МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Адил Мохамед Кадъм

КЛИНИЧНА И ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
“ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”
Шифър 7.1.
Професионално направление: „Медицина”
Научна специалност: „Педиатрия”

София, 2016 г.

Изследванията са извършени в Отделение по клинична генетика, СБАЛДБ „Проф. Иван Митев” и Национална ге.

Дисертацията съдържа 127 стандартни страници и включва 18 фигури, 16 таблици и 2 приложения. Оформена е в 10 стандартни глави: литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, приложения и литературни източници. Библиографията обхваща 196 източника, като 125 броя са публикувани през последните 15 години (70 от последните 10 години).

Авторът е задочен докторант към Катедра по педиатрия, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по педиатрия към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 10.03.2016 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Педиатрия, 4-ти етаж на СБАЛДБ, ул. „Академик Иван Гешов ” №11, София, 1606.

Защитата ще се състои на 02.06.2016 год. от 13.30 часа в залата на СБАЛДБ „Проф. д-р Иван Митев”.

Автор: д-р Адил Мохамед Кадъм

Заглавие: Клинична и генетична характеристика на български пациенти с фенилкетонурия

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”, шифър 7.

Професионално направление: „Медицина”, шифър 7.1.

Научна специалност: „Педиатрия”, (шифър 03.01.50)

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

ФАХ – фенилаланин хидроксилаза / фенилаланин хидроксилазен

ФА фенилаланин

BH_4 – тетрахидробиоптерин

ФКУ – фенилкетонурия

ХФА – хиперфенилаланинемия

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

PKUDOS – Phenylketonuria Demographics, Outcome and Safety

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

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. 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 ВН4 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.

II. 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. 1.

Таблица 1. Разпределение на тестовете по възрастова група и пол.

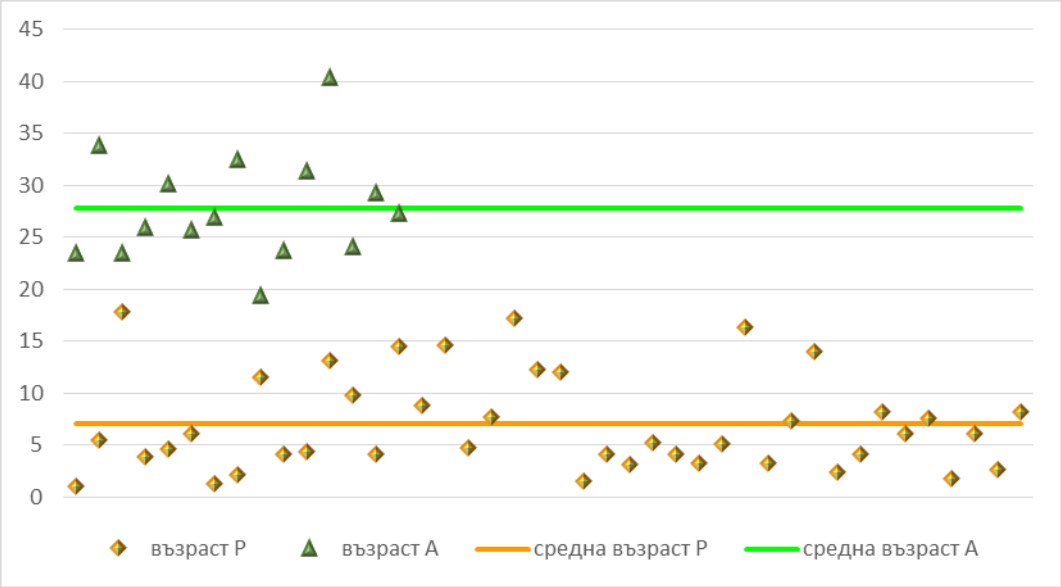
	Пол		МА		ОСТ		МА + ОСТ	
Пол	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Под 18г.	22	20	20	16	17	15	15	11
Над 18г.	8	7	6	3	5	5	3	2
Общо	30	27	26	19	22	20	18	13

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. 1.

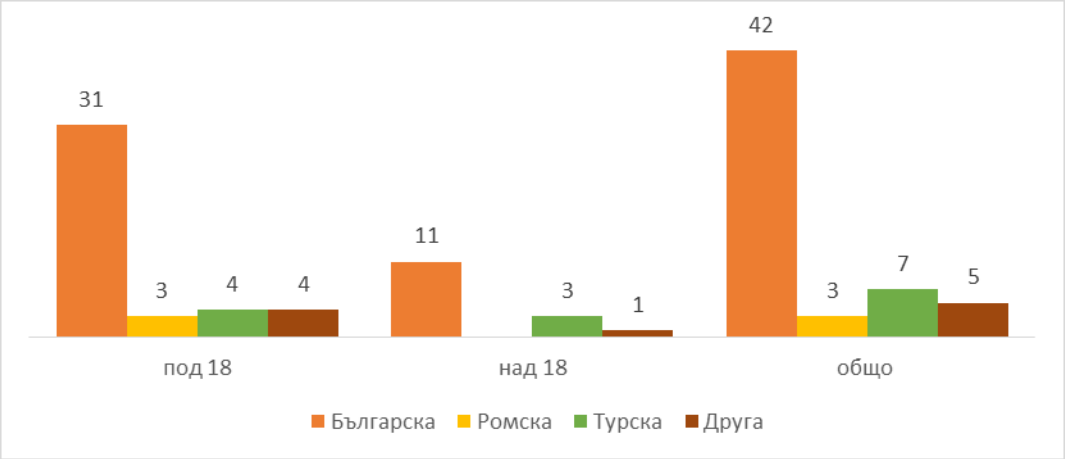
Изследваните пациенти са с различна етническа принадлежност, като се обособяват четири основни групи – българска, ромска, турска и други. На фиг.2 е представено разпределението по етнически групи.

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



Фигура 1. Разпределение на пациентите по възраст.

Р < 18г.; А ≥ 18г.



Фигура 2. 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). 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 K2ЕДТА) 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. 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.

III. 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.1). Резултатите от проведения ОСТ са представени на табл. 2.

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.3 е графично представена процентната промяна в изходните стойности на пациентите.

Таблица 2. 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 съотвентно 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.1). при изследваните пациенти се установява наличието на 23 различни мутации, разпределени по възрастови групи, както е показано на фиг.4.

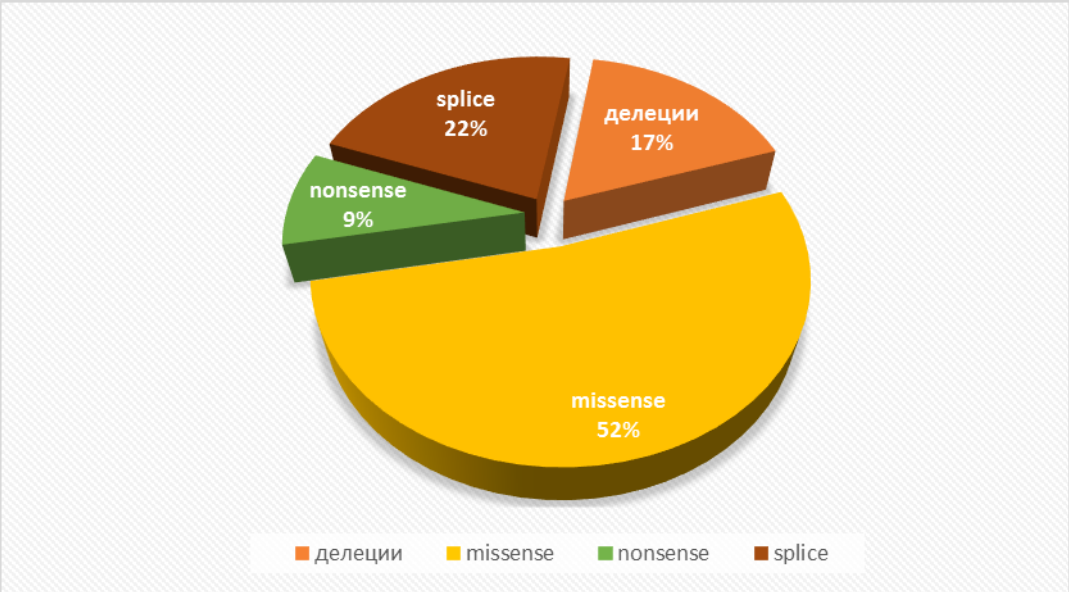
Най-честата мутация е p.R408W (c.1222C>T), която се характеризира с 2% остатъчна активност на мутантния ензим. Тя се открива в хетерозиготна комбинация при 15 от изследваните пациенти, а в хомозиготно при 6 от тях. Втората по честота мутация в групата под 18г. е p.R261Q (c.782G>A) – с остатъчна ензимна 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.5.

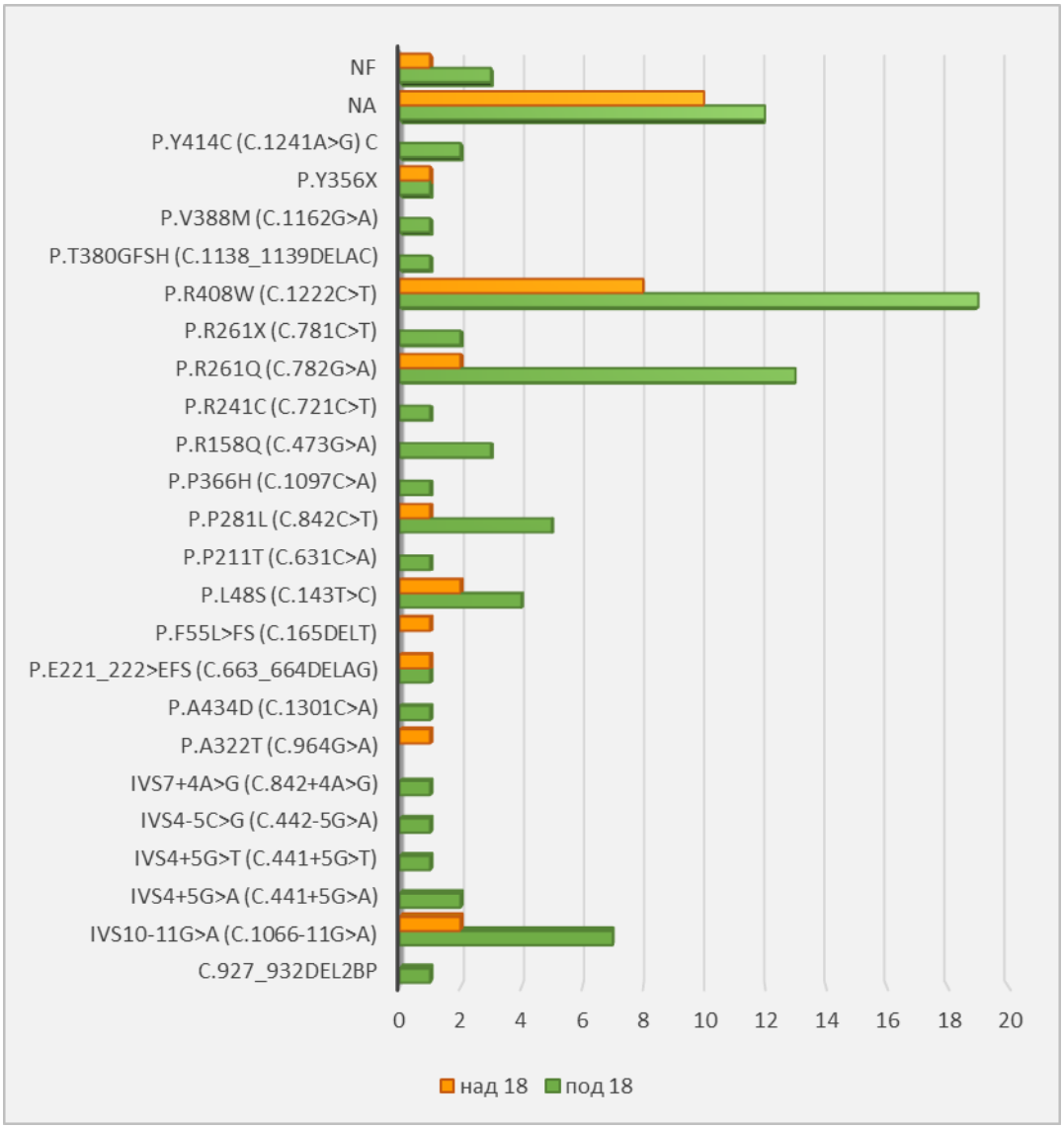
С най-голям дял са missense мутациите, следвани от сплайсинг дефектите и делециите, а с най-малък процент са мутациите, водещи до формиране на безсмислени кодони.

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. 6.

От направения мутационен анализ се установиха 30 генотипа (табл. 3), като при двама пациенти (генотипове G3 и G19) е открита само една мутация.



Фигура 5. Процентно разпределение на мутациите по вид.

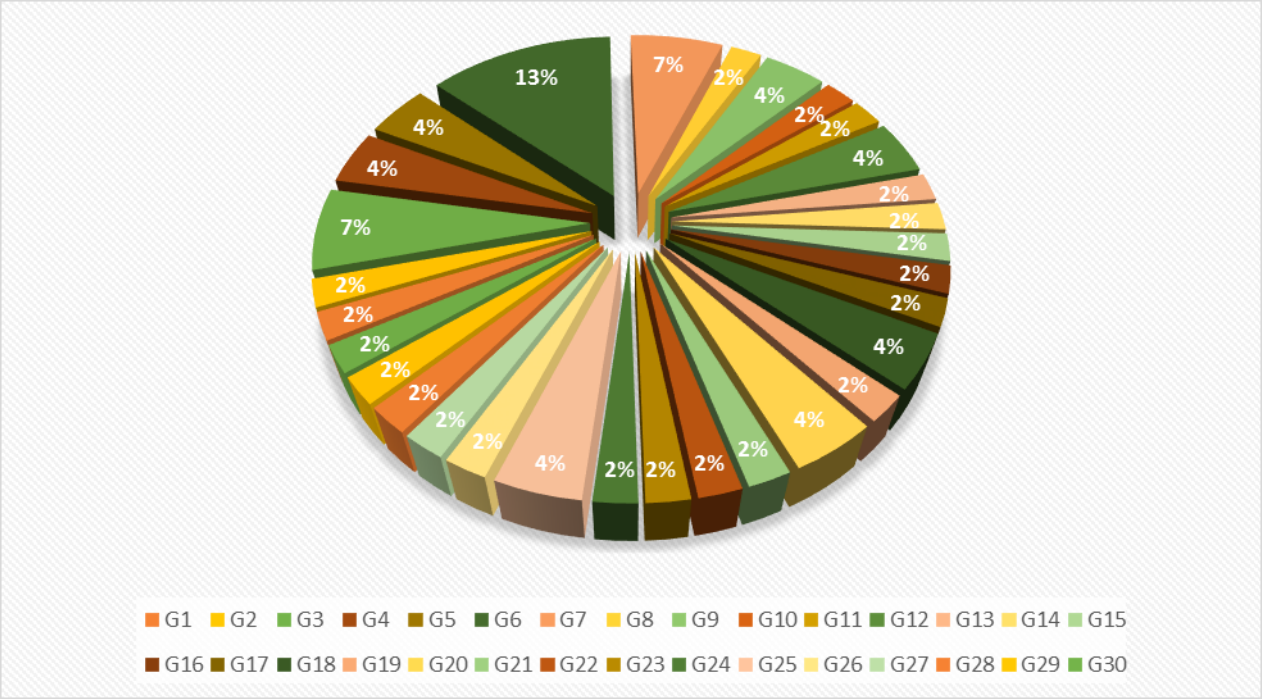


Фигура 4. Разпределение на мутациите по възрастови групи.

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

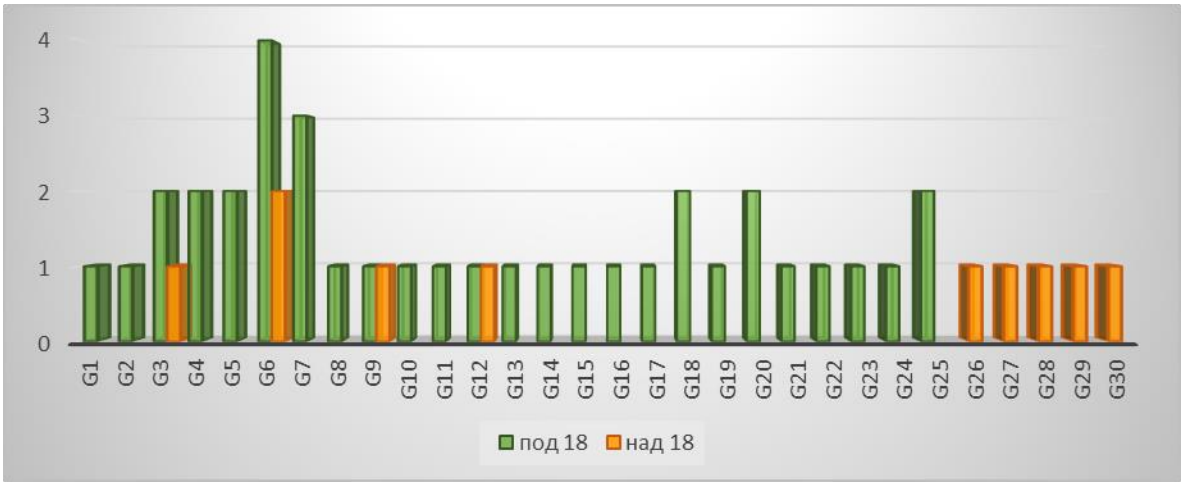
Фигура 6. Процентно разпределение на мутациите според засегнатия домейн.

Установените 30 генотипа имат следното процентно съотношние – фиг. 7.



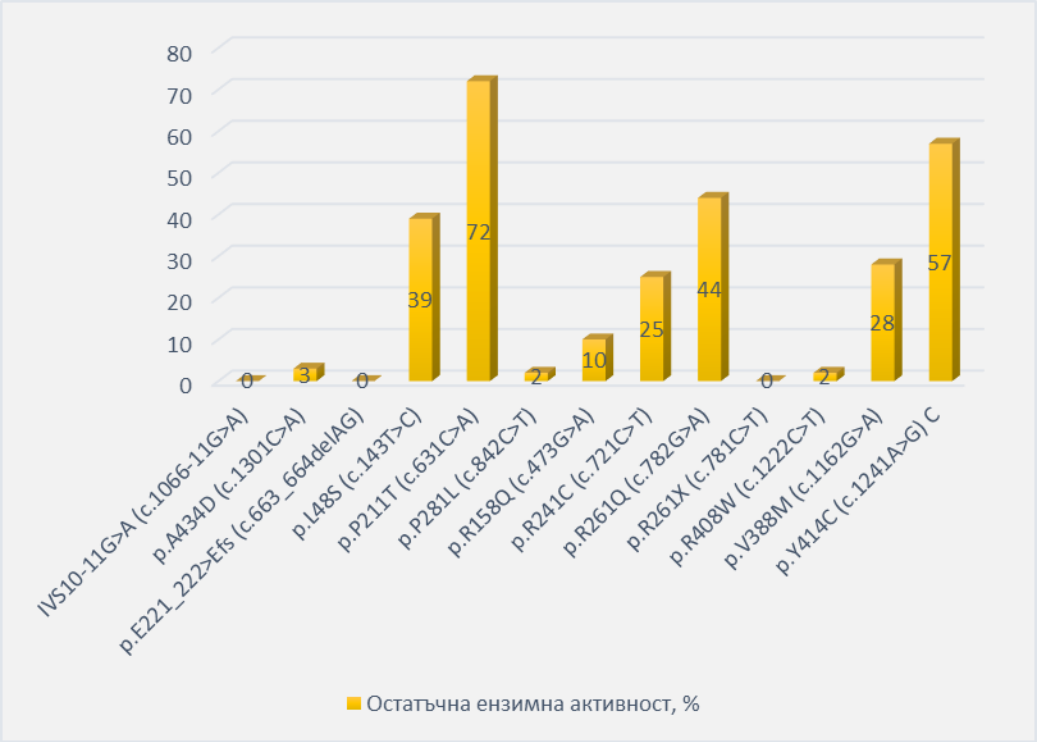
Фигура 7. Процентно съотношение на генотиповете.

Разпределението на генотиповете по възрастови групи е графично изобразено на фиг. 8.



Фигура 8. 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. 9 е представена графично остатъчната ензимна активност за тези 13 мутации, която варира от 0 до 72%.

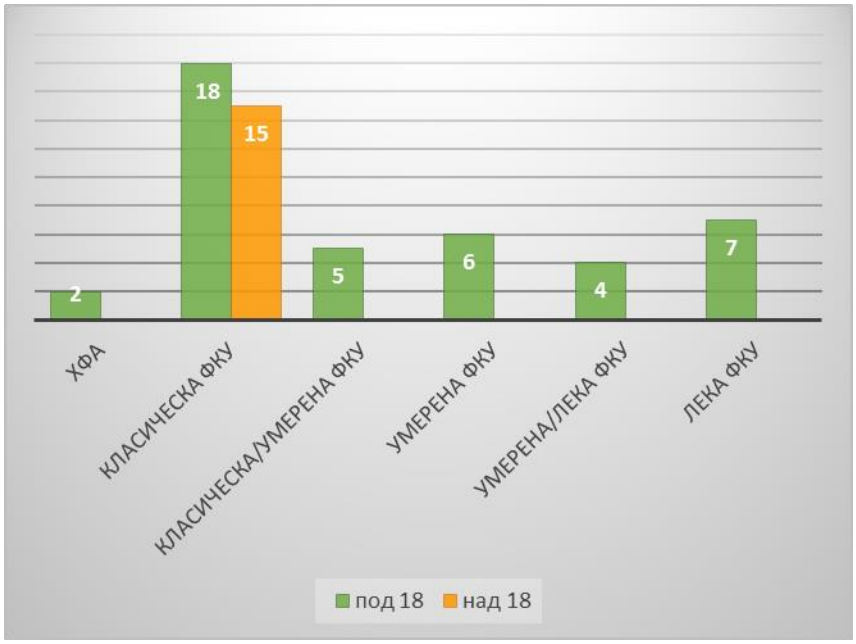


Фигура 9. Ниво на остатъчна ензимна активност.

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, разпределението на пациентите по фенотип е следното – фиг.10.



Фигура 10. 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).

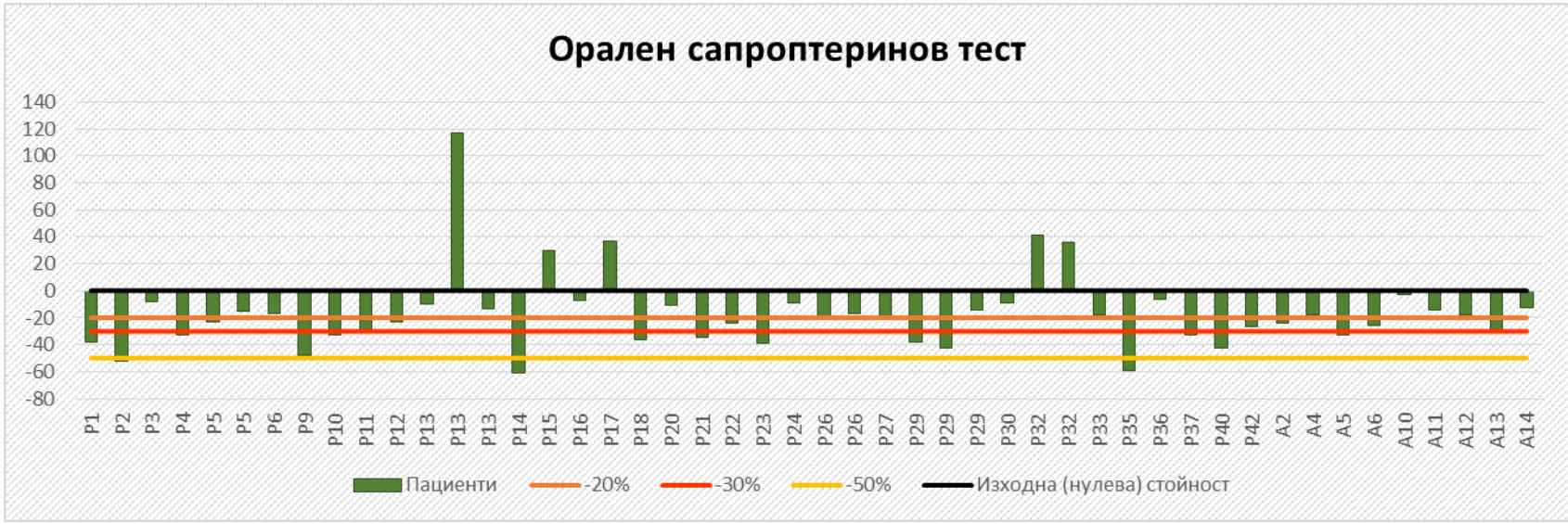
5. FoldX стойности

На табл. 3 са представени мутациите, за които е възможно изчисляване на FoldX стойности, заедно с остатъчната ензимна активност, с която са свързани.

Таблица 3. 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 3. Процентно намаление на изходните стойности при орален сапроптеринов тест.

Таблица 4. 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

IV. 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 мутантня 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. 5 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 5. 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 ензимната 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. 6 са представени пациентите от ромската етническа група.

Таблица 6. 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. 6) 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. 8). 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 7. 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 7. 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. 7) 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. 8), 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 8. 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.8 се вижда алелната честота за различните мутации, установени в нашето проучване в сравнение с алелната им честота от BIOPKU.

Таблица 9. Алелна честота на мутациите

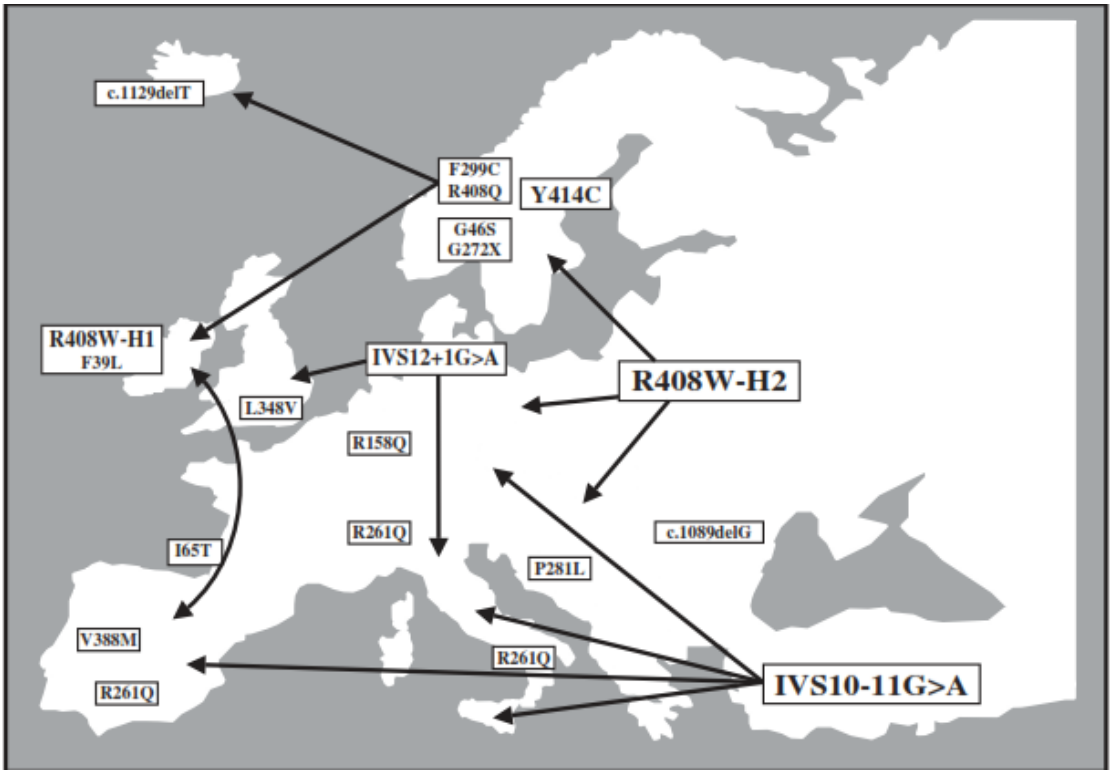
Мутация	Брой	Алелна честота, %	Алелна честота BIOPKU, %
p.R408W	27	23.68	21.2
p.R261Q	15	13.15	5.57
IVS10-11G>A	9	7.89	6.9
p.L48S	6	5.26	2.94
p.P281L	6	5.26	3.29
p.R158Q	3	2.63	3.07
IVS4+5G>A	2	1.75	0.172
p.E221_222>Efs	2	1.75	
p.R261X	2	1.75	0.84
p.Y356X	2	1.75	0.338
p.Y414C	2	1.75	2.86
c.927_932del2bp*	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. 11 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-честа 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 11. 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 10. 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 ФАХ-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 11. 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 ОЕА), 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 ОЕА, така и за свързания с нея метаболитен фенотип. A434D се изявява, като класическа ФКУ при функционални хемизиготи и хомозиготи и има 3% ОЕА. 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% ОЕА, 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% ОЕА, 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 (Р37), а другият е с бавен отговор (Р5), 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 (Р42) 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 паценти, 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 ОЕА 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 OEA 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 OEA (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.

V. 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 PAH-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. 12).

Фигура 12. Клиничен алгоритъм за диагностика, лечение и проследяване при хиперфенилаланинемия.

VI. 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 пръвеждането 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.

VII. 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.

VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА

Научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. **А. Кадъм**, Фенилкетонурия; Практическа педиатрия 4/2013; 9-11
2. Тинчева Р., **А. Кадъм**, Д. Авджиева, Фенилкетонурия – диагноза и лечение. Педиатрия 2014, 2, 57-60
3. **Кадъм. А**., Д.Авджиева, С.Андонова, М.Иванова, Р.Тинчева, А.Савов. Клинична и генетична характеристика на пациенти с фенилкетонурия в България. Педиатрия, 4, 2015, 28-32
4. Urh Groselj, Mojca Zerjav Tansek, Andraz Smon, Natalija Angelkova, Dana Anton, Ivo Baric, Maja Djordjevic, Lindita Grimci, Maria Ivanova, **Adil Kadam**, Vjosa Mulliqi Kotori, Hajrija Maksic, Oana Marginean, Otilia Margineanu, Olivera Milijanovic, Florentina Moldovanu, Mariana Muresan, Simona Murko, Michaela Nanu, Barbka Repic Lampret, Mira Samardzic, Vladimir Sarnavka, Aleksei Savov, Maja Stojiljkovic, Biljana Suzic, Radka Tincheva, Husref Tahirovic, Alma Toromanovic, Natalia Usurelu, Tadej Battelino; Newborn screening in southeastern Europe; Molecular Genetics and Metabolism 113 (2014) 42–45
5. Mojca Zerjav Tansek, Urh Groselj, Natalija Angelkova, Dana Anton, Ivo Baric, Maja Djordjevic, Lindita Grimci, Maria Ivanova, **Adil Kadam**, Vjosa Kotori, Hajrija Maksic, Oana Marginean, Otilia Margineanu, Olivera Miljanovic, Florentina Moldovanu, Mariana Muresan, Michaela Nanu, Mira Samardzic, Vladimir Sarnavka, Aleksei Savov, Maja Stojiljkovic, Biljana Suzic, Radka Tincheva, Husref Tahirovic, Alma Toromanovic, Natalia Usurelu and Tadej Battelino; Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe – survey results from 11 countries; Orphanet Journal of Rare Diseases (2015) 10:68

Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд

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

2. XIII Национален конгрес по педиатрия 2015 г. Орална презентация: Резултати от едногодишно лечение с Kuvan® на пациенти с фенилкетонурия

А. Кадъм, Д. Авджиева-Тзавелла, Р. Тинчева, А. Савов, М. Иванова, С. Андонова

IX. БЛАГОДАРНОСТИ

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.