

*На правах рукописи*

**Гундорова Полина**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИЙ В КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ  
РЕСПУБЛИКЕ**

03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

**Научный руководитель:**

Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор

**Научный консультант:**

Зинченко Рена Абульфазовна, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

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

**Голубенко Мария Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2017 года на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.016.01 при Федеральном Государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул.Москворечье, д. 1.

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

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2017

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

**Зинченко Рена Абульфазовна**

## Общая характеристика работы

### Актуальность исследования

Гиперфенилаланинемиями (ГФА) называют группу нозологий, основным общим симптомом которых является повышение уровня ФА в крови ( $>2\text{мг/дл}$ ) и при отсутствии специфического лечения задержка умственного и психомоторного развития. Основной причиной гиперфенилаланинемий является дефект гена *PAH*, кодирующего фермент ФАГ. Патология наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обеспечивает 98% всех ГФА, ее называют фенилкетонурией (ФКУ) или *PAH*-зависимой ГФА (Blau N. et al., 2011). Изучение патогенных вариантов гена *PAH* является актуальной задачей, так как позволяет делать прогнозы относительно клинического течения заболевания, чувствительности к кофакторной терапии, и необходимо для планирования деторождения в отягощенных семьях. Фенилкетонурия является одним из немногих наследственных заболеваний, клинические проявления которого можно свести к минимуму модификацией факторов среды. Соблюдение строгой безбелковой диеты с раннего возраста позволяет предотвратить развитие умственной отсталости у детей с диагнозом «ФКУ». Введение неонатального биохимического скрининга позволило выявлять больных детей в роддомах в течение первой недели с момента рождения и перенаправлять их для наблюдения у врачей-генетиков (Blau N. et al., 2014).

Частота фенилкетонурии значительно варьирует между популяциями и этническими группами как России, так и мира. Самые высокие частоты зарегистрированы в Турции и Северной Ирландии (1:6500 новорожденных), самые низкие в Финляндии (менее 1:100000), Японии (1:70000) и Тайланде (1:200000) (Blau N. et al., 2014). Частота заболевания в среднем по России 1:7000 новорожденных (Новиков П.В. et al., 2012), наблюдается колебание частот от региона к региону. В большей части популяций с низкой миграционной активностью обнаруживается увеличение частот отдельных аутосомно-рецессивных заболеваний. В этих случаях необходима разработка профилактических программ и проведение специализированных мероприятий по выявлению носителей в популяции и обязательному медико-генетическому консультированию отягощенных семей.

Спектр мутаций в гене *PAH* характеризуется значительными межпопуляционными различиями. Выявление наиболее распространенных патогенных вариантов позволяет создавать эффективные и экономичные панели для ДНК-диагностики ФКУ, специфичные для исследуемой популяции или региона. В России наиболее распространены мутации *PAH*, характерные для популяций Европы: R408W, R261Q, P281L, IVS12+1G>A, R158Q, R252W, Y414C, I306V (Zschocke J., 2003; Гундорова П. и др., 2016; Степанова А.А. и др., 2006). Группа мутаций, распространенных в Европе и на Ближнем Востоке: IVS10-11G>A, L48S, E390G, A403V, E280K, IVS4+5G>T, A300S (Dobrowolski S.F. et al., 2011; Zschocke J., 2003; Гундорова П. и др., 2016; Степанова А.А. и др., 2006). Более редкие в России, но тем не менее повторяющиеся варианты R243\*, R243Q, R111\*, широко распространены в Азии (Li N. et al., 2015; Okano Y. et al., 2011; Гундорова П. и др., 2016).

В ходе генетико-эпидемиологических исследований на территории Карачаево-Черкесской Республики, выявлено большое количество больных с диагнозами «фенилкетонурия» и «мГФА». Остается неясным, вызваны ли эти клинические формы разными молекулярно-генетическими причинами. Причина и механизмы широкого распространения аутосомно-рецессивной патологии в исследуемом регионе также предстоит выяснить. Обеспечение эффективного генетического консультирования возможно только после изучения частоты заболевания и спектра мутаций у больных с

клиническими проявлениями заболевания, определения распространенности патологии и создания диагностических панелей.

**Цель исследования:** Целью настоящей работы является изучение частоты и молекулярно-генетической природы заболевания в группах больных ФКУ и мягкой ГФА в Карачаево-Черкесии и выяснение популяционно-генетических механизмов распространения гиперфенилаланинемий в Республике для оптимизации профилактики и диагностики носительства заболевания населения.

**Задачи исследования:**

1. Определить спектр мутаций гена *PAH* у больных ФКУ и мГФА из Карачаево-Черкесской Республики.
2. Разработать систему детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена *PAH*.
3. Установить частоту гиперфенилаланинемий (ФКУ и мГФА) в Карачаево-Черкесии и оценить популяционную частоту носительства заболевания в выборках здоровых жителей Карачаево-Черкесии и расчетную частоту гиперфенилаланинемий в Республике.
4. Проанализировать особенности клинических проявлений при различных генетических вариантах ФКУ.
5. Установить «возраст», причину и время распространения наиболее частой мутации в Карачаево-Черкесии на основе анализа гаплотипов хромосом, несущих мутантный аллель.

**Научная новизна исследования.**

Впервые проведено комплексное генетико-эпидемиологическое обследование пациентов с гиперфенилаланинемиями из Карачаево-Черкесской Республики. Выявлены больные с различными клиническими формами ГФА, установлена молекулярно-генетическая причина их заболевания, обследованы больные и здоровые родственники. Определен уникальный спектр мутаций гена *PAH* для жителей Карачаево-Черкесии, выявлены наиболее распространенные варианты. Создана экономичная эффективная диагностическая система детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена *PAH*. Оценка гено-фенотипических корреляций подтверждает существующие теории о псевдодоминантном влиянии мягких мутаций *PAH* на фенотип.

На основании данных неонатального скрининга определена частота гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике, которая в настоящее время является самой высокой зарегистрированной в мире. В результате исследования ДНК здоровых жителей республики на носительство патогенных вариантов *PAH* определен наиболее отягощенный из проживающих на ее территории этнос, установлена популяционная частота носительства мутаций среди представителей различных национальностей. Определен механизм накопления мутации R261\* среди карачаевцев, а также возраст начала ее распространения.

**Практическая значимость исследования**

Выявленная общая молекулярно-генетическая причина заболевания у пациентов с диагнозом «ФКУ» и «мГФА» позволяет говорить об этих двух клинических формах как об одной нозологии; необходимо при консультировании учитывать клинический полиморфизм заболевания. Консультирование семей с пациентами мГФА приобретает иной характер: тогда как ранее они не состояли на учете у врача-генетика, так как им не назначается диета, теперь необходимо разьяснять им все аспекты планирования семьи и контроля уровня ФА при беременности. ДНК-диагностика больных ФКУ также предоставляет данные, необходимые для начала лечения пациентов кофакторной терапией.

Аномально высокая частота носительства мутаций *PAH* среди карачаевцев показывает необходимость разработки региональных профилактических программ, позволяющей выявление детей не только с классической ФКУ, но и мГФА, а также здоровых гетерозиготных носителей в популяции и дальнейшее консультирование при планировании ими деторождения с целью снижения частоты ФКУ в Карачаево-Черкесии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Определен спектр мутаций гена *PAH* у больных гиперфенилаланинемиями из Карачаево-Черкесской Республики. Аллельные частоты частых мутаций: R261\* - 55,2%, P211T - 8,0%, R413P - 7,2%, R408W - 4,0%, V230I - 2,4%, F331S - 1,6%.
2. Разработана система детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена *PAH*, основанная на принципе MLPA, включающая следующие патогенные варианты: R261\*, P211T, R413P, R408W, V230I, F331S, P211L. Система позволяет выявить 79,2% мутантных аллелей среди больных ГФА из Карачаево-Черкесии, 88,1% - среди больных карачаевцев.
3. По данным неонатального скрининга, частота гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике составляет 1:850 (1,18±0,16‰) новорожденных (ФКУ 1:1581 (2,52±0,23‰), мГФА 1:1834 (2,35±0,11‰)). В настоящее время это самая высокая частота ФКУ в мире для отдельно взятого региона. Расчетная частота заболевания составила 1:361 (2,77±0,09‰) среди карачаевцев, 1:6380 (0,16±0,04‰) среди черкесов, 1:4162 (0,24±0,04‰) среди абазин, 1:8213 (0,12±0,03‰) среди ногайцев. Частота носительства мутаций гена *PAH* составила 1:9 здоровых карачаевцев, 1:40 - черкесов, 1:32 - абазин, 1:45 - ногайцев.
4. Выявлены корреляции между генотипом *PAH* и фенотипом больных фенилкетонурией и мГФА. Частота мягких и тяжелых мутаций в выборке больных с «мГФА» составила 51,2% и 39,2% соответственно, в выборке больных с ФКУ - 6,0% и 90,5%. Подтверждено, что мягкие мутации обладают псевдодоминантным эффектом, обуславливая мягкий фенотип.
5. Выявлен уникальный гаплотип гена *PAH* на хромосомах с мутацией R261\*, который не был ранее описан в литературе. На основании расчета неравновесия по сцеплению R261\* с полиморфными локусами установлен возраст мутации  $g_{cp}=10.2\pm 2.7$  поколений (275±73 лет).

#### **Степень достоверности результатов**

Работа проведена на максимально возможно исчерпывающей выборке больных из Карачаево-Черкесской Республики (63 пробанда), обследована репрезентативная группа здоровых представителей коренных этносов (691 здоровый индивид). В работе использованы современные точные молекулярно-генетические и статистические методы исследования, интерпретация проведена с использованием методов статистической обработки данных. Выводы, умозаключения и сравнения подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно и логично представлены в виде таблиц. Для теоретического обоснования и сравнительного анализа привлечено большое количество отечественных и зарубежных источников литературы. Выводы полно и точно отражают результаты проделанной работы.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

В соответствии с областями исследования специальности 03.02.07 – Генетика (биологические науки) – «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Молекулярные основы наследственности. Мутационная изменчивость. Популяционная генетика». Работа включает в себя обсуждение проблем популяционной

генетики, генетической структуры популяций, генетики человека, медицинской генетики, наследственных болезней.

#### **Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены на VII Съезде Российского общества медицинских генетиков, Санкт–Петербург, 19-23 мая 2015 год; Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии диагностики наследственных болезней», Москва, 2016 год; Конференции молодых ученых ФГБНУ «МГНЦ», 2015 год; Конференции, посвященной 25-летию лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», г. Суздаль, 7-10 июля 2016 года, Съезде Европейского Общества Генетики Человека European Human Genetics Conference, 2015 June 6 - 9, Glasgow, Scotland, United Kingdom, Съезде Международного Общества Генетики Человека The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics, 2016 April 3-7, Japan, Kyoto.

Работа одобрена этическим комитетом и прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании Ученого совета ФГБНУ «МГНЦ».

#### **Личный вклад автора в выполнение исследования**

Автор работы непосредственно участвовал в разработке схемы и последовательности проведенных исследований, формулировании цели и задач, выборе методов исследования, статистической обработке полученных данных. Автором настоящей работы был проведен анализ ДНК 63 пробандов с различными формами гиперфенилаланинемий, а также 12 больных и 58 здоровых родственников. Автор принимал непосредственное участие в выборе частых вариантов для создания системы диагностики наиболее распространенных в республике мутаций, а также подборе условий и отладке метода. Автором проведено молекулярно-генетическое обследование 691 здоровых жителей республики. Автор провел молекулярный анализ гаплотипов хромосом с мутацией R261\*, а также последующую обработку полученных данных. Автором изучена и проработана зарубежная и отечественная литература по теме диссертации, проведен анализ полученных данных, сформулированы результаты и выводы. Автор опубликованы результаты настоящего исследования в рецензируемых журналах, а также представлены на российских и зарубежных научных конференциях.

#### **Публикации**

Материалы диссертации представлены в 13 печатных работах соискателя, в том числе в 7 статьях в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата биологических наук.

#### **Структура и объём диссертации**

Диссертация имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Работа представлена на 104 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц и 12 рисунков. Библиографический указатель включает 123 наименования, из них 21 отечественный и 102 иностранных источника.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы исследования**

Собраны медико-генетические данные о жителях десяти районов и двух городов Карачаево-Черкесской Республики, общая численность обследованного населения составила 397932 человек. Экспедиции с целью сбора материала проведены сотрудниками лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» в период с 2013 по 2016 года. В результате экспедиционной работы в сотрудничестве с работниками МГК Карачаево-

Черкесской Республики были выявлены семьи с отягощенным анамнезом по заболеваниям «фенилкетонурия» и «МГФА». Выявлено 84 больных гиперфенилаланинемией из 71 семьи. Биологический материал получен от 74 больных, из которых 62 являются неродственными пробандами. Из них с диагнозом «ФКУ» выявлено 58 больных из 51 семьи. Материал получен от 49 больных ФКУ, 42 являются неродственными пробандами. С диагнозом «МГФА» выявлено 26 больных из 21 семьи. Был получен биологический материал от всех 26 больных, из которых 21 являются неродственными пробандами. Также получен биологический материал от 58 здоровых родственников пациентов. Среди выявленных больных большинство составляют представители титульной нации карачаевцы (71 чел.), также присутствуют абазинцы (4 чел.), черкесы (2 чел.) и русские (7 чел.). Больных ногайской национальности выявлено не было.

В ходе молекулярно-генетического анализа была выявлена семья с двумя больными сибсами, имеющими разные генотипы. Оба входят в выборку пробандов для генофенотипического анализа (один с МГФА, второй с ФКУ), а в выборку для молекулярно-генетического анализа семья вносит 3 поврежденные хромосомы.

От сотрудников МГК и семей больных были получены следующие данные: дата рождения, национальность, степень умственного развития, клинический диагноз, уровень ФА на скрининге, ре-тесте и в настоящее время, степень соблюдения диеты. Уровни ФА удалось получить не для всех больных, гено-фенотипический анализ был проведен по имеющимся данным. Обследованные пациенты подписали письменное информированное согласие на добровольное участие в настоящем исследовании, включая забор биологического материала и публикацию данных в открытой печати. В случае несовершеннолетних детей согласие получено у их родителей. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

#### *Популяционная выборка*

В результате экспедиционной работы в городах Карачаевске и Черкесске, и шести районах республики был получен материал от 691 здоровых жителей, а также данные об их родственниках до третьего поколения и письменные информированные согласия на забор биологического материала, исследования и публикацию их результатов в печати. Материал получен от следующего числа здоровых жителей Карачаево-Черкесии: Карачаевск - 53 человек, Черкесск - 81 человек, Усть-Джегутинский район - 50 человек, Малокарачаевский район - 94 человек, Прикубанский район - 90 человек, Абазинский район - 106 человек, Ногайский район - 116 человек, Хабезский район - 101 человек. Все обследованные являлись коренными представителями своей национальности до третьего поколения: 328 карачаевцев, 104 черкеса, 126 абазин, 118 ногайцев и 15 русских.

#### **Методы исследования**

Выделение ДНК из цельной крови проводилось набором реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколам производителей. Выделение ДНК из сухих пятен крови на фильтровальной бумаге проводилось при помощи набора реактивов DIAAtomt DNA Prep100 kit (Isogene Lab. Ltd., Россия).

Для амплификации исследуемых фрагментов ДНК использовался метод ПЦР. Реакцию проводили на термоциклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров. Дизайн праймеров выполнен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез – в ЗАО «Евроген» (Россия).

Определение нуклеотидной последовательности проводили методом прямого секвенирования согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI Prism 3100

(Applied Biosystems). Полученные данные анализировались при помощи программы Chromas 2.4.1.

Мультиплексная лигазная реакция (MLPA) для детекции частых точковых замен гена *PAH* проводилась на амплификаторе MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) в 2 этапа с последующей визуализацией в ПААГ.

Анализ ДНК здоровых жителей республики с целью выявления носителей проводился с использованием разработанной в ходе данного исследования системы РКУ-КЧ1, включающей мутации R408W, R261\*, F331S, R413P, P211T, P211L. Во вторую модификацию РКУ-КЧ1 системы (РКУ-КЧ2) поиска частых мутаций гена *PAH* у жителей Карачаево-Черкесской Республики была внесена мутация V230I.

Электрофорез в полиакриламидном геле: для оценки результата амплификации использовали 7% гель с соотношением акриламида (АА) и бисакриламида (БА) 29:1. Для оценки результатов MLPA, использовали 9% гель с соотношением АА и БА 19:1. Для оценки количества копий STR повторов, использовали 8% гель с соотношением АА:БА=29:1,3. После разделения фрагментов гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,1 мкг/мл в 1xTBE) в течение 20 минут, промывали водой. Результаты исследования регистрировались на гель-документирующей системе GelDoc® 2000 в УФ-излучении.

Анализ гаплотипа гена PAH на хромосомах с мутацией R261\* производился методом анализа 7 внутригенных SNP локусов (rs869916, rs4646988, rs1522296, rs4646986, rs1722383, rs4646897, rs1042503). Детекция SNP производилась методом MLPA (система разработана в ходе настоящей работы) с последующей визуализацией в ПААГ.

Анализ числа копий внутригенных tandemных повторов STR и VNTR гена PAH проводился методом ПЦР с последующим электрофорезом в 7% полиакриламидном геле (АА:БА=29:1) и секвенированием по Сэнгеру. Определение длины аллелей STR и числа копий повторов VNTR проводилось по общепринятому алгоритму, описанному в литературе (Goltsov A.A. et al., 1992; Goltsov A.A. et al., 1993).

Анализ аллелей внегенных локусов STR D12S1588, D12S1727, D12S78, D12S338 и D12S317 проводился методом ПЦР. Анализ проводился на ДНК пациентов с мутацией R261\* в гомозиготном состоянии и на доступной ДНК от их родственников, а также в популяционной выборке карачаевцев.

#### Неравновесие по сцеплению

Для выявления аллелей, ассоциированных с фенилкетонурией, проводили анализ полиморфных маркеров и определяли гаплотипы, характерные для хромосом, несущих мутацию R261\*. При сравнении частот аллелей на хромосомах с мутацией и в популяционной выборке использовали критерий  $\chi^2$ . При малом числе наблюдений применяли точный критерий Фишера. Для расчета использовали формулу (2) (Bengtsson V.O. et al., 1981) в группе пациентов для оценки неравновесности по сцеплению полиморфных маркеров:  $\delta = (P_D - P_N)/(1 - P_N)$ , где  $\delta$  - мера неравновесности сцепления,  $P_D$  - частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией,  $P_N$  - частота этого же аллеля среди нормальных хромосом.

Определение возраста мутации возможно в случае, когда она распространилась в результате эффекта основателя. При этом под возрастом мутации подразумевается время ее распространения в популяции. Изменение величины неравновесия по сцеплению полиморфных маркеров с локусом заболевания позволяет вычислить количество поколений, за которое оно произошло.



$$g = \frac{\lg \frac{1-Q}{1-P_N}}{\lg(1-\theta)}, \text{ где } g - \text{ число поколений; } Q - \text{ доля мутантных хромосом без аллеля}$$

гаплотипа основателя;  $P_N$  – частота аллеля основателя в популяции;  $\theta$  – рекомбинационная фракция (Risch N. et al., 1995).

#### Методики статистического анализа.

1. Частота ФКУ на 1000 человек рассчитана как отношение больных, выявленных при проведении неонатального скрининга к общему числу новорожденных в Карачаево-Черкесской Республике:  $p = (p_1/n) * 1000$ ;  $p+q=1000$ , где  $p_1$  – число детей с диагнозами «ФКУ» и «мГФА»,  $n$  – общее число наблюдений, то есть размер обследованной выборки. Для оценки погрешности использовали среднюю ошибку выборочной доли  $S\%$ .

2. Расчет гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH* проведен по формуле:  $2pq = m/N/Ef$ , где  $2pq$  – доля гетерозигот,  $N$  – объем исследованной выборки,  $m$  – число выявленных носителей мутаций,  $Ef$  – эффективность диагностической системы.

3. Расчетная частота заболевания определялась по формуле:  $p^2 = (2pq)^2 * 0,25$ , где  $p^2$  – доля гомозигот по мутантному аллелю.

4. Сравнение частот аллелей в выборках проводили с использованием критерия  $\chi^2$  или точного критерия Фишера в пакете STATISTICA Version 10. Стандартное отклонение рассчитывали с использованием пакета программ Microsoft Excel.

### **Результаты и обсуждение**

#### **Определение спектра мутаций гена *PAH* у больных ГФА и ФКУ из Карачаево-Черкесской Республики**

Молекулярно-генетическими методами были исследованы образцы ДНК 62 неродственных пробандов с диагнозами «фенилкетонурия» и «мГФА», а также 22 больных сибсов и 58 здоровых родственников. В выборку для молекулярно-генетического анализа вошли 62 неродственных пробанда, 1 сибс с «мГФА» вносит еще одну поврежденную хромосому в выборку. Таким образом, расчет проводился на 125 хромосом. Первоначально был проведен поиск 9 частых на территории РФ мутаций гена *PAH* с помощью MLPA-системы PKU-9 у 63 пробандов: IVS4+5G>T, R158Q, EX5del4154ins268, R252W, R261Q, P281L, IVS10-11G>A, IVS12+1G>A, R408W. Эффективность системы для российских больных составляет около 70% (Гундорова П. и др., 2016). В выборке 63 пробандов из Карачаево-Черкесской Республики методом поиска 9 частых мутаций были выявлены молекулярно-генетические дефекты на 7,2% хромосом (9 из 125 изученных хромосом). Мутация R408W выявлена на 5 хромосомах (4%) у 4 русских по национальности пациентов и у одного абазина. Мутация IVS10-11G>A выявлена на 2 хромосомах (1,6%), у русского и черкеса. Мутации R158Q и EX5del4154ins268 выявлены по одному разу (0,8%) у русских пробандов. Таким образом, диагностическая система PKU-9 оказалась значительно менее эффективной для больных из Карачаево-Черкесской Республики.

Далее для пробандов, у которых не были выявлены обе мутации гена *PAH*, было проведено исследование с помощью диагностической системы поиска 10 повторяющихся мутаций гена *PAH* PKU-10 (L48S, IVS2+5G>A, IVS2+5G>C, R243Q, R243\*, R261\*, E280K, E390G, A403V, Y414C). Для российских больных эффективность этой системы составляет около 9% (Гундорова П. и др., 2016). В выборке больных ФКУ и ГФА из Карачаево-Черкесии на 60% исследуемых хромосом (75 из 125) были обнаружены мутации с помощью системы PKU-10. Причем на 55,2% хромосом была выявлена мутация R261\*. Мутация R261\* выявлена в гомозиготном или в компаунд-гетерозиготном состоянии с

другими мутациями у 44 карачаевцев и у одного абазина. Мутация A403V выявлена на 2 хромосомах (1,6%) у карачаевца и абазина. Мутация L48S выявлена на 1 хромосоме (0,8%) у абазина. Мутация Y414C - на 1 хромосоме (0,8%) у русского.

Таким образом, после поиска частых мутаций с использованием MLPA-систем, диагноз не был подтвержден у 34 пробандов. Из них у 27 человек при помощи метода MLPA была обнаружена только одна мутация, у 7 человек частых мутаций гена *PAH* не было обнаружено. То есть не обнаружены мутации на 41 хромосоме. У этих 34 пробандов было проведено прямое автоматическое секвенирование гена *PAH* с целью поиска невыявленных мутаций. В результате мутации были обнаружены на 37 хромосомах. Мутация P211T была выявлена на 10 хромосомах (8%), R413P – на 9 хромосомах (7,2%), V230I – на 3 хромосомах (2,4%), F331S – на 2 хромосомах (1,6%). Мутации T380M, R169H, IVS4-1G>A, R53H, R176Q, L321I, P211L, Lys363Asnfs\*37, A300S, D415N, IVS1+5G>T, S349P, D222\* были выявлены в единичных случаях (по 0,8%).

Таблица 1. Спектр мутаций гена *PAH* у больных ФКУ и мГФА из КЧР.

Мутация		Карачаево-Черкесия		Карачаевцы	
Позиция в белке	Позиция в кДНК	Число хр-м (ед.)	Аллельная частота (%)	Число хр-м (ед.)	Аллельная частота (%)
R261*	c.781C>T	69	55.2	68	67.3
P211T	c.631C>A	10	8.0	10	9.9
R413P	c.1238G>C	9	7.2	6	5.9
V230I	c.688G>A	3	2.4	2	2.0
F331S	c.992T>C	2	1.6	2	2.0
A403V	c.1208C>T	2	1.6	1	1.0
E390G	c.1169A>G	2	1.6	1	1.0
T380M	c.1139C>T	1	0.8	1	1.0
R169H	c.506G>A	1	0.8	1	1.0
IVS4-1G>A	c.442-1G>A	1	0.8	1	1.0
R53H	c.158G>A	1	0.8	1	1.0
R176Q	c.527G>A	1	0.8	1	1.0
L321I	c.961C>A	1	0.8	1	1.0
P211L	c.632C>T	1	0.8	1	1.0
R408W	c.1222C>T	5	4.0	0	0.0
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	2	1.6	0	0.0
Lys363Asnfs*37	c.1089delG	1	0.8	0	0.0
L48S	c.143T>C	1	0.8	0	0.0
A300S	c.898G>T	1	0.8	0	0.0
D415N	c.1243G>A	1	0.8	0	0.0
IVS1+5G>T	c.60+5G>T	1	0.8	0	0.0
EX5del4154ins268	c.442-2913_509+1173del4154ins268	1	0.8	0	0.0
S349P	c.1045T>C	1	0.8	0	0.0
R158Q	c.473G>A	1	0.8	0	0.0
D222*	c.664_665delGA	1	0.8	0	0.0
Y414C	c.1241A>G	1	0.8	0	0.0
Невыявленные		4	3.2	4	4.0
<b>Всего</b>		<b>125</b>	<b>100.0</b>	<b>101</b>	<b>100.0</b>

У четверых пробандов диагноз подтвердить не удалось. После всех выполненных исследований, у троих пробандов была обнаружена лишь мутация R261\* в гетерозиготном состоянии, у одного мутация V230I в гетерозиготном состоянии. Такой результат, вероятно, можно объяснить неполной информативностью метода исследования: крупные делеции, а также мутации глубоко в интронах не детектируются методом секвенирования по Сенгеру. ДНК-диагностика для больных сибсов была проведена по принципу поиска мутаций, выявленных у больного родственника. Диагноз «фенилкетонурия» или «ГФА, вызванная мутациями гена *PAH*» был подтвержден молекулярно-генетическими методами для 80 из 84 обследованных больных.

Полный спектр мутаций гена *PAH* у больных из Карачаево-Черкесской Республики представлен в таблице 1. Также представлен спектр мутаций для больных карачаевцев, которые, очевидно, являются наиболее отягощенным в республике этносом по заболеванию ФКУ. Среди всех обследованных больных они составляют 84%, среди пробандов – 79%. Притом, что карачаевцы составляют лишь 40% от населения республики, они вносят основной вклад в выборку больных ФКУ и мГФА, что дает возможность предположить высокую частоту заболевания среди представителей данной национальности. Также, наиболее распространенная (55,2%) среди больных из выборки мутация R261\* выявлена почти исключительно у карачаевцев. Частота мутации R261\* среди карачаевцев составляет 67,3%. Среди российских больных аллельная частота данной мутации составляет менее 1% (Гундорова П. и др., 2016) и выявляется у больных уроженцев республик Северного Кавказа. Повторяющиеся мутации P211T и F331S встретились только у карачаевцев, а R413P – только среди коренных этносов. Частота данных мутаций среди больных из России неизвестна, они не были выявлены в ходе секвенирования ДНК 240 больных фенилкетонурией (собственные данные).

Частые для российских больных мутации R408W, IVS10-11G>A, R158Q и EX5del4154ins268 среди карачаевцев не выявлены и встречаются преимущественно у русских больных.

### **Разработка систем детекции частых мутаций гена *PAH***

Наличие в спектре мутаций гена *PAH* повторяющихся вариантов позволяет создать систему, предназначенную для детекции частых в регионе мутаций. Такие системы ДНК-диагностики предназначены для уменьшения материально-технических и временных затрат на диагностику, их применение особенно актуально, когда небольшое количество мутаций гена имеет высокую суммарную аллельную частоту. Для создания подобных систем эффективно использовать принцип аллельспецифичной мультиплексной лигазной реакции (MLPA), который позволяет соединить в одной пробирке высокоспецифичную детекцию нескольких мутаций при одних условиях реакции. Так как ДНК-диагностика больных из выборки проводилась в два этапа, первоначально был определен спектр мутаций у больных с диагнозом «фенилкетонурия». Наиболее частыми вариантами гена *PAH* в этой выборке являлись R261\*, R413P, P211T, F331S и R408W. Также в систему была включена мутация P211L, так как по техническим причинам ее детекцию удобно осуществлять одновременно с вариантом P211T. Варианты R413P и R408W расположены на расстоянии менее 20 нуклеотидов друг от друга в последовательности ДНК, поэтому их детекция не может осуществляться в одной пробирке. Таким образом система была разделена на две реакции: R413P, P211T, P211L и F331S – в одной пробирке, R261\* и R408W – в другой. На этапе визуализации в полиакриламидном геле результаты амплификации из двух пробирок смешиваются в одной лунке электрофореза. Суммарная аллельная частота мутаций, входящих в систему PKU-KЧ1 составляет 76,8% для жителей

республики, 81,4% для коренного населения и 86,1% для карачаевцев. С помощью системы РКУ-КЧ1 проводился поиск мутаций гена *PAH* в популяционной выборке больных, эффективность системы учитывалась при расчете частот носительства и заболевания в соответствии с разделом «Методы».

После анализа спектра мутаций у больных с входящим диагнозом «мГФА», в систему была добавлена еще одна повторяющаяся мутация V230I, что позволило повысить эффективность диагностики. Конечный вариант системы РКУ-КЧ2 включает в себя 7 мутаций: R261\*, R413P, V230I, P211T, F331S, P211L, R408W. Электрофореграмма и представлена на рисунке 1.

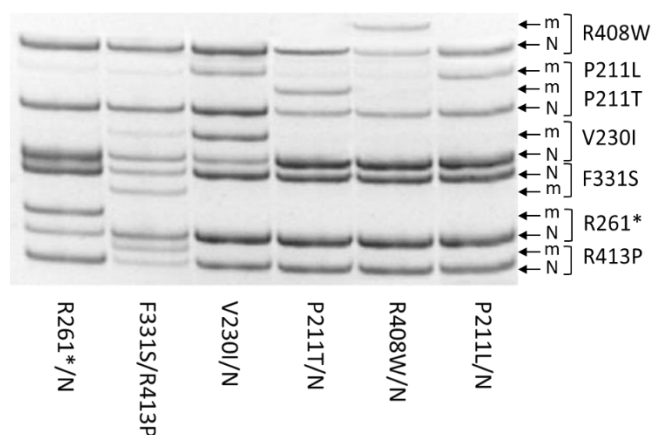


Рис. 1. Электрофореграмма системы детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена *PAH* РКУ-КЧ2.

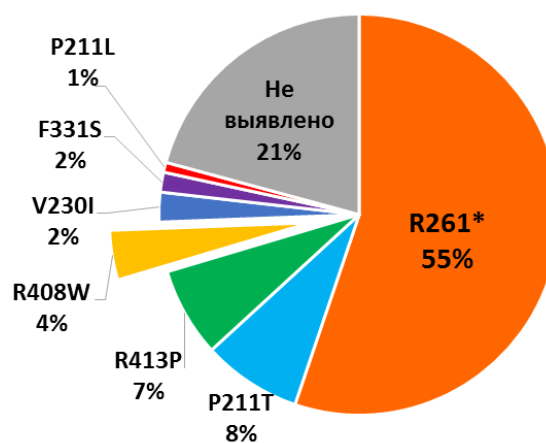


Рис. 2. Аллельные частоты мутаций, входящих в систему РКУ-КЧ2, среди больных из Карачаево-Черкесской Республики.

Суммарная аллельная частота мутаций, входящих в систему РКУ-КЧ2 составила 79,2% для общей выборки (рисунок 2), 88,1% для карачаевцев, также этот показатель увеличился для больных с мГФА с 58,4% до 65,9%. Система позволяет выявить обе мутации гена *PAH* у 62,7% больных с входящим диагнозом «гиперфенилаланинемия» из Карачаево-Черкесии и, хотя бы одну мутацию у 95,7% больных.

Кроме ДНК-диагностики больных с диагнозами «мГФА» и «ФКУ», разработанная система РКУ-КЧ2 может быть использована для выявления носителей среди здорового населения Карачаево-Черкесской Республики.

### Гено-фенотипический анализ

Для гено-фенотипического анализа выборка разделена на две: больные фенилкетонурией и мГФА. В первую вошли 42 больных с входящим диагнозом «фенилкетонурия» (84 хромосомы), во вторую 21 пациент диагнозом «мГФА», в том числе sibс больного из первой выборки, который вносит 1 поврежденную хромосому (41 хромосома). На основании данных базы PAHvdb (Blau N. et al., 2006-2017) (дата обращения 19 января 2017 года) мутации были разделены в зависимости от остаточной активности фермента ФАГ на мягкие и тяжелые. Мутации с остаточной активностью белка меньше 10% классифицируются как тяжелые; больше 10% - как мягкие с вероятной чувствительностью к препаратам тетрагидробиоптерина (Zurfluh M.R. et al., 2008). Мутации, для которых неизвестна остаточная активность фермента были классифицированы как «мутации с неизвестным клиническим эффектом». Также к этой группе относятся невыявленные мутации гена *PAH*. В таблице 2 представлены частоты тяжелых и мягких мутаций гена *PAH* в выборках пациентов ФКУ и мГФА из Карачаево-Черкесии. В данную выборку вошли только неродственные пробанды: 42 пациента с

входящим диагнозом «фенилкетонурия» и 21 с диагнозом «мГФА». При этом один из больных мГФА является больным сибсом больного из выборки ФКУ, эти два пробанда вносят в выборку ФКУ две, а в выборку ГФА одну хромосому с мутацией (см. «Материалы»). В верхней части таблицы 2 сгруппированы тяжелые мутации (названия мутаций выделены красным цветом), затем мутации с неизвестным клиническим эффектом (черный), в нижней части таблицы 2 – мягкие мутации (зеленый). Как мягкие также отмечены три мутации, для которых неизвестна остаточная активность ФАГ, но по данным литературы и результатам настоящей работы они влияют на фенотип пациентов как мягкие мутации: L321I, R176Q, R169H (см. ниже).

Таблица 2. Частоты тяжелых и мягких мутаций в выборках пациентов с ФКУ и мГФА.

Мутация			ФКУ (N=42)		мГФА (N=21)	
Позиция в белке	Позиция в кДНК	Ост. активность ФАГ, %	Число хр-м (ед.)	Частота, %	Число хр-м (ед.)	Частота, %
R261*	c.781C>T	0	56	66.7	13	31.7
R413P	c.1238G>C	3	8	9.5	1	2.4
R408W	c.1222C>T	2	3	3.6	2	4.9
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	5	2	2.4	0	0.0
Lys363Asnfs*37	c.1089delG	0	1	1.2	0	0.0
IVS1+5G>T	c.60+5G>T	0	1	1.2	0	0.0
EX5del4154ins268	c.442-2913_509+1173del4154ins268	0	1	1.2	0	0.0
S349P	c.1045T>C	1	1	1.2	0	0.0
R158Q	c.473G>A	10	1	1.2	0	0.0
D222*	c.664_665delGA	0	1	1.2	0	0.0
IVS4-1G>A	c.442-1G>A	0	1	1.2	0	0.0
F331S	c.992T>C	?	2	2.4	0	0.0
P211L	c.632C>T	?	1	1.2	0	0.0
невьявленные мутации		?	0	0.0	4	9.8
R169H	c.506G>A	? Мягкая	0	0.0	1	2.4
L321I	c.961C>A	? Мягкая	0	0.0	1	2.4
R176Q	c.527G>A	? Мягкая	0	0.0	1	2.4
P211T	c.631C>A	72	2	2.4	8	19.5
Y414C	c.1241A>G	57	1	1.2	0	0.0
L48S	c.143T>C	39	1	1.2	0	0.0
E390G	c.1169A>G	62	1	1.2	1	2.4
A300S	c.898G>T	31	0	0.0	1	2.4
D415N	c.1243G>A	72	0	0.0	1	2.4
V230I	c.688G>A	63	0	0.0	3	7.3
A403V	c.1208C>T	66	0	0.0	2	4.9
T380M	c.1139C>T	28	0	0.0	1	2.4
R53H	c.158G>A	79	0	0.0	1	2.4
<b>Мягкие мутации</b>			<b>5</b>	<b>6.0</b>	<b>21</b>	<b>51.2</b>
<b>Тяжелые мутации</b>			<b>76</b>	<b>90.5</b>	<b>16</b>	<b>39.0</b>
<b>Всего выявлено</b>			<b>84</b>	<b>100</b>	<b>37</b>	<b>90.2</b>

Попарно сравним суммарные частоты тяжелых и мягких мутаций в выборках больных ФКУ и мГФА используя критерий Хи-квадрат. Мягкие мутации достоверно чаще встречаются среди больных с клиникой мГФА ( $\chi^2=33,17$ ,  $p<0,00001$ ). Тяжелые мутации достоверно чаще встречаются среди больных с классической ФКУ ( $\chi^2=37,54$ ,  $p<0,00001$ ).

В выборку больных для гено-фенотипического анализа вошел 71 пациент (включая больных сибсов), для которых полностью или частично известны клинические данные (рисунок 3). Все больные с двумя тяжелыми мутациями гена *PAH* имеют классическую или среднетяжелую форму фенилкетонурии (38 пациентов). Это согласуется с представлениями о гено-фенотипических корреляциях у больных ГФА. Мягкая мутация в генотипе смягчает фенотип, это также подтверждается результатами настоящего исследования. Больные с одной мягкой мутацией преимущественно имеют мягкий фенотип, хотя в выборке больных с входящим диагнозом «фенилкетонурия» присутствуют 5 пациентов с одной мягкой мутацией (5 пациентов). Все больные с диагнозом «мГФА», у которых для выявленных мутаций гена *PAH* известны значения остаточной активности ФАГ, имеют в генотипе хотя бы одну мягкую мутацию (22 пациента).

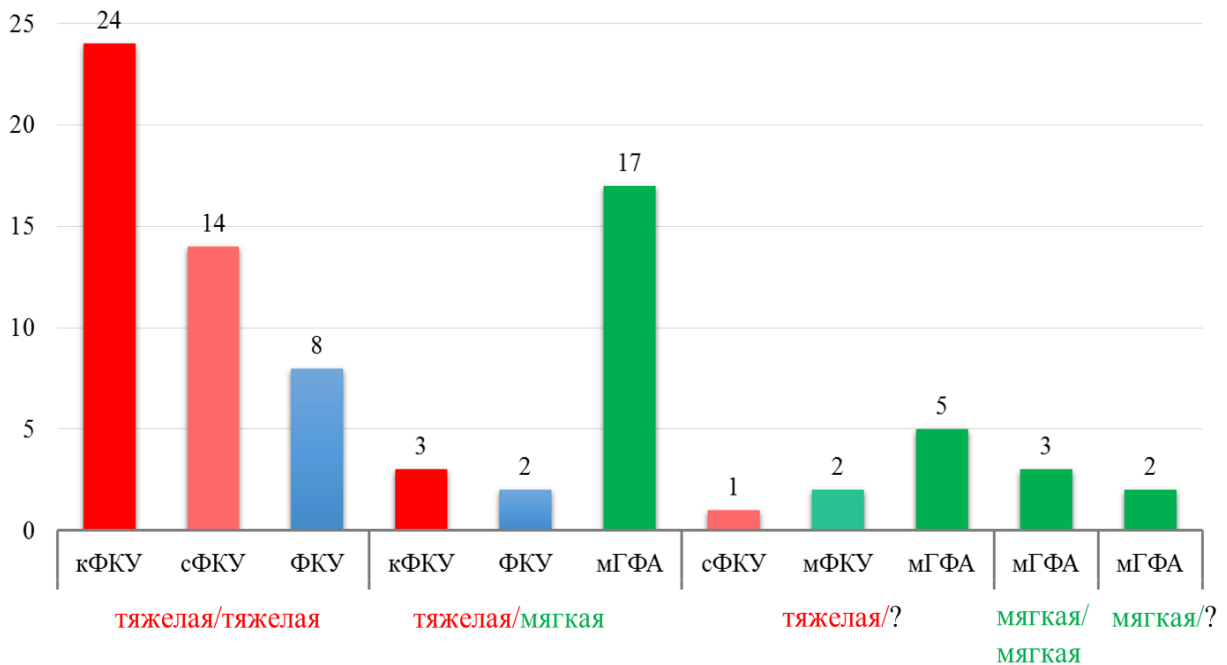


Рис 3. Гено-фенотипические корреляции у пациентов с ГФА

Примечание: Столбиками обозначено количество пациентов с различными клиническими формами заболевания. кФКУ – классическая ФКУ, сФКУ – среднетяжелая ФКУ, мФКУ – мягкая ФКУ, мГФА – мягкая ГФА.

Для мутаций R169H и R176Q не определена остаточная активность ФАГ, но по данным литературы они являются мягкими (Desviat L.R. et al., 1999). Мутация L321I ранее описана не была, но так как в компаунде с тяжелой мутацией она приводит к формированию мягкого фенотипа, вероятно L321I является мягкой мутацией. Таким образом при подсчете доли мягких и тяжелых мутаций варианты R169H, R176Q, L321I классифицированы как мягкие. Три пробанда являются компаунд-гетерозиготами по двум мягким мутациям и также имеют мягкий фенотип.

Все пробанды с диагнозом «мГФА» в Карачаево-Черкесской Республике не получают лечения и не соблюдают безбелковую диету, поэтому уровень ФА минимально искажен внешними факторами. У всех больных с входящим диагнозом «мГФА» значения ФА соответствуют диапазону 2-10 мг/дл.

Наиболее частая тяжелая мутация R261\* распространена в Иране. По данным разных авторов, она встречается на 4,5-8% мутантных хромосом (Alibakhshi R. et al., 2014; Bonyadi M. et al., 2010; Moradi K. et al., 2012; Zare-Karizi S. et al., 2011). Также мутация описана в популяциях Бразилии (Santana da Silva L.C. et al., 2003), Португалии (Rivera I. et al., 1998), Китая (Song L. et al., 2010) и Дальнего Востока Российской Федерации (Sueoka H. et al., 1999). Для пациентов из Германии, Ирана и Португалии показано независимое происхождение мутации R261\* (Dworniczak B. et al., 1991; Rivera I. et al., 1998). Аллельная частота мутации R261\*, сравнимая с таковой для Карачаево-Черкесии, в мире не была зарегистрирована. Мутация R261\* приводит к образованию стоп-кодона, активность ФАГ при наличии в гене *PAH* этого варианта составляет около 1% (Blau N. et al., 2006-2017). Данная мутация встретилась у карачаевцев (на 68 хромосомах) и абазин (на 1 хромосоме) из исследуемой выборки пробандов. У всех пациентов мутация R261\* в гомозиготном состоянии приводит к классической или среднетяжелой ФКУ, то есть мутация R261\* является тяжелой по результатам настоящего исследования. Она встретилась в выборке больных ФКУ на 66,7% хромосом, тогда как в выборке больных МГФА на 31,7% хромосом.

Пациенты, у которых была обнаружена хотя бы одна мягкая мутация, могут быть протестированы на чувствительность к препаратам тетрагидробиоптерина. Введение синтетических аналогов ВН4 позволит расширить диету у больных с мягкими и умеренными формами заболевания, что улучшает качество их жизни.

Одновременно с широким распространением тяжелого патогенного варианта R261\* можно отметить высокую суммарную аллельную частоту мягких мутаций у больных ФКУ из Карачаево-Черкесии. Как видно из гено-фенотипического анализа, компаунд-гетерозиготный генотип по тяжелой и мягкой мутации формирует достаточно мягкий фенотип. Зачастую это фенотип МГФА, который не требует лечения. Клинически почти здоровые пациенты с МГФА могут вести нормальную полноценную жизнь. Но для них вероятность передать потомкам мутацию гена *PAH* в гетерозиготном состоянии составляет 100%, а вероятность рождения больного ребенка в браке с носителем 50%. Кроме того, в случае беременности у женщин с мутациями гена *PAH* возможно внутриутробное поражения плода. Пациенты с мягкими клиническими формами заболевания, при отсутствии должной ДНК-диагностики и дородовой диагностики, способствуют увеличению темпов распространения носительства мутаций *PAH* среди здорового населения республики. При этом они передают потомкам и тяжелые мутации, которые присутствуют в их генотипе. Вероятно, мутация R261\* широко распространилась именно благодаря такому механизму «маскировки», передаваясь от больных с мягкими клиническими формами заболевания.

#### **Частота заболевания ГФА в Карачаево-Черкесской Республике по неонатальному скринингу**

Определение частоты заболевания проводилось совместно по диагнозам «ФКУ» и «МГФА», так как с молекулярно-генетической точки зрения, эти две клинические формы вызваны мутациями в одном гене. Разные формы гиперфенилаланинемий возникают в результате статистически обусловленных комбинаций тяжелых и мягких мутаций, которые тем не менее входят в один спектр вариантов гена *PAH*.

Данные о количестве родов, обследованных больных и о числе выявленных больных предоставлены МГК. За 9 лет скрининга на заболевание ФКУ в КЧР было обследовано 45873 новорожденных, выявлено 54 больных с повышенным уровнем ФА. По данным МГК республики, предоставленные цифры рождаемости в ЛПУ составляют около 98% всех родов в республике.

По данным неонатального скрининга определена частота гиперфенилаланинемий в исследуемом регионе, в среднем она составила 1:850 новорожденных ( $1,18 \pm 0,16\%$ ) – ФКУ 1:1581 ( $2,52 \pm 0,23\%$ ), ГФА 1:1834 ( $2,35 \pm 0,11\%$ ). Зарегистрированная частота является самой значительной не только среди различных регионов России, но и в мире. По данным неонатального скрининга по России в среднем частота ФКУ составляет 1:7142 (Новиков П.В. и др., 2012). В большинстве регионов наблюдаются частоты сопоставимые со средней по России. Аномально высокой частоты заболевания как в Карачаево-Черкесии ни в Российской Федерации, ни в мире не зарегистрировано. При этом расчетная частота представлена для населения республики в целом, хотя основное количество больных составляют карачаевцы. Очевидно, что для карачаевцев частота заболевания будет еще выше, что представляет существенную проблему в области здравоохранения.

Клинически 54% выявленных больных (29 человек) имеют тяжелые проявления, то есть диагноз «фенилкетонурия». 25 больных с диагнозом «мГФА» составляют 46% выявленных скринингом больных. С одной стороны, таким пациентам не назначается диета и они могут вести образ жизни, приближенный к таковому у здоровых людей. С другой стороны, имея две мутации в гене *PAH*, в браке с носителем вероятность рождения больного ребенка будет составлять 50%. При этом, больные потомки могут в свою очередь иметь тяжелую клиническую форму заболевания. Исходя из этих рассуждений, ДНК-диагностика для больных с диагнозом «мГФА» является обязательным этапом наблюдения в МГК, также, как и диагностика носительства у их будущих супругов с последующей возможностью проведения пренатальной ДНК-диагностики. В семьях с больными ГФА необходимо проводить подробные разъяснения по поводу будущих возможных беременностей больных девочек и связанных с этим рисков материнской ФКУ.

#### **Определения расчетной частоты заболевания ГФА и частоты носительства среди здоровых жителей республики**

Исследование проведено ДНК с целью поиска частых для Карачаево-Черкесии мутаций гена *PAH* на материале 691 здорового жителя республики. В результате анализа на наличие 6 частых мутаций с использованием системы РКУ-КЧ1 выявлено 39 здоровых носителей мутаций гена *PAH*, в том числе 31 карачаевец, 2 черкеса, 3 абазина, 2 ногайца. Расчет производился с учетом эффективности системы: 86,1% для карачаевцев и 76,8% для представителей остальных национальностей. Для черкесов и ногайцев частоты носительства составили 1:40 и 1:45 соответственно, расчетная частота заболевания 1:6380 и 1:8213. Такие значения близки к средним по России. Для абазин частота носительства составила 1:32 здорового индивида, расчетная частота заболевания 1:4162. Такая частота несколько выше средней по России. Но при малом количестве больных абазинской национальности установить молекулярно-генетическую причину повышенной частоты представляется затруднительным, так как у них не выявлено какой-либо мажорной мутации гена *PAH*. Среди выявленных в популяции также встретились и носители мутации R261\* и R413P.

Интересно, что частая для европейцев и русских мутаций R408W в популяционной выборке была выявлена среди черкесов и ногайцев. Среди карачаевцев данный вариант не был выявлен ни одного раза при большом объеме исследованной выборки (656 хромосом карачаевцев). В выборке больных вариант R408W зарегистрирован у больного абазинской национальности. Из представленных данных можно заключить, что наиболее распространенная в Европе и европейской части России мутация гена *PAH* R408W встречается среди представителей всех наиболее распространенных в Карачаево-Черкесской Республике национальностей, кроме карачаевцев.

Наибольшее число носителей мутаций гена *PAH* было выявлено среди карачаевцев.



В выборку вошли здоровые жители из нескольких районов республики: Усть-Джегутинского, Малокарачаевского, Прикубанского, а также карачаевцы, проживающие в городах Карачаевске и Черкесске. Среди 328 обследованных выявлен 31 носитель частых мутаций гена *PAH*, из них 21 носитель мутации R261\*, 6 носителей P211T, 4 носителя R413P. Мутации P211T и R413P имеют повышенную частоту носительства в популяции (1:55 и 1:82). Вариант R261\* встречается с частотой 1:16 здоровых карачаевцев и является основной причиной аномально высокой расчетной частоты заболевания 1:332. Суммарная частота носительства мутаций гена *PAH* составляет 1:9 здоровых карачаевцев. Очевидно, что высокую частоту фенилкетонурии в Карачаево-Черкесской Республике обеспечивает в основном высокая частота гетерозиготного носительства мутаций гена *PAH* у карачаевцев, причем главным образом варианта R261\*. В литературе на настоящий момент не описана ни одна популяция с такой высокой частотой заболевания ФКУ.

### **Особенности распространения мажорной мутации R261\***

Широкое распространение варианта R261\* среди карачаевцев позволяет предположить наличие эффекта основателя. При возникновении нового аллеля возникает полное неравновесие по сцеплению данного локуса с остальными. В результате рекомбинаций данное неравновесие уменьшается из поколения в поколение. Если возникший аллель является мутацией гена, то наблюдается неравновесие по сцеплению локуса заболевания со сцепленными с локусом генетическими маркерами. Для более тесно сцепленных аллелей будет наблюдаться более сильное отклонение от равновесия. Выявление меры сцепления путем анализа данных отклонений применяется для определения времени распространения мутации, т.е. «возраста» мутации (Devlin B. et al., 1995; Morton N.E., 2005; Mueller J.C., 2004; Pritchard J.K. et al., 2001).

### **Анализ гаплотипов гена *PAH* на хромосомах с мутацией R261\***

Исторически сложилась методика анализа RFLP-гаплотипа *PAH* с помощью эндонуклеаз рестрикции (Lidsky A.S. et al., 1985): PvuIIa, PvuIIb, BglIII, XmnI, MspI, EcoRI, AluI – RFLP гаплотипы (DiLella A.G. et al., 1986). Сайты описаны в dbSNP со следующими номерами: rs4646986, rs4646897, rs1522296, rs869916, rs1722383, rs4646988, rs1042503. Также существует точка, соответствующая сайту EcoRV, анализ которой возможен только методом Саузерн блота и по техническим причинам не был проведен в данной работе. Был проведен анализ областей tandemных повторов из 30 пар оснований VNTR, который локализован на расстоянии 3 kb от 3' конца последнего экзона гена *PAH* (Goltsov A.A. et al., 1992), и четырехнуклеотидных tandemных (TCTA)<sub>n</sub> повторов STR в интроне 3 на расстоянии 700bp от экзона 3 (Goltsov A.A. et al., 1993). Анализ семи точечных полиморфизмов и областей двух варибельных tandemных повторов позволяет определить гаплотип на хромосомах с мутацией. Сравнив полученный гаплотип с описанными в литературе известными гаплотипами мутации R261\* можно судить об общем или не связанном происхождении мутации в различных популяциях.

Для анализа гаплотипа *PAH* была разработана MLPA-система, включающая семь точек SNP. Были исследованы гаплотипы в выборке из 26 больных пробандов карачаевцев по национальности с генотипом *PAH* R261\*/R261\* и в популяционной выборке 28 здоровых карачаевцев, которые не являются носителями R261\* и родственниками больных. Во всех образцах из выборки больных обнаружен один и тот же гаплотип, который соответствует 8, 10 или 41 гаплотипу *PAH*, которые отличаются в зависимости от аллелей в локусе EcoRV. Анализ области STR повтора позволил выявить аллель, соответствующий 240 п.н. во всех исследованных образцах ДНК с генотипом R261\*/R261\*. В области VNTR выявлено 7 мономеров повтора. Те же аллели зарегистрированы во всех трех гаплотипах-кандидатах. Так как на всех исследованных

хромосомах с мутацией был выявлены одинаковые аллели для всех исследованных маркеров, неравновесие по сцеплению  $\delta=1$ , то есть гаплотип сцеплен с мутацией.

Согласно данным литературы, в Германии для мутации R261\* был описан гаплотип 3 в немецкой семье и неполный гаплотип в турецкой семье (MspI +, XmnI -), так как все члены семьи были гетерозиготными по остальным сайтам рестрикции (Dworniczak B. et al., 1991). Указанные аллели для турецкой семьи совпадают с таковыми у карачаевцев, однако данных недостаточно для подтверждения сходства гаплотипов. В Норвегии мутация R261\* была выявлена на хромосомах с гаплотипом 1 (Eiken H.G. et al., 1996). В Португалии вариант R261\* был обнаружен на хромосомах с гаплотипом 4 (Rivera I. et al., 1998). При исследовании больных ФКУ из Италии мутация была ассоциирована с гаплотипом 1 (Dianzani I. et al., 1995) и гаплотипом 4 (Romano V. et al., 1994). Авторы из Японии, впервые описавшие мутацию R261\*, выявили ассоциацию этого варианта с гаплотипом 2 (Shirahase W. et al., 1991). К сожалению, в Иране, где вариант R261\* наиболее распространен, не проводился анализ гаплотипов *PAH*, и мы не имеем возможности обсудить теорию иранского происхождения этой мутации. Тем не менее очевидно, что у исследованных больных вариант R261\* имеет общее происхождение. Анализ сцепления с полиморфными маркерами, лежащими на различном удалении от гена, позволит выявить степень «размывания» гаплотипа и возраст возникновения мутации.

#### Неравновесие по сцеплению

Было проведено исследование генотипов хромосом по пяти STR-маркерам, расположенным близи гена *PAH*, в двух выборках: 26 гомозиготных по мутации R261\* больных карачаевцев и 30 здоровых карачаевцев, которые не являлись родственниками больных и носителями мутации R261\*. Были выбраны 5 STR-маркеров с высокой гетерозиготностью, которые расположены в интервале 5002 т.п.н. вокруг гена *PAH*: два в сторону центромеры на расстоянии 2677,5 т.п.н. (D12S1588) и 1570,5 т.п.н. (D12S1727), три в сторону теломеры на расстоянии 992,5 т.п.н. (D12S78), 1269,5 т.п.н. (D12S338) и 2324,5 т.п.н. (D12S317) от гена. Для каждого аллеля всех исследованных маркеров было определено значение неравновесия по сцеплению  $\delta$  (таблица 3). Для оценки достоверности ассоциации данного аллеля с мутацией применяли  $\chi^2$ -тест или точный критерий Фишера. Используя полученные данные, выявили аллельный состав гаплотипа основателя. Так как в момент появления мутации формируется полное неравновесие по сцеплению с аллелями маркеров, которые составляют собственно гаплотип основателя, а результате рекомбинаций данное неравновесие размывается со временем, в настоящий момент максимальную неравновесность сцепления должны иметь те аллели, которые совпадают с таковыми у «основателя». Наиболее вероятный гаплотип основателя D12S1588-D12S1727-D12S78-D12S338-D12S317: 5-8-8-1-16.

Таблица 3. Ассоциация и неравновесие по сцеплению аллелей маркеров с мутацией R261\*.

Маркеры	Аллель	$\theta$ , сМ	$\chi^2$	$\delta \pm$ 95%ДИ
D12S1588	5	4.82	30.2	0.58±0.16
D12S1727	8	2.81	34.1	0.71±0.15
<i>PAH</i>	mut			
D12S78	8	1.87	93.0	0.92±0.08
D12S338	1	1.87	64.5	0.93±0.08
D12S317	16	4.28	66.4	0.73±0.12

Примечание:  $\theta$  – рекомбинационная фракция,  $\delta$  – неравновесие по сцеплению, ДИ – доверительный интервал.  $\chi^2$  рассчитан с уровнем значимости  $p < 0.0001$  для всех маркеров.

Рис 4. Гаплотипы хромосом с мутацией по пяти микросателлитным локусам

Маркер	D12S1588	D12S1727	PAH	D12S78	D12S338	D12S317
сМ	105.18	107.19	110	111.87	111.87	114.28
Мб	100.594	101.701	103.2715	104.264	104.541	105.596
№ семьи						
21	5	8	m	8	1	16
32	5	8	m	8	1	16
35	5	8	m	8	1	16
35	5	8	m	8	1	16
36	5	8	m	8	1	16
37	5	8	m	8	1	16
39	5	8	m	8	1	16
40	5	8	m	8	1	16
40	5	8	m	8	1	16
41	5	8	m	8	1	16
42	5	8	m	8	1	16
42	5	8	m	8	1	16
43	5	8	m	8	1	16
43	5	8	m	8	1	16
45	5	8	m	8	1	16
45	5	8	m	8	1	16
46	5	8	m	8	1	16
46	5	8	m	8	1	16
48	5	8	m	8	1	16
49	5	8	m	8	1	16
54	5	8	m	8	1	16
54	5	8	m	8	1	16
109	5	8	m	8	1	16
13	5	8	m	8	1	16
20.1	5	8	m	8	1	16
48	5	8	m	8	1	13
47	5	8	m	8	1	4
111	5	8	m	8	1	4
111	5	8	m	8	1	4
29	5	8	m	8	1	3
66	5	8	m	8	1	3
53	2/4	8	m	8	1	16
49	4	8	m	8	1	16
13	4	8	m	8	1	16
37	3	8	m	8	1	16
110	3	8	m	8	1	16
20.1	4	8	m	8	1	16
66	3	8	m	8	1	3
32	5	11	m	8	1	16
21	3	7	m	8	1	16
36	3	7	m	8	1	16
53	2/4	7	m	8	1	16
109	3	7	m	8	1	16
30	3	11	m	8	1	15
39	3	11	m	8	1	14
30	2	11	m	8	2	15
64	2/4	11	m	8	2	14/16
64	2/4	8	m	8	2	14/16
29	5	8	m	12	1	3
47	3	10	m	3	1	4
110	2	11	m	1	1	14
41	2	11	m	1	1	16

Примечание: заливкой выделена сохраняющая часть гаплотипа основателя.

Из данных рисунка 4 видно, что значение неравновесия по сцеплению уменьшается по мере удаления от гена, ассоциированного заболеванием. Такая закономерность характерна для популяций, в которых распространение аллеля произошло в результате эффекта основателя. Высокие значения неравновесия по сцеплению сохраняются на довольно большом расстоянии от гена, что может свидетельствовать о сравнительно небольшом возрасте эффекта основателя в исследуемой популяции.

Гаплотипы хромосом с мутацией R261\* представлены на рисунке 4. При доступности материала родителей и других родственников, гаплотипы на хромосомах у больных, гетерозиготных по каким-либо маркерам, определялись с помощью семейного анализа. В случаях, когда невозможно определить на какой хромосоме находится тот или иной аллель, варианты указаны через дробную черту (семьи № 53 и 64).

Наличие повторяющегося гаплотипа у хромосом с мутацией подтверждает предположение о том, что мутация R261\* широко распространилась среди карачаевцев в результате эффекта основателя.

### Возраст мутации R261\*

Расчет возраста распространенной среди карачаевцев мутации R261\* производился для маркеров D12S1588, D12S1727 и D12S317. Для маркеров D12S78 и D12S338 значение неравновесия по сцеплению с учетом доверительного интервала включает значение  $\delta=1$ , то есть они фактически еще сцеплены с мутацией. По этой причине расчет возраста мутации по маркерам был бы D12S78 и D12S338 некорректен.

Среднее значение числа поколений, прошедших с момента начала распространения мутации,  $g_{cp}$  составило  $10,2 \pm 2,7$  поколений. По данным исследования, проведенного в Карачаево-Черкесской Республике, средний возраст поколения составляет 26,98 лет (Ельчинова Г.И. и др., 2015). Исходя из этого, время, за которое произошло накопление мутации R261\* у карачаевцев составляет  $275 \pm 73$  лет. Средний год рождения больных 2005, соответственно период начала распространения мутации R261\* приходится на начало XVIII века (1730 год  $\pm$  73 года). Оценка параметров роста популяции проведена по данным динамики численности карачаевцев, график представлен на рисунке 5.

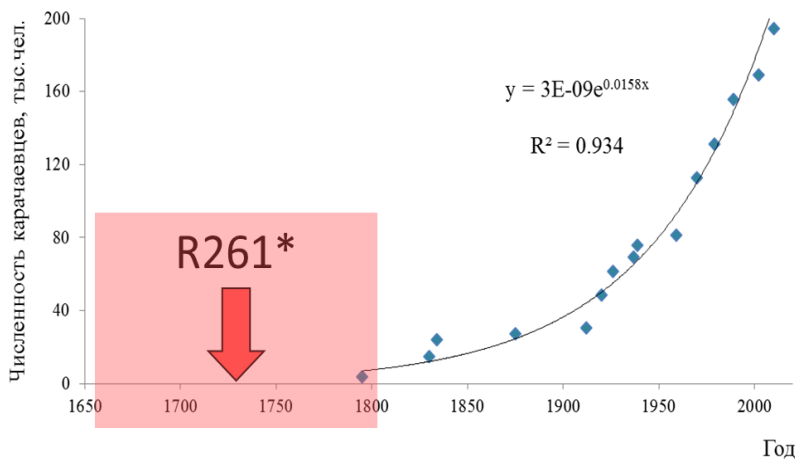


Рис. 5. Численность популяции карачаевцев в период с 1790 по 2010 год.

Примечание: Точками отмечены значения численности популяции карачаевцев (Эдиев Д.М., 2003). Кривая – аппроксимация экспоненциальной зависимости на график численности от времени. Стрелкой и заливкой выделен временной интервал предполагаемого распространения R261\* с учетом погрешности.

Согласно данным литературы, первые упоминания о карачаевцах относят к XII веку. В период до 1795 года численность популяции не увеличивалась. Учитывая произведенную оценку возраста мутации R261\*, можно предположить, что начало распространения мутации совпадает с началом роста численности популяции карачаевцев. В результате описанных процессов, исследуемый патогенный вариант широко распространился среди карачаевцев (1:16 здоровых карачаевцев) за сравнительно небольшой промежуток времени в 250-300 лет.

### Выводы

1. Спектр мутаций гена *PAH* у больных гиперфенилаланинемиями из Карачаево-Черкесской Республики ограничен и характеризуется накоплением некоторых вариантов. Суммарная аллельная частота 7 наиболее частых мутаций у больных из Карачаево-Черкессии составляет 79,2%. Аллельная частота наиболее распространенной мутации R261\* составляет 55,2% среди всех обследованных пациентов и 67,3% среди представителей титульной нации - карачаевцев.

2. Разработанная система детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена *PAH* (R261\*, R413P, V230I, P211T, F331S, P211L, R408W) РКУ-КЧ2 позволяет выявить обе мутации гена *PAH* у 62,7% больных с входящим диагнозом «гиперфенилаланинемия» из Карачаево-Черкессии и, хотя бы одну мутацию у 95,7% больных.

3. По данным неонатального скрининга частота гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике составляет 1:850 новорожденных, что в настоящее время является самой высокой частотой ФКУ в мире. Расчетная частота заболевания для черкесов, абазин и ногайцев близка к средней по РФ. В это же время, среди карачаевцев расчетная частота заболевания аномально высока - 1:332. Повышенная частота носительства мутаций гена *PAH* среди карачаевцев (1:9) обусловлена в основном распространением мутации R261\* (1:16).

4. Выявлена взаимосвязь между генотипом *PAH* и фенотипом больных фенилкетонурией и мГФА. Выявлены статистически достоверные различия частот ( $p < 0.0001$ ) мягких и тяжелых мутаций в выборках с разными клиническими формами ГФА. Частота мягких и тяжелых мутаций в выборке больных с «мГФА» составила 51,2% и 39,2% соответственно, в выборке больных с ФКУ - 6,0% и 90,5%. В результате анализа генотипов и клинических данных показано, что мягкие мутации обладают псевдоминантным эффектом, обуславливая мягкий фенотип.

5. Наличие общего гаплотипа на хромосомах с мутацией R261\* подтверждает влияние эффекта основателя на накопление фенилкетонурии среди карачаевцев. Гаплотип гена *PAH* на хромосомах с мутацией R261\* не совпадает с ранее описанными в литературе гаплотипами. Предполагается независимое происхождение мутации R261\* на территории Карачаево-Черкесской Республики или общее происхождение этого патогенного варианта у карачаевцев и иранцев, так как описаны контакты этих двух народов в прошлом. На основании расчета неравновесия по сцеплению R261\* с полиморфными локусами установлен возраст мутации  $g_{cp} = 10.2 \pm 2.7$  поколений (275 ± 73 лет). Период распространения R261\* предшествует фазе роста численности популяции карачаевцев конце XVIII - начале XIX веков.

### Практические рекомендации

Проведение ДНК-диагностики с использованием панели РКУ-КЧ2 рекомендовано всем выявленным на неонатальном скрининге детям представителям коренных национальностей с диагнозами «ФКУ» и «мГФА» с целью выявления молекулярной причины заболевания, прогноза течения заболевания, дальнейшей пренатальной диагностики будущих sibсов в отягощенных семьях, а также медико-генетического консультирования больных по поводу вступления в брак.

Рекомендуется осуществлять медико-генетическое обследование здоровых представителей коренных этносов республики с использованием панели РКУ-КЧ2 с целью выявления носителей мутаций гена *PAH*. Выявленным носителям необходимы подробные консультации врачей-генетиков, исследование гена *PAH* у их супругов и разъяснение рисков, связанных с деторождением.

Рекомендуется проводить подробное консультирование в семьях с больными ГФА по поводу актуальности диетотерапии и возможных рисков, связанных с деторождением в этих семьях. Супругам пациентов с ФКУ и мГФА рекомендовано проводить секвенирование гена *PAH* с целью исключения носительства мутаций. В случае обнаружения мутаций, рекомендуется предоставлять семьям возможность провести пренатальную диагностику.

Наблюдение за пациентками с ФКУ и мГФА, подробные консультации по поводу будущих возможных беременностей и риска материнской ФКУ являются актуальной задачей. Так как контроль уровня ФА необходим как в процессе, так и на этапе планирования беременности, пациентки должны быть в полной мере проинформированы о возможных рисках и находиться под наблюдением врачей-генетиков.

### Список публикаций по теме диссертации

#### Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Макаов А.Х., Зинченко Р.А., Абайханова З.М., Поляков А.В. Особенности спектра мутаций в гене *PAH* в Карачаево-Черкесской Республике // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 12. - с.1448-1457.

2. **Гундорова П.**, Зинченко Р.А., Макаов А.Х., Поляков А.В. Спектр мутаций гена *PAH* у больных с входящим диагнозом «гиперфенилаланинемия» из Карачаево-Черкесской Республики // Генетика. – 2017. - Т. 53. - № 7. - с.849-953.

3. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Бушуева Т.В., Беляшова Е.Ю., Зинченко Р.А., Амелина С.С., Куцев С.И., Поляков А.В. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов РФ с целью определения чувствительности к препаратам ВН4 // Генетика. – 2017. - Т. 53. - № 6. - с.732-739

4. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Шагина О.А., Поляков А.В. 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 // Медицинская генетика. - 2016. - Т. 15. - № 2 (164). - с. 29-36.

5. Амелина М.А., Зинченко Р.А., Степанова А.А., **Гундорова П.**, Поляков А.В., Амелина С.С. Изучение взаимосвязи генотипов (*PAH*) и фенотипов у больных фенилкетонурией из Ростовской области // Медицинская генетика. - 2016. - Т. 15. № 6 (168). - с. 3-10.

6. Амелина М.А., Амелина С.С., Зинченко Р.А., Степанова А.А., **Гундорова П.**, Поляков А.В. Частота и отягощенность ФКУ у детского населения Ростовской области // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. DOI: 10.17513/spno.24946

7. Макаов А.Х., Зинченко Р.А., Хлебникова О.В., Михайлова Л.К., Петрова Н.В., **Гундорова П.**, Петрина Н.Е., Васильева Т.А., Марахонов А.В., Адян Т.А., Поляков А.В., Гинтер Е.К. Молекулярная эпидемиология наследственной патологии в десяти популяциях Карачаево-Черкесской Республики // Медицинская генетика. - 2016. - Т. 15. - № 8 (170). - с. 6-9.

#### Список публикаций в других изданиях, представление материалов диссертации на конференциях

1. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Зинченко Р.А., Поляков А.В. Особенности спектра мутаций при фенилкетонурии в Карачаево-Черкесии // Устный доклад и тезисы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков, Санкт–Петербург, 19-23 мая 2015 г. и 3-й Всероссийской конференции с международным участие «Генетика опухолей кроветворной

системы», Санкт-Петербург, 19-20 мая 2015 г. (Опубликовано: Медицинская генетика, 2015, т. 14, № 2(152), с. 48)

2. **Гундорова П.** Новые возможности молекулярной диагностики фенилкетонурии. Устный доклад на Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии диагностики наследственных болезней», Москва 2016

3. Макаов А.Х.-М., Ельчинова Г.И., Галкина В.А., Дадали Е.Л., Хлебникова О.В., Поляков А.В., **Гундорова П.**, Васильева Т.А., Петрова Н.В., Куцев С.И., Зинченко Р.А. Эпидемиология моногенных наследственных болезней в Малокарачаевском районе Карачаево-Черкесской Республики // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. – Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. Вып. 24. Новосибирск: Академиздат, 2016. - 262 с. (С.90-96).

4. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Поляков А.В. Молекулярно-генетическая диагностика больных фенилкетонурией из различных регионов РФ с целью их последующего лечения препаратами ВН4 // Конференции молодых ученых ФГБНУ «МГНЦ», устный доклад – г. Москва. – 2016 год. - Сборник тезисов устных докладов. - с.

5. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Поляков А.В. Молекулярно-генетическая диагностика больных фенилкетонурией с целью их последующего лечения препаратами ВН4 // Актуальные аспекты молекулярной генетики. Конференция, посвященная 25-летию лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», устный доклад – г. Суздаль. – 7-10 июля 2016 года. – Тезисы конференции. – с. 28-29.

6. **Гундорова П.**, Степанова А.А., Макаов А.Х., Зинченко Р.А., Поляков А.В. Популяционные частоты носительства мутаций в гене *PAH* в Карачаево-Черкесской Республике // Актуальные аспекты молекулярной генетики. Конференция, посвященная 25-летию лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ». – г. Суздаль. – 7-10 июля 2016 года. – Тезисы конференции. – с. 33-34.

7. **Gundorova P.**, Stepanova A.A., Zinchenko R.A., Polyakov A.V. Mutation spectrum of phenylketonuria in Karachay-Cherkessia // European Journal of Human Genetics. - V 23, Supplement 1. - p. 404 (J06.15). ESHG. - 2015 June 6 – 9. -Glasgow, Scotland, United Kingdom.

8. **Gundorova P.**, Stepanova A.A., Polyakov A.V. Molecular genetic study of PKU patients from Russia with a view to their subsequent treatment with ВН4 // The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics, oral presentation. - 2016 April 3-7. – Kyoto, Japan.

#### Список используемых сокращений

ГФА – гиперфенилаланинемия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КЧР – Карачаево-Черкесская Республика

МГК – медико-генетическая консультация

мГФА – мягкая гиперфенилаланинемия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФА – фенилаланин

ФАГ (РАН) – фенилаланингидроксилаза

ФГБНУ «МГНЦ» – Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Медико-Генетический Научный Центр»

ФКУ – фенилкетонурия

ВН4 – tetrahydrobiopterin (тетрагидробиоптерин)

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (мультиплексная лигазная проб-зависимая амплификация)

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)