МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Адил Мохамед Кадъм

КЛИНИЧНА И ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”

Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина”

Научна специалност: „Педиатрия”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

проф. д-р Радка Тинчева, дм проф. д-р Алексей Савов, дб

София, 2016 г.

Благодаря на всички, които ми помогнаха за реализацията на настоящата работа, която посвещавам на майка си.

Най-искрени благодарности отправям на:

- на научните си ръководители проф. Радка Тинчева и проф. Алексей Савов, за подкрепата и доверието. На проф. Р. Тинчева благодаря също за дадената възможност и проявеното търпение.

- на целия екип на Национална генетична лаборатория, за безусловната помощ, ценните съвети и приятелското отношение.

- на целия екип на Клинична генетика към СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ за подкрепата, което ми оказват от първия ден на съвместната ни работа

- на всички пациенти и техните родители за съдействието при реализирането на този научен труд;

- на семейството и приятелите за това, че ме обичат

Не на последно място, а накрая, за да подчертая значението на този човек за мен, искам да изкажа най-дълбока и искрена благодарност, с огромно уважение и безкрайна обич на доц. Даниела Авджиева, без чиято помощ никога нямаше да бъде завършена тази дисертация.

Съдържание

Увод 1
I. Литературен обзор 3
1. Обща характеристика на ФКУ и ХФА 3
1.1. Определение 3
1.2. Историческа справка 3
1.3. Епидемиология 6
1.4. Класификация и номенклатура 6
1.5. Патобиохимия на фенилкетонурията 10
1.5.1. Фенилаланинхидроксилазна система 10
1.5.2. Тетрахидробиоптерин 12
1.6. Клинична изява, патофизиология и усложнения 14
1.6.1. ФКУ, дължаща се на ФАХ-дефицит 14
1.6.1.1. Физикална находка на пациентите с ФКУ в неонаталния период 14
1.6.1.2. Неврокогнитивен дефицит при ФКУ 14
1.6.1.2.1 Нелекувани пациенти или пациенти с късно начало на терапията 14
1.6.1.2.2 Лекувани пациенти 15
1.6.2. ФКУ, дължаща се на ВН4-дефицити 18
1.7. Диагностика на хиперфенилаланинемиите 18
1.7.1. Тест на Guthrie 19
1.7.2. Флуоресцентни методи 19
1.7.3. Тандем мас спектрометричен метод (ТМС) 20
1.7.4. Основни проблеми, свързани със скрининга 20
1.7.4.1. Време на взимане на пробата 20
1.7.4.2. Определяне на крайни стойности (cut-off) 21
1.7.4.3. Коморбидни състояния 21
2. Определение и значение на тестовете с ВН4, приложение и ефект 22
2.1. Тест с ВН4-натоварване 22
2.2. ВН4-респондерни ХФА/ФКУ 22
2.3. Приложение на ВН4 24
3. Молекулярна генетика и патогенеза 28
3.1. Мутации и Менделово унаследяване 28

3.2. Патогенеза 29
3.3. Генотип-фенотипна корелация 30
3.3.1. Генотип и тежест на ХФА 30
3.3.2. Генотип-фенотип корелация въз основа на *FoldX* алгоритъм 32
3.3.3. Генотип и отговор към BH4 33
II. Цел и задачи 38
III. Материали и методи 39
1. Участници в проучването 39
2. Биологични проби 41
3. Определяне на фенилаланинов толеранс 41
4. Орален сапроптеринов тест 42
5. ДНК-анализ 43
6. Определяне на фенилаланиновите нива 43
6.1 Флуоресцентен нинхидринов метод 43
6.2 Масспектрометричен метод 44
7. Определяне на FoldX стойност 44
8. Графична обработка на резултатите 45
IV. Резултати 47
1. Подбор на пациенти 47
2. Орален сапроптеринов тест 47
2. Мутационен анализ 50
3. Фенотипен анализ 55
4. Корелация фенотип-генотип 56
5. FoldX стойности 56
V. Обсъждане 62
1. Обсъждане на резултатите от оралния сапроптеринов тест и комплексна оценка на респондерите. 63
2. Обсъждане на откритите мутации 70
3. Обсъждане на фенотипния анализ 79
4. Обсъждане на корелацията фенотип-генотип 79
4.1. Обсъждане на корелацията мутация-метаболитен фенотип 80
4.2. Обсъждане на корелацията мутация-респондерен фенотип 81

4.3. Обсъждане на корелацията генотип-фенотип 83
5. Обсъждане на FoldX стойностите и тяхната корелация 91
VI. Заключение 95
VII. Изводи 98
VIII. Приноси 100
IX. Приложения 101
X. Литературни източници 98

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. Класификационни схеми при ХФА..... 9

Таблица 2. Клинична класификация на ФКУ и ХФА..... 10

Таблица 3. Фенилаланин хидроксилаза и ензими, свързани със синтеза и метаболизма на тетрахидробиоптерин..... 12

Таблица 4. Тестове от проучвания за отговор към BH4..... 26

Таблица 5. Разпределение на тестовете по възрастова група и пол..... 37

Таблица 6. Нива на фенилаланин при орален сапроптеринов тест..... 45

Таблица 7. Корелация на FoldX стойностите на изследваните мутации..... 53

Таблица 8. Разпределение на пациентите по генотип и клинична изява..... 55

Таблица 9. Фенотипна и генотипна асоциация на респондерите..... 61

Таблица 10. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от ромски етнически произход..... 67

Таблица 11. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от турски етнически произход..... 69

Таблица 12. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от друг етнически произход..... 69

Таблица 13. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от български етнически произход..... 70

Таблица 14. Алелна честота на мутациите..... 71

Таблица 15. Мутация-метаболитен фенотип..... 77

Таблица 16. Мутация-респондерен фенотип..... 78

СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 Общ вид на РАН-системата..... 11

Фигура 2 Структура на ФАХ..... 11

Фигура 3 „Минорен“ път за метаболизиране на фенилаланина..... 12

Фигура 4. Основни механизми, свързани с нарушения в невро-психичното състояние на пациенти с ФКУ..... 17

Фигура 5. Процентно разпределение на видовете мутации..... 27

Фигура 6. Сравнение на генотипа на пациентите в двете основни бази данни..... 34

Фигура 7. Разпределение на пациентите по възраст..... 38

Фигура 8. Разпределение на пациентите по етнически групи..... 38

Фигура 9. Процентно намаление на изходните стойности при орален сапроптеринов тест 55

Фигура 10. Разпределение на мутациите по възрастови групи..... 49

Фигура 11. Процентно разпределение на мутациите по вид..... 48

Фигура 12. Процентно разпределение на мутациите според засегнатия домейн... 50

Фигура 13. Процентно съотношение на генотиповете..... 50

Фигура 14. Разпределение на генотиповете по възрастови групи..... 51

Фигура 15. Ниво на остатъчна ензимна активност..... 51

Фигура 16. Разпределение по фенотип..... 52

Фигура 17. Разпространение на най-честите мутации в Европа..... 73

Фигура 18. Клиничен алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване при хиперфенилаланинемия..... 93

СПИСЪК НА ПРИЛОЖЕНИЯТА

Приложение 1 : Информирано съгласие за провеждане на орален сапроптеринов тест..... 96

Приложение 2 : Диагностичен алгоритъм при провеждане на орален сапроптеринов тест..... 97

ФАХ – фенилаланин хидроксилаза / фенилаланин хидроксилазен

ФА фенилаланин

BH_4 – тетрахидробиоптерин

ФКУ – фенилкетонурия

ХФА – хиперфенилаланинемия

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

PKUDOS – Phenylketonuria Demographics, Outcome and Safety

УВОД

Фенилкетонурията (ФКУ, OMIM 261600) доскоро беше една от най-често доказваните причини за умствено изоставане. Благодарение на масовия неонатален скрининг и ранното диетолечение, умственото изоставане вече е рядко срещано сред пациентите с ФКУ. Като резултат от това, тя се превръща във водещ пример за „лечимо“ генетично заболяване. Този впечатляващ напредък все пак не разрешава изцяло проблема с осигуряването на дългосрочни резултати при ФКУ. Дълго време липсва единно мнение относно продължителността на диетата, все още пациентите в пубертетна възраст и голяма част от възрастните, не се съобразяват ефективно с нея, а повече от 2/3 от пациентките с ФКУ не я спазват стриктно преди забременяване.

Всичко това създава голям интерес към откриването на нови методи за лечение и контрол на фенилкетонурията, като: употребата на тетрахидробиоптерин (BH4; сапроптерин) при пациенти с хиперфенилаланинемия, дължаща се на специфични мутации, засягащи фенилаланинхидроксилазата (ФАХ); добавянето на дълговерижни неутрални аминокиселини различни от фенилаланина; проучвания върху ензима фенилаланин амонилиаза (PAL); разработване на генна терапия с вирусни и невирусни вектори.

Фенилкетонурията и другите хиперфенилаланинемии (ХФА) се дължат в 98% от случаите на мутация в гена кодиращ ФАХ (PAH, EC 1.1.4.16.1). Описани са повече от 957 мутации, засягащи този ген. Повечето ФКУ-пациенти имат две различни мутации (смесени хетерозиготи). Взаимодействието между два различни мутантни полипептида в тетрамерната ензимна молекула, увеличава сложността на заболяването. Големият брой възможни алелни комбинации прави предсказването на фенотипа много трудно [*Dipple and McCabe, 2000; Scriver and Kaufman, 2001; Kasnauskiene et al., 2003; Kim et al., 2006; Bercovich et al., 2008; Daniele et al., 2009*]. Анализите на *in vitro* експресията показват широки граници на остатъчната активност (от 0% до 75 %) [*Waters et al., 1998; Jennings et al., 2000; Waters, 2003*].

Доказано е, че ФАХ-генотиповете не обясняват изцяло фенотипните прояви и, че други фактори влияят върху хомеостазата на фенилаланина (ФА) [*Kayaalp et al., 1997; Mallolas et al., 1999; Scriver and Waters, 1999; Benit et al., 1999*]. Корелационните проучвания са трудни поради високата алелна хетерогенност и голямата фенотипна вариабилност. Въпреки това има разработени системи за преценка на корелацията генотип-фенотип, базирани върху оценката на влиянието на всяка една мутаци върху фенотипа [*Guldberg et al., 1998; Guttler et al., 1999*].

В нашето проучване си поставихме за цел да изследваме генотипа на пациенти с фенилкетонурия и хиперфенилаланинемия, които се проследяват регулярно в двата клинични центъра (Клинична генетика на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ за пациенти до 18г. и Клиника по ендокринология и метаболитни заболявания към УМБАЛ „Царица Йоанна“ – над 18г.), както и да определим техния отговор към приложението на сапроптерин и наличната корелация между генотипа и този отговор. За да постигнем поставената цел бяха приложени комбинации от различни лабораторни тестове, свързани с отделните етапи на изследването. Известно е, че съществуват множество алелни комбинации при пациентите с ФКУ и ХФА. В България също е налице една хетерогенна популация, както по отношение на генотипа, така и във фенотипно отношение. Откриват се индивиди с генотип, определян от множество автори, като „нереспондерен“, при които се установява положителен отговор на теста с орален сапроптерин.

Това е първото проучване в България, при което се прави подробна генетична и фенотипна характеристика, включваща отговор към тетрахиробиоптерин на голяма група пациенти с ФКУ и ХФА.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Обща характеристика на ФКУ и ХФА

1.1. Определение

Хиперфенилаланинемията (ХФА) е хронично, абнормно увеличение на нивата на фенилаланин в кръвта. ХФА обикновено се проявява като следствие на два типа вродени дефекти на обмяната: фенилкетонурия и ВН4-дефицити.

ФКУ е наследствено метаболитно заболяване, причинено от генетична мутация, водеща до дефицит на ензима фенилаланинхидроксилаза, необходим за метаболизирането на фенилаланина до тирозин. При липса на достатъчни количества от ензима или нарушената му функция, нивата на ФА се повишават в кръвта и мозъка, което води до мозъчно засягане, проявяващо се с умствено изоставане, гърчове, тремор и др. Въпреки че е рядко заболяване, ФКУ е една от най-честите метаболитни болести. Честотата в Европа е средно около 1 на 8 000 новородени, като тази честота варира в различните страни.

1.2. Историческа справка

Фенилкетонурията е първата разпозната причина за умствено изоставане и първото генетично нарушение, при което е доказано, че своеобразното лечение може да предотврати най-тежките му прояви. Историята на това заболяване включва постепенно разбиране на механизмите на ензимния дефицит и бавно пътуване към откриването на едно по-добро лечение. *Pearl S. Buck* в книгата за дъщеря си *„Детето, което никога не порасна“*описва съкрушителния ход на нелекуваната ФКУ *[Buck PS., 1992; Finger et al., 2004]*. Десетилетия след това е описана фенилкетонурията, а още 20 години са били нужни, за да се започне лечение.

Изясняването на биохимичните промени при заболяването настъпва в края на 20-те години на 20-ти век, когато един баща забелязал, че децата му, които са с

умствено изоставане, имат специфична миризма на урината и решава да ги заведе при *Asbjørn Følling* – лекар, изучаващ метаболитните заболявания *[Centerwall, 2000; Christ, 2003]*. Наличният тогава рутинен анализ на урината, включвал и тест с железен хлорид, добавен към подкиселена урина, за доказване наличието на кетони. Този тест довел до неописвана по-рано реакция на тразниторно тъмнозелено оцветяване. Последващите изследвания доказали наличието на високи нива фенилпируватна киселина, като това се превърнало в първото описание на биохимичните промени в основата на ФКУ *[Følling, 1934]*.

Названието *„фенилкетонурия“* се приписва на *Lionel Penrose*, който работи в областта на метаболитните заболявания във Великобритания в края на 30-те години на миналия век *[Centerwall, 2000]*, макар да има данни, че наименованието на състоянието е дадено от неговия сътрудник *Juda H. Quastel [Laxova et al., 1998]*. *Penrose* е посещавал институции за настаняване на лица с умствено изоставане и подбирал пациенти с характерна миризма на урината на „мухъл и мишина“, на които поставил диагнозата ФКУ. Ранните му опити в диетолечението на ФКУ, основани на захари, плодове и витамини, довели до малнутриция и били бързо изоставени. Въпреки това, чрез внимателното изучаване на популацията от институционализирани пациенти, той успява да дефинира автозомно рецесивния начин на унаследяване на ФКУ. През 1937, *Dr George Jervis*, един от пионерите в проучването на ФКУ в САЩ, открива дефект във функцията на ензима фенилаланинхидроксилаза, като причина за хиперфенилаланинемията, характерна за ФКУ *[Jervis GA, 1953]*.

Първата успешна диета за лечение на ФКУ е приложена през 50-те години, при момиче на 17г. от *Dr Horst Bickel*. Момичето е било с прояви, които днес считаме за класически симптоми на нелекувана фенилкетонурия: умствено изоставане, без речево развитие и незаинтересованост към обкръжението, абнормна походка, повишен мускулен тонус, хиперрефлексия, екзема и аберантно поведение (непрекъснато стенене и удряне на главата). Основавайки се на работата на *Følling* и другите преди тях, *Bickel* и *Louis Woolf* приготвят първия белтък за заместване без фенилаланин, като елиминират останалите протеини от диетата на пациентката *[Bickel et al., 1953]*. Детето показва значително подобряване в поведението,

настроението и моторното развитие, научава се да пълзи и се изправя, само за 2 седмици. Без знанието на майката, *Bickel* добавя ФА към следващата партида от протеиновата формула и детето регресира до началното си състояние в рамките на 2 дни. Това дава ключа към лечението, а именно рестрикцията на ФА. Така лишените от ФА специализирани белтъчни формули се превръщат в стандарт за лечението на ФКУ, като по-ранното приложение, води до по-добри резултати.

Разработването на първия рутинен скринингов тест за ФКУ, базиран на измерването на концентрацията на ФА в капки кръв е дело на *Dr Robert Guthrie* в края на 50-те години. Този тест прави възможен скрининга за ХФА сред новородените през 60-те и 70-те, като по този начин дава шанс рестрикционната диета да се започне навреме, за да бъдат избегнати по-тежките последствия на заболяването. Работата на множество научни екипи през 80-те и 90-те години на 20-ти век, води до локализиране на гена за човешката ФАХ на 12-та хромозома *[Lidsky et al., 1984]*. Допълнителните проучвания, през следващите две десетилетия, идентифицират повече от 500 мутации в този ген *[Scriver et al., 2000]*.

Днес, неонаталният скрининг и прилагането на ФА-рестриктивна диета са приети като ефективни и финансово приемливи, за да бъдат прилагани почти в целия свят *[Thomason et al., 1998]*. Биохимичните и молекулярните механизми на заболяването са все по-ясни, както и ограниченията на прилаганото лечение. Цяло поколение от деца с ФКУ са спрели рестриктивната диета в пубертетната възраст, тъй като клиницистите са считали, че развитието на мозъка приключва около 5-6-годишна възраст и следователно не може да бъде увреден от излагането на високи нива на ФА. Все пак първоначалните доклади от Полша и подобните от други европейски страни и Северна Америка, доказват намаляването на IQ, появата на фин моторен дефицит, когнитивни увреждания, емоционални нарушения и дефицит на вниманието, при пациенти прекъснали диетата. Още повече, че жени с ФКУ рискували във висока степен да родят деца с вродени сърдечни малформации, микроцефалия, ниско тегло и интелектуален дефицит, дължащи се на токсичното интраутеринно въздействие на високите нива ФА в кръвта на майката. Едва през 2000г. *The National Institutes of Health* свиква Консенсусна конференция за ФКУ и поставя началото на нова ера за ФКУ, както и въвежда препоръката за диета през целия живот *[NIHCDP, 2001]*.

1.3. Епидемиология

Днес, почти всички случаи на ФКУ се откриват чрез националните програми за неонатален скрининг. ФКУ е по-честа сред индивиди от кавказката или източноазиатската популации, където са засегнати около 1:10 000 – 15 0000 новородени *[NIHCDP, 2001; Williams et al., 2008; Loeber JG, 2007]*. Въпреки това случаите на ФКУ не са разпределени равномерно: например постоянна ХФА се открива при 1 от 4 000 новородени в Турция и Северна Ирландия *[Ozalp et al., 2001; Zschocke et al., 1997]*. Честотата в Латинска Америка варира от 1:25 000 до 1:50 000 новородени с по-ниска честота в северните части *[Borrajo GJ, 2007]*. Честотата, съобщена от автори в Азия е от 1:11 500 до 1:100 000 в някои региони на Китай *[Zhan et al., 2009; Jiang et al., 2003]*, по-малко от 1:200 000 в Тайланд *[Pangkanon et al., 2009; Charoensiriwatana et al., 2003]* и около 1:70 000 в Япония *[Aoki K., 2003]*. Испания се различава от останалите европейски страни по това, че има сравнително висока честота на случаи с леко повишени нива на ФА, дължащи се на частична инактивация на РАН *[Desviat et al., 1999]*. Честотата за популациите в Африка и Южна Азия са по-ниски от тези за кавказката популация. В България честотата на класическата ФКУ е около 1:21 000, като е налице сравнително висока честота на леките ХФА и съотношение ФКУ/ХФА = 1:2 *[L Kalaydjieva et al., 1990]*.

1.4. Класификация и номенклатура

Класифицирането на ФКУ и ХФА е един доста сложен въпрос. ФКУ, при която са нужни незабавни терапевтични действия за избягване на неврологично засягане, обикновено се приема при стойности на ФА над 360 μmol/l (1 mg/dL = 60 μmol/l). По-рано класификацията се е базирала на максималните нива на ФА, преди въвеждане на терапията. Пациенти с нива на ФА 120 – 600 μmol/l (2-10 mg/dL) се класифицират, като лека (не-ФКУ) ХФА; нива от 600 до 1200 μmol/l (10-20 mg/dL) се считат за „лека“ ФКУ; нива над 1200 μmol/l (20 mg/dL) са в рамките на „класическа“ ФКУ. Все

пак това е в сила само, ако фенилаланинът достигне целия си биологичен потенциал за по-дълъг период без лечение. Класификацията не е изцяло приложима в днешни дни, тъй като се използват нивата от неонаталния скрининг, които по правило не достигат максимума. Поради това се счита за по-уместно, като основа на класификацията да се приемат нивата на диетичен толеранс, т.е. количеството ФА, което пациентът може да приеме за едно денонощие, като запази нивата на фенилаланин в кръвта си в рамките на референтните за възрастта. На табл. 1 са представени различните класификационни схеми на свързаните с ФА нарушения, като таблицата не е нито изчерпателна, нито пълна по отношение на всички представени в литературата предложения, но показва вариантите, които могат да бъдат интегрирани в клиничната практика. Използването на тази таблица, за да се диагностицира специфичен подтип на ФКУ, базирайки се на единична стойност, получена от неонаталния скрининг, е доста ограничено, тъй като тази стойност не може да покаже пика на ФА при липса на лечение. Класифицирането на новодиагностициран пациент отнема време и определено се нуждае от определянето на ФА-толеранс. Следователно за класификацията са необходими клинични и лабораторни данни, което в никакъв случай не се изчерпва с еднократно изследване на ФА. ФА-толеранс може да бъде определен чрез различни алгоритми, като границите му при лечение със сапроптерин не могат да бъдат приложени към представените класификации. Винаги трябва да се има предвид, че съществуват и транзиторни форми на ХФА (новородени с ниско тегло, чернодробно засягане, недоносени, деца на майки с ФКУ, новородени на парентерално хранене и др.). Не бива да се пропуска, че ВН4-дефицитът, дължащ се дефект в ГТП-циклохидролазата (GTPCH), при неонаталния скрининг, може да се представи с нормални нива на ФА. Интересна е т.нар. лека ХФА „сива зона“, за която няма постигнат консенсус дали да се лекува или не. Според последните проучвания всички състояния с ниво на ФА над 10 mg/dL следва да бъдат лекувани, поради което в табл.1 тази категория е включена сред формите, за които се изисква лечение.

	ФА-свързани разстройства	Класификационни схеми						
		Нива на ФА преди лечението	ФА и съотношение Phe:Tyr в периода на новороденото	ФА-толеранс			РАН-фенотип	Вероятност за отговор към BH4
				Кърмачета < 1г. (mg/kg/d)	Деца 2-5г. за поддържане на ФА 300 µmol/l	Възраст > 5г. и нива на ФА 120-360 µmol/l		
РАН-дефицити, изискващи лечение	Тетрахидро биоптерин ови дефицити	Нормални или повишени	2 – 35 mg/dL (120-2120 µmol/l) Понякога и нормални	Променливи	Променливи	Променливи	Няма дефиниран	Много висока
	Класическа ФКУ	> 1200 µmol/l (> 20 mg/dL)	≥ 7 mg/dL (≥ 420 µmol/l) Phe:Tyr > 5	25-45 mg/kg (130-330 mg/d)			2 класически мутации (често с нулева активност)	Ниска
	Умерена ФКУ	900-1200 µmol/l (15-20 mg/dL)	Данните са ограничени	45-50 mg/kg			Класическа + умерена или две умерени мутации	Ниска

		Лека ФКУ	600-900 µmol/l (10-15 mg/dL)	Данните са ограничени	55 mg/kg			Класическа, умерена или лека + лека мутация за ХФА	Средо изразена
		Лека ХФА „сива зона“	360-600 µmol/l (6-10 mg/dL)	Данните са ограничени	70 mg/kg			Класическа, умерена или лека + лека мутация за ХФА	Висока
РАН-дефицити, не изискващи лечение		Лека ХФА	120-360 µmol/l (2-6 mg/dL)	Phe 151-360 µmol/l (средно 244) Phe:Tyr 0.8-8.25 (средно 3.3)	Нерестриктивна диета	Нерестриктивна диета	Нерестриктивна диета	Мутация, свързана с класическа, умерена или лека + мутация, свързана с лека ХФА	Няма дефинирана

Таблица 1. Класификационни схеми при ХФА.

[Blau et al., 2011; Guldber et al., 1998; Guttler et al., 1996; Scriver et al., 1985; Marsden et al., 2006; Chace et al., 1998; McHugh et al., 2011; Marquardt et al., 2012; Acosta et al., 1997]

В нашата практика се използва следната класификация (табл.2), основана на *[Guldberg et al., 1998]:*

Таблица 2. Клинична класификация на ФКУ и ХФА

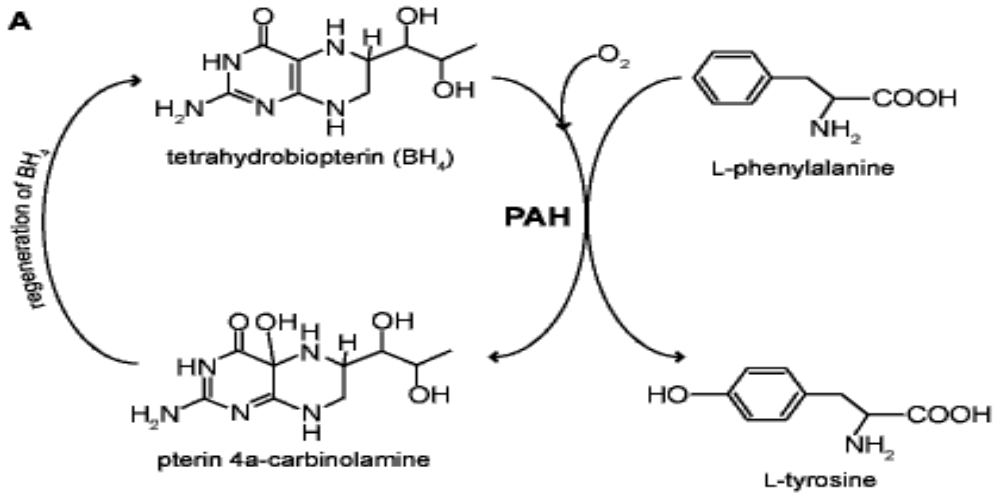
Форма	**ФА толеранс, mg дневно**	**Нива на ФА в кръвта, mg/dl**
Класическа ФКУ	< 250-350	-
Умерена ФКУ	350-400	-
Лека ФКУ	400-600	-
Лека ХФА	Без рестрикция	< 10

1.5. Патобиохимия на фенилкетонурията

1.5.1. Фенилаланинхидроксилазна система

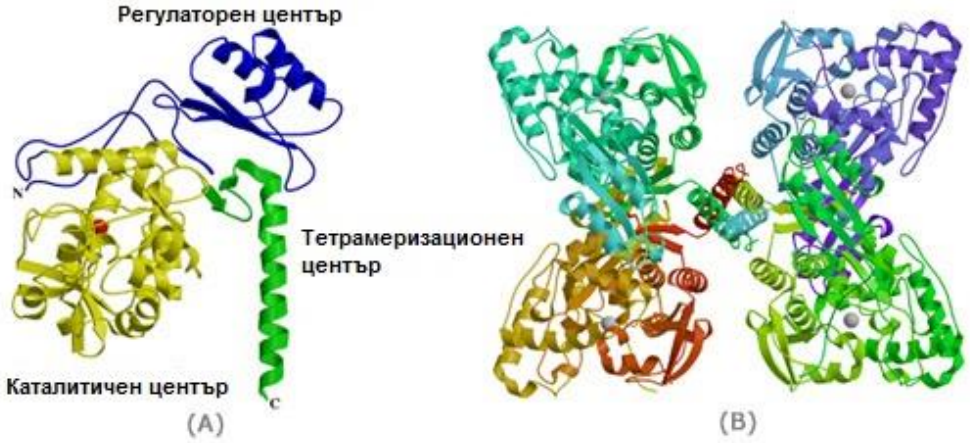
Напълно функциониращата ФАХ-система се състои от ФАХ-ензима, кофактор – тетрахидробиоптерин (BH4), два регенериращи ензима – птерин-4α-карбиноламин дехидратаза (PCD) и дихидроптеридин редуктаза (DHPR). От основно значение за хидроксилирането на фенилаланина до тирозин са молекулният кислород и желязото.

Фенилаланин хидроксилазата катализира превръщането на ФА в тирозин (фиг.1) и представлява скоростоопределящ етап в единствения клинично значим биохимичен път за катаболизма на ФА. Счита се, че този път е отговорен за утилизацията на около ¾ от ФА, абсорбиран от храната. ФАХ-системата е биологично важна не само като катаболитен път за елиминиране на излишъка от ФА, но и като път за *de novo* синтез на тирозин, който поради тази причина не е незаменима аминокиселина при здрави индивиди.



Фигура. 1 Общ вид на ФАХ-системата. *[Bassan et al. 2003]*

Структурата на ФАХ (фиг.2) е подобна на други хидроксилази на ароматните аминокиселини, като тирозин хидроксилаза и триптофан хидроксилази 1 и 2. Размерът на всяка субединица на ФАХ е около 50 kDa и активният ензим съществува, като димер или основно, като тетрамер от тези субединици, като тези форми са в равновесие, в зависимост от pH на цитозола. Всяка субединица на ФАХ съдържа N-край – регулаторна област (остатъци 1-142), каталитична област (остатъци 143-410) и С-край (остатъци 410-452), който медиира свързването на субединиците в тетрамер. Мутантни протеини следствие на делеция, засягаща С-края формират каталитично активни димери, но не и тетрамери *[Knappskog et al., 1996]*.

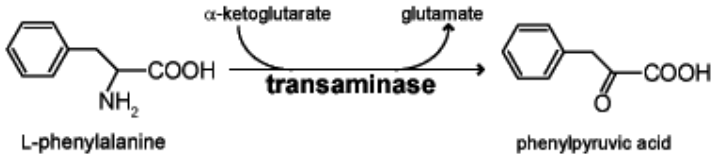


Фигура. 2 Структура на ФАХ. *[Kobe et al, 1999]*.

Активният център на ФАХ съдържа железен атом, свързан с три заредени аминокиселинни остатъка (два хистидинови и един глутаматен). Основната част на ФАХ-активността се установява в черния дроб.

Активността на ФАХ изисква свързването на всички три субстрата на ензима – ФА, молекулен кислород и кофактор ВН4, преди да протече, каквато и да е реакция. ФА е основен регулатор на ФАХ-активност чрез един сравнително сложен механизъм *[Pey et al., 2005; Kaufman S., 1993]*.

Съществува и т.нар. „минорен“ или второстепенен път на утилизация на фенилаланина (фиг.3), при който се получава фенилпируватна киселина и, който при нормални условия, поема не повече от ¼ от количеството фенилаланин.



Фигура. 3 „Минорен“ път за метаболизиране на фенилаланина. *[Bassan et al. 2003]*

1.5.2. Тетрахидробиоптерин

Класическият път на *de novo* биосинтез на ВН4 от гуанозин трифосфат (GTP) изисква три ензима: ГТФ-циклохидролаза I (GTPCH), 6-пирувиол-тетрахидробиоптерин синтетаза (PTPS) и сепиаптерин редуктаза (SR). Клинично значимите ензими за синтез на ВН4 и ФАХ са представени на табл. 3.

Таблица 3. Фенилаланин хидроксилаза и ензими, свързани със синтеза и метаболизма на тетрахидробиоптерин.

OMIM	Ензим, съкращение, EC no.	Ген
261600	Фенилаланин хидроксилаза, PAH (1.14.16.1)	PAH
233910	ГТФ циклохидролаза I[a], GTPCH (3.5.4.16)	GCH1

600225	ГТФ циклохидролаза I[б], GTPCH (3.5.4.16)	
261640	6-пирувиол-тетрахидробиоптерин синтетаза, PTPS (4.6.1.10)	PTS
182125	Сепиаптерин редуктаза, SR (1.1.1.153)	SPR
264070	Птерин-4-алфа-карбиноламин дехидратаза I, PCD (4.2.1.96)	PCBD
261630	Дихидроптеридин редуктаза, DHPR (1.6.99.7)	QDPR

а. автозомно рецесивен вариант

б. свързан с автозомно доминантна DOPA-резистентна дистония

[Източник OMIM database]

Известни са над 110 мутации на GCH1-гена, които се свързват с автозомно-доминантни форми на дефицит на моноамини или невротрансмитери без ХФА (Dopa-респондерна дистония, болест на Segawa). Само няколко форми се свързват с автозомно-рецесивни форми на GTPCH-дефицит.

Мутациите в PTS (над 50 мутантни алела), PCBD (около 9 алела) и в QDPR (35 мутации) се асоциират с автзомно-рецесивна ХФА, обикновено с дефицит на допамин и 5-хидрокситриптамин (серотонин).

Около 12 мутантни алела в SPR-гена се свързват с автозомно-рецесивни варианти на BH4 дефицит без ХФА.

Свързването на BH4 с ФАХ може да увеличи стабилността на протеина и да предотврати разпадането му, този феномен е известен, като „шаперонен ефект“. Този ефект е описан при някои мутантни форми на ФАХ, при които фармакологични дози на екзогенен BH4 повишава ензимната активност. Счита се, че това е в основата на положителния отговор при т.нар. „респондерни мутации“.

1.6. Клинична изява, патофизиология и усложнения

1.6.1. ФКУ, дължаща се на ФАХ-дефицит

1.6.1.1. Физикална находка на пациентите с ФКУ в неонаталния период

При децата с ФКУ в неонаталния период липсват физикални находки, освен особената „миша“ миризма на урината и потта. Описани са случаи на по-слаб тегловен прираст при деца с ФКУ, но се счита, че това основно се дължи на редуцирания белтъчен прием и е сравнително рядко *[Feillet et al., 2010; Hoeksma et al., 2005; Huemer et al., 2007]*.

1.6.1.2. Неврокогнитивен дефицит при ФКУ

1.6.1.2.1 Нелекувани пациенти или пациенти с късно начало на терапията

Децата с класическа ФКУ, нелекувани с ФА-рестриктивна диета развиват тежък интелетуален дефицит, гърчове, атаксия, моторен дефицит и поведенчески нарушения, а в много случаи имат и аутистични прояви. Най-често първите леки прояви на заболяването се наблюдават във възрастта между 2 и 4 месеца, а пълно разгръщане на клиниката, след шестия месец. След 6-месечна възраст обикновено тези пациенти показват изоставане в развитието, което може да бъде свързано с аберантно поведение, като раздразнителност, плачливост и неспокойствие, а в по-голяма възраст, включващо самонараняване, агресивност, импулсивност и психози *[Penrose LS., 1972]*. Поради наличието на предимно повишен мускулен тонус, разширени рефлексогенни зони и оживени рефлекси, често е поставяна погрешно диагноза детска церебрална парализа (ДЦП). Малките деца с по-късно поставена диагноза, показват забележимо и бързо подобрение след започване на диетата. Те могат да започнат да ходят и говорят, както и да покажат положителна еволюция по отношение на интелектуалните функции и поведението. Въпреки това, повечето остават с определена степен на интелектуален дефицит и почти всички имат когнитивни нарушения, независимо от покачването на IQ. Степента на засягане

зависи от възрастта, на която е започнало лечението. Подобрението на когнитивните функции след ФА-рестрикция, при възрастни с нелекувана ФКУ е съпроводено от намаление на агресията, психозите и самонараняването. Споменатите прояви са рефрактерни на медикаментозни и поведенчески терапии, но намаляват след дългосрочен диетичен контрол на нивата на ФА *[Yannicelli et al., 1995; Baumeister et al., 1998; Adams DJ., 2009]*.

1.6.1.2.2 Лекувани пациенти

Стриктната терапия на ФКУ не винаги може да предпази пациентите от невропсихологическа дисфункция, още повече, че индивиди от едно семейство понякога има различен ход на заболяването. Причината за тези, на пръв поглед, парадоксални наблюдения остава неизвестна, но е ясно, че определена степен на неврокогнитивен дефицит настъпва при повечето пациенти с ФКУ, независимо от доживотната диетотерапия *[van Spronsen et al., 2008]*. При различните проучвания се установява, че IQ на децата с ФКУ е в рамките на средните норми, но е около 7-10 пункта по-ниско от това на сиблингите и връстниците им *[Gassió et al., 2005; Koch et al., 1984]*.

Мета-анализ на 40 проучвания в областта на ФКУ показва, че средните нива на ФА корелират значително с IQ. Повишението на ФА с около 100 μmol/l се свързва с редукция на IQ с 2-4 пункта, за пациенти с ранно начало на терапията и с граници на ФА от 394 до 750 μmol/l *[Waisbren et al., 2007]*. Подобни мета-анализи доказват значителното намаление на скоростта за преработка на информация на мозъка, при високи ФА нива *[Albrecht et al., 2009]*.

Патологичните изменения при ФКУ са почти изцяло свързани с мозъка. Етиологията на когнитивните проблеми, възникващи при ХФА е все още неясна, като се разглеждат няколко механизма, имащи роля на различни нива (фиг. 4).

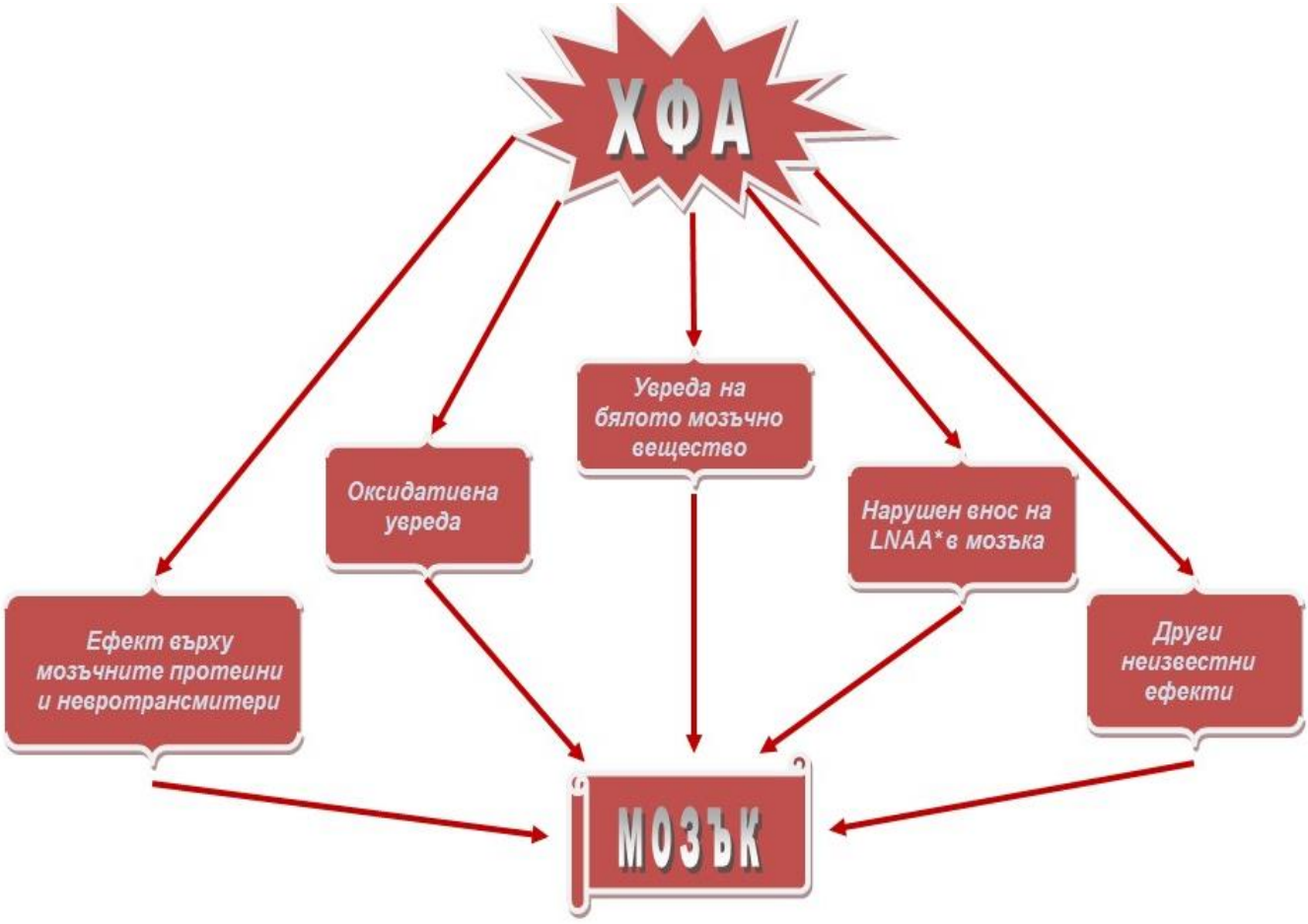
Фенилаланинът се конкурира с останалите дълговерижни неутрални аминокиселини (ДНА), тъй като се пренасят от един и същ транспортерен белтък, отговорен за навлизането им в ЦНС. Поради това хиперфенилаланинемията

едновременно води до увеличаване на ФА-нива в мозъка и намаляване на мозъчните нива на други аминокиселини, които са есенциални за белтъчния синтез и невротрансмитерната продукция *[Gentile et al., 2010; van Spronsen et al., 2009]*. Съответно, понижените нива на ДНА, различни от фенилаланина може да се счита за самостоятелен фактор в патофизиологията на неврологичните нарушение при ФКУ. Приложението на ДНА може да бъде полезно при контролиране нивата на ФА и се свързва с тенденция за подобряване на невропсихологичните индекси, особено при пациентите с недобър контрол на ФА *[Schindeler et al., 2007; van Spronsen et al., 2009]*. Интересен е фактът, че в две 4-седмични контролирани клинични изпитания е доказано, че приемът на тирозинови добавки не подобрява функционирането на ЦНС *[van Spronsen et al., 2009, van Spronsen et al., 2001]*.

Друг механизъм, свързван с патологията на ЦНС е промяната в миелиновия метаболизъм, водещо до характерните за ФКУ абнормни прояви в бялото мозъчно вещество. Известно е, че миелинът създава изолаторна обвивка около нервните влакна, която се полага от клетките на Шван (гръбначен мозък) или астроглията (мозък). Миелинизацията е динамичен процес, който продължава през по-голямата част от живота и повлиява редица мозъчни функции, както и психичното състояние *[Fields RD., 2008]*. Високата концентрация на фенилаланин и/или редуцираната наличност на други дълговерижни неутрални аминокиселини, могат да инхибират миелинизацията, като водят до намалено или липсващо формиране на миелин при нелекувани пациенти, както и да доведат до оточност на миелина при ранно третирани пациенти с ФКУ *[Surtees et al., 2000; van Spronsen et al., 2009; Anderson et al., 2010]*. Тези лезии могат да бъдат обратими в рамките на няколко месеца след установяването на добър контрол на фенилаланина *[Anderson et al., 2010]*.

Установените, при магнитно-резонансно изобразяване, увреждания на бялото мозъчно вещество корелират с когнитивните нарушения при някои пациенти с ФКУ. Въпреки това, подобни структурни промени обикновено не корелират с функционалния невропсихологичен статус, така че нарушенията на миелина не могат да се считат за основен патофизиологичен дефект, който да обясни промените при ФКУ *[Anderson et al., 2010; Jones et al., 1995; Thompson et al., 1993]*.

В ЦНС на някои пациенти с ФКУ се откриват, освен високите нива на фенилаланин, понижени стойности на други аминокиселини, включително тирозин и метионин *[Surtees et al., 2000]*. Ниските нива на тирозин водят до намаление на допамина, изследван в цереброспинална течност на пациенти с ФКУ. Вариацията в неврокогнитивните и моторни дефицити, наблюдавани при деца с ФКУ, изглежда свързана с функционални нарушения, локализирани предимно във фронталните лобове, където са концентрирани множество допаминергични връзки *[Anderson et al., 2010]*.



Фигура 4. Основни механизми, свързани с нарушения в невро-психичното състояние на пациенти с ФКУ. *[Surtees et al., 2000]*

*LNAA – дълговерижни неутрални аминокиселини

Високите мозъчни нива на ФА могат да доведат до нарушение на глутаматергичната синаптична трансмисия, както и различно по степен инхибиране на някои ключови ензими, като пируват киназа, тирозин хидроксилаза, триптофан хидроксилаза и ХМГ-КоА-редуктаза *[van Spronsen et al., 2009]*. Промените в серотониновата концентрация обуславят голяма част от поведенческите аномалии при ФКУ. При пациентите с ФКУ се установяват и радикали, водещи до увреждане на тъканите. За съжаление до момента няма ясни данни за това, каква е точната последователност и клинична значимост на всички тези механизми взети заедно.

1.6.2. ФКУ, дължаща се на BH4-дефицити

BH4-дефицитите се проявяват със сравнително тежък фенотип, като засягат, както чернодробния ФАХ-метаболизъм, така и биосинтеза на ЦНС-невротрансмитери. Клиничните прояви са типични за дефицит на катехоламините и серотонина. При дефицит на допамин в повечето случаи се установяват паркинсонизъм, сънливост, дистония, ротаторни очни движения, хиперсаливация и затруднено гълтане, докато при серотонинов недостиг се откриват предимно депресия, нарушена термогенеза, безсъние. За разлика от предходните, ниските нива на норадреналин са свързани с малкомозъчна симптоматика, аксиална хипотония и птоза на клепачите. Съществуват сигурни данни, че при тези пациенти е налице нарушение на синтеза на азотен оксид *[Zorzi et al., 2002]*. Те се нуждаят от заместителна терапия с невротрансмитери и BH4.

Много малко пациенти с BH4-дефицит са описани с лек периферен фенотип. Тези пациенти са с ХФА, но с нормален метаболизъм на мозъчните невротрансмитери и имат нужда единствено от монотерапия с BH4. Само най-тежките форми на BH4-дефицит се презентират с неврологична симптоматика при раждането.

1.7. Диагностика на хиперфенилаланинемиите

Откриването на биохимичните, а впоследствие и на молекулярно-генетичните причини за ФКУ, както и установяването на безспорния ефект от ФА-рестриктивната диета, води до необходимостта от ранно поставяне на диагнозата и осигуряване на максимално добър краен ефект за пациентите. Бързият прогрес на заболяването и бързото повлияване от диетата в ранна детска възраст, поставя за цел диагностицирането на заболяването да става в периода на новороденото.

1.7.1. Тест на Guthrie

Основата за развитието на неонаталните скринингови програми е поставена преди повече от 50 години от *Robert Guthrie* и неговия тест за бактериално инхибиране. Той започва разработването на теста през 1960г. и публикува детайлна методология през 1963г. Тестът се основава на капилярна кръв (от петата на детето) взета върху филтърна бланка и оставена да съхне при стайна температура. Дискове от напоената с кръв бланка се поставят върху агар, на който е култивиран *Bacillus subtilis* - микроорганизъм, нуждаещ се от фенилаланин за своя растеж. Гелът съдържа и β-2-тиенилаланин, който потиска растежа чрез инхибиране употребата на фенилаланин. Увеличаването на концентрацията на ФА чрез кръвната проба (ако тя е от дете с хиперфенилаланинемия) преодолява инхибиторния ефект и в рамките на един ден около позитивната проба се формира кръг, отговарящ на бактериалния растеж. Диаметърът на получената бактериална колония позволява да се прецени концентрацията на ФА в пробата. Този метод вече има само историческа стойност.

1.7.2. Флуоресцентни методи

Най-чувствителен от тази група методи е нинхидриновият флуоресцентен метод, модификация на *McCaman and Robins, 1962.* Това е и основният метод използван за неонатален скрининг в България, както и при определяне на фенилаланиновите концентрации на пациентите, разгледани в настоящата дисертация.

1.7.3. Тандем мас спектрометричен метод (ТМС)

Тандем мас спектрометрията е разработена като надежден количествен метод за определяне концентрациите на аминокиселини в малки обеми кръв или плазма. Методът предоставя по-нисък процент на фалшиво положителни проби в сравнение с флуориметричния, където те достигат почти до 1%. Освен това позволява едновременното измерване на нивата на ФА и тирозин, както и определянето на съотношението между тях. В допълнение, методът позволява една проба да бъде изследвана едновременно за голям брой вродени метаболитни заболявания.

Всички описани методи се използват успешно в скрининговите програми, но е нужно да се подчертае, че методите базирани на изследване на плазмата, дават резултати с около 15% по-високи от тези базирани на суха капка кръв *[Gregory et al., 2007]*.

1.7.4. Основни проблеми, свързани със скрининга

1.7.4.1. Време на взимане на пробата

Всички новородени следва да бъдат изследвани за ФКУ в първите дни от живота им, с цел осигуряване на навременно диетолечение и предпазването им от неврологични увреждания. Съществуват различни национални препоръки за времето на взимане на пробите, включително и такива, които препоръчват взимане до или на седмия ден от раждането *[NIH, 2000]*. Държавите, в които скринингът се осигурява от родилните отделения, пробите обикновено се взимат между 3 и 5 дни след раждането, като за по-широка времева граница се приема 2 – 7 дни. В България препоръките са за

взимане между втория и петия ден, като най-често пробите се осигуряват в първите 24-48 часа.

1.7.4.2. Определяне на крайни стойности (cut-off)

Най-често използваната крайна стойност при неонатален скрининг е 4 mg/dl *[Dhondt JL., 2006]*, като при по-чувствителните методи, като ТМС се препоръчва по-ниска стойност. В последните 5 години се отчита тенденция за намаляване на крайните стойности, свързано със снижаването на границите за мониториране. Основен проблем е, че ранното скриниране, свързано с желанието за по-бързо изписване от родилното отделение, често води до получаването на фалшиво негативни резултати, поради невъзможността на полученият с храната ФА да се натрупа до диагностични (или токсични) нива. В текущите препоръки е прието, че при здраво, доносено новородено пробата може да се вземе и след 12-ия час, особено при методите определящи съотношението фенилаланин/тирозин (определянето на това съотношение повишава чувствителността на метода в сравнение с изследването само на ФА) *[Dhondt JL., 2006]*.

1.7.4.3. Коморбидни състояния

При някои деца, особени преждевременно родените, може да се прояви известна незрялост на ензимните системи, свързани с аминокиселинния метаболизъм, като това води до транзиторно повишаване на ФА до нива, достатъчни да позитивират скрининговия тест *[Zaffanello et al., 2003; Zaffanello et al., 2005]*. Поради това резултатите трябва да бъдат внимателно интерпретирани, особено при деца с интеркурентно заболяване, прием на антибиотици, трансфузия на биопродукти и др.

2. Определение и значение на тестовете с BH4, приложение и ефект

2.1. Тест с BH4-натоварване

Първоначално BH4-тестът е използван за разграничаване между пациентите с ФКУ и BH4-дефицит. В началото се е провеждал с орален прием на BH4 в доза 7.5 mg/kg. По-късно дозата е увеличена до 20 mg/kg, след описани случаи на пациенти с DHPR-дефицит, които отговарят на по-високи, но не и на ниски дози BH4. Натоварващият тест е допълнителен метод за ранно откриване на BH4-дефицитите, тъй като ФА и тирозин могат да се изследват в повечето метаболитни лаборатории, докато измерването на птерини се извършва само в няколко високоспециализирани центъра. В допълнение на това, този тест открива и ФКУ-пациенти, отговарящи на приложението на BH4.

2.2. BH4-респондерни ХФА/ФКУ

Феноменът на BH4-чувствителна ФКУ е описан за първи път при японски пациенти *[Kure et al., 1999]* и е потвърден в ретроспективно проучване на 1730 пациенти с ФАХ-дефицит *[Bernegger et al., 2002]*. Процентът на пациенти, отговарящи на приема на BH4 намалява с увеличаване тежестта на ХФА. Подобни наблюдения са установени и при други продължителни проучвания *[Fiege et al., 2007]*. Ясна е нуждата от стандартизиран тест с BH4-натоварване, както и детайлни ръководства за лечение и приложение, с които да се оптимизира идентифицирането на пациенти, които биха имали най-голяма полза от това приложение. Предложени са няколко теста *[Blau N., 2008]*, използващи различни дози BH4 (обикновено 10 mg/kg или 20 mg/kg), повтаряне на дозата на BH4, както и едновременно приложение на BH4 и ФА. Определението за клинично значим отговор на лечение с BH4 е намаляване на нивата на ФА с най-малко 30% и се използва почти при всички разновидности на теста (само с едно изключение).

Ключовите резултати на някои от споменатите проучвания са показани на табл. 4 *[Bernegger et al., 2002; Leuzzi et al., 2006; Mitchell et al., 2005; Muntau et al.,*

2002; Burton et al., 2007; Fiege et al., 2007; Langenbeck U., 2008]. Въпреки хетерогенността на методологията на тестване, относително постоянна част от пациентите с ФКУ, отговарят на лечение с BH4. По-висока степен на отговор се наблюдава при по-леките варианти на ХФА и ФКУ. Само при едно от сравнените проучвания е използвана търговската форма на BH4, сапроптерин дихидрохлорид (Kuvan®).

Добре известно е, че не всички пациенти с ФКУ отговарят на лечение със сапроптерин и, че този отговор е по-висок при пациенти с хиперфенилаланинемия и леки форми на ФКУ, за разлика от тези с класически фенотип *[Muntau et al., 2002]*. Установено е, че отговор към BH4 е налице при 71% от популацията с непрекъснат продължителен прием, включена в *PKUDOS*, в 27% при тези с краткотраен прием или около 57% за цялата изследвана популация. Поради това, че от лечението се очаква да се намалят нивата на ФА, данните в *PKUDOS* може би подценяват броя пациенти с класическа ФКУ, тъй като според литературните данни, честотата на отговор сред пациентите с класическа ФКУ е едва 7-13% *[Leuzzi et al., 2006; Mitchell et al., 2005; Hennermann et al., 2005]*. *PKUDOS* (Phenylketonuria Demographics, Outcome and Safety) е регистър, създаден да осигурява лонгитудинално данни за безопасността и ефективността при пациенти с ФКУ, които приемат или са приемали BH4 под формата на сапроптерин дихидрохорид. Общата популация, включена в регистъра е от 1189 пациента с ФКУ, от които 504 са приемали непрекъснато сапроптерин (от датата на регистриране); 211 – с интермитентен прием и 474 с друга продължителност на приема. Данните от регистъра показват, че 43% от пациентите с продължителна употреба на сапроптерин са с класическа форма на ФКУ (определено по това, че имат пикови стойности на ФА над 1200 μmol/l = 20 mg/dl). Това е неочаквано голям процент, който въпреки всичко може да е по-нисък от реалния поради следните основни причини: 1) не всички пикови стойности на ФА са включени в регистъра; 2) ранната диагностика и лечение, след въвеждане на неонаталния скрининг, водят до понижаване на пиковите концентрации на ФА. Трябва да се има предвид, че клиницистите търсят и друг ефект отсвен намаляването на нивата на ФА. Подобряването на невропсихиатричните симптоми, повишаването на диетичния ФА-толеранс с или без намаляване на нивата на ФА, оправдава продължителната терапия със сапроптерин *[Vockley et al., 2014]*.

2.3. Приложение на BH4

Лечението на ФКУ е доживотен процес *[Vockley et al., 2014]*, но по отношение на продължителното приложение на сапроптерин (перорална форма на BH4), все още няма достатъчно информация, дори включвайки данните от международни ФКУ регистри *[Keil et al., 2013; Campistol et al., 2012; Blau et al., 1993]*. В анализ публикуван 2015г.*[Longo et al.,2015], Никола Лонго* и сътрудници представят безопасността и ефикасността на приложение на сапроптерин в продължение на 7 години, на голям брой пациенти с ФКУ, базирайки се на регистъра *PKUDOS.*

Предишни проучвания са показали, че сапроптеринът се приема добре и има изключително приемлив профил на безопасност, впоследствие потвърдено и от споменатия анализ *[Longo et al., 2014, Burton et al., 2011; Leuret et al., 2012; Shintaku et al., 2014]*. В регистъра, дългосрочното проследяване на безопасността, показва, че страничните ефекти, свързани със сапроптерин са в много ниска степен (6%), като по-голямата част от тях не са сериозни (91%), а нежелани събития не са регистрирани. Най-честите нежелани реакции свързани с лекарството са от страна на ГИТ (3%), нервната система (2%), следвани от прояви на дихателната система. Отчетените данни са сравними с тези, получени при клиничните изпитания на сапроптерина *[Levy et al., 2007; Longo et al., 2014; Burton et al., 2011; Burton et al., 2007]*. Нежеланите реакции са подобни по тип и честота във всички възрастови групи.

Продължителната употреба на сапроптерин е свързана със сигнификантно и продължително понижение на ФА нива в кръвта, като намалението на средната стойност е с около 43% и се задържа за повече от 5 години. Данните са сравними с тези, получени при по-краткотрайни проучвания *[Levy et al., 2007; Burton et al., 2007]*. В допълнение на това, при пациентите, приемащи дългосрочно сапроптерин, се установява значително повишение на средния диетичен ФА толеранс с около 48%. Това повишаване на толеранса, на фона на употребата на BH4, води до включване в диетата на по-голямо количество естествен белтък *[Vockley et al., 2014; Rohr et al., 2014]*. Подобен ефект не се установява при кратки курсове.

Децата под 4-годишна възраст показват добър контрол и повишаване на фенилаланиновия толеранс с и без прием на сапроптерин. Това се дължи на повишаването на толеранса, свързано с растежа и развитието и съответно повишените нужди от ФА. Положителният ефект е в осигуряването на нормален темп на растеж и намаляване на флуктуациите в нивата на ФА *[Leuret et al., 2012; Shintaku et al., 2014]*. Сапроптеринът се приема добре от децата на възраст под 4г. и профилът му на безопасност не се различава от този в останалите групи.

N, общ брой пациенти	**Доза на BH4**	**Продължителност**	**Критерии за отговор**	**% респондери**	
1919	20 mg	8 часа	Степен на хидроксилиране на ФА	0-74%	
50	20 mg/kg (енократна доза)	24 часа	ФА ↓ ≥ 30%	Класическа ФКУ (30)	13%
				Лека ФКУ (15)	53%
				Лека ХФА (5)	100%
37	20 mg/kg/d (разделен на дози) + ФА 25 mg/kg/d в 3 дози	7 дни	ФА ↓ ≥ 30%	Лека ХФА (6)	83%
				Лека ФКУ (9)	89%
				Умерена ФКУ (7)	43%
				Класическа ФКУ (7)	7%
38	20 mg/kg (еднократна доза)	15 часа	ФА ↓ ≥ 30%	Лека ХФА (10)	100%
				Лека ФКУ (21)	81%

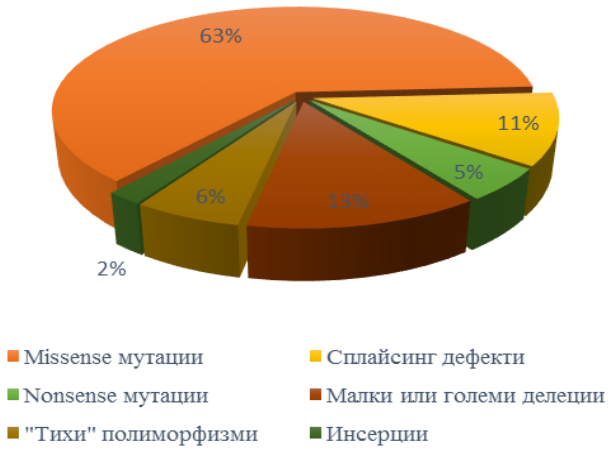
	+ ФА 100 mg/kg в 1 хранене			Класическа ФКУ (7)	0%
490	10 mg/kg/d	8 дни	ФА ↓ ≥ 30%	ФА < 600 µmol/l (57)	54%
				ФА ≥ 600 µmol/l (428)	15%
				Обща честота на отговор	20%
557	20 mg/kg (еднократна доза)	8 часа или 24 часа	ФА ↓ ≥ 20-50%	8 часа (ФА ↓ ≥ 30%)	38%
				24 часа (ФА ↓ ≥ 30%)	46%

Таблица 4. Тестове от проучвания за отговор към BH4. *[Bernegger et al., 2002; Leuzzi et al., 2006; Mitchell et al., 2005; Muntau et al., 2002; Burton et al., 2007; Fiege et al., 2007]*

3. Молекулярна генетика и патогенеза

3.1. Мутации и Менделово унаследяване

Генът за ФАХ е локализиран на 12-та хромозома - 12q23.2, съдържа 13 екзона *[NIHCDP, 2001]*. Хиперфенилаланинемиите са резултат от мутации в локуса за ФАХ или в локусите, отговорни за синтеза на ВН4. Мутациите могат да бъдат неутрални и патогенни в зависимост от фенотипната проява. Идентифицирани са повече от 500 патогенни мутации. Мутации се откриват във всички 13 екзона. Процентното разпределение на различните видове мутации е представено на фиг. 5.



Фигура 5. Процентно разпределение на видовете мутации.

Тъй като ФАХ-генът е двуалелен и съществуват много болестотворни мутации, то повечето пациенти са от типа на т.нар. смесени хетерозиготи. ФКУ се унаследява по автозомно рецесивен механизъм.

3.2. Патогенеза

Waters et al. (2000) описват четири ФКУ-свързани мутации на ФАХ, които променят аминокиселина на място отдалечено от активния център на ензима. Използвайки три комплементарни *in vitro* протеин експресиращи системи и 3D структурна локализация, *Waters et al. (2000)* демонстрират наличието на общ механизъм на засягане на четвъртичната структура на ФАХ-белтък. Този тип засягане на „нагъването“ на молекулата води до нарушаване на олигомеризацията и повишена скорост на протеолитичната деградация, което от своя страна е причина за ниските цитозолни нива на ензима. Ензим-специфичната активност и кинетичните свойства не са особено засегнати, което навежда на мисълта, че единственият начин тези мутации да намаляват ензимната активност в клетките *in vivo* е чрез предизвикване на структурни промени, провокиращи клетката да разруши аберантния протеин. Тези мутации са избрани за изучаване, тъй като са свързани с изразена хиперфенилаланинемия при пациенти. *Waters et al. (2000)* стигат до извода, че техните лабораторни данни доказват наличието на индвидуални разлики в клетъчното поведение към аберантния протеин, което води до различна тежест на фенотипната изява.

Повечето missense мутации на ФАХ, нарушават ензимната активност, предизвиквайки повишена белтъчна нестабилност и агрегация. *Gjetting et al. (2001)* описват алтернативен механизъм, по който някои от ФАХ-мутации водят до формирането на дефектен ензим. Те използват база данни от проучвания, за да идентифицират N-терминалния домейн на ФАХ, хомоложен на регулаторния домейн на префенат дехидратазата (ПДХ), която е скорост-лимитиращ ензим на бактериалния метаболитен път за биосинтез на фенилаланин. Мутациите, възникващи в N-края на ФАХ се разпределят най-често в областта между 46-ия и 48-ия аминокиселинни остатъци, както и между 65-ия и 69-ия, като тези два района са висококонсервативни и са запазени в ПДХ. Изучаването на свързването в тези региони показва, че дивите варианти на този домейн, свързват специфично фенилаланин, докато при мутантните варианти тази спсособност е значително понижена. Тези данни показват, че нарушаването на фенилаланин-медииранота активиране на ФАХ е важен патогенетичен механизъм при някой мутации на N-края.

Повечето missense мутации открити ри ФКУ, водят до т.нар. „misfolding“ или нарушено нагъване (нарушено формиране на четвъртичната структура) на ФАХ протеин, увеличен белтъчен търновър и загуба на ензимна активност. *Pey et al. (2007)* за първи път изучава въздействието на енергийните промени върху нативната ФАХ структура на 318 ФКУ-свързани missense мутации, използвайки специален алгоритъм FoldX. За 80-те мутации, за които е бил възможен анализ на експресивността при еукариоти, е установено наличието на корелация между енергийното въздействие на мутацията, *in vitro* установената остатъчна активност на ензима и метаболитния фенотип. Това доказва, че намалението на протеиновата стабилност е основен молекулярен патогенетичен механизъм при ФКУ и може да предопредели фенотипната изява. Тази корелация е по-значима за метаболитния фенотип, отколкото остатъчната ензимна активност. Изучаването на различните миссенс мутации в базата данни показва, че аминокиселинните остатъци в 7-9 екзони и регионите между отделните домейни в една субединица, имат основна структурна роля и представляват т.нар. „горещи точки“ за дестабилизация на молекулата.

3.3. Генотип-фенотипна корелация

3.3.1. Генотип и тежест на ХФА

ФКУ е изключително хетерогенна по отношение на тежестта на проява, което се доказва от различния ФА-толеранс на пациентите с това заболяване. Спектърът на ХФА варира от случаи, които не се нуждаят от лечение до тежки случаи на класическа ФКУ, където има екстремно повишаване на нивата на ФА *[Ahring et al.,2009]*. *Missence* мутациите представляват повече от половината от досега известните мутации *[Blau et al., 2010]*. Част от наблюдаваните мутации, например *R408W, R252W* значително намаляват активността на ФАХ и водят до появата на умерени или тежки фенотипове *[Ahring et al., 2009; Abadie et al., 2005; Burgard et al., 1997; Schweitzer-Krantz et al., 1999]*. Други, като *E390G, Y414C, A300S* се представят с висока остатъчна ензимна активност и така диетичният ФА-толеранс е по-висок и съответно фенотипът на ФКУ е по-лек.

Провеждани са множество изследвания, в които се разглежда структурата на мутациите във фенилаланин хидроксилазния протеин, като евентуален помощен параметър при създаването на генотип-фенотип корелация. Като резултат от подобни проучвания *Jennings* и сътрудници *[Jennings ett al., 2000]* извеждат няколко общи правила, които свързват генотипа с метаболитния фенотип:

- *Nonsense* мутациите обичайно водят до класическа ФКУ, освен ако не са локализирани в терминалния участък на С-края, когато не редуцират протеиновата експресия.
- *Splicing* мутациите, също водят до класическа ФКУ, като евентуално изключение правят мутациите, който засягат сплайсинга в малка степен и/или водят до експресия на белтъци, в които липсват само екзони 1-3 и/или 13.
- *Missense* мутациите и малките аминокиселинни делеции и инсерции, трябва да бъдат индивидуално анализирани, оценявайки величината на нарушението от аминокиселинната субституция, инсерция или делеция.
- Мутации в активния център обикновено се изявяват като класическа ФКУ, макар да е възможно и по-слабо засягане.
- Мутациите в каталитичния домейн имат по-тежка фенотипна изява в сравнение с тези в регулаторния. По-тежко се проявяват и мутации на по-дълбоко разположените аминокиселинни остатъци, отколкото тези на повърхността.

Особено важно при определянето на генотип-фенотипната корелация е информацията относно остатъчната ензимна активност на дефектния протеин.

3.3.2. Генотип-фенотип корелация въз основа на *FoldX* алгоритъм

Поради големия брой мутации и разнообразното им комбиниране в отделни генотипове, не винаги е възможно да се открият функционални хемизиготи и хомозиготи по дадени мутации, с чиято помощ да се установи лесно генотип-фенотип корелацията, особено що се отнася до метаболитния фенотип на пациентите с ФКУ. Подобен проблем съществува и при много други генетични заболявания, което налага използването на алтернативни методи за определяне тежестта на дадена мутация. Един от най-точите методи за определяне на ефекта от дадена мутация върху стабилността на белтъка, е определянето на енергийните промени в белтъчната молекула. Съществува голяма гама от методи за определяне на енергийните нива, вариращи от статистически анализ на познати белтъчни структури до методи, основани изцяло на физиката. *Lazaridis и Karplus* разделят тези методи на две групи; статистически ефективни енергийни функции и физични ефективни енергийни функции. Съществува и трети клас методи, базиран предимно на емпирични данни получени при експериментална работа върху протеините – емпирични ефективни енергийни функции, какъвто е и FoldX. Целта на FoldX е да опише енергийните промени в белтъчната стабилност с помощта на прости емпирични термини, които позволяват лесна интерпретация от неспециалисти в областта на физиката, физико-химията и математиката. С този метод се дава възможност да се определи ефекта на някои ‚некласифицирани“, като изява мутации, т.е. такива, за които липсва специфична корелация, както и за съдържащите ги генотипове.

Силовото поле FoldX е създадено от енергийна функция, взимаща под внимание основни фактори, определящи белтъчната стабилност. Свободната енергия, получена от разгъването на таргетен белтък (ΔG) се изчислява, използвайки следното уравнение:

$$\Delta G = W_{vdw} \, x \, \Delta G_{vdw} + W_{solvH} \, x \, \Delta G_{solvH} + W_{solvP} \, x \, \Delta G_{solvP} + \Delta G_{wb} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{el} + \Delta G_{Kon} + W_{mc} \, x \, T \, x \, \Delta S_{mc} + W_{sc} \, x \, T \, x \, \Delta S_{sc} + W_{clash} \, x \, \Delta G_{clash} \, ,$$

където ΔG_{vdw} е сборът от вандерваалсовите сили на всички атоми, включително взаимодействието им с атомите на разтворителя; ΔG_{solvH} и ΔG_{solvP} са разликите в енергията на хидратация, съответно на неполярни и полярни групи, когато тези групи се променят от ненагънато в нагънато състояние; ΔG_{hbond} е разликата в свободната енергия между образуването на вътремолекулна водородна връзка и формирането на междумолекулна водородна връзка (с разтворителя); ΔG_{wb} е допълнителната стабилизираща свободна енергия, осигурена от водна молекула, която създава повече от една водородна връзка с белтъка (водни мостове); ΔG_{el} е електростатичната енергия на заредените групи, включително хеликс-диполите; ΔS_{mc} е промяната в ентропията, неоходима за фиксиране на белтъчния скелет в нагънато състояние; ΔS_{sc} е промяната в ентропията нужна да се стабилизират страничните вериги в дадена конформация; ΔG_{clash} представлява мярка за влиянието на стеричните припокривания.

Данните се въвеждат във функция, от която се извеждат два параметъра *m*-наклон и y_0-отсечка, които могат да се използват за интерполиране на стойностите. Параметърът *m* е стойност, която отразява зависимостта на изменението на свободната енергия от т.нар. „енергийни санкции‘ (т.е. допълнително енергийно изискване поради структурни разместванията, причинени от мутации), а вторият параметър FoldX-y_0 се асоциира с повишените енергийни изисквания за стабилност на молекулата, които се създават в мутантния остатък. Двата параметъра се считат за достъпни инструменти при предсказването на фенотипа *in vivo* и в по-малка степен на остатъчната ензимна активност *in vitro*. При голям брой мутации на ФАХ-ген се установява известна корелация, която се приема и за основа на интерпретацията на FoldX стойностите: лека ХФА $m = 0\text{-}0.1$; $y_0 \leq 3$ *kcal/mol* (свързано с остатъчна ензимна активност над 50%); лека ФКУ $m = 0.1\text{-}0.3$; $y_0 = 3\text{-}7$ *kcal/mol* (остатъчна ензимна активност 10-50%); тежка или класическа ФКУ $m > 0.3$; $y_0 > 7$ *kcal/mol* (остатъчна ензимна активност под 10%). *[Pey et al., 2007]*

3.3.3. Генотип и отговор към BH4

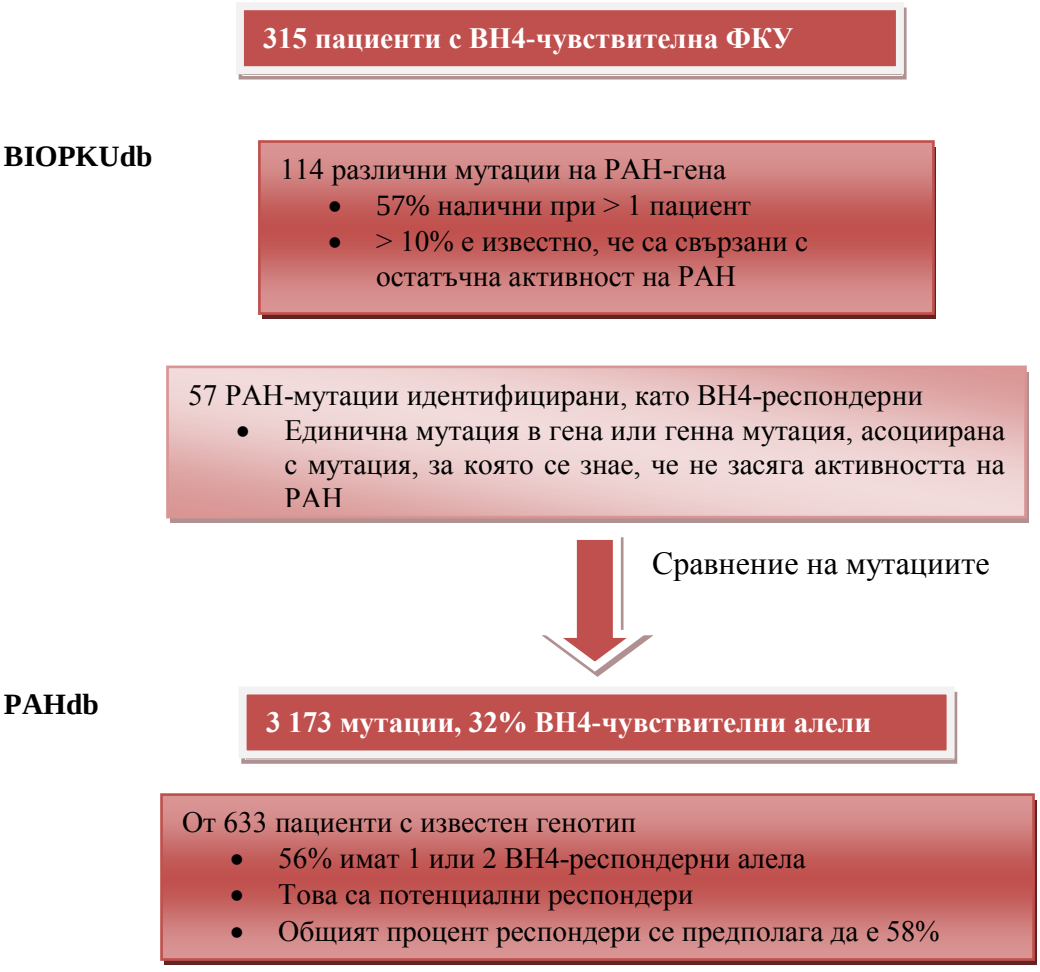
Някои мутации се свързват с BH4-чувствителен ФКУ-фенотип, при който приложението на фармакологични дози екзогенен BH4 води до увеличаване на активността на ФАХ, което е достатъчно да намали нивата на циркулиращ ФА до клинично значима степен *[www.nspku.org.uk; Michals K., 2010]*. Тези мутации обикновено лежат в основата на по-леки форми на ФКУ със значителна остатъчна активност на ФАХ. Някои анализи доказват мутации, които улесняват стабилизирането на структурата на ФАХ-протеина от BH4 („молекулен шаперон“), което се съгласува с BH4-респондерен фенотип *[Abadie et al., 2005; Motzfeldt et al., 1999]*. Връзката между генотипа и фенотипа е сложна, а и при ФКУ е доказано, че при пациенти с еднакъв генотип има различен ФА-толеранс *[Ahring et al., 2009]*.

Характера на мутациите в ФАХ-гена при пациенти с BH4-отговаряща ФКУ е изследван при 315 пациенти, използвайки BIOPKU database (BIOPKUdb) *[Michals K., 2010]*. Ключовите детайли от генотипа на тези пациенти са обобщени във фиг. 6. Петдесет и седем специфични мутации са асоциирани с BH4-отговор, а от останалите 54 мутации, 20 категорично не се свързват с BH4-отговор, а за последните 37 все още няма сигурни данни.

Честотата на мутациите описани в BIOPKUdb е анализирана, използвайки информацията от базата данни PAHdb, която съдържа детайлите за повече от 3000 ФАХ-алела: 32% от алелите са идентифицирани, като потенциални респондери на BH4, докато останалите са нереспондери или с неясен отговор. Информацията за генотиповете е събрана от 633 пациенти, от които 58% имат поне един потенциално респондерен алел. Някои проучвания показват, че генотипът може да бъде добър начин за предсказване на отговора към BH4 *[van Rijn et al., 2003]*.

Тази предполагаема честота на отговор към BH4 е по-висока от наблюдаваната при тестовете с натоварване. Това доказва комплексния характер на взаимодействието между генотипа и реалната честота на BH4-отговора. Някои пациенти могат да отговорят добре на теста с натоварване, но да дадат слаби резултати при по-продължителен прием. Още повече, че BH4-отговора може да варира дори при пациенти с еднакъв генотип. Проучване

сред хърватската ФКУ-популация показва, че честотата на BH4-респондерите е по-ниска от тази предположена по генотипа *[Walter et al., 2002]*. Наличието на мутации в регулаторната част на PAH се свързва с BH4-чувствителен ФКУ фенотип *[Bilginsoy et al., 2005]*, но освен това се асоциира с несъответствие между наблюдавания генотип и отговора към BH4 при анализа на 250 пациенти *[Schulz et al., 1995]*. Като цяло, сам по себе си генотипът не е достатъчен, за да предскаже BH4-отговора, но може да бъде полезен при идентифициране на не-респондерите.



Фигура 6. Сравнение на генотипа на пациентите в двете основни бази данни.

Типовете мутация се определят според базата данни BIOPKU. Тези категории са определени след оценката на около 700 пациенти с ФКУ, като свързването на мутацията с определена тежест на състоянието се базира основно на тези, които са функционално хемизиготни генотипове (притежаващи мутация с нулева ензимна активност). Въпреки това, повече от 21% от пациентите все още са с дискордантен фенотип независимо от предположенията, базирани на проучване тежестта на мутациите. Комбинацията от два мутантни алела е важна за предсказване на остатъчната активност на ФАХ. По този начин тежестта на заболяването в повечето случаи се определя от мутацията с по-малка тежест, като по този начин две мутации с подобна тежест могат да формират един по-мек фенотип, отколкото, ако всяка една мутация действа сама по себе си. В допълнение на това, предположението какъв ще бъде отговорът към BH4, изхождайки от генотипа не винаги е достоверно.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящата дисертация е да се характеризират нарушенията във фенилаланинхидроксилазния ген, фенотипната им изява, включително и отговора им към приложение на сапроптерин, както и определяне на значението им за лечението на пациенти с фенилкетонурия и хиперфенилаланинемия.

Задачи

1. Да се определят мутациите на ФАХ-ген при пациенти, които се наблюдават в двата клинични центъра.

2. Да се определят респондерите по отношение приложението на BH4 сред пациентската популация.

3. Да се представи корелацията на генотипа и метаболитния фенотип, както и корелацията между генотипа и отговора към сапроптерин.

4. Да се изработи клиничен алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване на пациентите с хиперфенилаланинемия.

5. Да се създаде ДНК банка от деца с ФКУ и родителите им за извършване на генетични и геномни изследвания.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Участници в проучването

В проучването са включени общо 57 пациенти, от които 42 на възраст под 18г. и 15 – над 18г. В групата под 18-годишна възраст съотношението по пол е 1.1 : 1 в полза на мъжкия пол (22 момчета и 20 момичета), докато в групата над 18г. съотношението е 1.14 : 1 (8 мъже и 7 жени). При 45 пациенти са изследвани мутации във ФАХ-ген (36 от групата < 18г. и 9 от групата > 18г.). Общо при 42-ма е проведен орален сапроптеринов тест. Подробно разпределение по пол и възрастови групи по отношение на ДНК-анализа и сапроптериновия тест е представено на табл. 5.

Таблица 5. Разпределение на тестовете по възрастова група и пол.

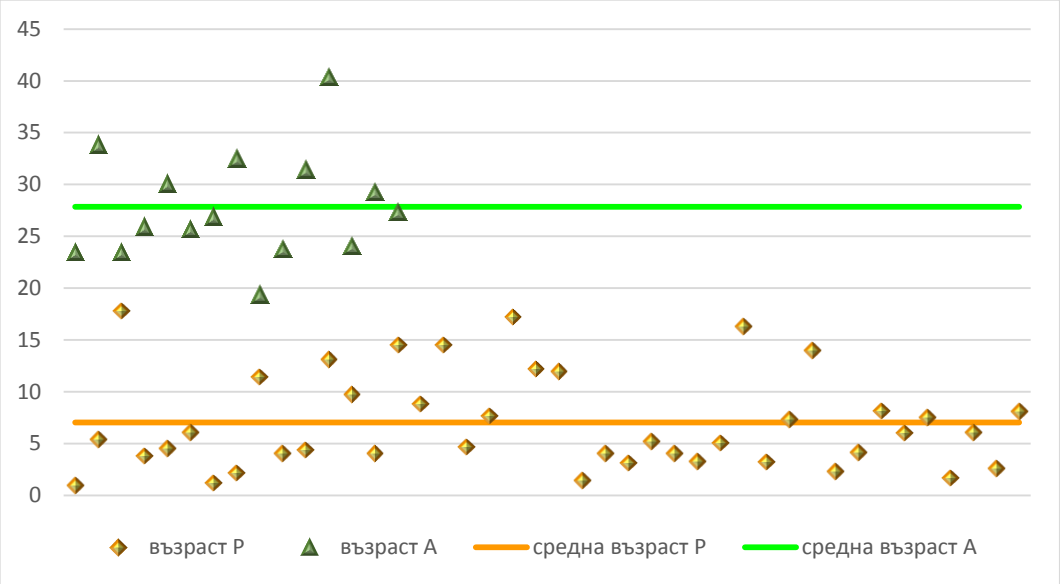
	Пол		МА		ОСТ		МА + ОСТ	
Пол	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Под 18г.	22	20	20	16	17	15	15	11
Над 18г.	8	7	6	3	5	5	3	2
Общо	30	27	26	19	22	20	18	13

МА – мутационен анализ; ОСТ – орален сапроптеринов тест

Средната възраст на пациентите за групата под 18 г. е 7.01 г., а за групата над 18 г. – 27.85 г. Графиката за разпределението по възраст е представена на фиг. 7.

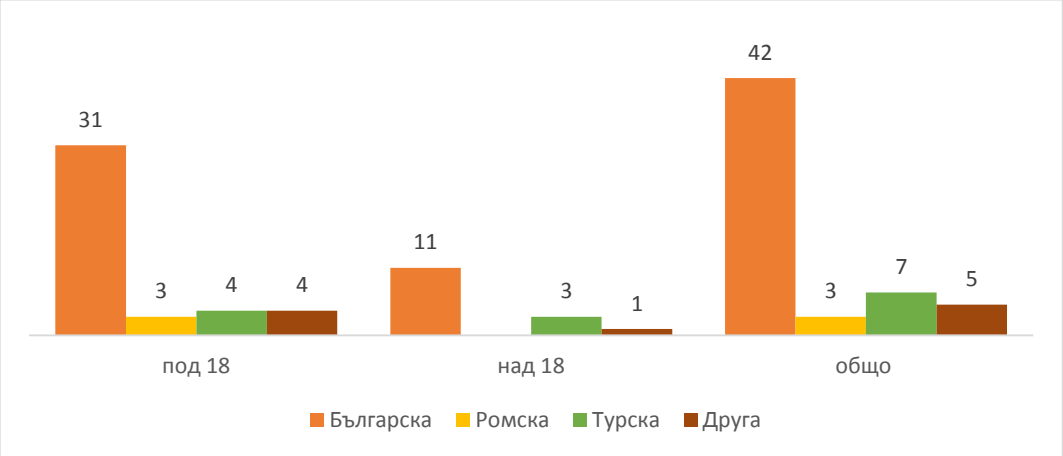
Изследваните пациенти са с различна етническа принадлежност, като се обособяват четири основни групи – българска, ромска, турска и други. На фиг. 8 е представено разпределението по етнически групи.

Всички родители/пълномощни представители на участниците и самите пациенти са подписали информирано съгласие за участие (Приложение 1 стр. 96).



Фигура 7. Разпределение на пациентите по възраст.

Р < 18г.; А ≥ 18г.



Фигура 8. Разпределение на пациентите по етнически групи.

2. Биологични проби

От всеки участник са взети проби венозна кръв чрез затворена вакутейнер система и капилярна кръв на филтърна бланка, при спазване на стандартните процедури за стерилност. Използваните вакутейнер системи са съответно с активатор на съсирването за стандартен биохимичен анализ и две отделни с EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic A) за пълна кръвна картина и изолирането на ДНК. При провеждането на анализите са съблюдавани правилата на добрата лабораторна практика за безопасна работа с биологичните агенти – ръкавици, очила, ламинарни боксове, отделни стаи за ДНК изолиране, стерилни камери, стерилни съдове, специални контейнери за отпадъците.

3. Определяне на фенилаланинов толеранс

Всички родители на пациенти под 18г. са представили 3 менюта за последните пет дни преди взимане на проби с отчетени нива на фенилаланин в границите 2 – 4,5 мг%. При пациентите, при които е изискано повишаване на нивото на фенилаланин над 6 мг% преди провеждането на ОСТ е използвано менюто от последната седмица, за определяне на максималния фенилаланинов толеранс. За пациентите на 18-годишна възраст са използвани анамнестични данни за детската възраст и средни нива на прием на естествен белтък по настоящи данни. Въз основа на тях е изчислен среден стандартен фенилаланинов толеранс. По подобен начин е изчислен фенилаланиновият толеранс при отчетени минимални и максимални стойности на фенилаланин в рамките на последните 6 месеца преди провеждане на оралния сапроптеринов тест, а при тези, при които такъв тест не е проведен, са взети стойностите от последните 6 месеца преди последната хоспитализация. За пациенти, при които липсват голями флуктуации в нивата на фенилаланин е изисквано и меню по време на боледуване за сравняване на количествата приеман фенилаланин. Количеството фенилаланин в храната е изчислявано на база стандартни таблици, а за храните, за които липсват данни за съдържанието на

фенилаланин е използвано съдържанието на белтък, като е прието, независимо от произхода, 1 g естествен белтък да се изичслява, като 50 mg фенилалнин.

4. Орален сапроптеринов тест

Оралният сапроптеринов тест се проведе по предварително одобрен протокол (приложение 2, стр.97). Преди провеждане на теста при всички пациенти, с изключение на четирима, нивата на фенилаланин са ≥ 6 mg%. Рано сутринта, след поне 6-часова пауза без хранене, в деня на провеждане на теста са взети кръвните проби за биохимичен анализ, пълна кръвна картина, ДНК-анализ, метаболитен скрининг и нулева проба за ниво на фенилаланин. След това всеки пациент е приел, разтворени във вода таблетки сапроптерин (Kuvan®) в доза 20 мг/кг. Следващите проби са взети след 8, 24 и 48 часа от приема на препарата. Диетата не се променя в периода седмица преди и по време на провеждането на теста. При интерпретирането на резултатите са спазени следните правила:

А. Бърз отговор: нивото на фенилаланина спада най-малко с 30% от изходното след 24 часа.

Б. Бавен отговор: намаление нивото на фенилаланина под 20% на осмия час и над 20%, но под 30% на 24 час или 48 час.

В. Намаление нивото на фенилаланина с повече от 80-90% след 4-8 часа е показател за BH4 дефицит.

Наличието на бърз отговор, както и намаляването на нивата на фенилаланин ≥ 30% между изходната и, която и да е от последващите проби, се счита за положителен отговор, а съответно пациентът се определя, като респондер. Всички останали стойности се определят, като липса на отговор.

5. ДНК-анализ

От всеки участник е взета кръвна проба (венозна кръв с антикоагулант К2ЕДТА) за ДНК, която е изолирана от левкоцити чрез стандартна солева процедура, използвана рутинно в Национална генетична лаборатория. На следващия етап е извършено намножаване на локусите на кодиращите райони на PAH гена (екзони 1 – 13) чрез полимеразна верижна реакция (PCR – polymerase chain reaction).

Точното определяне на мутацията (генотипиране) е извършено чрез стандартно директно секвениране по Сангер на намножените райони, с помощта на генетични анализатори ABI3130/3130xl (Applied Biosystems). Използван е търговски набор за секвенционна реакция (BigDye ® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystems), който включва специална ДНК–полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди (ddG, ddA, ddT и ddC).

6. Определяне на фенилаланиновите нива

Пробите по време на сапроптериновия тест, както и контролните проби на пциентите по време на проследяването им, използвани зса определяне на фенилаланиновия толеранс, са изработени по флуоресцентен нинхидринов метод, който се използва и при масовия неонатален скрининг.

6.1 Флуоресцентен нинхидринов метод

Основният тестов метод е модификация на McCaman and Robins, 1962 [1]. Принципът на метода се състои в измерване на флуоресценцията на продукта от реакцията между фенилаланин-нинхидрин с L-левцин-L-аланин, в присъствието на сукцинатен буфер и Cu реагент. Използваната проба за анализа е суха капка кръв върху филтърна хартия

S&S 903 с диаметър 3.0 мм (3.2 µl кръв). Използван е флуориметър 1420 VICTOR 2D, на Perkin Elmer. Количественото определяне на фенилаланина се извършва с фабричен кит "Neonatal Phenylalanine" , Wallac Oy, PerkinElmer съгласно инсрукциите в кита.

6.2 Масспектрометричен метод

Като потвърждаващ метод е използван ESI –MS/MS метод, чийто принцип се основава на масспектрометрично определяне на фенилаланина по метода на вътрешния стандарт (използва се стабилно белязан Phenylalanine-D5) след екстракция с органичен и дериватизация до бутилов естер. Отново се използва стандартна проба за анализа – суха капка кръв върху филтърна хартия S&S 903 с диаметър 3.0 мм (3.2 µl кръв), а апаратът за анализиране е LC-MS/MS система: Waters TQ Detector, снабден с Waters 1526µ Binary HPLC помпа. Количественото определяне на фенилаланина се извършва с фабричен кит "MassChrom Amino acids and acylcarnitines from Dried Blood", на Chromsystems съгласно инсрукциите в кита.

7. Определяне на FoldX стойност

FoldX е специално създаден алгоритъм, който използва емпирично силово поле. Чрез него може да се определи енергийният ефект на точкови мутации, както и енергията на взаимодействие на протеиновите комплекси (включително протеин-ДНК). FoldX може да „мутира" белтъчни и ДНК странични вериги с помощта на вероятностно-базирана ротамерна библиотека, като в същото време проучва алтернативни конформации на околните странични вериги.

FoldX стойността се изчислява въз основа на два параметъра: единият е m-стойност, която отразява зависимостта на изменението на свободната енергия от т.нар. „енергийни санкции' (т.е. допълнително енергийно изискване поради структурни разместванията,

причинени от мутации), а вторият параметър е FoldX-y0, която е се асоциира с повишените енергийни изисквания за стабилност на молекулата, които се създават в мутантния остатък.

Различните фенотипове, прогнозирани въз основа на двата параметъра са следните:

Лека ХФА: y0 = 3 kcal/mol; m = 0.1

Лека ФКУ: $3 < y0 \leq 7$ kcal/mol; $0.1 < m \leq 0.3$

Класическа ФКУ: y0 > 7 kcal/mol; m > 0.3

Първата стъпка на прогнозиране е да се осигури предварителен фенотип на базата на стойността на FoldX-y0; втората стъпка е или да се потвърди фенотипът, ако m-стойността даде подобен или по-мек фенотип, или да се преоцени прогнозираният ако m – стойността показва по-тежък фенотип от този на FoldX-y0 стойността. В последния случай, реорганизацията на протеина доминира над стабилностните промени от локалните ефекти на мутацията.

Използван е специализиран софтуер FoldX Suite с графичен интерфейс за YASARA (**Y**et **A**nother **S**cientific **A**rtificial **R**eality **A**pplication).

8. Графична обработка на резултатите

Изработването на графиките за онагледяване на получените резултати е извършено с помощта на Microsoft Office Professional Plus.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Подбор на пациенти

Включените в проучването пациенти са с установени от неонаталния скрининг високи нива на фенилаланин и се проследяват в двата клинични центъра (Клинична генетика на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ и Клиника по ендокринология и метаболитни заболявания към УМБАЛ „Царица Йоанна“). За по-лесно онагледяване на резултатите пациентите са кодирани с буква и цифра, обозначаващи съответно възрастовата група (Р – под 18г.; А – над 18г.) и поредния номер при подреждане по азбучен ред. Изследвани са 42 пациенти под 18г. и 15 – над 18г. Подробното разпределение по пол и възрастова група е представено на табл.5 в частта *Материали и методи.* При всички пациенти диагнозата е поставена на възраст по-малка от 25 дни, базирайки се на резултатите от масовия неонатален скрининг. Всички пациенти до навършване на 18г. са проследявани в отделението по Клинична генетика на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“, а навършилите 18г. са насочени към УМБАЛ „Царица Йоанна“. От общо 57 пациенти при 42 е проведен ОСТ; при 45 – МА, а при 31 – и двата анализа.

Създаде се подробна електронна база данни, съдържаща клинична информация за всеки пациент. От всеки пациент е изолирана високомолекулна ДНК.

2. Орален сапроптеринов тест

Орален сапроптеринов тест е проведен при 42 пациенти: 10 над 18-годишна възраст и 32 – под 18г. (за разпределение по пол и възрастови групи вж. табл.5). Резултатите от проведения ОСТ са представени на табл. 5.

От проведения ОСТ се установява наличието на 15 респондери (13 в групата под 18г. и 2 в групата над 18г.), от които 10 са с бърз отговор (един възрастен и 9 под 18г), а 5 – с бавен положителен (един над 18г. и 4 в педиатричната група). С бавен отговор, но

клинически не значим за определянето им, като респондери са 7 пациента (2 над 18г. и 5 – под 18г.). На фиг.9 е графично представена процентната промяна в изходните стойности на пациентите.

Таблица 6. Нива на фенилаланин при орален сапроптеринов тест.

Пациент	ФА нулева проба, мг%	ФА 8-ми час, мг%	ФА 24-ти час, мг%	ФА 48-ми час, мг%	Промяна*, %	Отговор**
P1	**7.3**	**4.5**	**4.8**	**9.3**	**- 38.35**	**бърз**
P2	**13.7**	**8.7**	**7.5**	**6.5**	**- 52.55**	**бърз**
P3	18	16.5	18.5	25.3	- 8.3	
P4	**3.7**	**2.5**	**3.1**	**2.8**	**- 32.43**	**бърз**
P5	31.8	24.7	24.5	26	22.95	бавен
P5	20.3	19.3	20.1	17.3	- 14.77	
P6	15.4	18.3	15.8	18.5	- 17.29	
P9	**12**	**6.3**	**6.7**	**11.7**	**- 47.5**	**бърз**
P10	**12.1**	**9.6**	**9.9**	**8.1**	**- 33.05**	**бавен положителен**
P11	10.6	8.4	7.5	7.8	- 29.24	бавен
P12	18.2	16.8	18.3	14	23.07	бавен
P13	10.7	9.6	10.9	10.6	- 10.28	
P13	4.8	7.4	8.1	10.4	+ 116.66	
P13	9.2	8	9.7	15.4	- 13.04	
P14	**4.9**	**2.9**	**2.6**	**1.9**	**- 61.22**	**бърз**
P15	14.9	14.4	16.3	19.3	+ 29.53	
P16	7.8	8.5	7.9	8.8	- 7.05	
P17	19.9	21.3	22.4	27.3	+ 37.18	
P18	**15**	**9.5**	**10.7**	**11.3**	**- 36.66**	**бърз**
P20	23.9	22	23.6	21.4	- 10.46	
P21	**6**	**5.7**	**3.9**	**6.5**	**- 35.00**	**бавен положителен**
P22	12.3	12.7	10.9	9.7	- 23.62	бавен
P23	**7**	**4.3**	**5**	**5.2**	**- 38.57**	**бърз**
P24	10.6	9.6	13.4	15	- 9.43	
P26	11.4	9.3	12	11	- 18.42	
P26	2.3	1.9	2.8	2.8	- 17.39	
P27	6.1	5.5	4.9	8.5	- 19.67	
P29	**10**	**10**	**6.2**	**8.3**	**- 38.00**	**бавен положителен**

P29	**3.8**	**5.2**	**3**	**3.6**	**- 42.3**	**бавен положителен**
P29	6.2	6.3	5.4	8.1	- 14.28	
P30	16.2	14.7	15.1	15.7	- 9.25	
P32	7.3	9.8	8	10.3	+ 41.09	
P32	13.4	15.9	17.3	18.2	+ 35.82	
P33	26.1	21.7	23.8	21.4	- 18.00	
P35	**2.2**	**0.9**	**2.4**	**2.2**	**- 59.09**	**бърз**
P36	9.4	8.8	8.9	9	6.38	
P37	**7.6**	**5.1**	**5.4**	**5.9**	**- 32.89**	**бърз**
P40	**13.5**	**9.7**	**7.8**	**7.7**	**- 42.22**	**бавен положителен**
P42	36	32.2	29.7	26.5	- 26.38	бавен
A2	11.1	12.6	12.1	9.6	- 23.8	бавен
A4	28.5	23.3	28.1	27.5	- 18.24	
A5	**25.8**	**17.4**	**18.4**	**21.8**	**- 32.55**	**бърз**
A6	8.7	8.8	6.5	8.2	- 26.13	бавен
A10	23.7	26	24.9	25.3	- 2.69	
A11	23.9	23.4	20.4	23	-14.64	
A12	24.8	20.4	21.5	21.6	- 17.74	
A13	**22.4**	**24.5**	**20.7**	**17.1**	**- 30.2**	**бавен положителен**
A14	18.9	17.5	17.6	16.6	- 12.16	

* промяна между нулеата и минималната стойности на ФА; ** бърз отговор: нивото на фенилаланина спада най-малко с 30% от изходното след 24 часа; бавен отговор: намаление нивото на фенилаланина под 20% на осмия час и над 20%, но под 30% на 24 час или 48 час; наличието на бърз отговор, както и намаляването на нивата на фенилаланин ≥ 30% между изходната и която и да е от последващите проби, се счита за положителен отговор, а съответно пациентът се определя, като респондер. Всички останали стойности се определят, като липса на отговор.

С лилав цвят са означени пациентите, определени като респондери.

Пациент P1, P14 и P35 дават бърз положителен отговор с максимално намаляване на изходните фенилаланинови нива с над 50 %. При тези пациенти фенотипната изява на заболяването е съответно ХФА, умерена към лека и умерена ФКУ. Бърз отговор дават пациенти P2, P4, P9, P18, P23, P37 и A5, а бавен положителен отговор се установява при един възрастен (A13) и четири деца (P10, P21, P29, P40). Трима от пациентите с бавен отговор имат лека форма на ФКУ, а двама са с класическа ФКУ. При трима от тези пациенти няма изследван генотип, а при останалите двама се установяват генотипове 23 и

25. За генотип G23 това е единственият пациент в групата, а с генотип G25 е описан още един пациент P41 с умерена към лека ФКУ, на когото не е проведен ОСТ.

2. Мутационен анализ

При 45 от изследваните пациенти е направен ДНК-анализ за определяне на мутациите във ФАХ-гена (за подробно разпределение по пол и възрастови групи вж. табл.4). при изследваните пациенти се установява наличието на 23 различни мутации, разпределени по възрастови групи, както е показано на фиг.10.

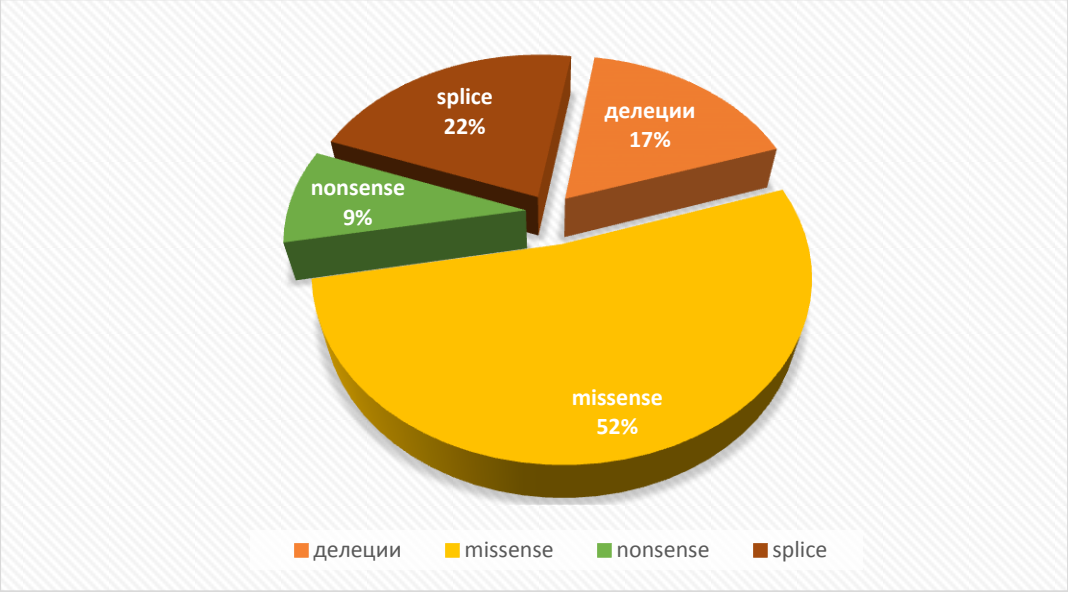
Най-честата мутация е p.R408W (c.1222C>T), която се характеризира с 2% остатъчна активност на мутантния ензим. Тя се открива в хетерозиготна комбинация при 15 от изследваните пациенти, а в хомозиготно при 6 от тях. Втората по честота мутация в групата под 18г. е p.R261Q (c.782G>A) – с остатъчна ензимна активност от 44%, която се установява в хетерозиготно състояние в 11 от случаите, а двама пациенти са хомозиготи по тази мутация. В групата над 18г. с еднаква честота са IVS10-11G>A (c.1066-11G>A) – с нулева остатъчна активност, p.L48S (c.143T>C) – 39% остатъчна активност и p.R261Q (c.782G>A). В групата под 18 г. R261Q се открива при 9 пациента – съставни хетерозиготи, а при 2 е в хомозиготно състояние, докато L48S се открива при 4 хетерозиготи. Мутацията p.R408W е най-честа при всички етнически групи – българска, ромска, турска и др. В групата под 18 г. общо 7 пациента са хомозиготи по носената от тях мутация, а над 18 г. хомозиготи са 2 от изследваните.

От установените мутации 12 са missense, 2 – nonsense, 4 са делеции, а 5 засягат сплайсинга, което като процентно разпределение е показано на фиг.11.

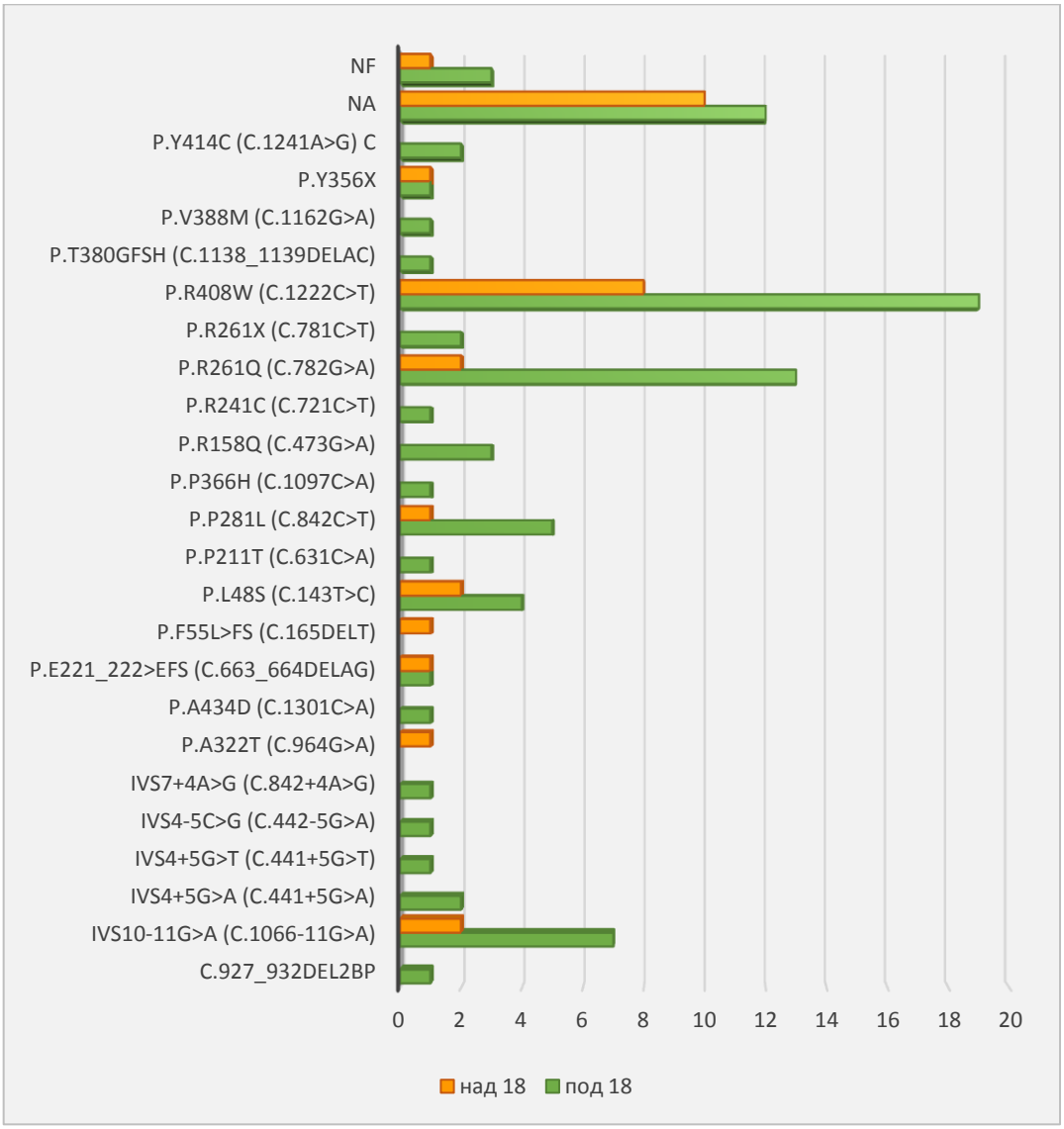
С най-голям дял са missense мутациите, следвани от сплайсинг дефектите и делециите, а с най-малък процент са мутациите, водещи до формиране на безсмислени кодони.

По отношение на засегнатия домейн се откриват 5 мутации в некаталитични области, 14 в каталитичния домейн, 2 в олигомеризационния и 2 в регулаторния, разпределени процентно, както е на фиг. 12.

От направения мутационен анализ се установиха 30 генотипа (табл. 6), като при двама пациенти (генотипове G3 и G19) е открита само една мутация.

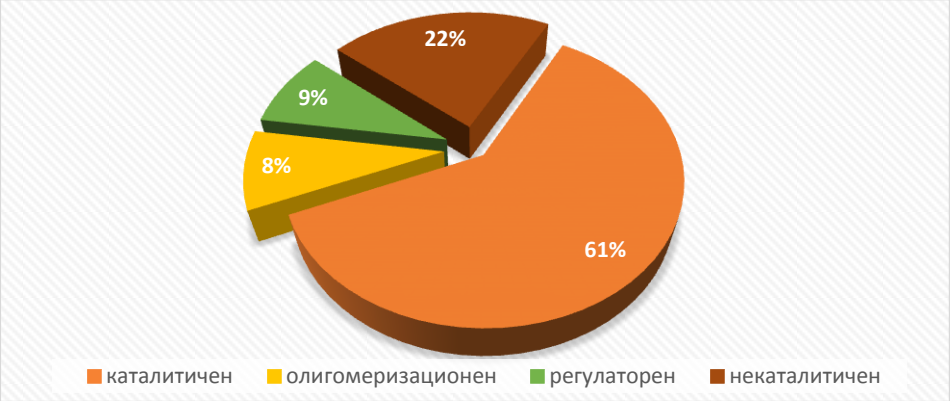


Фигура 11. Процентно разпределение на мутациите по вид.



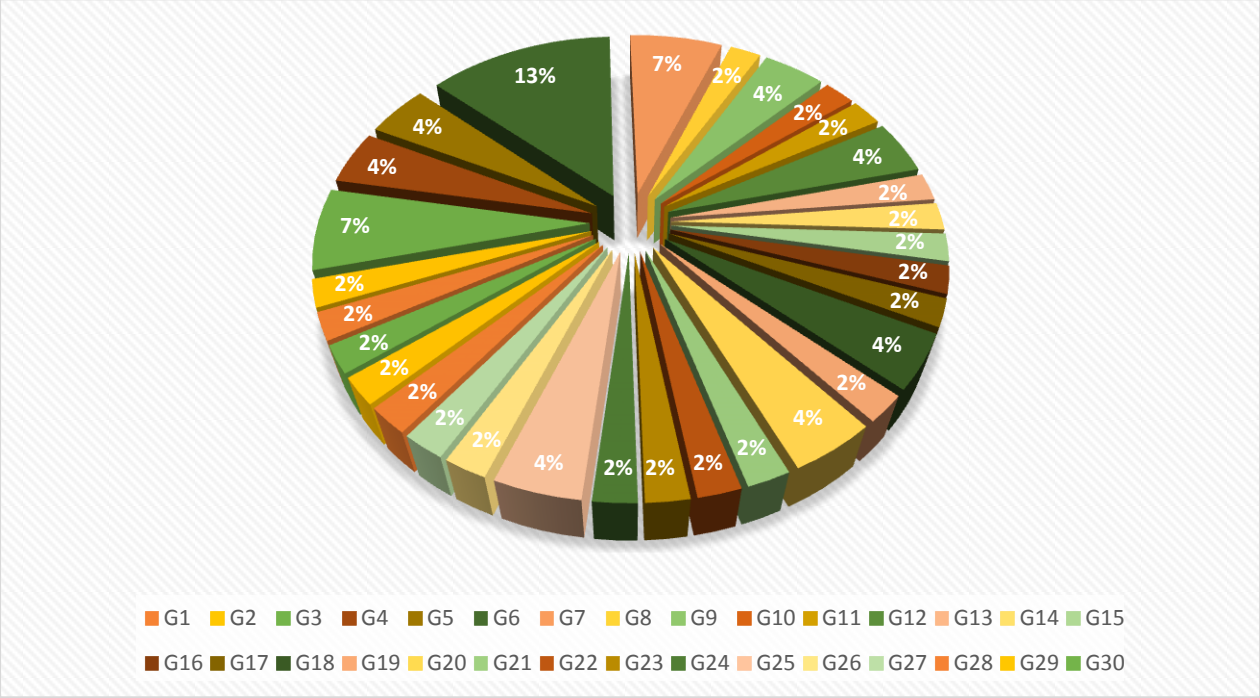
Фигура 10. Разпределение на мутациите по възрастови групи.

NF – не е открита мутация; NA – не е изследван



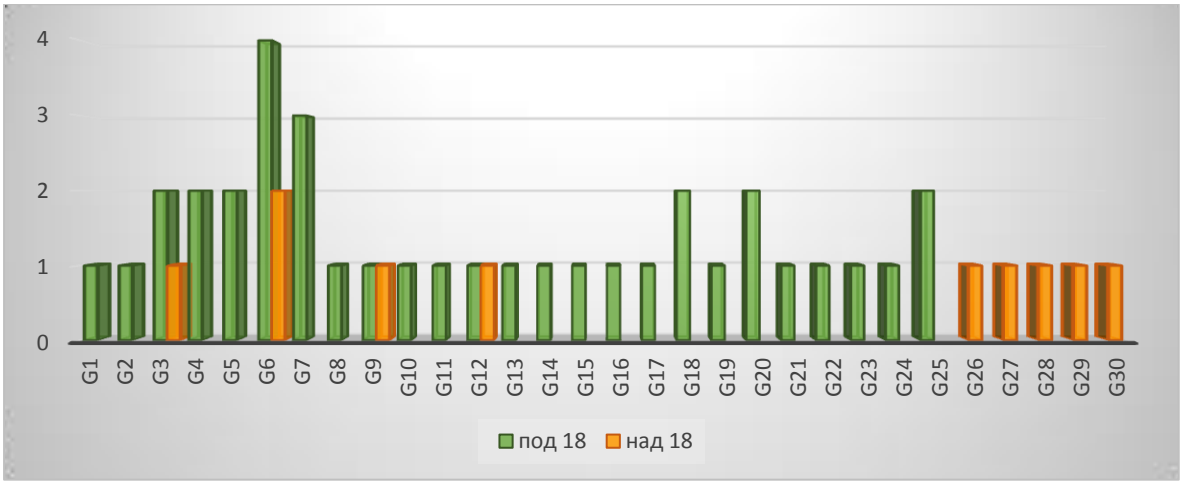
Фигура 12. Процентно разпределение на мутациите според засегнатия домейн.

Установените 30 генотипа имат следното процентно съотношние – фиг. 13.



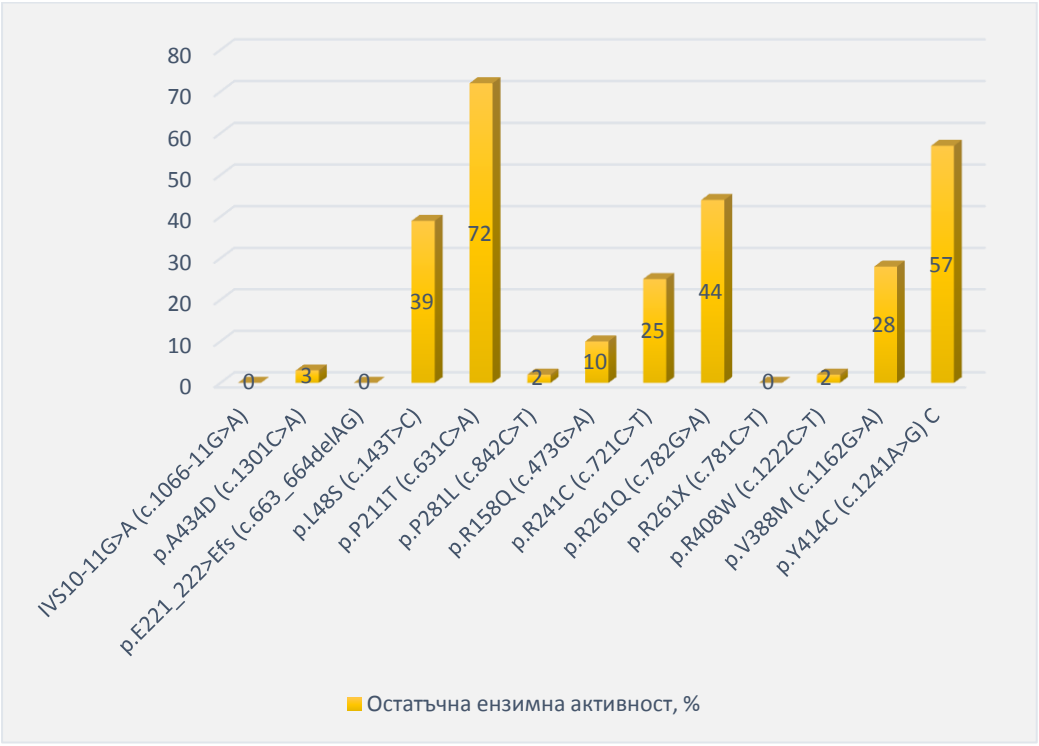
Фигура 13. Процентно съотношение на генотиповете.

Разпределението на генотиповете по възрастови групи е графично изобразено на фиг. 14.



Фигура 14. Разпределение на генотиповете по възрастови групи.

При 13 от установените 23 мутации е известна остатъчната ензимна активност на патологичния белтък, получен следствие на дадената мутация. На фиг. 15 е представена графично остатъчната ензимна активност за тези 13 мутации, която варира от 0 до 72%.

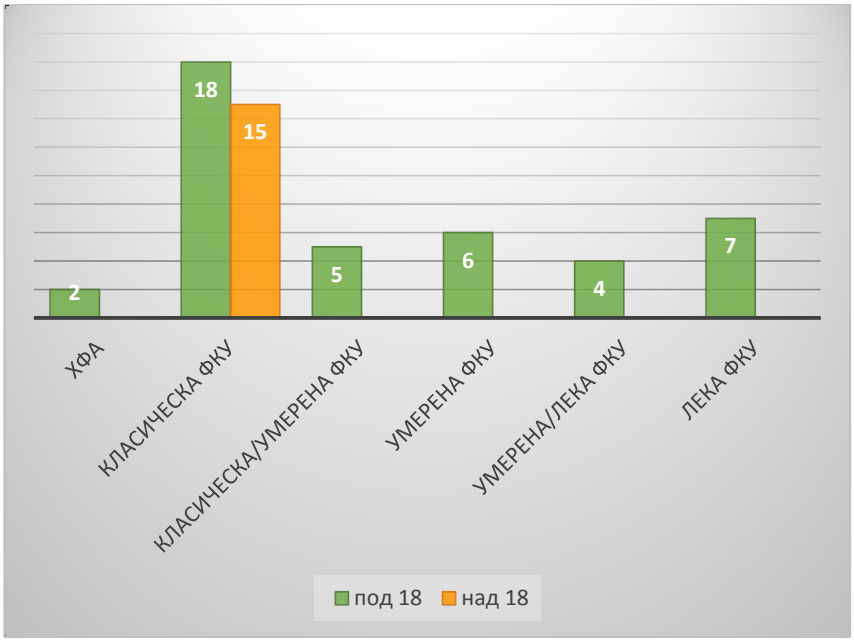


Фигура 15. Ниво на остатъчна ензимна активност.

За останалите 10 установени мутации, липсват данни за остатъчната ензимна активност на аберантния протеин, освен тези локализирани в интроните, които са с нулева активност, като IVS10-11G>A, но не са отбелязани в графиката.

3. Фенотипен анализ

Според споменатата клинична класификация, базирана на фенилаланиновия толеранс (табл.2), разпределението на пациентите по фенотип е следното – фиг.16.



Фигура 16. Разпределение по фенотип

В групата над 18г. всички пациенти са с клиничната изява на класическа фенилкетонурия, докато в групата под 18г. такива са само 18 от пациентите, като останалите са съответно: двама с ХФА; 5 с класическа към умерена ФКУ; 6 с умерена ФКУ; 4 с умерена към лека форма и 7 с лека ФКУ.

4. Корелация фенотип-генотип

От представените данни се вижда, че с ХФА са свързани само генотипове G1 и G18, като вторият се изявява и като умерена към класическа ФКУ. При 7-те пациента с лека ФКУ се установяват генотипове G9, G14, G15, G17, G23 и G25, а един пациент е с неопределен генотип. Най-голяма вариация в генотиповете е налице при пациентите с класическа ФКУ (табл. 6).

5. FoldX стойности

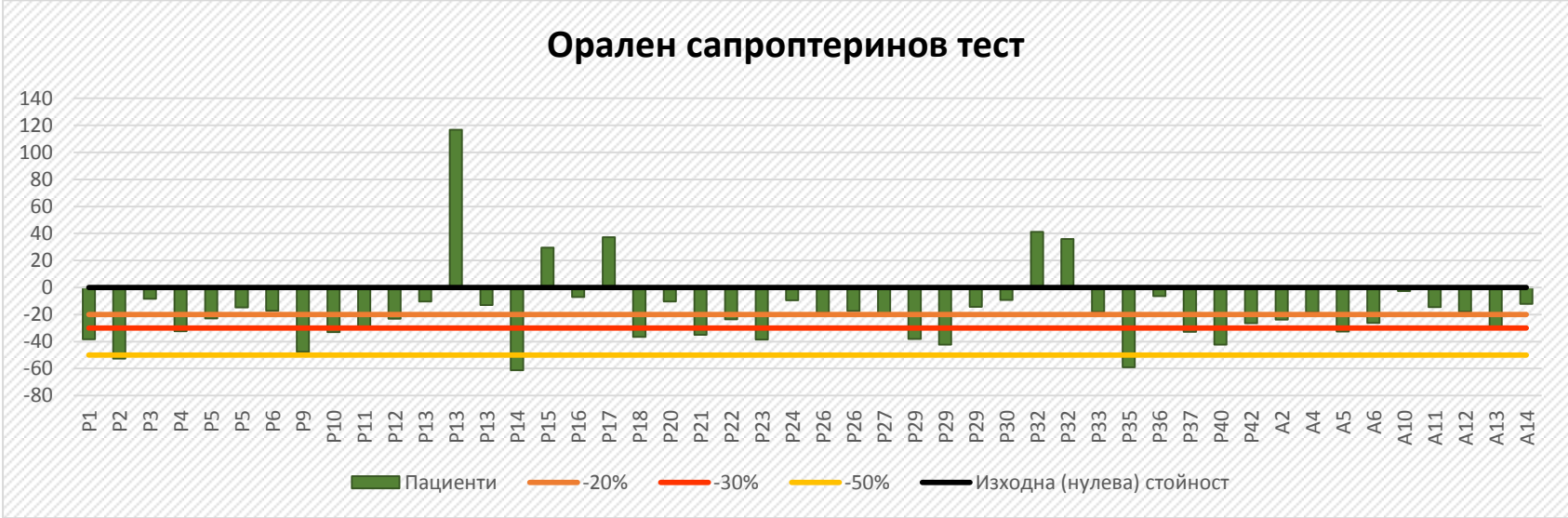
На табл. 7 са представени мутациите, за които е възможно изчисляване на FoldX стойности, заедно с остатъчната ензимна активност, с която са свързани.

Таблица 7. Корелация на FoldX стойностите на изследваните мутации

Мутация	m	y0	Предполагаем фенотип	ОЕА*, %
p.Y356X (c. 1068C>A)	0.05	6.5	Лека ФКУ	
p.A434D (c.1301C>A)	0.62	6	Класическа ФКУ	3
p.F55l>fs (c.165delT)	0.05	2.9	ХФА	
p.R408W (c.1222C>T)	4.56	21.5	Класическа ФКУ	2
p.R158Q (c.473G>A)	0	2.5	ХФА	10
p.P211T (c.631C>A)	0	5.1	Лека ФКУ	72
p.P366H (c.1097C>A)	<0.01	2.4	ХФА	
p.Y414C (c.1241A>G)	0	6	Лека ФКУ	57

p.A322T (c.964G>A)	0.58	3.9	Класическа ФКУ	
p.R261Q (c.782G>A)	0	7.4	Класическа ФКУ	44
p.P281L (c.842C>T)	0	6.7	Лека ФКУ	2
p.R241C (c.721C>T)	0	4.4	Лека ФКУ	25
p.V388M (c.1162G>A)	0	1.7	ХФА	28
p.L48S (c.143T>C)	0	5.9	Лека ФКУ	39

*ОАЕ – остатъчна ензимна активност



Фигура 9. Процентно намаление на изходните стойности при орален сапроптеринов тест.

Таблица 8. Разпределение на пациентите по генотип и клинична изява.

ID	Алел 1	Екзон	Алел 2	Екзон	Фенотип	Генотип
P1	p.P366H (c.1097C>A)		p.A434D (c.1301C>A)		ХФА	G1
P2	p.L48S (c.143T>C)	2	p.R261Q (c.782G>A)	7	класическа	G2
P3	p.R408W (c.1222C>T)	12	NF		класическа	G3
P4	p.R261Q (c.782G>A)	7	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа	G4
P5	p.L48S (c.143T>C)	2	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа	G5
P6	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	умерена	G6

P7	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G6
P8	p.P281L (c.842C>T)	7	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G7
P9	NA		NA		умерена/лека	
P10	NA		NA		класическа	
P11	p.E221_222>Efs (c.663_664delAG)		p.V388M (c.1162G>A)		класическа/умерена	G8
P12	p.L48S (c.143T>C)	2	p.R408W (c.1222C>T)	12	лека	G9
P13	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.R261X (c.781C>T)	7	класическа	G10
P14	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.T380Gfsh (c.1138_1139delAC)	11	умерена	G11
P15	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G6
P16	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.R408W (c.1222C>T)	12	умерена	G12
P17	p.R158Q (c.473G>A)	5	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G13
P18	IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	4	c.927_932del2bp	9	лека	G14
P19	IVS4-5C>G (c.442-5G>A)	4	p.Y356X	11	лека	G15
P20	IVS4+5G>A (c.441+5G>A)	4	IVS4+5G>A (c.441+5G>A)	4	класическа	G16
P21	NA		NA		лека	
P22	p.R408W (c.1222C>T)	12	NF		умерена/лека	G3
P23	p.P211T (c.631C>A)	6	p.R408W (c.1222C>T)	12	лека	G17
P24	NA		NA		класическа	
P25	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.Y414C (c.1241A>G) C	12	класическа/умерена	G18
P26	p.P281L (c.842C>T)	7	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа/умерена	G7

P27	NA		NA		класическа	
P28	p.P281L (c.842C>T)	7	NF		класическа	G19
P29	p.R241C (c.721C>T)	7	p.P281L (c.842C>T)	7	лека	G23
P30	NA		NA		класическа	
P31	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа/умерена	G20
P32	p.R158Q (c.473G>A)	5	p.R261X (c.781C>T)	7	класическа	G24
P33	p.R408W (c.1222C>T)	12	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа/умерена	G20
P34	IVS7+4A>G (c.842+4A>G)	7	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	умерена	G21
P35	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.P281L (c.842C>T)	7	умерена	G7
P36	p.R158Q (c.473G>A)	5	p.R261Q (c.782G>A)	7	класическа	G22
P37	p.L48S (c.143T>C)	2	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	умерена/лека	G5
P38	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.Y414C (c.1241A>G) C	12	ХФА	G18
P39	p.R261Q (c.782G>A)	7	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа	G4
P40	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.R261Q (c.782G>A)	7	лека	G25
P41	p.R261Q (c.782G>A)	7	p.R261Q (c.782G>A)	7	умерена/лека	G25
P42	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	умерена	G6
A1	p.F55l>fs (c.165delT)	2	p.R261Q (c.782G>A)	7	класическа	G26
A2	NA		NA		класическа	
A3	p.L48S (c.143T>C)	2	p.Y356X	11	класическа	G27
A4	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G6

A5	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G6
A6	NA		NA		класическа	
A7	p.A322T (c.964G>A)	9	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа	G28
A8	p.E221_222>Efs (c.663_664delAG)	6	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G29
A9	p.R408W (c.1222C>T)	12	NF		класическа	G3
A10	p.P281L (c.842C>T)	7	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	11	класическа	G30
A11	p.R408W (c.1222C>T)	12	p.R261Q (c.782G>A)	7	класическа	G12
A12	NA		NA		класическа	
A13	NA		NA		класическа	
A14	NA		NA		класическа	
A15	p.L48S (c.143T>C)	2	p.R408W (c.1222C>T)	12	класическа	G9

V. ОБСЪЖДАНЕ

Множество са проведените изследвания, свързани с генотипа, фенотипа и корелацията между тях, при пациенти с хиперфенилаланинемии (ФКУ, ХФА), но до момента няма единно мнение по отношение на стандарта за класифицирането на различните форми и теоретичното определяне на даден метаболитен и/или респондерен статут на пациентите. Хиперфенилаланинемията се представя с широк фенотипен спектър, варирайки от класическа ФКУ до умерена ХФА, често в зависимост от остатъчната ензимна активност *[Okano et al. 1991]*. От откриването на първата мутация във ФАХ-ген, при пациент с ФКУ *[Dillela et al. 1986]* до момента са идентифицирани и описани над 900 мутации с различна фенотипна изява. Повечето мутации са в кодиращите региони или на границата интрон-екзон и са разпределени равномерно сред екзоните на ФАХ-ген, като се забелязва преимуществено засягане на 3´ краищата на отделните екзони.

Броят на различните мутации в дадена популация е често висок, като се забелязва преобладаването на няколко мутации, както и наличието на определен брой „частни“ или специфични за популацията мутации *[Avigad et al. 1991]*. Освен това са налице съществени разлики между мутационните спектри на различните популации, което затруднява установяването на добра генотип-фенотип корелация. В допълнение на това, липсата на общоприет стандарт за класифицирането на фенотипа, в зависимост от нивата на фенилаланин преди лечение или фенилаланиновия толеранс, води до затруднено асоцииране на определен фенотип към даден генотип.

Публикувани са множество проучвания, свързани с една или повече популации, в които се прави описание на мутациите и анализ на фенотип-генотип корелацията (метаболитен профил и BH4-респондерен статус) в европейски *[Okano et al. 1991; Guldberg et al. 1993; Svenson et al. 1993; Popescu et al. 1994; Dianzani et al. 1995; Zschocke and Hoffmann 1999; Kozak et al. 1997; Guldberg et al. 1998; Mallolas et al. 1999; Sucoka et al. 1999; O'Donnell et al. 2002; Kasnauskiene et al. 2003; Pey et al. 2003; Desviat et al. 2004; Stojiljkovic et al. 2006; Daniele et al. 2009; Blau et al. 2010; Kostandyan et al. 2011; Rivera et*

al. 2011; Djordjevic et al. 2012; Groselj et al. 2012; Bik-Multanowski et al. 2013; Bueno et al. 2013; Trunzo et al. 2013], австралийски *[Jennings et al. 2000; Ramus et al. 2013]*, азиатски *[Avigad et al. 1990; Kleiman et al. 1992; Lee et al. 2004; Song et al. 2005; Bercovich et al. 2008; Dobrowolski et al. 2011; Ajami et al. 2013; Murad et al. 2013; Biglari et al. 2015]*, африкански *[Kleiman et al. 1992; Weinstein et al. 1993]*, южноамерикански *[Santos et al. 2010; Vela-Amieva et al. 2015]* и северноамерикански *[Kayaalp et al. 1997; Enns et al. 1999; Yang et al. 2001]* популации. Във всички тези проучвания се откриват определени генотипове, които винаги се асоциират с даден фенотип или ограничена вариация от фенотипове, но в същото време се установяват и съществени несъответности между предполагаем и реален фенотип, както и между наличните фенотипове в отделните популации.

В настоящата дисертация се представят и обсъждат резултатите от изследването на 57 пациенти от българската популация, с хиперфенилаланинемия, както и наличната корелация между генотип и фенотип, по отношение метаболитния профил и респондерния статус. Това е първото по рода и мащаба си изследване на пациенти с хиперфенилаланинемия в България.

1. Обсъждане на резултатите от оралния сапроптеринов тест и комплексна оценка на респондерите.

ФАХ е нехемов, желязозависим ензим, изискващ наличието на тетрахидробиоптерин, като основен кофактор при хидроксилирането на фенилаланина и използващ кислорода, като допълнителен субстрат *[Erlandsen et al. 2004]*. Някои пациенти с ФКУ отговарят на натоварващи тестове с BH_4 с намаляване на ФА-нива. За обяснение на ефекта на BH_4 при пациентите с ФКУ (предимно тези с леки форми на заболяването) са предложени няколко възможни механизма *[Erlandsen et al. 2004]*:

a. Намален афинитет на мутантната ФАХ към BH_4

b. Стабилизиране на активните тетрамер/димерни форми на мутантния протеин и предпазването им от протеолитично разделяне, т.е. BH_4 действа като химичен шаперон, предотвратяващ неправилното нагъване, водещо до последваща убиквитин-зависима протеазомна деградация.
c. Положителна регулация на експресията на ФАХ-ген
d. BH_4-индуцирани промени в биосинтеза на самия кофактор
e. Стабилизиране на ФАХ мРНК

От всички 42 пациенти, на които е проведен ОСТ се установяват 15 респондери, което представлява около 35.7 % или 26.3 % от всички изследвани пациенти. С оглед на това, че настоящото проучване не обхваща цялата популация на ФКУ-пациенти в страната, както и фактът, че ОСТ не е проведен при всички 57 пациенти, споменатата честота на респондери е съпоставима със споменатата в литературата, а именно от 17 % *[Sarkissian et al. 2011]* до 28.2 % *[Bik-Multanowski et al. 2013]* и 36 % *[Karačić et al. 2009]*. Според различните източници пациентите с ХФА отговарят на приложение на тетрахидробиоптерин в около 100 % от случаите, леките форми на ФКУ 85-90 %, а при класическа ФКУ едва в 8-10 %.

На табл. 8 са показани нашите пациентите с положителен ОСТ, както и асоциираните с тях фенотипове и генотипове. Освен респондера, с генотип G25 е описан и още един пациент (P41) с умерена към лека ФКУ, на когото не е проведен ОСТ, но би могло да се предположи, че ще даде позитивен отговор.

Таблица 9. Фенотипна и генотипна асоциация на респондерите.

ID	Фенотип	Генотип	Отговор
P1	ХФА	G1	бърз
P2	класическа	G2	бърз
P4	класическа	G4	бърз
P9	умерена/лека	не изследван	бърз
P10	класическа	не изследван	бавен положителен

P14	умерена	G11	бърз
P18	лека	G14	бърз
P21	лека	не изследван	бавен положителен
P23	лека	G17	бърз
P29	лека	G23	бавен положителен
P35	умерена	G7	бърз
P37	умерена/лека	G5	бърз
P40	лека	G25	бавен положителен
A5	класическа	G6	бърз
A13	класическа	не изследван	бавен положителен

Пациентът с генотип G1 е първи и до момента единствен, описан в литературата с този генотип, въпреки че двете мутации, от които е съставен са описани от *Guldberg et al. 1993* и *Song et al. 2005,* съответно в сицилианска (както и в други южноевропейски) и севернокитайска популации. Двете мутации в генотипа (p.A434D и p.P366H) са missense мутации, локализирани, съответно в олигомеризационния (екзон 12) и каталитичния (екзон 11) региони. Клиничната изява на заболяването при този пациент е ХФА, като не може да се намери точна корелация на фенотипа с остатъчната ензимна активност, тъй като едната мутация е с 3 % ОЕА, докато при другата не е определена такава.

С генотип G2 има описан само един пациент в нашата група, който клинично се изявява с класическа ФКУ. Двете мутации в този генотип са p.L48S, описана при 6 от нашите пациенти и p.R261Q – при 15. Те са с ОЕА, съответно 39 % и 44 %, което корелира положителния отговор към сапроптерин. Поради високата остатъчна активност на двете патогенни мутации се очаква по-лек фенотип, но в базата данни BIOPKU от регистрираните 42 пациенти с този генотип, 64.29 % са с лека ФКУ, 33.33 % - с класическа ФКУ, а 2.38 % са с лека ХФА. От тези 42 пациенти само при 29 е проведен ОСТ, като в 75.86 % от случаите е установен бърз отговор, а при 6.9 % - бавен, като липса на отговор се наблюдава в 17.24 % от изследваните пациенти. Мутацията p.L48S е missense мутация,

описана за първи път при турски пациенти от *Konecki et al. 1991*. Тя засяга регулаторния домейн (екзон 2) на ензима. Мутацията p.R261Q, също е missense вариант, засягащ каталитичния регион (екзон 7) и е описана за първи път от *Abadie et al. 1989*, при проучване на т.нар. „горещи точки" – критични за нарушаване на езнимната структура места. Тази мутация засяга критичен за свързването на кофактора регион (CBR1), което може да обясни положителния отговор към екзогенно повишаване на концентрацията на сапроптерин.

Двама от описаните пациенти са с генотип G4, като и при двамата клиничната изява е класическа ФКУ. ОСТ тест е проведен при единия пациент (P4) в рамките на настоящето проучване, а при втория (P39) тестът е проведен по-късно, поради което не фигурира в данните и също е респондер. P4 е съставен хетерозигот, носител на описаната вече мутация p.R261Q и на IVS10-11G>A – мутация, локализирана в интрон 10 (11 позиции, преди екзон 11), засягаща некаталитичен регион, водеща до дефект в сплайсинга. Мутацията е често описвана при пациенти в южните и югоизточни части на Европа *[Dworniczak et al. 1991; Pey et al. 2003]* и се съобщава с честота около 25 % при арменски пациенти с ФКУ [Kostandyan et al., 2011]. При нея е налице нулева ОЕА. В базата данни BIOPKU са регистрирани 61 пациенти с този генотип, като при 72.13 % се проявява класическа ФКУ, а при 27.87 % лека ФКУ. От изследваните 34 пациенти – 82.35 % са нереспондери, при 11.76 % има бавен отговор, а респондери са едва двама или 5.88 %. Това е един от генотиповете, доказващ необходимоста от провеждане на ОСТ, дори и при наличието на малък процент отговорили.

Респондерът (P14) с генотип G11 е първи и единствен описан до момента с този генотип. Той е съставен хетерозигот, носител на мутациите: p.R261Q (описана при предходни респондери) и p.T380Gfsh (c.1138_1139delAC) – делеция в екзон 11, засягаща каталитичния район, описана за първи път в литературата от нашия екип. Клиничната изява при нашия пациент е умерена ФКУ. За момента липсват данни за остатъчна ензимна активност при тази мутация. При този пациент се наблюдава и най-изразеното понижаване на изходните нива на ФА при ОСТ с над 60 %.

Пациентът (P18) с генотип G14 е единствен описан до момента. Генотипът се изявява, като лека ФКУ и е съставен от двете мутации: IVS4+5G>T и c.927_932del2bp. Първата мутация се намира в интрон 4 и засяга некаталитичния регион на ензима, като води до сплайсинг дефект, а втората е делеция в екзон 9, засяга каталитичния регион и е описана за първи път от нашия екип *[Кадъм и др., 2015; Kathom et al., 2014]*. При пациента не е започнато лечение със сапроптерин въпреки добрия отговор, поради отключването на захарен диабет тип 1 и необходимостта от комбиниране на двете диети (за ФКУ и ИЗЗД). Не може да се обсъжда корелация между мутацията и диабета, поради липса на достатъчно литературни данни за сучетаването на ФКУ с диабет тип 1. По литературни данни се установява, че nonsense мутациите, делециите (водят до промяна в рамката на четене) и дефектите на сплайсинга, най-често имат нулева ОЕА *[Berkovich et al. 2008]*. Съгласно това нашият пациент би трябвало да няма никаква ОЕА и най-вероятна фенотипна изява следва да бъде класическата ФКУ, като вероятността за добър отговор към ОСТ е минимална. В случая се вижда, че клиничната изява е лека ФКУ, с много добър бърз отговор при ОСТ с понижение на нивата на ФА около 36.6 %.

Пациент P23 с фенотипно изявена лека ФКУ и е респондер с генотип G17 – съставен хетерозигот със следните две мутации: p.P211T и p.R408W. Първата мутация е с най-високата, описана в нашата група, ОЕА – 72 %. Това е missense мутация, засягаща каталитичния регион и описана за първи път от *Guldberg et al. 1993*. Втората е най-често описваната мутация, както в българската, така и в други европейски популации, като ОЕА при нея е едва 2 %. Тя е локализирана в екзон 12 и засяга каталитичния регион. С този генотип са регистрирани общо 5 пациенти в базата данни, като при двама от тях е налице класическа ФКУ, при двама – лека ХФА и само при един лека ФКУ. От петимата регистрирани на един е проведен ОСТ – с положителен отговор. Поради наличието на пациенти с класическа ФКУ с този генотип, въпреки високата остатъчна активност на единия мутантен протеин, следва да се потърси и друга причина, освен ОЕА, определяща фенотипната изява на състоянието.

P29 е единственият описан с генотип G23 в нашата група пациенти и първи описан в литературата с този генотип. Той е с лека ФКУ и дава бавен положителен отговор на

ОСТ с намаление на ФА-нива с над 42 % на 24-ия час. Пациентът е съставен хетерозигот, носител на две локализирани в екзон 7 missense мутации, засягащи каталитичния регион: p.R241C и p.P281L. ОЕА на мутациите е съответно 25 % и 2 %. Информация за p.R241C е публикувана за първи път от *Takarada et al. 1993,* описвайки мутациите, засягащи екзон 7, без да се спира на тяхното клинично проявление, а втората – при проучване на ФКУ пациенти от Средиземноморието от *Okano et al. 1991,* като се подчертава нейното разпространение сред не-ориенталската група пациенти. Впоследствие обаче са публикувани данни, които показват сравнителни висока честота (10.25 %) на P281L в иранската популация на пациенти с ФКУ *[Biglari et al., 2015]*, което доказва наличието на мутацията в Западна и Средна Азия.

Пациентът (P35) с генотип G7 е с умерена ФКУ. Неговият ОСТ е направен при сравнително ниски стойности на изходния фенилаланин, поради което е повторен след повишаване на стойностите, давайки съизмерим резултат. Изходните нива на ФА при него намалят с почти 60 %, на фона на това, че остатъчната ензимна активност на мутациите в неговия генотип е едва 2 % и за двете. Генотип 7 е съставен от описаните вече мутации p.P281L и p.R408W. Останалите двама пациенти със същия генотип са с умерена към класическа и класическа форма на ФКУ, като при единия не е провеждан ОСТ, а при другия отговорът е под 20 %. С този генотип в BIOPKU са регистрирани 83 пациенти, като респондерен статус е определен при 19 от тях. Всички изследвани не са дали отговор на теста и са определени, като нереспондери. По отношение на фенотипната изява 81 са с класическа ФКУ (97.59 %), а двама (2.41 %) са с лека ФХУ. Наличието на един респондер в нашата популация и сравнително по-леката клинична изява при два от тримата с този генотип, в сравнение със споменатите данни, ни кара да смятаме, че е редно да се повтори теста при пациента ни, определен като нереспондер и да се подложи на тест неизследваният пациент със същия генотип.

Пациент P37 (генотип G5) е с лека към умерена ФКУ и е определен, като респондер следствие на бърз отговор при ОСТ. Пациентът е смесен хетерозигот, носител на мутациите: p.L48S и IVS10-11G>A. Другият пациент от нашата група със същия генотип е с изява на класическа ФКУ и не е респондер. В BIOPKU се откриват 29 регистрирани

случая с този генотип, като 65.52 % са с лека ФКУ, 31.03 – с класическа ФКУ и 3.45 с ХФА. От 20, на които е определен респондерния статус, 8 са респондери (40 %), 35 % са нереспондери и 25 % дават бавен отговор.

С генотип G25 са двама пациенти, от които респондер е този с лека ФКУ, а този с лека към умерена не е изследван. Пациентът е хомозигот по p.R261Q – мутация, засягаща каталитичния домейн в регион, свързващ кофактора, с ОЕА 44 %. Това е един от двата хомозиготни фенотипа, при които се откриват респондери в българската популация. Двамата пациенти с този фенотип са от различни географски райони и различни етнически групи. В базата данни с този фенотип са регистрирани 136 пациенти, от които 74.26 % са с лека ФКУ, 24.26 % - с класическа ФКУ и 1.47 % с ХФА. Сред изследваните 78 пациенти се установяват 61 респондери (78.21 %), 13 (16.67 %) – нереспондери и 4 (5.13 %) с бавен отговор.

Един респондер е установен и сред шестимата пациенти с генотип 6. Той е с класическа фенилкетонурия и е носител на най-честата мутация p.R408W в хомозиготно състояние. От шестимата с този генотип, двама са с умерена ФКУ, а останалите – с класическа ФКУ. Генотипът е един от най-честите в европейските популации. В BIOPKU са регистрирани 821 пациента с този генотип, от тях 99.63 % са с класическа ФКУ, а само трима (0.37 %) са с лека ФКУ. Нашите двама пациенти са първите, съобщени с умерена форма на заболяването. От тестваните едва 73 пациенти, няма нито един репондер с този генотип, което заедно с това, че мутацията води до образуване на протеин с много ниска остатъчна активност (2 %), ни накара да повторим теста при този пациент. Поради получаването на съпоставим резултат (32.55 % спад на ФА-нива при първия тест и 34.8 % спад при втория), пациентът е определен, като респондер. Стриктното проследяване на промените в диетотерапията му, показаха увеличение с 50 % на ФА-толеранс в първите 6 мес. и допълнително 38 % увеличение в следващите 6. За малко повече от година пациентът удвои фенилаланиновия си толеранс, запазвайки през цялото време стабилни нива на фенилаланина (4.2 – 5.8 мг %). Това показва, че приемането на генотип G6, като по правило нереспондерен е довело до нетестуване на пациенти с този генотип. Поради тази

причина може би са „изпуснати“ редки случаи на респондери, чиято терапия може да бъде коригирана с добавянето на сапроптерин.

Останалите четирима респондери са с неизследван генотип и при тях не може да се направи анализ и корелация.

2. Обсъждане на откритите мутации

В различните популации, преобладават различни мутации, които най-често са свързани с етническите групи, от които е съставено местното население. В много случаи, разпространението и честотата на една мутация могат да се използват за илюстриране на различни миграционни теории, за което по-често са използвани т.нар. хаплотипове. В някои случаи близки в географско, а и в етническо отношение популации, показват значителна разлика в честотата на определени мутации.

Нашите пациенти са разпределени в четири етнически групи – българска, турска, ромска и други, като последната е най-хетерогенна и включва пациенти с гръцки, полски, еврейски и руски произход, както и българи мюсюлмани, отделени поради възможното влияние на затворената общност върху генетичното разнообразие. На табл. 9 са представени пациентите от ромската етническа група.

Таблица 10. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от ромски етнически произход

ID	Алел 1	Алел 2	Фенотип	Генотип
P20	IVS4+5G>A	IVS4+5G>A	класическа ФКУ	G16
P30	NA	NA	класическа ФКУ	
P31	IVS10-11G>A	p.R408W	класическа/умерена ФКУ	G20

NA – не е изследван

Мутацията IVS4+5G>A е сплайсинг мутация на некаталитичния регион, локализирана в интрон 4 на ФАХ-ген. За първи път мутацията е описана във Франция при проучване на десет новородени с хиперфенилаланинемия, подложени на сапроптеринов тест в неонаталния период *[Feillet et al., 2008]*. Поради малкия брой пациенти, липсата на

мутационен анализ при един от тях и наличието на един хомозигот по мутация IVS4+5G>A, не може да бъде извадено заключение за това дали има превалиращи мутации в ромската популация в България. При нашите пациенти не откриваме мутация R252W, която е описвана за най-честа при ромски семейства от България *[Kalaydjieva et al., 1993]*, Словакия – при всички ромски фамилии с ФКУ *[Kalanin et al., 1994]* и Чехия *[L. Kosak – регистрация в базата данни без публикация]*. Това разминаване най-вероятно се дължи на обхващането на малък брой пациенти от ромски произход, които след определен период спират да спазват диетата и не посещават клиничните центрове за проследяване.

В групата с пациенти от турски етнически произход (табл. 10) се вижда, че двете най-чести мутации, представени с по два алела, R408W и R261Q, са най-честите, като цяло в българската популация (виж табл. 12). Според проучване от 2011 г. *[Dobrowolski et al., 2011]*, най-честите мутации в турската популация са IVS10-11G>A (24.6 %), R261Q (8.7 %) и P281L (8.4 %), които за нашата популация от изследвани пациенти са съответно на трето, второ и пето място по честота. При нашите пациенти от турски произход се откриват втората и трета по честота мутации, характерни за турската популация, но не и най-честата, но се установява еднаква честота на R408W и R261Q. В турската популация R408W е пета по разпространение с честота около 6.4 % *[Dobrowolski et al., 2011]*. Въпреки малкия брой пациенти и липсата на установени генотипове при трима от тях, можем да заключим, че популацията на българите от турски произход, макар и по-малка е сравнително по-нехомогенна от тази в Турция, с по-малък брой близкородствени бракове (има само един хомозигот). Наличието на мутация, характерна за Европа (R408W) и мутация, неописвана до момента при пациент от турски произход (Y356X), доказва наличието на смесване на отделните етнически групи в българската популация. Интересно е да се отбележи, че мутацията Y356X е описана с висока честота в две доста отдалечени една от друга популации в Дания *[Guldberg et al., 1993]* и Япония *[Okano et al.,1994]*. Честотата на мутацията в описаната японска популация от 203 пациенти е 1.7 %, което е почти идентична с честотата в нашата пациентска група, при честота на ФКУ в Япония 1:120 000, т.е. около 6 пъти по-малка от тази в България *[Okano et al., 2011]*. Тази мутация се описва с относително висока честота в Северен Китай и корейската популация.

Таблица 11. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от турски етнически произход

ID	Алел 1	Алел 2	Фенотип	Генотип
P8	p.P281L	p.R408W	класическа ФКУ	G7
P19	IVS4-5C>G	p.Y356X	Лека ФКУ	G15
P21	NA	NA	лека ФКУ	-
P41	p.R261Q	p.R261Q	умерена/лека ФКУ	G25
A6	NA	NA	класическа ФКУ	-
A9	p.R408W	NF	класическа ФКУ	G3
A13	NA	NA	класическа ФКУ	-

NA – не е изследван

В четвъртата етническа група – други, са поставени пациенти с различен от българския, турския и ромския етнически произход, както и пациенти от специфична етно-религиозна група, а именно българи мюсюлмани (A2, P42, P7). Пациент P12 е с българо-гръцки произход, а P15 е с полско-еврейско-руски. Интересно е да се отбележи наличието на трима пациенти с еднакъв генотип – G6, хомозиготи по най-честата мутация. При пациент P12 се открива мутация, характерна за южните славяни, но поради липса на достатъчно данни за мутационната честота в гръцката популация, не може да се търси съпоставка.

Таблица 12. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от друг етнически произход

ID	Алел 1	Алел 2	Фенотип	Генотип
A2	NA	NA	класическа ФКУ	-
P7	p.R408W	p.R408W	класическа ФКУ	G6
P12	p.L48S	p.R408W	Лека ФКУ	G9
P15	p.R408W	p.R408W	класическа ФКУ	G6

P42	p.R408W	p.R408W	Умерена ФКУ	G6

NA – не е изследван

В групата на пациентите от български етнически произход (табл. 12) се вижда, че най-честа е мутацията R408W (17 алела), следвана от R261Q (13 алела), IVS10-11 (8 алела), L48S (5 алела), P281L (5 алела). Тази последовтелност се запазва и като обща тенденция за цялата група (виж табл. 13), поради това, че пациентите с български етнически произход са мнозинство. В групата има четирима пациенти, които са хомозиготи по най-честата (трима) и втората по честота (един) мутации.

Таблица 13. Мутации, фенотип и генотип при пациенти от български етнически произход

ID	Алел 1	Алел 2	Фенотип	Генотип
P1	p.P366H	p.A434D	ХФА	G1
P2	p.L48S	p.R261Q	класическа	G2
P3	p.R408W	NF	класическа	G3
P4	p.R261Q	IVS10-11G>A	класическа	G4
P5	p.L48S	IVS10-11G>A	класическа	G5
P6	p.R408W	p.R408W	умерена	G6
P9	NA	NA	умерена/лека	-
P10	NA	NA	класическа	-
P11	p.E221_222>Efs	p.V388M	класическа/умерена	G8
P13	p.R261Q	p.R261X	класическа	G10
P14	p.R261Q	p.T380Gfsh	умерена	G11
P16	p.R261Q	p.R408W	умерена	G12
P17	p.R158Q	p.R408W	класическа	G13
P18	IVS4+5G>T	c.927_932del2bp	лека	G14
P22	p.R408W	NF	умерена/лека	G3
P23	p.P211T	p.R408W	лека	G17
P24	NA	NA	класическа	-
P25	p.R261Q	p.Y414C	класическа/умерена	G18
P26	p.P281L	p.R408W	класическа/умерена	G7
P27	NA	NA	класическа	-
P28	p.P281L	NF	класическа	G19
P29	p.R241C	p.P281L	лека	G23
P32	p.R158Q	p.R261X	класическа	G24
P33	p.R408W	IVS10-11G>A	класическа/умерена	G20
P34	IVS7+4A>G	IVS10-11G>A	умерена	G21
P35	p.R408W	p.P281L	умерена	G7

P36	p.R158Q	p.R261Q	класическа	G22
P37	p.L48S	IVS10-11G>A	умерена/лека	G5
P38	p.R261Q	p.Y414C	ХФА	G18
P39	p.R261Q	IVS10-11G>A	класическа	G4
P40	p.R261Q	p.R261Q	лека	G25
A1	p.F55l>fs	p.R261Q	класическа	G26
A3	p.L48S	p.Y356X	класическа	G27
A4	p.R408W	p.R408W	класическа	G6
A5	p.R408W	p.R408W	класическа	G6
A7	p.A322T	IVS10-11G>A	класическа	G28
A8	p.E221_222>Efs	p.R408W	класическа	G29
A10	p.P281L	IVS10-11G>A	класическа	G30
A11	p.R408W	p.R261Q	класическа	G12
A12	NA	NA	класическа	-
A14	NA	NA	класическа	-
A15	p.L48S	p.R408W	класическа	G9

NA – не е изследван

На табл.13 се вижда алелната честота за различните мутации, установени в нашето проучване в сравнение с алелната им честота от BIOPKU.

Таблица 14. Алелна честота на мутациите

Мутация	Брой	Алелна честота, %	Алелна честота BIOPKU, %
p.R408W	27	23.68	21.2
p.R261Q	15	13.15	5.57
IVS10-11G>A	9	7.89	6.9
p.L48S	6	5.26	2.94
p.P281L	6	5.26	3.29
p.R158Q	3	2.63	3.07
IVS4+5G>A	2	1.75	0.172
p.E221_222>Efs	2	1.75	
p.R261X	2	1.75	0.84
p.Y356X	2	1.75	0.338
p.Y414C	2	1.75	2.86
c.927_932del2bp*	1	0.88	
IVS4+5G>T	1	0.88	0.9
IVS4-5C>G	1	0.88	0.129
IVS7+4A>G	1	0.88	
p.A322T	1	0.88	
p.A434D	1	0.88	0.123

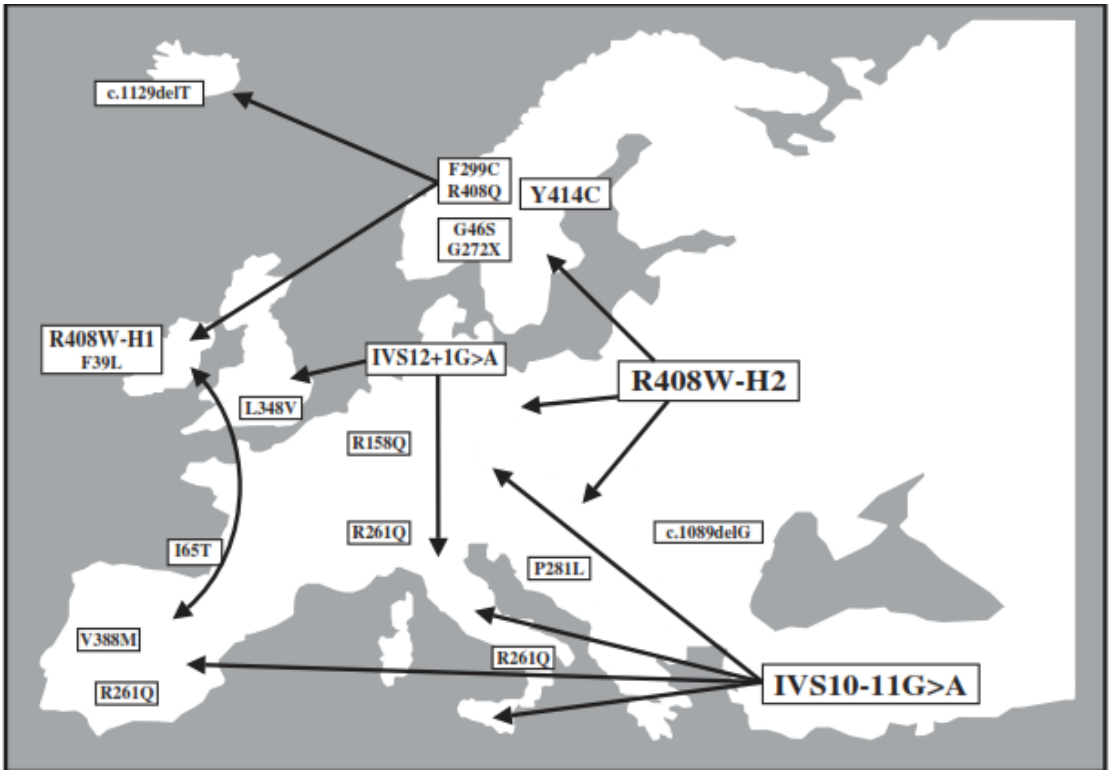
p.F55l>fs	1	0.88	0.97
p.P211T	1	0.88	0.209
p.P366H	1	0.88	
p.R241C	1	0.88	1.07
p.T380Gfsh*	1	0.88	
p.V388M	1	0.88	1.76

*В лилаво са отбелязани мутациите, които за първи път са установени при настоящото проучване.

По отношение на първите пет по честота мутации в българската популация, съществена разлика се наблюдава само по отношение на честотата на p.R261Q, която е с два пъти по-голяма честота от регистрираната в BIOPKU. При останалите мутации са описани много малък брой алели, поради което не е редно да се говори за съпоставимост на резултатите. Въпреки малкия брой изследвани пациенти, тенденцията за честота на алелното разпределение в българската популация следва тази на повечето европейски популации. Трудно е да се направи точно сравнение за близките популации от Балканския регион, поради ограничените данни, които са налични са някои от страните. Известно е, че в Хърватия има сравнително висока честота на мутациите P281L и R261Q, както и на сравнително рядката за Европа – E390G *[Baric et al., 1992; Zschocke et al., 2003]*. Според предишни проучвания в България има сравнително висока честота на мутацията IVS10–11G>A *[Kalaydjieva et al., 1993]*, което се потвърждава и от нашите резултати. В Румъния има данни за мутационен анализ на 22 семейства с ФКУ, като не всички са от румънски произход и трите най-чести мутации открити при тях са R408W, c.1089delG и P225T, като последните три са сравнително редки в европейски план *[Popescu et al., 1998]*. Данните за Гърция се базират на проучвания с ниска степен на откриване на мутациите (около 30 %), при което се установява около 10 % относителна честота за мутациите P281L и IVS10–11G>A *[Traeger-Synodinos et al., 1994]*. На фиг. 17 е представено схематично разпределение на най-честите мутации в Европа, както и възможния миграционен път.

Най-честата мутация сред нашите пациенти е p.R408W. Те я и най-често във всички популации от славянски произход, като Литва – 73.4 % *[Kasnauskiene et al., 2003]*, Унгария 49 %, Румъния 48 %, Хърватия 37 % *[Zschocke et al., 2003]*. В предишно проучване,

проведено в България на 29 пациенти, изследвани за петте най-чести мутации в европейската популация, е установена честота на p.R408W около 34 % *[Kalaydjieva et al., 1990]*. Въпреки, че е свързана основно със славянските популации, тя съставлява около 63 % от мутациите на пациенти с ФКУ в Далечния Изток на Русия *[Sueoka et al., 1999]*. В САЩ честотата на мутацията варира, като е най-висока в щатите Тексас 19 % *[Yang et al., 2011]*, Джорджия *[Woo et al., 1994]* и Калифорния *[Enns et al., 1999]*, сред пациентите с европейски корени. Мутацията е най-честа за европейската популация, но е свързана с различни хаплотипове, които превалират в един или друг регион.



Фигура 17. Разпространение на най-честите мутации в Европа. *[Zschocke et al. 2003]*

Особен интерес представлява мутацията p.L48S, която се установява с честота около 5.26 % в българската популация, за разлика от преобладаването ѝ с около 31 % в

сръбската *[Djordjevic et al. 2012]* и 21 % в сръбско-черногорската популации *[Stojiljkovic et al. 2006]*, които са географски и исторически близки до българската. Мутацията е описана за първи път в Турция *[Konecki et al. 1991]*, а по-късно и в други европейски популации, като българска, румънска, чешка, немска, белгийска (2 %), хърватска, сицилианска (5 %), южноиталианска (11 %); турска популация в Германия (9.2-13.3 %) *[Zschocke et al. 2003; Aulehla-Scholz et al. 2003]*. Проучването на *Dianzani et al.* показва, че p.L48S е чест алел в Южна Италия (12.6 %), докато в Северна Италия се открива в едва 1.5 %. Счита се, че този градиент от север на юг, наблюдаван сред населението на континентална Италия, се дължи на праисторическо колонизиране на Италия от неолитни фермери, идващи от Близкия изток *[Zschocke et al. 2003; Dianzani et al. 1994]*. Подобно на разпространението в Италия, мутацията p.L48S сред славянските популации в Северна и Централна Европа е много рядка, ако въобще е описана. Докато при славяните от Южна Европа тази мутация е с по-висока честота: Хърватия 5 %, Сърбия и Черна гора 21 % *[Stojiljkovic et al. 2006]*. Според споменатите проучвания тези разлики в честотата се обясняват със смесването на славяните с автохтонни популации, населяващи региона и влиянието на неолитните миграции в източно-западна посока. Все пак голямата разлика в честотата на българската и сръбско-черногорската популации по отношение на мутацията p.L48S, най-вероятно се дължи и на т.нар. „ефект на праотеца-основател“.

Мутацията R261X е локализирана в екзон 7 и е nonsense мутация, засягаща каталитичния домейн в CBR1 – кофактор свързващ регион, подобно на R261Q. Тя е описана за първи път в проучване на честите мутации в екзон 7, вкоето са включени и български пациенти *[Dworniczak et al., 1991]*.

Мутации IVS4+5G>T, IVS4-5C>G и IVS7+4A>G са сплайсинг дефекти на некаталитичния домейн. Първите две са локализирани в интрон 4, а последната в интрон 7. IVS4+5G>T е описана за първи път сред полски пациенти с лека ХФА *[Zekanowski et al., 1997]*, IVS4-5C>G е открита и описана за първи път при пациенти от Сицилия *[Guldberg et al., 1993]*, а в първото мащабно изследване на ФКУ пациенти от Турция е регистрирана IVS7+4A>G *[Dobrowolski et al., 2011]*. По-късно и трите мутации са описани в испанската *[Bueno et al., 2013]*, италианската *[Fiori et al., 2005]*, мексиканската *[Vela-Amieva et al.,*

2015] и португалската *[Rivera et al., 2011]* популации, като в последната съставят над 15 % от общия брой мутации. Това доказва връзката на генетичните вариации при българската популация с тези на населението в северния средиземноморски регион.

Мутация p.F55l>fs (c.165delT) е делеция, засягаща регулаторния домейн и е локализирана в екзон 2. Описана е за първи път, като мутация с промяна в рамката на четене във втори екзон, свързана с хаплотип 1 *[Eigel et al., 1991]*. Мутацията е и втора по честота (7.69 %) в сирийската популация *[Murad et al., 2013]*. Сред първите три по честота е и в щата Джорджия в САЩ, където заедно с R408W и L348V, според доказват британския произход на населението, което най-често съобщава за началото си от ирландски, английски и шотландски предци *[Woo et al., 1994]*.

Единствената описана от нас мутация в екзон 5 е p.R158Q (c.473G>A), която е тип missense и засяга каталитичния регион *[Dworniczak et al., 1989]*.

Мутацията Y414C се счита за най-честа в скандинавските страни и най-вече Швеция *[Svensson et al., 1992]* и е описана за първи път в рамките на мащабно проучване за хетерогенността на пациентите с ФКУ *[Okano et al., 1991]*. Това е missense мутация, локализирана в 12^{ти} екзон и засяга олигомеризационния домейн на ензима. Характеризира се със сравнително висока ОЕА от 57 %.

Една от двете мутации, които устновяваме в девети екзон е p.A322T (c.964G>A). Първите данни публикувани за тази мутация са в рамките на проучване за молекулните основи и полиморфизмите, засягащи ФАХ-ген при пациенти с хиперфенилаланинемии *[Eisensmith et al., 1992]*. Тя е missense мутация, засягаща каталитичния домейн в кофактор-свързващ регион (CBR3).

Вторият екзон по честота на засягане в нашата група пациенти е екзон 12. Една от мутациите, които откриваме там е p.V388M (c.1162G>A). Тя е с ОЕА 28 %, засяга каталитичния домейн и е missense мутация. Описана е за първи път и със сравнително висока честота в датската популация *[Guldberg et al., 1999]*. По-късно се описва с честота 10.8 % в португалската популация *[Rivera et al., 2011]*.

Една от четирите описани делеции, засягаща каталитичния домейн и локализирана в 6 екзон е p.E221_222>Efs (c.663_664delAG). Остатъчната ензимна активност при тази мутация е нулева, но е описана, като една от мутациите, при които следва да се прави продължително натоварване със сапроптерин за определяне на респондерния статус *[Fiege et al., 2005]*.

В екзон 9 е локализирана нова делеция, засягащи каталитичния домейн, открита при настоящото проучване. Липсват данни за остатъчната ѝ ензимна активност.

3. Обсъждане на фенотипния анализ

Фенотипното разпределение на нашата група пациенти е представено на фиг. 16 в глава „IV. Резултати“. Прави впечатление, че пациентите в групата над 18 г. са с изява на класическа фенилкетонурия, дори в случаите, когато имат еднакъв фенотип с пациенти под 18 г. с по-лека изява на заболяването. Освен възможността за вариации в рамките на един и същ генотип, не може да се изключи и ефект от т.нар. „метаболитно програмиране“, при което пациенти неспазващи диетата, намаляват фенилаланиновия си толеранс, което води до класифицирането им във фенотипно по-тежка група. В допълнение към това, тези пациенти губят възможността да реагират адекватно на ОСТ, като могат да дадат фалшиво негативен отговор.

4. Обсъждане на корелацията фенотип-генотип

Под метаболитен фенотип се разбира клиничната изява на дадено метаболитно заболяване, в нашия случай, това са клиничните форми според класификацията на *Guldberg et al.* (табл. 2). Определянето на всяка една генотип-фенотип корелация има два аспекта: определяне на фенотипната асоциация на всяка мутация и определяне на

фенотипната изява на комбинация от мутации (два алела взаимодействащи в рамките на даден генотип).

4.1. Обсъждане на корелацията мутация-метаболитен фенотип

Поради влиянието на двата алела един върху друг, за да се дефинира връзката между дадена мутация и фенотипната ѝ изява, е необходимо тя да бъде разгледана в хомозиготно състояние и в състояние на функционална хемизиготност (т.е. в съчетание с „нулев“ алел – мутация, категорично определяща неактивен продукт). Базирайки се на тези данни, впоследствие може да се търси влияние между различните мутации при съставните хетерозиготи.

Таблица 15. Мутация-метаболитен фенотип

Мутация	Фенотип по литературни данни	Фенотип при наши пациенти*
p.R408W (c.1222C>T)	Класическа ФКУ	Умерена/класическа (умерена, класическа)
p.R261Q (c.782G>A)	Умерена, класическа ФКУ	Класическа (лека, умерена)
IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	Класическа ФКУ	класическа
p.L48S (c.143T>C)	Лека, умерена, класическа ФКУ	Класическа, умерена/лека
p.P281L (c.842C>T)	Класическа ФКУ	Класическа ФКУ
p.R158Q (c.473G>A)	Умерена, класическа ФКУ	Класическа ФКУ
IVS4+5G>A (c.441+5G>A)	Класическа ФКУ	(класическа ФКУ)
p.E221_222>Efs (c.663_664delAG)	Класическа ФКУ	-
p.R261X (c.781C>T)	Класическа ФКУ	-
p.Y356X (c. 1068C>A)	Класическа ФКУ	Лека ФКУ
p.Y414C (c.1241A>G) C	Лека, класическа, умерена ФКУ, ХФА	-
c.927_932del2bp	-	Лека ФКУ
IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	Класическа ФКУ	-
IVS4-5C>G (c.442-5G>A)	Лека ФКУ	-

IVS7+4A>G (c.842+4A>G)	Класическа ФКУ	Умерена ФКУ
p.A322T (c.964G>A)	Класическа ФКУ	Класическа ФКУ
p.A434D (c.1301C>A)	Класическа ФКУ	-
p.F55l>fs (c.165delT)	Класическа ФКУ	-
p.P211T (c.631C>A)	некласифицирана	-
p.P366H (c.1097C>A)	некласифицирана	-
p.R241C (c.721C>T)	Лека ХФА	-
p.T380Gfsh (c.1138_1139delAC)	-	-
p.V388M (c.1162G>A)	Умерена ФКУ	Класическа/умерена ФКУ

***** Фенотипът при наши пациенти е въведен само при наличие на функционален хемизигот, а в скоби е фенотипът при хомозиготна комбинация, ако има такъв.

При 11 от мутациите, не можем да направим сравнение с установения от нас фенотип поради липсата на функционални хемизиготи и хомозиготи по мутацията. При IVS4+5G>A имаме хомозигот, но не и комбинация с нулева мутация, а само по отношение на първите две по честота мутации имаме и функционални хемизиготи и хомозиготи. При мутациите R408W и R261Q се забелязва изразена вариабилност в установените при нашите пациенти фенотипове, особено в случаите с хомозиготно носителство. Видимо отклонение от очакваната по литературни данни изява се наблюдава при мутацията Y356X, която е описвана, като свързана с класическа ФКУ *[Guldberg et al., 1998]*, докато при нашия пациент (функционален хемизигот) се изявява с лека ФКУ, в съчетание с мутация в интрон 4. Същата мутация Y356X, в съчетание с L48S, която е с над 30% ОЕА, се проявява, като класическа ФКУ. Тези различия дават основание да се счита, че асоциирането на дадена мутация с определена клинична изява не може да бъде еднозначно за по-голяма част от мутациите.

4.2. Обсъждане на корелацията мутация-респондерен фенотип

Освен известна корелация с метаболитния фенотип, мутациите на PAH-ген дават до известна степен информация, дали пациентът ще отговори или не на приложение на

орален сапроптерин. Този тип корелация също се прави при функционални хемизиготи и хомозиготи по изследваната мутация.

Таблица 16. Мутация-респондерен фенотип

Мутация	Фенотип по литературни данни	Фенотип при наши пациенти*
p.R408W (c.1222C>T)	нереспондер	±
p.R261Q (c.782G>A)	±	±
IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	нереспондер	-
p.L48S (c.143T>C)	±	-
p.P281L (c.842C>T)	нереспондер	-
p.R158Q (c.473G>A)	нереспондер	нереспондер
IVS4+5G>A (c.441+5G>A)	нереспондер	нереспондер
p.E221_222>Efs (c.663_664delAG)	нереспондер	-
p.R261X (c.781C>T)	нереспондер	-
p.Y356X (c. 1068C>A)	нереспондер	-
p.Y414C (c.1241A>G) C	респондер	-
c.927_932del2bp	-	-
IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	нереспондер	-
IVS4-5C>G (c.442-5G>A)	-	-
IVS7+4A>G (c.842+4A>G)	-	-
p.A322T (c.964G>A)	-	нереспондер
p.A434D (c.1301C>A)	-	-
p.F55l>fs (c.165delT)	нереспондер	-
p.P211T (c.631C>A)	некласифициран	-
p.P366H (c.1097C>A)	-	-
p.R241C (c.721C>T)	некласифициран	-
p.T380Gfsh (c.1138_1139delAC)	-	-
p.V388M (c.1162G>A)	нереспондер	нереспондер

* Фенотипът при наши пациенти е въведен само при наличие на функционален хемизигот, а в скоби е фенотипът при хомозиготна комбинация, ако има такъв; ± налице са данни за наличие и за липса на отговор;

При сравнение с литературните данни се открива, че R408W описвана, като категорично нереспондерна мутация, се открива в хомозиготно състояние при един от нашите респондери, за когото по нагоре в обсъждането се уточни, че е подложен двукратно на ОСТи е проследяван дълъг период от време, за да се гарантира

положителния му респондерен статус. За мутацията L48S не откриваме респондери в нашата група (хемизиготи или хомозиготи), поради което нашият резултат не потвърждава този от наличната литература, докато за A322T до момента не е описван респондерен статус, в нашата група е изследван пациент, при когото мутацията е съчетана с IVS10-11G>A (с нулева OEA), който е нереспондер.

Въз основа на литературните данни и получените от нас резултати, може да се приеме, че корелацията между определена мутация и респондерния статус не е постоянна и еднозначна, поради което не би трябвало да се използва за взимане на решение относно лечението на пациентите.

4.3. Обсъждане на корелацията генотип-фенотип

Мутациите, установени в настоящото проучване се разпределят в 30 различни генотипа, представени на табл. 6, заедно с клиничната им изява при нашите пациенти. С положителен отговор към приложение на сапроптерин са свързани генотиповете G1, G2, G4, G5, G6, G7, G11, G14, G17, G23 и G25. Генотипове G1, G8, G11, G14, G19 и G23 са описани за първи път при нашите пациенти и до момента остават единствените описани с тази комбинация от мутантни алели.

Генотип G1 е съставен от две мутации A434D и P366H. И двете мутации не са класифицирани по отношение на респондерния си статус, а за P366H липсват данни, както за OEA, така и за свързания с нея метаболитен фенотип. A434D се изявява, като класическа ФКУ при функционални хемизиготи и хомозиготи и има 3% OEA. Това е единствената мутация от установените в нашето проучване, чиито изчисления за FoldX функцията са направени в тетрамерна форма, а не в нефосфорилирана димерна, както е при останалите. Това се дължи на факта, че мутацията сериозно нарушава олигомеризацията на ФАХ и формира аберантен протеин, с много високо ниво на енергиен

дисбаланс в димерната структура. Този генотип при нашия пациент се изявява с ХФА, но поради липсата на допълнително данни не може да се направи обективна корелация.

Генотип G2 е съставен от мутациите L48S и R261Q, които са съответно с 39% и 44% OEA, проявяват се предимно, като умерена и класическа ФКУ. При двете мутации са описани пациенти с отрицателен и с положителен отговор към сапроптерин. В BIOPKU са регистрирани 42 пациенти с този генотип, като при 64.29% клиничната изява е лека ФКУ, при 33.33% - класическа ФКУ, а при 2.38% - ХФА. От регистрираните случаи за респондерен статус са тествани 29 пациенти, от които 75.86% са респондери, 17.24% не отговарят на теста, а 6.9% дават бавен отговор. Нашият пациент с този генотип е с клиниката на класическа ФКУ и отговаря на приложението на сапроптерин.

Генотип G3 е комбинация от R408W и неуточнена мутация, установен при трима наши пациенти, от които двама са с класическа ФКУ, а един е с лека към умерена форма. Пациентите подлежат на допълнително изследване и уточняване. Наличието на бавен отговор при единия от пациентите (P22) предполага възможност за нова проверка на респондерния статус.

Генотип G4 е съставен хетерозиготен генотип от R261Q и IVS10-11G>A. Двете мутации се изявяват предимно, като умерена или класическа ФКУ. В нашата група пациенти с този генотип и класическа ФКУ са двама, като само единият е доказан, като респондер в рамките на настоящото проучване. На втория пациент също е доказан положителен респондерен статус, но тъй като ОСТ е проведен по-късно, неговият отговор не е включен в представените данни. С този генотип в BIOPKU са регистрирани 61 пациенти, от които 27.87% са с лека ФКУ, а 72.13 – с класическа. От тях са тествани 34, като респондери са 5.88%, с бавен отговор 11.76% и 82.35% са нереспондери. Мутацията R261Q има 44% OEA, докато втората мутация от генотипа е с 0% активност. Наличието на отговор, макар и при малък процент пациенти показва, че при този генотип е задължително провеждането на ОСТ.

Генотип G5 е представен при двама наши пациенти, като клиничната изява при единия е умерена/лека ФКУ, а при другия – класическа форма. Двете мутации,

определящи генотипа са L48S и IVS10-11G>A. От описаните в базата данни 29 случая с този генотип, 65.52% са с лека ФКУ, 31.03% - с класическа, а 3.45% с ХФА. От тях са тествани 20, като в 40% има положителен отговор, в 25% бавен отговор, а при 35% липсва отговор към сапроптерин. В нашата група има един респондер с този генотип (P37), а другият е с бавен отговор (P5), което предполага възможност за ново провеждане на ОСТ.

Генотип G6 е хомозиготна комбинация на R408W. С този генотип са описани 821 пациенти в BIOPKU, като 0.37% (трима) са с лека ФКУ, а останалите 99.63% - с класическа. От тестваните 73 пациенти няма нито един респондер. В нашата група с този генотип са 6 пациенти, като клиничната картина при четирима от тях е класическа ФКУ, а при двама – умерена ФКУ. Респондер е само един пациент с този генотип, който е от групата над 18 г. и е с класическа ФКУ. Единият от пациентите от педиатричната група (P42) дава бавен отговор при ОСТ. Някои автори възприемат бавния отговор, като частичен такъв *[Trefz et al., 2009]* и предлагат тези пациенти да бъдат тествани повече от веднъж или да се приложи сапроптерин за по-продължителен период и да се изследва промяната във фенилаланиновия толеранс.

Генотип G7 е комбинация от мутациите P281L и R408W. Двете мутации са с еднаква, ниска ОЕА – 2%, проявяват се с класическа ФКУ и са по правило нереспондерни. В нашата група има 3 пациенти с този генотип, като един е с класическа ФКУ, един с умерена към класическа и един с умерена ФКУ, който е и респондер. От описаните в базата данни 83 случая с тази комбинация от алели, само 2.41% са с лека ФКУ, а останалите 97.59% са с класическа форма. Тествани са 19 пациенти, от които не е установен нито един респондер. В случая нашият пациент представлява единствен описан респондер с този генотип, което доказва отново необходимостта от провеждане на ОСТ.

Генотип G8 е описан само при един наш пациент с умерна към класическа ФКУ. Генотипът е комбинация от p.E221_222>Efs и V388M.. Двете мутации са нереспондерни по литературни данни *[Guldberg et al., 1997; Sarkissian et al., 2011]* и се изявяват съответно, като класическа и умерена ФКУ. Първата мутация е с 0% на ОЕА, докато V388M е с 28%. Интересно е да се отбележи, че една missense мутация с не особено висока

ОЕА, успява да „смекчи“ фенотипната изява на делеция, която по правило протича с тежка клиника. Нашият пациент е първият описан в литературата случай с този генотип. Пациент P11 от нашата група дава бавен отговор при ОСТ

Генотип G9 е съставен от L48S и R408W и се установява при двама наши нереспондерни пациенти, като пациентът под 18 г. е с лека ФКУ, а този от групата над 18 г. – с класическа ФКУ. В базата данни са регистрирани 69 случая с този генотип, като 43.48% са с лека ФКУ, а 56.52% - с класическа. От регистрираните случаи, ОСТ е проведен при 30, като в 20% е налице положителен отговор, в 6.67% - бавен и в 73.33% - липсва отговор. От нашите пациенти P12, който е с лека ФКУ има бавен отговор при ОСТ.

Генотип G10, който се установява при един наш пациент, е съставен от мутациите R261Q и R261X. Първата мутация е по-вариабилна като клинична изява, както по литературните данни, така и по отношение на установените от нас (табл.14 и табл.15), докато втората мутация твърдо се описва, като свързана с класическа ФКУ и нереспондерен статус. В базата данни са регистрирани 9 случая с този генотип, от които 11.11% са с лека ФКУ, а 88.89% - с класическа. От изследваните 4, няма нито един респондер, както е и в нашия случай.

Генотип G11 се описва за първи път в настоящото проучване при респондерен пациент с умерена ФКУ. Съставен е от мутациите R261Q и T380Gfsh, засягащи кталитичния домейн. Първата мутация е с 44% ОЕА, а за втората липсват данни, тъй като се описва за първи път от нашия екип *[Кадъм и др., 2015; Kathom et al., 2014]*. Локализацията на R261Q в кофактор-свързващ регион на ФАХ може да обясни отговора към сапроптерин, както и сравнително леката клинична картина на фона на делеция, която определя по-тежък фенотип. Това корелира и с клиничната изява и респондерния статус на R261Q (табл. 14 и табл. 15).

Генотип G12 се установява при двама наши пациенти – един с умерена ФКУ (под 18 г.) и един с класическа (над 18 г.). Генотипът е съставен от R261Q и R408W. От регистрираните в BIOPKU 114 случая с този генотип, 52.63% са с лека ФКУ, 47.37% - с класическа, а от тестваните 32 пациенти с бърз отговор са 6.25%, с бавен – 9.38%, а при

84.38% - липсва отговор. Нашите двама пациенти са нереспондери, въпреки наличието на по-лека клиника при единия. Този генотип се счита за един от най-вариабилните и се описват пациенти с намаление на ФА нива под 9%, от 10 до 29% и категорични респондери с над 30% намаление *[Desviat et al., 2004; Erlandsen et al., 2004; Matalon et al., 2005]*. Това предполага възможността за повтаряне на ОСТ, както и за евентуално продължително приложение на сапроптерин и проследяване на ФА-толеранс.

Генотип G13 е представен само от един пациент, с класическа ФКУ, в нашата група. В рамките на генотипа влизат мутациите R158Q и R408W. От 125 регистрирани случая, лека ФКУ се открива в 8%, а в 92% - класическа ФКУ. ОСТ е проведен при 23 пациенти, като положителен и бавен отговор има при еднакъв брой - 8.7%, а в 82.61% - липсва отговор. Двете мутации засягат каталитичния регион и са с ниска ОЕА – 2% за R408W и 10% за R158Q. По литературни данни се изявяват с класическа, нереспондерна ФКУ (табл. 14 и табл. 15).

Генотип G14 е установен за първи път в настоящото проучване, като едната от съставящите го мутации - c.927_932del2bp е описана само от нашия екип. Пациентът с този генотип е обсъден подробно при разглеждането на респондерите.

Генотип G15 е налице при един наш пациент с лека ФКУ и представлява комбинация от сплайсинг мутация IVS4-5C>G в интрон 4 и Y356X – nonsense мутация в екзон 11. В базата данни има 3 регистрирани случая с този генотип, като 66.67% са с лека ФКУ, а 33.33% с ХФА. От двамата подложени на ОСТ единият пациент е респондер, а другият – не. Нашият пациент е респондер, но ОСТ е проведен след приключване на обработката данните, поради което не е включен в настоящия труд. Въпреки че липсват данни за ОЕА на двете мутации е известно, че Y356X се свързва с нереспондерна класическа ФКУ, докато IVS4-5C>G се описва в рамките на лека ФКУ, което съвпада с нашия пациент, но също е нереспондерна. Това доказва наличието на допълнителни взаимодействия и епигенетични фактори, които определят отговора към сапроптерин.

Генотип G16 е хомозиготно състояние на IVS4+5G>A, които се открива само при един наш пациент с класическа, нереспондерна ФКУ. В BIOPKU са регистрирани два

случая с този генотип, като подобно на нашия пациент и двата случая са с класическа ФКУ и не отговарят на ОСТ. Този пациент има брат, починал в ранна детска възраст с усложнения на ФКУ, поради неспазване на диета.

Генотип G17 се установява при един пациент с лека ФКУ, който е и респондер. Генотипът е описан подробно при обсъждането на резултатите от ОСТ.

Генотип G18 откриваме при двама наши пациенти с умерена към класическа ФКУ и с ХФА. Генотипът е съчетание на мутациите R261Q и Y414C, с ОЕА съответно 44% и 57%. ОСТ е проведен само при единия пациент, който е категоричен респондер, но не е включен в настоящите данни, тъй като тестът е проведен след тяхната обработка. В базата данни този генотип е представен от 15 регистрирани случая, от които 86.67% са с лека ФКУ, 6.67% - с класическа и 6.67% с ХФА. От изследваните за отговор към сапроптерин 13 пациенти, само един (7.69%) е дал бавен отговор, а всички останали 92.31% имат бърз положителен отговор. Двете мутации в рамките на генотипа са описани като респондерни с вариабилна клиника, включваща предимно леки форми на заболяването. При този генотип се наблюдава почти пълна, позитивна корелация между мутационните фенотипове и фенотипа на крайния генотип.

Генотип G19 е четвъртият от общо пет генотипа, които са представени за първи път в настоящия труд, но не го описваме, като нов генотип, поради наличието само на една мутация. Установен е при един наш пациент с класическа ФКУ и представлява генотип с една установена мутация P281L, без наличие на друга (секвениран е целия ген, проведен е анализ за микроделеции и дупликации, изследвани са подробно двамата родители – майката /пациент А10/ е с класическа ФКУ и генотип G30, а при бащата не се установяват мутации). Пациентът е с клиниката на класическа ФКУ, протичаща на фона на тежък майчин ФКУ синдром – микроцефалия, тежка вродена сърдечна малформация, изоставане в нервно-психическото развитие, пирамидна симптоматика и лицев дисморфизъм, дължащ се на неспазване на диетата от страна на майката преди концепцията и по време на бременността. Повишените нива на фенилаланин не се дължат на потискане на ФАХ-

система от високите ФА-нива на майката, тъй като те персистират до момента (пациентът е на 4-годишна възраст).

Генотип G20 е установен при двама наши пациенти с умерена към класическа ФКУ. ОСТ е проведен само при един от тях, който е нереспондер. Двете мутации в рамките на генотипа са R408W и IVS10-11G>A, съответно с 2% и 0%, остатъчна ензимна активност. Към настоящия момент са регистрирани 116 случая с този генотип, от които с лека ФКУ са 6.9%, а 93.1% са с класическа форма. От тестваните 21 пациенти, има един респондер, един с бавен отговор и 19 (90.48%) са нереспондери. С оглед на това, че двете мутации се описват, като нереспондерни и свързани с класическа ФКУ, при този генотип е налице почти пълна корелация между фенотипните изяви на отделните мутации и крайния генотип.

Генотип G21 е представен от един пациент в нашата група, с клиниката на умерена ФКУ. Съставен е от два сплайсинг дефекта IVS7+4A>G и IVS10-11G>A, в некаталитичния регион. Генотипът е сравнително рядък и в базата данни има регистриран само един случай с изява на класическа ФКУ. Двете мутации се свързват с класическа ФКУ, като само за втората има данни, че е по правило нереспондерна (табл. 14 и табл. 15). Липсват данни за респондерния фенотип, отговарящ на този генотип, а при нашия пациент не е проведен ОСТ.

Генотип G22 е хетерозиготна комбинация на R158Q и R261Q. Установява се при един наш пациент с класическа ФКУ. В BIOPKU са регистрирани 20 случая с този генотип, от които 60% са с лека ФКУ, а 40% - с класическа. От тестваните 9 пациенти, бавен отговор има при един, 44.44% са с положителен отговор и също толкова не отговарят на приложението на сапроптерин. Поради наличната ОЕА, 10% за R158Q и 44% за R261Q, и описването на вариабилна клинична картина, включително леки форми и при двете мутации, както и фактът, че нашият пациент е с лош контрол на фенилаланина, може да се приеме, че липсата на отговор в този случай не е категорична и тестът следва да бъде повторен. Липсата на добър контрол може да компрометира, както метаболитния, така и респондерния фенотип.

Генотип G23 е съставен от познати мутации, R241C и P281L, но комбинацията от тях се описва за първи път в настоящата дисертация. Установен е при един наш пациент с лека ФКУ, който дава положителен отговор на ОСТ. Двете мутации имат сравнително ниска остатъчна активност – 2% за P281L и 25% за R241C, като и двете са локализирани в екзон 7 и засягат каталитичния район. Мутацията P281L е свързана с нереспондерен статус и класическа ФКУ, докато за R241C липсват данни за респондерния фенотип, но е свързана с лека ФКУ. Видимо комбинацията от двете мутации се изразява във фенотип, по-лек, отколкото на всяка една мутация в хемизиготно или хомозиготно състояние.

Генотип G24 е съставен от мутациите R158Q и R261X и се открива при един наш пациент с класическа, нереспондерна ФКУ. От 5 регистрирани в BIOPKU случая, няма тествани за отговор към сапроптерин и всички са с класическа форма на заболяването. При нашия пациент е установен и ювенилен артрит, като в литературата липват данни за подобна коморбидност. Фенотипът представлява функционално хемизиготно състояние за R158Q, тъй като втората мутация е с доказана нулева ОЕА. Двете мутации са по правило нереспондерни и свързани предимно с класическа форма на ФКУ.

Генотип G25 е хомозиготно състояние на R261Q. Установен е при двама пациенти с лека към умерена ФКУ и лека ФКУ. ОСТ е проведен само при втория пациент, който е респондер. Генотипът е представен в детайли при осбъждането на респондерите.

Генотип G26 е комбинация от мутациите p.F55l>fs и R261Q. Делецията p.F55l>fs е мутация, водеща до промяна в рамката на четене, засягаща регулаторния домейн *[Eigel et al., 1991]* и е свързана с нереспондерна, класическа ФКУ. От регистрираните 9 случая, 22.22% са с лека ФКУ, а 77.78% - с класическа, но по отношение на отговора към сапроптерин 40% са нереспондери, докато в 60% е налице бавен отговор. Това е предпоставка за възможно повлияване на ФА-толеранс при по-дългосрочно приложение на сапроптерин.

Генотип G27 е с регистриран в BIOPKU само един пациент с лека ФКУ, докато нашият пациент е с класическа форма. Наличието на мутациите L48S и Y356X, предполага

възможност за повтаряне на теста, поради споменатата вече вариабилност на L48S в комбинация с nonsense мутации *[Stojiljkovic et al., 2006]*.

Генотип G28 е представен в нашата група и в BIOPKU с един регистриран случай, като нашият пациент е с класическа ФКУ, а регистрираният в базата данни – с лека ФКУ. Генотипът е комбинация от A322T – missense мутация на каталитичния регион и IVS10-11G>A.

Генотип G29 също е сравнително рядък и има само един регистриран случай в базата данни, с класическа ФКУ, като нашия пациент. Генотипът е съставен от p.E221_222>Efs – делеция, засягаща каталитичния регион, с нулева OEA и R408W.

Генотип G30 е установен при един наш пациент с нереспондерна класическа ФКУ. Съставен е от мутациите P281L и IVS10-11G>A. Регистрирани са 21 случая с този генотип, като при 4.76% има изява на лека ФКУ, а в 95.24% - класическа. По отношение на отговора при ОСТ, положителен отговор има само в 28.57% от случаите, докато липса на отговор се отчита в 71.43%.

По отношение на генотиповете, представени при пациенти от групата на 18-годишна възраст, трябва да се отбележи, че изявата на класическа фенилкетонурия, не винаги е в корелация с генотипа, а зависи в голяма степен от дългия период на неспазване или неправилно спазване на диета. Поради същата причина се установява и разминаване в респондерния статус.

5. Обсъждане на FoldX стойностите и тяхната корелация

Определянето на енергетичните взаимодействия между отделните мутации се счита за един сравнително обективен начин за установяване на генотип-фенотипна корелация. При 14 от установените при нашето проучване мутации са изчислени параметрите на FoldX функцията.

При разглеждането на генотип G1 в светлината на експерименталното силово поле, се открива, че генотипът е съставен от мутациите: P366H с y0 = 2.4, което заедно с m-стойност <0.01, предполага ОЕА над 50% и клинична изява на ХФА и A434D с y0-стойност, предполагаща ОЕА 10-50% (реално 3%), а m-стойност (табл. 7), корелираща с класическа ФКУ и ОЕА под 10%. В съответствие с правилата за интерпретация на резултатите, при m-стойност прогнозираща по-тежък фенотип, следва да се прецени прогнозата. Интересното е, че от заложените за изчисления 14 мутации, единствено A434D се налага да бъде разглеждана не в състояние на нефосфорилиран димер (основното състояние за изчисления на стойностите на FoldX за ФАХ), а в тетрамерна структура, поради силното засягане на олигомеризацията. Това показва слабост на метода при прогнозиране на фенотипа, в резултат на засегнат олигомеризационен домейн, но като цяло корелацията на P366H с ХФА, каквато има при нашия пациент е водеща и по-точна в сравнение с корелирането на A434D.

Мутацията Y356X се свързва с нереспондерна класическа ФКУ, базирайки се на стандартната генотип-фенотип корелация (при функционални хемизиготи и хомозиготи), докато според FoldX стойностите (табл.7) мутацията предполага лека ФКУ, какъвто е случая и с нашия пациент P19. Това предполага вероятен отговор при повтаряне на теста при пациент A3, тъй като той е носител на същата мутация, комбинирана с L48S, която също предполага лека ФКУ. Най-вероятно изявата на класическа ФКУ (към момента на провеждане на настоящото проучване) и липсата на отговор се дължат на негативно „метаболитно програмиране“, като резултат от неспазването на диета.

За мутацията F55l>fs, FoldX функцията определя изява, като ХФА, докато стандартният корелационен анализ я свързва с класическа ФКУ. Пациентът, носител на тази мутация е над 18 г. и с лош метаболитен контрол, което не ни позволява да определим, доколко силовото поле е точно в този случай.

Съществува пълна корелация и съвпадение на фенотиповете, свързани с R408W, независимо от използвания метод. Екстремно високата стойност на y0 стойността (над 20) обяснява и тежката клиника при почти всички хомозиготи.

Мутация R158Q се определя, като свързана с ХФА, въпреки че ОЕА е 10%. При нашите пациенти не може да се потвърди корелацията, поради наличието на мутацията в съставни хетеозиготни генотипове с друга мутация с тежка клинична изява, като R261Q и R408W.

Мутацията P211T е некласифицирана до момента, но според FoldX стойностите следва да се изявява, като лека ФКУ. Тази корелация се доказва от нашия пациент P23, въпреки съчетанието с R408W.

Наличието на Y414C определя по-лека клинична картина, което се доказва от изявата при нашите пациенти P25 и P38. Съчетанието с мутация, водеща до класическа ФКУ, но с висока ОЕА (R261Q) не утежнява фенотипа, което най-вероятно се дължи на това, че m-стойността и на двете мутации е нула.

С класическа ФКУ се свързва и A322T, което съвпада със стандартната корелация и находката при нашия пациент.

С ХФА се свързва V388M, която има 28% ОЕА, но съчетанието с делеция при пациент определя по-тежкия фенотип.

С лека ФКУ са асоциирани P281L, R241C и L48S, като и трите са с нулева m-стойност. По отношене на y0 стойността (6.7, 4.4 и 5.9) се вижда ясно, че по-ниските нива на ОЕА, корелират с по-висока y0. Трите мутации създават ясна тенденция към по-леки фенотипове, особено при комбиниране с други мутации с ниска m-стойност на функцията.

В заключение можем да твърдим, че колкото по-висока е y0-стойността, толкова по-ниска е ОЕА, а ниските m-стойности обуславят „изтегляне“ на фенотипа към по-леката част на спектъра, особено при съставни хетерозиготи.

Определянето на корелация между FoldX стойностите и респондерния статус не е показателно поради това, че BH4 често има ефект на шаперон и това променя енергийната стабилност на молекулата, давайки много голям брой потенциални респондери (над 60%), докато реално отговорът към сапроптерин не е толкова висок и най-вероятно се повлиява силно от епигенетични фактори. Все още не е възможно едновременно „поставяне“ на два

протеина в силовото поле, което би представлявало идеален модел за изучаване на взаимодействията между продуктите на различните алели.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенилкетонурията и другите форми на хиперфенилаланинемия са може би най-подробно проучените метаболитни нарушения. Като резултат от това са открити множество мутации на фенилаланинхидроксилазния ген, които водят до различни по тежест патологични промени. До момента липсва 100 % корелация между генотипа и фенотипа, както по отношение на метаболитния статус, така и по отношение отговора към приложение на сапроптерин. Наличието на почти хиляда патологични мутации и множеството комбинации между тях, както и установяването на пациенти с доказана само една мутация на PAH-ген, затруднява откриването на една стабилна корелация. Развитието на съвременните технологии и успешното приложение на екзогенни ензими при лечението на някои метаболитни заболявания, създава предпоставка за все по-голяма ангажираност на учените в изучването на патогенетичните механизми на фенилкетонурията, с цел откриване на едно по-ефективно лечение и подобряване контрола на заболяването.

В нашето проучване бяха изследвани 57 пациенти, като при 45 от тях е проведен ДНК-анализ за установяване на мутации във PAH-ген, а общо при 42-ма е проведен орален сапроптеринов тест. При пациентите беше определен фенилаланинов толеранс на базата на седмично меню, за да бъде достоверно отнасянето им към различните групи, според класификацията на Guldberg.

Мутационният анализ показва, че най-честа при нашата група пациенти е мутацията R408W, която е и най-честа, като цяло за европейската популация. Водещи за нашата група са missense мутациите с 52 %, съпоставимо с литературните данни, където те са най-многобройни и представляват около 63 % от всички мутации. По отношение на делециите и сплайсинг дефектите, нашите данни се различават от световните. Откритите от нас делеции са 17 % (13 % по литературни данни), като това е с около 5 % по-малко от сплайсинг дефектите (22 %), които в световен мащаб заемат трето място с едва 11 %.

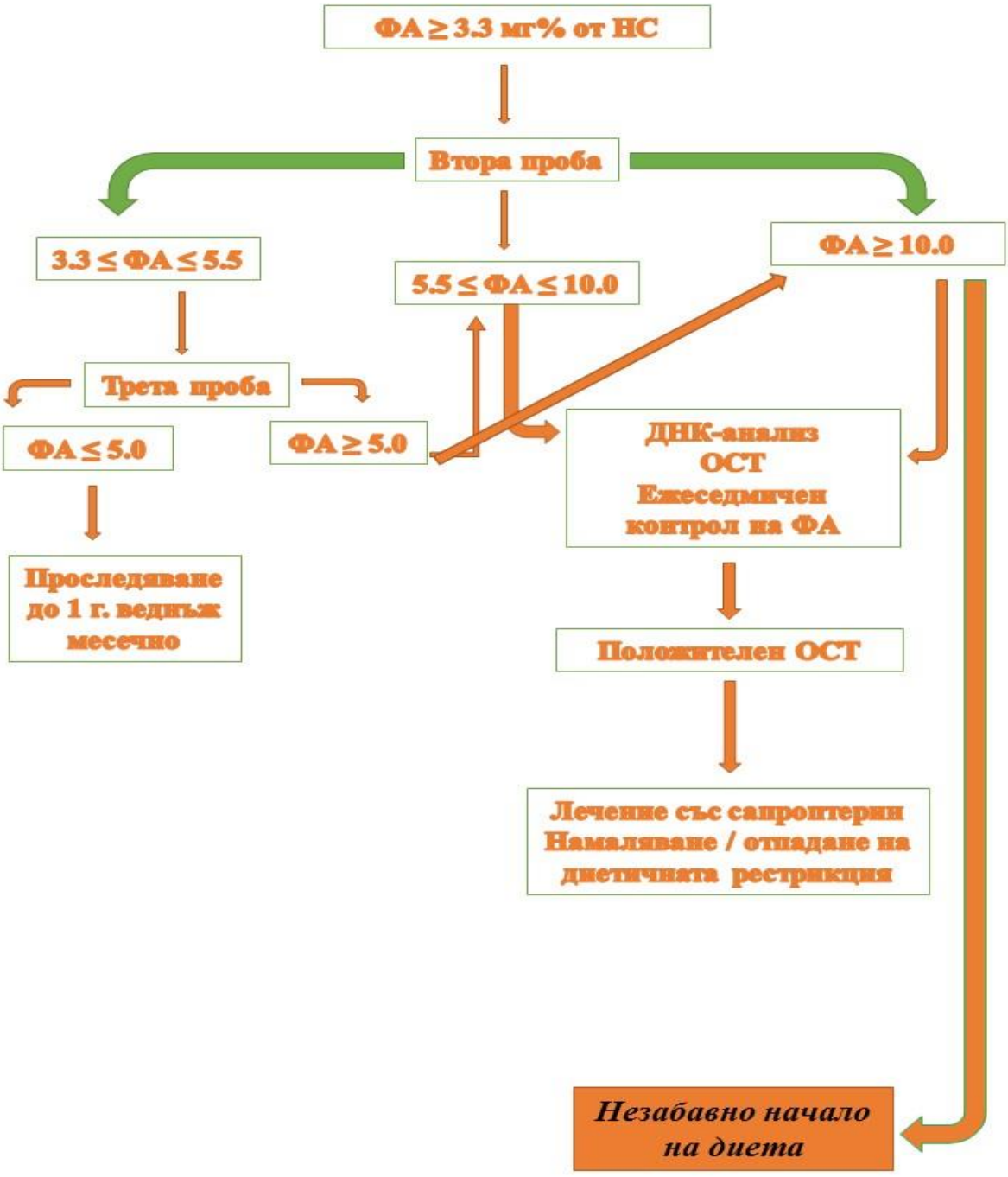
Nonsense мутациите при нашите пациенти са 9 %, за разлика от литературните данни, където техният дял е около 5 %. При нашето проучване не се откриват „тихи полиморфизми“ и инсерции. Разликата в получените данни може да се дължи, както на това, че голяма част от пациентите са с неустановен генотип, така и на явното разнообразие, което е налице в изследваната популация.

Най-честа клинична изява на мутациите във ФАХ-гена е класическата фенилкетонурия, въпреки че в групата над 18 г. установяването е при някои пациенти се дължи на неспазване на диетата.

Установени са 15 респондери, което представлява 35.7 % от пациентите, на които е проведен ОСТ и 26.3 % от цялата изследвана популация, като данните отговарят на тези в литературата, според които респондери са 21-44 % от пациентите с ФКУ и 20-28 % от всички, на които е проведен тест за определяне на респондерен статус.

Получените резултати показват, необходимостта от провеждане на ОСТ, независимо от установения фенотип, както и възможността за повтаряне на теста, след възстановяване на правилен диетичен режим, за да бъдат избегнати фалшиво негативните отговори.

В резултат от дългогодишната работа на Клинична генетика към СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“, както и от резултатите в настоящото проучване, се стигна до формирането на един точен, обстоен и лесен за приложение алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване на пациентите с хиперфенилаланинемии (фиг. 18).



Фигура 18. Клиничен алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване при хиперфенилаланинемия.

VII. ИЗВОДИ

1. Най-честа мутация в българската популация е p.R408W (c.1222C>T).
2. Установената честота на респондери в изследваната популация е 21%.
3. Най-чест генотип в двете възрастови групи е G6 – хомозиготи по мутация p.R408W. Той е и най-чест за европейската популация. Фенотипно се изявява, като класическа и умерена ФКУ. Въз основа на ОСТ, единият от пациентите с G6 е и респондер.
4. Най-чест вид са missense мутациите, като най-често засегнат е каталитичният регион. На второ място в българската популация са сплайсинг дефектите, изместваики делециите.
5. Респондерният статус не зависи изцяло от генотипа, съответно остатъчната ензимна активност, затова е задължително првеждането на ОСТ.
6. Мутации, водещи до образуването на протеин с по-висока остатъчна активност, имат по-висок ФА толеранс и по-лека клинична изява, както и по-голяма вероятност за положителен респондерен статус.
7. Стриктният контрол на ФА нива променя ФА толеранс и отговора към BH4 в положителна насока, докато неправилното спазване на диетата води до изявата на класическа фенилкетонурия, независимо от заложения в генотипа толеранс.
8. Най-честата изява на мутациите във ФАХ-гена е класическата ФКУ.
9. FoldX-стойността може да се използва за потвърждаване на най-тежкия фенотип, т.е. класическа фенилкетонурия, но за стойности под 3, не може да бъде достоверен метод и следва да се интерпретира заедно с други параметри.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с научен характер

1. Диагностицирани са две нови мутации във ФАХ-гена (c.927_932del2bp и p.T380Gfsh (c.1138_1139delAC)), съответно, съдържащите ги генотипове са описани за първи път.
2. Описани са за първи път 6 нови генотипа.
3. Установени са честотата и типа на мутациите при селектирана група български пациенти с фенилкетонурия.
4. За първи път е направена подробна фенотипна и генотипна характеристика на български пациенти с ФКУ.

Приноси с приложен характер

1. Изработен е алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване на пациенти с хиперфенилаланинемия. Поставена е генетична (етиологична) диагноза при пациенти с ФКУ. Предоставена е генетична консултация на техните семействата.
2. Въведена е за първи път в България методика за тестване на отговор към сапроптерин.
3. Въведена е за първи път в България терапия за ФКУ с орален сапроптерин.
4. Създадена е ДНК банка от пациенти с хиперфенилаланинемия и част от техните родители, която е необходима база за бъдещи изследвания.

IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 : Информирано съгласие за провеждане на орален сапроптеринов тест.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ НА ПАЦИЕНТА (родител/настойник) за провеждане на орален тест със сапроптерин и генетичен анализ .....

Съгласие за лечение и изследвания	С настоящето потвърждавам доброволното си съгласие, екипът на отделението да провежда лечението ми и да предписва необходимите медикаменти, като елемент от лечението на моето заболяване. Включително започването на BH4 тест. Съгласявам се да бъдат правени изследвания, свързани със състоянието, **включително и генетичен анализ.**
Информираност за лечебния процес	Обяснени са ми: процеса на лечението, естеството на диетата и правилника за вътрешния ред, който трябва да спазвам. Запознат/а съм с процедурите, необходими за лечението на заболяването на моето дете и разбирам, че това включва ежедневно приемане на определените медикаменти и определени храни. Запознат/а съм с това, че медикаментите и храните, които са ми предписани, е необходимо да приемам в присъствието на медицинската сестра и че не трябва да приемам непредписани лекарства и храни.
Информираност за алтернативни лечения	Представени са ми алтернативни методи на лечение, а също и възможни рискове и усложнения при лечението ми, но въпреки това желая да бъда приет на лечение в сектор по Клинична генетика към СБАЛДБ, поради възможност за подобряване на състоянието на детето.
Възможност за прекратяване на лечението	Информиран/а съм за възможността да прекратя лечението си по всяко време, което при прекъсване по мое желание ще означава административно изписване. Информиран/а съм за възможността да бъда административно изписан/а при неспазване на правилника на отделението.
Правила за лечение	Приемам да спазвам представените ми изисквания като неразделна част от моето лечение: Да не употребявам алкохол и непредписани медикаменти и храни. Да спазвам правилника за вътрешния ред Да се отнасям с подобаващо уважение към персонала и останалите болни в отделението Да уведомявам своевременно лекуващия лекар и медицинска сестра при наличието на смущаващи за мен обстоятелства относно състоянието ми и престоя в отделението.
Действия при непредвидени обстоятелства	Разбирам, че по всяко време на лечението, определено състояние може да изисква да се предприемат действия, допълнителни или различни от тези, които ми бяха представени. Упълномощавам лекуващия ми лекар, както и неговите сътрудници, да извършват и провеждат всички процедури, които са необходими и препоръчителни от професионална гледна точка.

Съгласен	Съгласна	Не съм съгласен	Не съм съгласена

Да бъдат използвани кръв и кръвни продукти по предназначение, ако се сметне за необходимо (невярното се зачертава). Известно ми е, че преливането на дарителска кръв и други кръвни продукти в много редки случаи може да доведе до някои усложнения.

Допълнителни условия .....

.....

.....

ЗАЯВЯВАМ, ЧЕ НАСТОЯЩИЯТ ФОРМУЛЯР МИ БЕ РАЗЯСНЕН ПОДРОБНО, ЧЕ СЪМ ГО ПРОЧЕЛ/А (СА МИ ГО ПРОЧЕЛИ), И СЪМ НАЯСНО СЪС СЪДЪРЖАНИЕТО МУ. ПРЕДОСТАВЕНА МИ БЕ ВЪЗМОЖНОСТ ДА ЗАДАВАМ ВЪПРОСИ

Дата ..... час ..... (невярното се зачертава)

Лекуващ лекар .....

Д-р .....

Подпис на пациента (или законен представител)

Приложение 2 : Диагностичен алгоритъм при провеждане на орален сапроптеринов тест.

ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ

Тридневен Kuvan / BH4 тест с натоварване

Име, презиме и фамилия, дата на раждане:

Дата на провеждане на теста:
Ръст, тегло, обиколка на глава: …… см / ..... кг / ..... см
Phe от последната проба: …… mg%
3-4 дни преди теста- прием на храна богата на фенилаланин
1. При започване на теста:
а) Венозна кръв - взета в ..... часа на ..... г.
Аминокиселини в плазма (бланка), ДНК (2 ml EDTA), биохимия: урея, креатинин, пикочна киселина, чернодробни трансаминази, кр.захар, желязо, общ белтък, електролити; ПКК
Филтърна хартия с кръвна проба на 0´ за фенилаланин (може капилярна) - първа филтърна проба.
Писмено информирано съгласие от родителите/пациента
2. Прием на BH4 (4 часа гладуване) 20 mg/kg KG BH4 (KUVAN®); 100 mg Tabl. в отделение Клинична генетика.
Таблетките се разтварят във вода: количество …… ***mg BH4 (.....*** *табл.)* дадени на .....г. в ..... *ч.*
3. След приема на таблетките BH4 и по време на целия тест: без промяна в диетата.
4. 8 часа след приема на таблетките BH4 в .....часа на .....г.: капилярна кръвна проба.
5. 24 часа след приема на таблетките BH4 в ..... часа на .....г.: капилярна кръвна проба (филтърна хартия).
6. 48 часа след приема на таблетките BH4 в ..... часа на .....г.: капилярна кръвна
Трите филтърни бланки да се изпратят на .....г. сутринта в НГЛ
Резултатите се получават на .....
12. Преминаване на диетично хранене

Интерпретация на теста

1. Положителен тест- нивото на фенилаланина спада най-малко с 30% от изходното след 24 часа
2. Бавен отговор- Намаление нивото на фенилаланина с 20% на осмия час, но над 20% и под 30% на 24 час
3. При неоднозначен отговор на теста да се определят мутациите
4. Намаление нивото на фенилаланина с повече от 80-90% след 4-8 часа е показател за BH4 дефицит.

X. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, et al. Association française pour le dépistage et la prevention des handicaps de l'enfant (AFDPHE) Arch Pediatr. 2005;12:594–601.

2. Abadie, V., Lyonnet, S., Maurin, N., Berthelon, M., Caillaud, C., Giraud, F., Mattei, J.-F., Rey, J., Rey, F., Munnich, A. CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria. (Abstract) Am. J. Hum. Genet. 45 (suppl.): A169 only, 1989

3. Acosta PB, Michals-Matalon K, Austin V, et al. Nutrition findings and requirements in pregnant women with phenylketonuria. In: Platt, L. Effects of Genetic Disorders on Pregnancy Outcome. London: Parthenon Publishing; 1997. p. 21-32.

4. Adams DJ., 2009; Treatment of an Individual withPhenylketonuria and Neurological Impairment with Sapropterin

5. Ahring K, Belanger-Quintana A, Dokoupil K, Gokmen Ozel H, Lammardo AM, MacDonald A et al. (2009). Dietary management practices in phenylketonuria across European centres. Clin Nutr 28, 231–236.

6. Ajami N, Kazeminezhad S, Foroughmand A, Hasanpour M, Aminzadeh M. A preliminary mutation analysis of phenylketonuria in southwest Iran. Genetics and Molecular Research. 2013;12(4):4958-4966.

7. Albrecht J, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: a meta-analysis. Neurosci Biobehav Rev. 2009;33:414–421.

8. Anderson P.J., Leuzzi V. (2010) White matter pathology in phenylketonuria. Mol Genet Metab 99(Suppl. 1): S3–S9

9. Aoki K, Ohwada M, Kitagawa T. Long-term follow-up study of patients with phenylketonuria detected by the newborn screening programme in Japan. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2007;30(4):608-608.

10. Aulehla-Scholz C, Heilbronner H. Mutation spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. Hum Mutat. 2003;21:399–400.

11. Avigad, S., Cohen, B. E., Bauer, S., Schwartz, G., Frydman, M., Woo, S. L., Niny, Y. & Shiloh, Y. (1990) A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. Nature 344, 168–170.

12. Avigad, S., Kleiman, S., Weinstein, M., Cohen, B. E., Schwartz, G., Woo, S. L. & Shiloh, Y. (1991) Compound heterozygosity in nonphenylketonuria hyperphenylalanemia: the contribution of mutations for classical phenylketonuria. Am J Hum Genet 49, 393– 399.

13. Barić I, Mardešić D, Gjurić G, Samavka V, Göbel-Schreiner B, Lichter-Konecki U et al. Haplotype distribution and mutations at the PAH locus in Croatia. Hum Genet. 1992;90(1-2):155-157.

14. Baric, I., Mardesic, D., Sarnavoka, V., Lichter-Konecki, U., Konecki, D. S., Trefz, F. K. Geographical distribution of the P281L mutation at the phenylalanine hydroxylase locus: possible origin in southeastern Europe. J. Inherit. Metab. Dis. 17: 376-377, 1994.

15. Bassan A, Blomberg MRA, Siegbahn PEM. Chem.–Eur. J. 2003;9:4055–4067

16. Bassan A, Blomberg MRA, Siegbahn PEM. Chem.–Eur. J. 2003;9:106–115

17. Baumeister AA, Baumeister AA. Dietary treatment of destructive behavior associated with hyperphenylalaninemia. Clin Neuropharmacol. 1998;21:18–27

18. Benit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, et al. (1999). The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. Mol. Genet. Metab. 68: 43-47

19. Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. J Hum Genet. 2008;53:417–418

20. Bercovich D. Elimelech A. Zlotogora J, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. J Hum Genet. 2008;53:407–418.

21. Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. Mol Genet Metab. 2002;77:304–13

22. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. Lancet.1953;265:812–3

23. Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. SpringerPlus. 2015;4(1).

24. Bik-Multanowski M. et al. Molecular genetics of PKU in Poland and potential impact of mutations on BH4 responsiveness. Acta Biochim Pol 60, 613–616 (2013).

25. Bilginsoy C. et al. Living with phenylketonuria: Perspectives of patients and their families. J Inherit Metab Dis. 2005;11:639–649.

26. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. Mol Genet Metab. 2011;104 Suppl:S2–9

27. Blau, N. (2008). "Defining tetrahydrobiopterin (BH(4))-responsiveness in PKU." J Inherit Metab Dis 31(1): 2-3.

28. Blau, N. (2010). "Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency." Expert Rev Endocrinol Metab 5(4): 483-494.

29. Blau, N., A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. Macdonald, F. K. Trefz and F. V. Spronsen (2010). "Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries." Mol Genet Metab 99: 109-115.

30. Blau, N., and J. L. Dhondt. "Tetrahydrobiopterin deficiency and an international database of patients." In Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, edited by J E Ayling, M. G. Nair and C. M. Baugh, 255-262. New York: Plenum Press, 1993.

31. Blau, N., B. Thöny, C. W. Heizmann, and J. L. Dhondt. "Tetrahydrobiopterin deficiency: From phenotype to genotype." Pteridines 4 (1993): 1-10.

32. Blau, N., F. J. Van Spronsen and H. L. Levy (2010). "Phenylketonuria." Lancet 376: 1417-1427.

33. Borrajo, G. J. (2007). Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. Journal of Inherited Metabolic Disease, 30, 466–481

34. Buck PS; The Child Who Never Grew. Bethesda, MD: Woodbine House, 1992.

35. Bueno MA, Gonzalez-Lamuno D, Delgado-Pecellin C, Aldamiz-Echevarria L, Perez B, Desviat LR, Couce ML. Molecular epidemiology and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria patients from South Spain. J Hum Genet. 2013;58:279–284.

36. Burgard P, Rey F, Rupp A, Abadie V, Rey J. Neuropsychologic functions of early treated patients with phenylketonuria, on and off diet: results of a cross-national and cross-sectional study. Pediatr Res.1997;41:368–374

37. Burton B.K., Grange D.K., Milanowski A., Vockley G., Feillet F., Crombez E.A., et al. (2007) The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6 R-tetrahydrobiopterin): A phase II, multicentre, open-label, screening study. J Inherit Metab Dis 30: 700–707

38. Burton BK, Adams DJ, Grange DK, Malone JI, Jurecki E, Bausell H, Marra KD, Sprietsma L, Swan KT. Tetrahydrobiopterin therapy for phenylketonuria in infants and young children. J Pediatr. 2011 Mar;158:410–5.

39. Campistol J, Perez-Duenas B, Montero R, Artuch R, Conill J, Vilaseca MA (2006) Coenzyme Q10 deficiency seems to be implicated in the pathophysiology of tremor in patients with phenylketonuria. J Inherit Metab Dis 29(suppl 1):96

40. Centerwall, S.A. & Centerwall, W.R. (2000). The discovery of Phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children, and a scientist. Pediatrics, 105, 89- 103.

41. Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-totyrosine ratio determined by mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. Clin Chem 1998;44:2405-9.

42. Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Krasao P, Chaisomchit S, Waiyasilp S. Neonatal screening program in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2003;34(Suppl. 3):94–100.

43. Christ, S. E. (2003). Asbjørn Følling and the discovery of phenylketonuria. Journal of the History of the Neurosciences, 12, 44-54.

44. Daniele A. Scala I. Cardillo G, et al. Functional and structural characterization of novel mutations and genotype-phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. FEBS J. 2009;276:2048–2059

45. Desviat L, Pérez B, Bèlanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sánchez A et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. Molecular Genetics and Metabolism. 2004;83(1-2):157-162.

46. Desviat L, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García M, Martínez-Pardo M et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. Eur J Hum Genet. 1999;7(3):386-392.

47. Dianzani I, Giannattasio S, de Sanctis L, Alliaudi C, Lattanzio P, Dionisi Vici C, Burlina A, et al (1995) Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. Eur J Hum Genet 3:294–302

48. Dianzani I, Giannattasio S, de Sanctis L, Marra E, Ponzone A, Camaschella C, Piazza A. 1994. Genetic history of PKU MUTATIONS IN EUROPE 353 phenylketonuria mutations in Italy. Am J Hum Genet 55: 851–853.

49. DiLella, A. G., J. Marvit, K. Brayton and S. L. Woo (1987). "An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2." Nature 327(6120): 333-6

50. Dipple KMcCabe E. Phenotypes of Patients with "Simple" Mendelian Disorders Are Complex Traits: Thresholds, Modifiers, and Systems Dynamics. The American Journal of Human Genetics. 2000;66(6):1729-1735.

51. Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, et al. Molecular genetics and genotype-based estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU patients: spotlight on phenotypic implications of p.L48S. JIMD Rep. 2013;9:49–58.

52. Dobrowolski, S. F., C. Heintz, T. Miller, C. Ellingson, I. Ozer, G. Gokcay, T. Baykal, B. Thony, M. Demirkol and N. Blau (2011). "Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population." Molecular genetics and metabolism 102(2): 116-21.

53. Dworniczak, B., C. Aulehla-Scholz and J. Horst (1989). "Phenylketonuria: detection of a frequent haplotype 4 allele mutation." Human genetics 84(1): 95-6

54. Dworniczak, B., L. Kalaydjieva, C. Aulehla-Scholz, K. Ullrich, I. Kremensky, B. Radeva and J. Horst (1991). "Recurrent nonsense mutation in exon 7 of the phenylalanine hydroxylase gene." Human genetics 87(6): 731-3

55. Eigel, A., B. Dworniczak, L. Kalaydjieva and J. Horst (1991). "A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1." Human genetics 87(6): 739-41.

56. Eisensmith, R. C., Woo, S. L. C. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. Hum. Mutat. 1: 13-23, 1992.

57. Eisensmith, R. C., Woo, S. L. C. Updated listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. (Letter) Am. J. Hum. Genet. 51: 1445-1448, 1992.

58. Enns G, Martinez D, Kuzmin A, Koch R, Wakeem C, Woo S et al. Molecular Correlations in Phenylketonuria: Mutation Patterns and Corresponding Biochemical and Clinical Phenotypes in a Heterogeneous California Population. Pediatr Res. 1999;46(5):594-594.

59. Erlandsen H, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tyring S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martínez A, Stevens RC. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:16903–8.

60. Feillet F, Agostoni C. Nutritional issues in treating phenylketonuria. J Inherit Metab Dis. 2010;33(6):659–664. doi: 10.1007/s10545-010-9043-4.

61. Feillet F, MacDonald A, Hartung Perron D, Burton B. Outcomes beyond phenylalanine: an international perspective. Mol Genet Metab. 2010;99(Suppl 1):S79–S85

62. Feillet F., Cheryab C., Namourab F., Kimmouna A., Favrea E., Lorentz E., et al. (2008) Evaluation of neonatal BH4 loading test in neonates screened for hyperphenylalaninemia. Early Hum Dev 84: 561–567

63. Fiege Blau N. Assessment of Tetrahydrobiopterin (BH4) Responsiveness in Phenylketonuria. The Journal of Pediatrics. 2007;150(6):627-630.

64. Fiege, B., L. Bonafe, D. Ballhausen, M. Baumgartner, B. Thony, D. Meili, L. Fiori, M. Giovannini and N. Blau (2005). "Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study." Molecular genetics and metabolism 86 Suppl 1: S91-5.

65. Finger S, Christ SE. Pear S. Buck and phenylketonuria (PKU). J Hist Neurosci 2004; 13:44-57

66. Fiori L, Fiege B, Riva E, Giovannini M. Incidence of BH4-responsiveness in phenylalanine-hydroxylase-deficient Italian patients. Mol Genet Metab. 2005;86 (Suppl 1):S67–S74.

67. Følling A. Utskillelse av fenylpyrodruesyre i urinen som stoffskifteanomali i forbindelse med imbecillitet. Nord Med 1934; 8: 1054 - 9.

68. Gassió R, Artuch R, Vilaseca MA, et al. Cognitive functions in classic phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia: experience in a paediatric population. Dev Med Child Neurol. 2005;47:443–448

69. Gentile J.K., Ten Hoedt A.E., Bosch A.M. (2010) Psychosocial aspects of PKU: Hidden disabilities— a review. Mol Genet Metab 99(Suppl. 1): S64–S67

70. Gjetting T, Petersen M, Guldberg P, Güttler F. In vitro expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation. Mol Genet Metab. 2001;72:132–43.

71. Gregory CO, Yu C, Singh RH. Blood phenylalanine monitoring for dietary compliance among patients with phenylketonuria: comparison of methods. Genet Med. 2007;9:761–765.

72. Groselj U, Tansek MZ, Kovac J, Hovnik T, Podkrajsek KT, Battelino T. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. Mol Genet Metab.2012;106(2):142–148.

73. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, et al. (1998). A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. Am. J. Hum. Genet. 63: 71-79

74. Guldberg, P., V. Romano, N. Ceratto, P. Bosco, M. Ciuna, A. Indelicato, F. Mollica, C. Meli, M. Giovannini, E. Riva and et al. (1993). "Mutational spectrum of phenylalanine

hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe." Human molecular genetics 2(10): 1703-7

75. Guttler F, Azen C, Guldberg P, Romstad A, et al. (1999). Relationship among genotype, biochemical phenotype, and cognitive performance in females with phenylalanine hydroxylase deficiency: report from the Maternal Phenylketonuria Collaborative Study. Pediatrics 104: 258-262

76. Güttler F, Guldberg P. The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. Eur J Pediatr 1996;155(Suppl. 1):S6-10.

77. Hennermann JB, Bührer C, Blau N, Vetter B, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. Mol Genet Metab. 2005;86:S86–S90.

78. Hoeksma, M.; Reijngoud, D.J.; Pruim, J.; de Valk, H.W.; Paans, A.M.; van Spronsen, F.J. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. Mol. Genet. Metab. 2009, 96, 177–182.

79. Huemer M, Huemer C, Moslinger D, Huter D, Stockler-Ipsiroglu S. Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature. J Inherit Metab Dis. 2007;30(5):694–699.

80. Jennings IG, Cotton RG and Kobe B (2000). Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. Eur. J. Hum. Genet. 8: 683-696

81. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. Proc Soc Exp Biol Med.1953;82:514–5.

82. Jiang J, Ma X, Huang X, et al. A survey for the incidence of phenylketonuria in Guangdong, China. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003;34 (suppl 3): 185.

83. Jones SJ, Turano G, Kriss A, Shawkat F, Kendall B, Thompson AJ. Visual evoked potentials in phenylketonuria: association with brain MRI, dietary state, and IQ. J Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. 1995;59:260–265.

84. Kalanin, J., Takarada, Y., Kagawa, S., Yamashita, K., Ohtsuka, N., Matsuoka, A. Gypsy phenylketonuria: a point mutation of the phenylalanine hydroxylase gene in gypsy families from Slovakia. Am. J. Med. Genet. 49: 235-239, 1994.

85. Kalaydjieva L, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Kremensky I, Bronzova J, Eigel A et al. Classical phenylketonuria in Bulgaria: RFLP haplotypes and frequency of the major mutations. Journal of Medical Genetics. 1990;27(12):742-745.

86. Kalaydjieva, L., Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Devoto, M., Romeo, G., Sturhmann, M., Kucinskas, V., Yurgelyavicius, V., Horst, J. Silent mutations in the phenylalanine hydroxylase gene as an aid to the diagnosis of phenylketonuria. J. Med. Genet. 28: 686-690, 1991.

87. Kalaydjieva, L., Dworniczak, B., Kucinskas, V., Yurgeliavicius, V., Kunert, E., Horst, J. Geographical distribution gradients of the major PKU mutations and the linked haplotypes. Hum. Genet. 86: 411-413, 1991.

88. Karačić I, Meili D, Sarnavka V, et al. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. Mol Genet Metab. 2009;97(3):165–171.

89. Kasnauskiene J, Giannattasio S, Lattanzio P, Cimbalistiene L, Kucinskas V. The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. Hum Mutat. 2003;21:398.

90. Kasnauskiene J. Cimbalistiene L. Kucinskas V. Validation of PAH genotype-based predictions of metabolic phenylalanine hydroxylase deficiency phenotype: investigation of PKU/MHP patients from Lithuania. Med Sci Monit. 2003;9:142–146

91. Kathom, H., D. Avdjieva-Tzavella, S. Andonova, R. Tincheva and A. Savov (2014). "Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4 responsiveness in phenylketonuria patients from Bulgaria." J Inherit Metab Dis 37(Suppl 1): S70

92. Kaufman, S. 1993. The phenylalanine hydroxylating system. Adv. Enzymol. 67 77–264.

93. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, et al. (1997). Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. Am. J. Hum. Genet. 61: 1309-1317.

94. Keil S, Anjema K, van Spronsen FJ, Lambruschini N, Burlina A, BélangerQuintana A, Couce ML, Feillet F, Cerone R, Lotz-Havla AS, Muntau AC, Bosch AM, Meli CA, Billette de Villemeur T, Kern I, Riva E, Giovannini M, Damaj L, Leuzzi V, Blau N. Long-term Follow-up and Outcome of Phenylketonuria Patients on Sapropterin: A Retrospective Study. Pediatrics. 2013, 131: e1881-8

95. Kim SW, Jung J, Oh HJ, Kim J, Lee KS, Lee DH, Park C, Kimm K, Koo SK, Jung SC. Structural and functional analyses of mutations of the human phenylalanine hydroxylase gene. Clin Chim Acta 2006;365:279-287

96. Kleiman, S., Bernstein, J., Schwartz, G., Eisensmith, R. C., Woo, S. L. & Shiloh, Y. (1992) A defective splice site at the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria and benign hyperphenylalaninemia among Palestinian Arabs. Hum Mutat 1, 340–343

97. Knappskog P, Flatmark T, Aarden J, Haavik J, Martinez A. Structure/Function Relationships in Human Phenylalanine Hydroxylase. Effect of Terminal Deletions on the Oligomerization, Activation and Cooperativity of Substrate Binding to the Enzyme. Eur J Biochem. 1996;242(3):813-821.

98. Kobe, B., Jennings, I.G., House, C.M., Michell, B.J., Goodwill, K.E., Santarsiero, B.D., Stevens, R.C., Cotton, R.G.H., and Kemp, B.E. 1999. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. Nat. Struct. Biol. 6 442–448

99. Koch, R., Azen, G., Friedman, E. G., & Williamson, M. L. (1984). Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement test results at eight years of age. Journal of Inherited Metabolic Disease, 7, 86- 90.

100. Konecki, D. S., M. Schlotter, F. K. Trefz and U. Lichter-Konecki (1991). "The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria." Human genetics 87(4): 389-93

101. Kostandyan N, Britschgi C, Matevosyan A, Oganezova A, Davtyan A, Blau N et al. The spectrum of phenylketonuria genotypes in the Armenian population: Identification of three novel mutant PAH alleles. Molecular Genetics and Metabolism. 2011;104:S93-S96.

102. Kozak L, BlažkovaM, Kuhrova V, Pijackova A, Ruzickova S, Št`astna S. 1997. Mutation and haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: identification of four novel mutations. J Med Genet 34:893-898.

103. Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. J Pediatr. 1999;135(3):375–378.

104. L. Kosak – регистрация в базата данни без публикация

105. Langenbeck U. Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias. J Inherit Metab Dis. Feb 2008;1:67-72.

106. Laxova R. Lionel Sharples Penrose, 1898-1972: A personal memoir in celebration of the centenary of his birth. Genetics 1998; 150:1333-40

107. Lee DH, Koo SK, Lee K-S, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. J Hum Genet.2004;49:617–621.

108. Leuret O, Barth M, Kuster A, Eyer D, de Parscau L, Odent S, GilbertDussardier B, Feillet F, Labarthe F (2012) Efficacy and safety of BH4 before the age of 4 years in patients with mild phenylketonuria. J Inherit Metab Dis.

109. Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, et al. The spectrum of phenylalanine variations under tetrahydrobiopterin load in subjects affected by phenylalanine hydroxylase deficiency. J Inherit Metab Dis. 2006;29:38–46

110. Levy H.L., Milanowski A., Chakrapani A., Cleary M., Lee P., Trefz F., et al. (2007) Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6 R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: A phase III randomised placebo-controlled study. Lancet 370: 504–510

111. Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:6221–5

112. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. J Inherit Metab Dis. 2007;30:430–438. doi: 10.1007/s10545-007-0644-5

113. Longo N, Siriwardena K, Feigenbaum A, Dimmock D, Burton B, Stockler S et al. Long-term developmental progression in infants and young children taking sapropterin for phenylketonuria: a two-year analysis of safety and efficacy. Genetics in Medicine. 2014;17(5):365-373.

114. Longo N., Siriwardena K., Feigenbaum A., Dimmock D., Burton B.K., Stockler S., Waisbren S., Lang W., Jurecki E., Zhang C., et al. Long-term developmental progression in infants and young children taking sapropterin for phenylketonuria: A two-year analysis of safety and efficacy. Genet. Med. 2014

115. Mallolas J, Mila M, Lambruschini N, Cambra FJ, et al. (1999). Biochemical phenotype and its relationship with genotype in hyperphenylalaninemia heterozygotes. Mol. Genet. Metab. 67: 156-161.

116. Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. Hum Genet. 1999;105:468–473.

117. Marsden D. Larson C. Levy HL. Newborn screening for metabolic disorders. J Pediatr.2006;148:577–584

118. Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, et al. Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. Genet Med. 2004;6(1):27–32

119. McCaman, M. W., and Robins, E., Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. J. Lab. Clin. Med. 59,885 (1962).

120. McHugh D, Cameron CA, Abdenur JE, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. Genet Med 2011;13:230-54

121. Mitchell JJ, Wilcken B, Alexander I, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: The New South Wales experience. Mol Genet Metab. 2005;86:S81–S85.

122. Motzfeldt K, Lilje R, Nylander G. Breastfeeding in phenylketonuria. Acta Paediatrica Supplement.1999;88(432):25–27

123. Muntau AC, Röschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. N Engl J Med. 2002;347:2122–2132.

124. Murad H., Dabboul A., Moassas F., Alasmar D.& Al-Achkar W. Mutation spectrum of phenylketonuria in Syrian population: genotype-phenotype correlation. Gene 528, 241–247 (2013).

125. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. Pediatrics 2001; 108:972-82

126. O'Donnell K, O'Neill C, Tighe O, et al. The mutation spectrum of hyperphenylalaninaemia in the Republic of Ireland: the population history of the Irish revisited. Eur J Hum Genet. 2002;10:530–538.

127. Okano Y, Hase Y, Lee DH, Takada G, Shigematsu Y, Oura T, Isshiki G (1994) Molecular and population genetics of phenylketonuria in Orientals: correlation between phenotype and genotype. J Inherit Metab Dis 17:156–159

128. Okano Y, Kudo S, Nishi Y, Sakaguchi T, et al. (2011). Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. J. Hum. Genet. 56: 306-312.

129. Okano, Y., R. C. Eisensmith, F. Guttler, U. Lichter-Konecki, D. S. Konecki, F. K. Trefz, M. Dasovich, T. Wang, K. Henriksen, H. Lou and et al. (1991). "Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria." The New England journal of medicine 324(18): 1232-8.

130. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {2016}. World Wide Web URL: http://omim.org/

131. Ozalp I, Coskun T, TokatlN A, et al (2001) Newborn PKU screening in Turkey: at the present and organization for future. Turk J Pediatr 43: 97–101

132. Pangkanon S, Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Chaisomchit S. Detection of phenylketonuria by the newborn screening program in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2009;40:525–529.

133. Penrose LS., 1972, The biology of mental defect. Revised edition. London. Sidgwick and Jackson.

134. Pey A, Desviat L, Gámez A, Ugarte M, Pérez B. Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. Human Mutation. 2003;21(4):370-378.

135. Pey AL, Pérez B, Martínez MA, et al. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. Hum Mutat 2004;24:388-99

136. Pey, A. L., Stricher, F., Serrano, L., Martinez, A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. Am. J. Hum. Genet. 81: 1006-1024, 2007.

137. Popescu, A., Andrian, T., Guttler, F., Guldberg, P. (1994). Genotype-phenotype correlation in 11 Romanian PKU families. J Inherit Metab Dis, 17, 374-375.

138. Popescu, T., Blazkova, M., Kozak, L., Jebeleanu, G., and A. Popescu (1998). Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian phenylketonuric alleles. Hum. Mutat. 12(5), 314-9.

139. Ramus SJ, Treacy EP, Cotton RGH. Characterization of phenylalanine hydroxylase alleles in untreated phenylketonuria patients from Victoria, Australia: origin of alleles and haplotypes. Am J Hum Genet.1995;56:1034–1041.

140. Rivera I, Mendes D, Afonso A, Barroso M, Ramos R, Janeiro P, Oliveira A, Gaspar A, Tavares de Almeida I. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. Mol Genet Metab. 2011;104(Suppl):S86–S92.

141. Santos LL, Fonseca CG, Starling AL, Januario JN, Aguiar MJ, Peixoto MG, Carvalho MR. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. Genet Mol Res. 2010;9:1–8.

142. Sarkissian CN, Gamez A, Scott P, Dauvillier J, Dorenbaum A, Scriver CR, et al. Chaperone-like therapy with tetrahydrobiopterin in clinical trials for phenylketonuria: is genotype a predictor of response? JIMD Rep. 2012;5:59–70.

143. Schindeler S, Ghosh-Jerath S, Thompson S, Rocca A, Joy P, Kemp A, Rae C, Green K, Wilcken B, Christodoulou J. The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. Mol Genet Metab. 2007;91:48–54.

144. Schulz Bremer H. Nutrient intake and food consumption of adolescents and young adults with phenylketonuria. Acta Paediatrica. 1995;84(7):743-748.

145. Schweitzer-Krantz S, Burgard P. Survey of national guidelines for the treatment of phenylketonuria.Eur J Pediatr. 2000;159:S70–S73.

146. Scriver CR and Waters PJ (1999). Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. Trends Genet. 15: 267-272

147. Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2000.

148. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver, CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw Hill; 2000.

149. Scriver CR, Waters PJ, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Cote D, et al. PAHdb: a locus-specific knowledge base. Hum Mutat 2000;15:99-104.

150. Scriver, C. R., Gregory, D. M., Sovetts, D., Clow, C. L., Tissenbaum, G. Normal plasma free amino acid values in adults: the influence of some common physiological variables. Metabolism 34: 868-873, 1985.

151. Shintaku H, Fujioka H, Sawada Y, Asada M, Yamano T. Plasma biopterin levels and tetrahydrobiopterin responsiveness. Mol Genet Metab. 2005;86(S1):S104–106.

152. Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N, Sakura N, Yoshida I, Yoshino M, Matsubara Y, Suzuki K, Aoki K, Kitagawa T. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. Pediatr Res. 2004;55:425–30.

153. Singh R, Rohr F, Frazier D, Cunningham A, Mofidi S, Ogata B et al. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. Genetics in Medicine. 2014;16(2):121-131.

154. Song F, Jin Y-W, Wang H, Zhang Y-M, Yang Y-L, Zhang T. Mutations in exon 7 of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Chinese patients with phenylketonuria. Yichuan. 2005;27:53–56.

155. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, et al. Molecular and phenotypic characteristics of phenylketonuria patients in Serbia and Montenegro. Clin Genet. 2006;70:151–155.

156. Sueoka H, Moshinetsky A, Nagao M, Chiba S (1999). Mutation screening of phenylke

157. Surtees R and Blau N (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. Eur. J. Pediatr. 159 (Suppl 2): S109-S113.

158. Svensson, E., Andersson, B., Hagenfeldt, L. Two mutations within the coding sequence of the phenylalanine hydroxylase gene. Hum. Genet. 85: 300-304, 1990.

159. Svensson, E., Eisensmith, R. C., Dworniczak, B., von Dobeln, U., Hagenfeldt, L., Horst, J., Woo, S. L. C. Two missense mutations causing mild hyperphenylalaninemia associated with DNA haplotype 12. Hum. Mutat. 1: 129-137, 1992.

160. Takarada, Y., J. Kalanin, K. Yamashita, N. Ohtsuka, S. Kagawa and A. Matsuoka (1993). "Phenylketonuria mutant alleles in different populations: missense mutation in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene." Clinical chemistry 39(11 Pt 1): 2354-5

161. Thomason MJ, Lord J, BainMDet al. Asystematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. J Public Health Med 1998; 20:331-43.

162. Thompson A, Tillotson S, Smith I, Kendall B, Moore S, Brenton D. Brain MRI changes in phenylketonuria: Associations with dietary status. Brain. 1993;116(4):811-821.

163. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kalogerakou M, Soulpi K, Missiou-Tsangaraki S, Kattamis C. Preliminary mutation analysis in the phenylanaline hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. Hum Genet. 1994;94(5).

164. Trefz FK, Burton BK, Longo N, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Pediatr. 2009;154:700–707.

165. Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G (2010) Long-term follow-up of patients with phenylketonuria receiving tetrahydrobiopterin treatment. J Inherit Metab Dis

166. Trunzo R. et al. Mutation analysis in hyperphenylalaninemia patients from South Italy. Clin Biochem46, 1896–1898 (2013).

167. van Rijn M, Bekhof J, Dijkstra T, Smit PG, Moddermam P, van Spronsen FJ. A different approach to breastfeeding of the infants with phenylketonuria. European Journal of Pediatrics. 2003;163:323–326.

168. van Spronsen F.J., Hoeksma M., Reijngoud D. (2009) Brain dysfunction in phenylketonuria: Is phenylalanine toxicity the only possible cause? J Inherit Metab Dis 32: 46–51

169. van Spronsen FJ, Ahring KK, Gizewska M. PKU – What is daily practice in various centres in Europe? J Inherit Metab Dis. 2009;32:58–64.

170. van Spronsen FJ, Burgard P. The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood: the need for a new guideline. J Inherit Metab Dis. 2008;31:673–679. doi: 10.1007/s10545-008-0918-6.

171. van Spronsen FJ, van Rijn M, Dorgelo B, et al. Phenylalanine tolerance can already reliably be assessed at the age of 2 years in patients with PKU. J Inherit Metab Dis. 2009;32:27–31

172. Van Spronsen, F.J., Van Rijn, M., Bekhof, J., Koch, R. and Smit. P.G. (2001).Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets, The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2): 153-157.

173. Vela-Amieva M, Abreu-González M, González-del Angel A, Ibarra-González I, Fernández-Lainez C, Barrientos-Ríos R et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency in Mexico: genotype-phenotype correlations, BH 4 responsiveness and evidence of a founder effect. Clin Genet. 2014;88(1):62-67.

174. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, Mitchell J, Smith WE, Thompson BH, Berry SA. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. Genet Med. 2014, 16: 188- 200.

175. Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. Mol Genet Metab.2007;92:63–70

176. Walter J.H., White F.J., Hall S.K., MacDondald A., Rylance G., Boneh A., et al. (2002) How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? Lancet 360: 55–57

177. Waters PJ (2003). How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. Hum. Mutat. 21: 357-369.

178. Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Jones AO, Scriver CR (1999) Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: a mechanism underlying phenylketonuria. J Inherit Metab Dis 22:208–212

179. Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. Mol Genet Metab 69:101–110

180. Waters PJ, Parniak MA, Hewson AS, Scriver CR (1998) Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). Hum Mutat 12:344–354

181. Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR (1998b) In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. Hum Mutat 11:4–17

182. Weinstein M, Eisensmith R, Abadie V, Avigad S, Lyonnet S, Schwartz G et al. A missense mutation, S349P, completely inactivates phenylalanine hydroxylase in North African Jews with phenylketonuria. Hum Genet. 1993;90(6).

183. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev. 2008;29:31–41.

184. Woo, S. L. C., Lidsky, A., Law, M., Kao, F. T. Regional mapping of the human phenylalanine hydroxylase gene and PKU locus to 12q21-qter. (Abstract) Am. J. Hum. Genet. 36: 210S only, 1984.

185. www.nspku.org.uk

186. Yang Y, Drummond-Borg M and Garcia-Heras J (2001). Molecular analysis of phenylketonuria (PKU) in newborns from Texas. Hum. Mutat. 17: 523.

187. Yannicelli, S., and Ryan, A. (1995) Improvements in behavior and physical manifestations in previously untreated adults with phenylketonuria using a phenylalanine-restricted diet: a national survey, Journal of Inherited Metabolic Disease, 18: 131-134.

188. Zaffanello M, Zamboni G, Maffeis C, Tatò L. Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false-positive and positive results at recall-testing. J Med Screen. 2003;10(4):181-183.

189. Zaffanello M, Zamboni G, Maselli M, Gandini A, Camilot M, Maffeis C et al. Genetic Analysis Carried Out on Blood-Spots of Phenylalanine Hydroxylase-Deficient Newborns Detected by Northeastern Italian Neonatal Screening. Genetic Testing. 2005;9(2):133-137.

190. Zekanowski, C et al (1997), Molecular basis of mild hyperphenalaninemia in Poland, J Med Genet, Vol 34, pp 1035-6.

191. Zhan JY et al. 2009. Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China. World J Pediatr 5(2):136-139.

192. Zhou Y, Ma Y, Zhang Q, Gao W, Liu J, Yang J et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. Genetics and Molecular Biology. 2012;35(4):709-713.

193. Zorzi G, Redweik U, Trippe H, Penzien JM, Thony B, Blau N. Detection of sepiapterin in CSF patients with sepiapterin reductase deficiency. Mol Genet Metab 2002; 75: 174–7.

194. Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin N. 1997. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. Hum Genet 100:189–194.

195. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. Human Mutation. 2003;21(4):345-356.

196. Zschocke JHoffmann G. Phenylketonuria mutations in Germany. Human Genetics. 1999;104(5):390-398.