phenylalanine hydroxylase gene mutations in Hamadan and Lorestan provinces of Iran and their associations with variable number of tandem repeat alleles // *Iran. J. Med. Sci.* 2018. V. 43. № 3. P. 318–323.
13. Bagheri M., Rad I.A., Jazani N.H. et al. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Azerbaijani population, a report from West Azerbaijan province of Iran // *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2015. V. 18. № 7. P. 649–653.
14. Dobrowolski S.F., Heintz C., Miller T. et al. Molecular genetics and impact of residual *in vitro* phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population // *Mol. Genet. Metab.* 2011. V. 102. № 2. P. 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.11.158>
15. Kostandyan N., Britschgi C., Matevosyan A. et al. The spectrum of phenylketonuria genotypes in the Armenian population: identification of three novel mutant *PAH* alleles // *Mol. Genet. Metab.* 2011. V. 104. Suppl. P. S93–S96. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.006>
16. Гундорова П., Степанова А.А., Макаев П.А. и др. Особенности спектра мутаций в гене *PAH* у больных фенилкетонурией из Карачаево-Черкесской Республики // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 12. С. 1448–1457. <https://doi.org/10.7868/S0016675816110047>
17. Гундорова П., Кузнецова И.А., Куцев С.И. и др. Результаты программы генотипирования больных фенилкетонурией и гиперфенилаланинемией // *Мед. генетика.* 2018. Т. 17. № 12 (198). С. 14–24. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.12.14-24>
18. Zurfluh M.R., Zschocke J., Lindner M. et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29. № 1. P. 167–175. <https://doi.org/10.1002/humu.20637>
19. Trefz F., Lichtenberger O., Blau N. et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in neonates with hyperphenylalaninemia: a semi-mechanistically-based, non-linear mixed-effect modeling // *Mol. Genet. Metab.* 2015. V. 114. № 4. P. 564–569.

Molecular Genetic Study of Phenylketonuria in Patients from Georgia

P. Gundorova^{a,*}, I. A. Kuznetsova^a, D. Agladze^b, L. Margvelashvili^c,
E. Kldiashvili^d, O. Kvlividze^{d,e}, S. I. Kutsev^a, and A. V. Polyakov^a

^aFederal State Budgetary Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Moscow, 115522 Russia

^bResearch Institute of Clinical Medicine, T’bilisi, 0112 Georgia

^cChildrens New Hospital, T’bilisi, 0159 Georgia

^dNew Vision University, T’bilisi, 0159 Georgia

^eGeorgian Foundation for Genetic and Rare Diseases, T’bilisi, 0162 Georgia

*e-mail: p_gundorova@inbox.ru

A molecular genetic study of the full mutation spectrum in phenylketonuria (PKU) in patients from Georgia was conducted for the first time. The frequency of PKU according to neonatal screening for 15 years was 1 : 6111 newborns. 140 probands with the diagnosis of phenylketonuria were examined. The following methods were used: detection of 25 frequent *PAH* gene mutations, next generation sequencing of the *PAH*, *PTS*, *GCH1*, *PCBD1*, *QDPR*, *SPR* and *DNAJC12* genes, MLPA method for searching for large deletions and duplications. The most frequent pathogenic variants identified during the study: p.Pro281Leu (33.7%), IVS10-11G>A (21.1%), p.Arg261* (8.6%). Mutations were found on 97.8% of the chromosomes studied. Two pathogenic variants were found in 135 probands (96.4%), the diagnosis of phenylketonuria was confirmed. According to the results of the prediction of a potential response to the sapropterin therapy based on the genotype, 70% of probands will not respond to the treatment. The study did not reveal patients with BH4-dependent forms of hyperphenylalaninemia.

Keywords: hyperphenylalaninemia, sapropterin, BH4, NGS.