УДК 577.122.332

Оценка степени проявления фенилкетонурии, обусловленной гомозиготной мутацией p.R155H, при помощи масс-спектрометрического анализа метаболитов крови

О. А. Батурина[1], А. А. Черноносов[1], В. В. Коваль[1,2], И. В. Морозов[1,2*]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8
[2]Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
*E-mail: mor@niboch.nsc.ru
Поступила в редакцию 21.12.2018
Принята к печати 27.03.2019
DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-42-46

РЕФЕРАТ **Мы сравнили проявления фенилкетонурии (ФКУ) у двух гомозиготных носителей редкой мутации p.R155H – брата и сестры, детей одних и тех же родителей, получавших различное лечение. Такие пациенты представляют собой уникальную модель, позволяющую оценить как степень фенотипического проявления мутации, так и эффективность терапии. ФКУ, обусловленная мутациями с достаточной остаточной активностью фенилаланингидроксилазы, зачастую не выявляется, если диагноз основан исключительно на концентрации фенилаланина в крови. Подобная ошибка была допущена в случае одного из наших пациентов. Для уменьшения вероятности ошибок мы предлагаем использовать для диагностики более точные методы, например, масс-спектрометрический анализ метаболитов крови, эффективность которого показана в данной работе.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **p.R155H, гиперфенилаланинемия, карнитин в крови, масс-спектрометрия, мутация, фенилаланин в крови, фенилкетонурия.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **ФКУ – фенилкетонурия; ФАГ – фенилаланингидроксилаза; ЦНС – центральная нервная система; С0 – свободный карнитин; С2–С18 – ацилкарнитины.**

ВВЕДЕНИЕ

Фенилкетонурия типа I (классическая) (ФКУ; MIM 261600) – аутосомное рецессивно наследуемое заболевание, обусловленное недостаточной активностью фенилаланингидроксилазы (ФАГ; [КФ 1.14.16.1]) [1, 2]. Недостаток ферментативной активности обычно обусловлен мутациями в гене фенилаланингидроксилазы [1]. Неполное превращение фенилаланина в тирозин из-за недостаточной активности ФАГ приводит к накоплению в тканях и биологических жидкостях фенилаланина и токсичных продуктов альтернативных путей его метаболизма, таких, как фенилпируват, винилацетат, фениллактат и фенилацетилглутамин, что приводит к развитию симптомов заболевания, в частности слабоумия. Распространенными признаками фенилкетонурии также являются уменьшение концентрации тирозина и изменение баланса аминокислот в биологических жидкостях. Повсеместно используемая классификация степени проявления ФКУ, основанная на концентрации фенилаланина в крови, была предложена C.R. Scriver и S. Kaufman [3]. Согласно N. Blau и соавт. [4] ФКУ рассматривается как классическая (тяжелая) при концентрации фенилаланина в крови до лечения более 1200 мкМ; как ФКУ средней тяжести – при концентрации фенилаланина в пределах 900–1200 мкМ; как легкая форма – при концентрации 600–900 мкМ; концентрации менее 600 мкМ до лечения рассматриваются как гиперфенилаланинемия.

Неонатальный биохимический анализ является наиболее широко используемым в настоящее время методом ранней диагностики генетических заболеваний и предотвращения их последствий. Всемирная организация здравоохранения определила социальные и экономические предпосылки для включения заболевания в национальные программы неонатальной диагностики [5]. В настоящее время неонатальная диагностика ФКУ, как одного из наиболее распространенных генетических заболеваний (частота от 1 : 10000 до 1 : 25000 среди европеоидов [6]), проводится в большинстве стран. В Российской Федерации такая диагностика предусматривает несколько измерений уровня фенилаланина в плазме крови, первое из которых проводится на 4 или 5 день после рождения. Если обнаруживается повышенный уровень, то измерение проводится повторно. Однако диагностика, основанная только на уровне фенилаланина в крови, может быть недостоверной, особенно при пограничных уровнях. Для точной диагностики требуются более совершенные методы, особенно в случае мутаций с относительно высокой остаточной активностью ФАГ, при которых уровень фенилаланина в крови повышается незначительно, оставаясь менее 500 мкМ, что недостаточно для однозначной диагностики. Масс-спектрометрический анализ метаболитов крови может обеспечить постановку более точного диагноза, основанного на оценке концентрации не только фенилаланина, но также тирозина и других аминокислот, что, в частности, позволяет определить соотношение фенилаланина и тирозина. Основанный на уровне метаболитов диагноз должен подтверждаться генетическим анализом с идентификацией мутаций гена *ФАГ* и характера их наследования при помощи определения нуклеотидных последовательностей соответствующих локусов.

В настоящее время основным и наиболее широко используемым методом коррекции ФКУ является диетотерапия [7, 8], направленная прежде всего на предотвращение повреждений центральной нервной системы (ЦНС), ведущих к деградации умственных способностей. Для достижения этой цели диетотерапия должна начинаться не позднее нескольких недель после рождения. Будучи в целом достаточно эффективной, такая диета ограничивает потребление белков животного происхождения, что может привести к уменьшению концентраций свободного карнитина (C0) и ацилкарнитинов (C2–C18), и, как следствие, к нарушениям метаболизма и функционирования митохондрий у некоторых пациентов [9].

В данной работе мы определяли уровни метаболитов в крови при наличии и отсутствии диетотерапии у двух родственных гомозиготных носителей ассоциированной с ФКУ мутации p.R155H гена *ФАГ* с использованием масс-спектрометрического анализа высушенных образцов крови. Близкородственных гомозиготных пациентов с различными историями использования диетотерапии можно рассматривать как уникальную модель для исследования как фенотипического проявления мутации, так и эффективности терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оба пациента являются детьми одних и тех же родителей. У девочки (1), рожденной в июне 2009 года в России, ФКУ выявлена в процессе неонатальной биохимической диагностики, и она получала диету с ограниченным содержанием фенилаланина со второго месяца жизни. У мальчика (2), рожденного в июле 2001 года в Узбекистане, неонатальная диагностика не выявила ФКУ, и к нему не применяли диетотерапию. Образцы крови для масс-спектрометрического анализа были взяты в 2010 году, примерно через год после начала диетотерапии у пациента 1. В это же время проведена оценка физического развития и статуса ЦНС пациентов, которая не выявила каких-либо существенных отклонений. Исследование проводили в соответствии с требованиями комитета по медицинской этике ИХБФМ СО РАН.

В процессе неонатальной диагностики образцы крови собирали, используя бумажные фильтры (Perkin Elmer, Финляндия), концентрацию фенилаланина в крови определяли с использованием анализатора Delfia/Victor и набора реактивов производителя (Wallac Oy, Финляндия). Геномную ДНК выделяли из крови как описано ранее [10]. Мутации в гене *ФАГ* идентифицировали, определяя методом Сэнгера по двум цепям ДНК нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР-амплификации областей всех экзонов и прилежащих районов интронов гена *ФАГ* с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 и генного анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Нуклеотидные последовательности ДНК обоих пациентов были идентичными и соответствовали известным последовательностям гена *ФАГ* за исключением мутации p.R155H. Нуклеотидные последовательности родителей пациентов позволили подтвердить наследование мутации p.R155H. Масс-спектрометрический анализ содержания фенилаланина, тирозина и ацилкарнитинов проводили в ЦКП масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН с использованием стандартной процедуры [11]. Использовали реактивы для подготовки образцов и внутренние стандарты из набора для диагностики новорожденных Amino

acids and acylcarnitines kit # 55000 (Chromsystems Instruments & Chemicals, Германия), образцы готовили согласно протоколу производителя набора. Анализ проводили с использованием системы тандемного масс-спектрометра Agilent 6410 QQQ с системой ионизации ESI, объединенного с системой жидкостной хроматографии Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Количественный анализ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с общим временем анализа 2.5 мин. Сигнал регистрировали и анализировали с использованием программы MassHunter v.1.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Точечная мутация p.R155H является заменой G на A в структуре экзона 5 гена *ФАГ*, приводящей к замене аргинина в каталитическом домене ФАГ на гистидин. Остаточная активность фермента, содержащего мутацию, остается достаточно высокой, примерно 44% от исходной, согласно данным http://www.biopku.org [12]. Поэтому мутация p.R155H считается ассоциированной с гиперфенилаланинемией с относительным коэффициентом корреляции генотипа и фенотипа 8 по шкале, предложенной Guldberg и соавт. [1]. Эта редкая мутация ранее была описана лишь в одном случае в сочетании с мутацией p.D143G у пациента с диагнозом гиперфенилаланинемия [13]. Нами изучены два рожденных от одних родителей гомозиготных носителя мутации p.R155H, один из которых подвергался диетотерапии, в то время как другой – нет. Будучи гомозиготными носителями мутации, такие пациенты дают уникальную возможность непосредственно изучить степень проявления мутации на уровне фенотипа, в то время как существенные различия в применявшейся терапии позволяют оценить ее сравнительную эффективность.

Первоначальное фенотипическое проявление мутации p.R155H у пациентов 1 и 2 несколько различалось, несмотря на одинаковый генотип по локусу *ФАГ* и общую родословную. Концентрация фенилаланина в крови в момент неонатальной диагностики у пациента 1 составила 1100 мкМ, на основании чего был поставлен диагноз ФКУ средней тяжести и предписана диетотерапия. У пациента 2 ФКУ не была диагностирована в процессе неонатальной диагностики, проводившейся в Республике Узбекистан, возможно, в силу разных сроков и стандартов диагностики. В 2010 году уровень фенилаланина в крови этого пациента составил 497 ± 13 мкМ (*таблица*), что соответствует максимум гиперфенилаланинемии. Таким образом, при использовании в качестве критерия только уровня фенилаланина крови можно заключить, что генотип p.R155H/p.R155H может проявляться достаточно широким спектром симптомов – от слабо выраженной гиперфенилаланинемии до ФКУ средней тяжести, в зависимости от других биохимических особенностей пациента, ассоциированных, например, с полом, составом питания в неонатальный период и т.п. При этом неонатальная диагностика, основанная на концентрации фени-

Концентрации метаболитов крови по данным масс-спектрометрии

Метаболит	Концентрация метаболита, мкМ		Медианное значение у здоровых детей (5-й–95-й процентили), мкМ (по данным [14])
	пациент 1	пациент 2	
Фенилаланин	298 ± 10	497 ± 13	45 (32–64)
Тирозин	43 ± 2	86 ± 2	84 (48–159)
Фенилаланин / Тирозин	6.9 ± 0.3	5.8 ± 0.1	
Свободный карнитин (C0)	31.7 ± 0.4	44.0 ± 1.1	15.5 (9.2–26.4)
Ацетилкарнитин (C2)	10.4 ± 0.7	11.9 ± 0.3	17.3 (10.1–29.4)
Пропионилкарнитин (C3)	1.48 ± 0.04	2.68 ± 0.2	1.42 (0.81–2.56)
Бутирилкарнитин (C4)	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 (0.12–0.30)
Изовалерилкарнитин (C5)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 (0.06–0.17)
Гексаноилкарнитин (C6)	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.002	0.05 (0.02–0.10)
Октаноилкарнитин (C8)	0.02 ± 0.002	0.06 ± 0.02	0.05 (0.03–0.08)
Деканоилкарнитин (C10)	0.02 ± 0.002	0.07 ± 0.002	0.07 (0.04–0.13)
Додеканоилкарнитин (C12)	0.03 ± 0.02	0.09 ± 0.002	0.08 (0.04–0.19)
Тетрадеканоилкарнитин (C14)	0.06 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.18 (0.11–0.31)
Гексадеканоилкарнитин (C16)	0.56 ± 0.02	0.53 ± 0.02	2.93 (1.65–4.76)
Октадеканоилкарнитин (C18)	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.86 (0.52–1.43)

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего пяти или шести измерений.

лаланина в крови, может не выявить заболевание, что и произошло с пациентом 2.

Эффективное использование масс-спектрометрии для точной диагностики ФКУ, особенно при промежуточных концентрациях фенилаланина в крови, описано в работах Chace и соавт. [15, 16]. В качестве более точного и селективного критерия диагностики вместо концентрации фенилаланина они предложили использовать отношение концентрации фенилаланина и тирозина, поскольку при этом корректируются изменения общего уровня аминокислот. Отношение концентраций фенилаланина и тирозина в крови в норме находится в диапазоне от 0.49 до 0.93, повышаясь до значений от 1.3 до 14.3 у больных ФКУ [15, 16]. Мы зарегистрировали высокие значения этого параметра, явно и однозначно соответствующие ФКУ как у пациента 1 (6.9 ± 0.3), так и у пациента 2 (5.8 ± 0.1) (*таблица*). В то же время родители пациентов – гетерозиготные носители мутации, имели отношения, характерные для здоровых людей: 0.9 ± 0.1 (мать) и 0.7 ± 0.02 (отец).

Мы также определили уровни карнитинов в крови пациентов (*таблица*) и сравнили их с данными 20 здоровых детей [17]. Ранее было показано, что уровни карнитинов могут быть полезным критерием при идентификации врожденных сбоев метаболизма, и они существенно меняются при различных метаболических нарушениях [18]. Также отмечено, что концентрации карнитинов значительно понижаются в крови пациентов с ФКУ после диетотерапии с пониженным содержанием фенилаланина, если она не дополняется карнитинами [19]. У наших пациентов выявлено незначительное снижение общего уровня карнитинов (44.9 мкМ у пациента 1 и 55.2 мкМ у пациента 2) относительно нормальных уровней, которые составляют 60–100 мкМ [20]. Общие уровни ацилкарнитинов (13.2 мкМ у пациента 1 и 13.9 мкМ у пациента 2) полностью соответствовали норме. Возможный дефицит карнитинов мы определяли по отношению концентраций ацилкарнитинов и свободных карнитинов. Значения (0.42 у пациента 1 и 0.33 у пациента 2) были значительно ниже верхнего предела нормы (0.6), что свидетельствует о достаточных уровнях свободного карнитина, а также о соответствующей норме доле связанных форм карнитина. Таким образом, концентрации ацилкарнитинов у наших гомозиготных носителей p.R155H были в пределах нормы, несмотря на то, что ряд исследований [21, 22] свидетельствуют о значительных отличиях концентраций ацилкарнитинов у пациентов с классической ФКУ от нормы.

ВЫВОДЫ

Мы обследовали двух близкородственных гомозиготных носителей мутации p.R155H, ассоциированной с ФКУ, с различными историями терапии: один подвергался диетотерапии, а другой лечения не получал. В случае использования концентрации фенилаланина в крови в качестве единственного диагностического критерия ФКУ состояние одного пациента следует классифицировать как гиперфенилаланинемию, а другого – как ФКУ средней тяжести. В то же время использование отношения концентраций фенилаланина и тирозина в качестве критерия позволяет достоверно диагностировать ФКУ у обоих пациентов. Таким образом, уровень фенилаланина в крови сам по себе не может служить достоверным критерием диагностики ФКУ во всех случаях и не должен использоваться в качестве единственного диагностического критерия. Наши данные подтверждают возможность использования соотношения концентраций фенилаланина и тирозина в качестве более точного и достоверного критерия при неонатальной диагностике. Мы также показали возможность использования масс-спектрометрического анализа в качестве основного метода неонатальной диагностики ФКУ.

Определенные нами концентрации свободной и связанных форм карнитинов в крови свидетельствуют о том, что гомозиготные носители мутации p.R155H, вероятно, не испытывают существенных ограничений энергетического обмена в клетках, в отличие от пациентов с классической ФКУ или ФКУ средней тяжести. ●

Работа выполнена при поддержке проектов ГЗ (№ 0309-2019-0020 и 0309-2019-0007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guldberg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ullrich K., Hoffmann G.F., Burgard P., Schmidt H., et al. // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 63. P. 71–79.
2. DiLella A.G., Kwok S.C., Ledley F.D., Marvit J., Woo S.L. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 743–749.
3. Scriver C.R., Kaufman S., Woo S.L. // Annu. Rev. Genet. 1988. V. 22. P. 301–321.
4. Blau N., van Spronsen F.J., Levy H.L. // Lancet. 2010. V. 376. P. 1417–1427.
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания».
6. Williams R.A., Mamotte C.D., Burnett J.R. // Clin. Biochem. Rev. 2008. V. 29. P. 31–41.
7. Ahring K., Bélanger-Quintana A., Dokoupil K., Gokmen Ozel H., Lammardo A.M., MacDonald A. // Clin. Nutr. 2009. V. 28. P. 231–237.
8. Bushueva T.V. // Questions of Modern Pediatrics. 2010. V. 9. P. 157–162.

9. Mutze U., Beblo S., Kortz L., Matthies C., Koletzko B., Bruegel M., Rohde C., Thiery J., Kiess W., Ceglarek U. // PLoS One. 2012. V. 7. P. 1–9.
10. Baturina O.A., Tupikin A.E., Lukjanova T.V., Sosnitskaya S.V., Morozov I.V. // J. Med. Biochem. 2014. V. 33. P. 333–340.
11. Chace D.H., Kalas T., Naylor E.W. // Clin. Chem. 2003. V. 49. P. 1797–1817.
12. Databases of Pediatric Neurotransmitter Disorders (PND), including the locus-specific database of PAH variants and BIOPKU genotypes database [Internet]. Division of Metabolism University Children's Hospital Steinwiesstrasse 75 CH-8032 Zürich Switzerland [cited 2018 Sep 10]. Available from: http:www.biopku.org
13. Dobrowolski S.F., Pey A.L., Koch R., Levy H., Ellingson C.C., Naylor E.W., Martinez A. // J. Inherit. Metab. Dis. 2009. V. 32. P. 10–21.
14. Liu Q., Wu J., Shen W., Wei R., Jiang.J, Liang J., Chen M., Zhong M., Yin A. // J. Matern. Fetal Neonatal. Med. 2017. V. 30 (22). P. 2697–2704.
15. Chace D.H., Mlllington D.S., Terada N., Kahier S.G., Roe C.R., Hofman L.F. // Clin. Chem. 1993. V. 39. P. 66–71.
16. Chace D.H., Sherwin J.E., Hillman S.L., Lorey F., Cunningham G.C. // Clin. Chem. 1998. V. 44. P. 2405–2409.
17. Leontieva I.V., Nikolaeva E.A., Alimina E.G., Zolkina I.V. // Practice Pediatrician. 2012. V. 10. P. 74–79.
18. Jones L.L., McDonald D.A., Borum P.R. // Prog. Lipid Res. 2010. V. 49 (1). P. 61–75.
19. Vilaseca M.A., Briones P., Ferrer I., Campistol J., Riverola A., Castillo P., Ramon F. // J. Inherit. Metab. Dis. 1993. V. 16 (1). P. 101–104.
20. Weigel C., Kiener C., Meier N., Schmid P., Rauh M., Rascher W., Knerr I. // Ann. Nutr. Metab. 2008. V. 53. P. 91–95.
21. Fischer G.M., Nemeti B., Farkas V., Debreceni B., Laszlo A., Schaffer Z., Somogyi C., Sandor A. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 150. P. 200–210.
22. Engel A.G., Rebouche C.J. // J. Inherit. Metab. Dis. 1984. V. 7 (Suppl. 1). P. 38–43.