https://doi.org/10.17116/molgen20213902138

Частота гетерозиготного носительства вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии, в популяционном исследовании ЭССЕ-Вологда

© О.В. КУРИЛОВА[1], М.В. КЛИМУШИНА[1], А.В. КИСЕЛЕВА[1], А.И. ЕРШОВА[1], Е.А. СОТНИКОВА[1], М.Г. ДИВАШУК[1], Э.Ю. ХЛЕБУС[1], О.П. СКИРКО[1], И.А. ЕФИМОВА[1], С.А. ШАЛЬНОВА[1], П.А. СЛОМИНСКИЙ[2], А.Н. МЕШКОВ[1], О.М. ДРАПКИНА[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России, Москва, Россия;
[2]ФБГУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Создание панели для выявления гетерозиготного носительства частых мутаций, ассоциированных с фенилкетонурией (ФКУ), и определение их аллельных частот в одном из регионов России. ФКУ является одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний с аутосомно-рецессивным наследованием. Скрининг на носительство приводит к сокращению числа детей, рожденных с ФКУ.

Материалы и методы. Диагностическая панель включала 23 патогенных варианта нуклеотидной последовательности гена *PAH*. Участники исследования (*n*=642) были случайно отобраны из популяционного исследования ЭССЕ-Вологда. Генотипирование проводилось с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ данных выполнен с помощью программного обеспечения TaqMan Genotyper Software (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты. Было выявлено 17 гетерозиготных носителей шести вариантов нуклеотидной последовательности, ассоциированных с развитием ФКУ: R408W (rs5030858), A403V (rs5030857), I306V (rs62642934), L48S (rs5030841), IVS12+1G>A (rs5030861), R261Q (rs5030849_C_T). Частота гетерогизот в российской популяции составила 2,65% (95% CI 1,55—4,21), или 1:38.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности массового скрининга на носительство частых мутаций, ассоциированных с ФКУ у людей с неотягощенным семейным анамнезом. Разработанная диагностическая панель позволяет быстро получить результат генетического анализа и может быть использована для скрининга носительства ФКУ.

Ключевые слова: *фенилкетонурия, ген PAH, мутация, частота, популяционное исследование.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Курилова О.В. — https://orcid.org/0000-0003-3082-5161; e-mail: olga_kurilova81@mail.ru
Климушина М.В. — https://orcid.org/0000-0002-7876-9325; e-mail: mklimushina@gmail.com
Киселева А.В. — https://orcid.org/0000-0003-4765-8021; e-mail: sanyutabe@gmail.com
Ершова А.И. — https://orcid.org/0000-0001-7989-0760; e-mail: alersh@mail.ru
Сотникова Е.А. — https://orcid.org/0000-0002-8395-4146; e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com
Дивашук М.Г. — https://orcid.org/0000-0001-6221-3659; e-mail: divashuk@gmail.com
Хлебус Э.Ю. — https://orcid.org/0000-0002-8355-8960; e-mail: elkhlebus@gmail.com
Скирко О.П. — https://orcid.org/0000-0003-3755-0279; e-mail: ops_70@mail.ru
Ефимова И.А. — https://orcid.org/0000-0002-3081-8415; e-mail: biobank@gnicpm.ru
Шальнова С.А. — https://orcid.org/0000-0003-2087-6483; e-mail: sshalnova@gnicpm.ru
Сломинский П.А. — https://orcid.org/0000-0003-3530-0655; e-mail: paslominsky@bk.ru
Мешков А.Н. — https://orcid.org/0000-0001-5989-6233; e-mail: meshkov@lipidclinic.ru
Драпкина О.М. — https://orcid.org/0000-0002-4453-8430; e-mail: odrapkina@gnicpm.ru
Автор, ответственный за переписку: Курилова О.В. — e-mail: olga_kurilova81@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Курилова О.В., Климушина М.В., Киселева А.В., Ершова А.И., Сотникова Е.А., Дивашук М.Г., Хлебус Э.Ю., Скирко О.П., Ефимова И.А., Шальнова С.А., Сломинский П.А., Мешков А.Н., Драпкина О.М. Частота гетерозиготного носительства вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии, в популяционном исследовании ЭССЕ-Вологда. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(2):38–45. https://doi.org/10.17116/molgen20213902138

Carrier frequency of heterozygous phenylketonuria mutations in the population-based cohort study (ESSE-VOLOGDA)

© O.V. KURILOVA[1], M.V. KLIMUSHINA[1], A.V. KISELEVA[1], A.I. ERSHOVA[1], E.A. SOTNIKOVA[1], M.G. DIVASHUK[1], E.Yu. KHLEBUS[1], O.P. SKIRKO[1], I.A. EFIMOVA[1], S.A. SHALNOVA[1], P.A. SLOMINSKY[2], A.N. MESHKOV[1], O.M. DRAPKINA[1]

[1]FSI «National Medical Research Center for Preventive Medicine» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia;
[2]The Institute of Molecular Genetics of National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

ABSTRACT

The **aim** of this study was to develop the custom panel for the diagnosis of heterozygous carriage of common variants associated with phenylketonuria (PKU) and to establish their allelic frequencies in one of the Russian regions. PKU is one of the most common monogenic diseases with an autosomal recessive inheritance. Carrier screening leads to a reduction in the number of children born with PKU disease.

Materials and methods. Custom diagnostic panel included 23 variants of the *PAH* gene. The study participants (*n*=642) were randomly selected from the population-based cohort study ESSE-Vologda. Genotypes were determined by real-time polymerase chain reaction on the QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Data processing was performed using the TaqMan Genotyper Software (Thermo Fisher Scientific, USA).

Results. 17 heterozygous carriers of six variants were identified: R408W (rs5030858), A403V (rs5030857), I306V (rs62642934), L48S (rs5030841), IVS12+1G>A (rs5030861), R261Q (rs5030849_C_T). The frequency of heterozygotes in the Russian population was 2.65% or 1:38 (CI95%: 1.55—4.21%).

Conclusion. The results suggest that it is promising to develop a programme for carrier detection of PKU mutations in the population for individuals without a family history of PKU. The proposed panel is fast and suitable method for mass screening of PKU carriers.

Keywords: *phenylketonuria, PAH gene, mutation, frequency, population study.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Kurilova O.V. — https://orcid.org/0000-0003-3082-5161; e-mail: olga_kurilova81@mail.ru
Klimushina M.V. — https://orcid.org/0000-0002-7876-9325; e-mail: mklimushina@gmail.com
Kiseleva A.V. — https://orcid.org/0000-0003-4765-8021; e-mail: sanyutabe@gmail.com
Ershova A.I. — https://orcid.org/0000-0001-7989-0760; e-mail: alersh@mail.ru
Sotnikova E.A. — https://orcid.org/0000-0002-8395-4146; e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com
Divashuk M.G. — https://orcid.org/0000-0001-6221-3659; e-mail: divashuk@gmail.com
Khlebus E.Yu. — https://orcid.org/0000-0002-8355-8960; e-mail: elkhlebus@gmail.com
Skirko O.P. — https://orcid.org/0000-0003-3755-0279; e-mail: ops_70@mail.ru
Efimova I.A. — https://orcid.org/0000-0002-3081-8415; e-mail: biobank@gnicpm.ru
Shalnova S.A. — https://orcid.org/0000-0003-2087-6483; e-mail: sshalnova@gnicpm.ru
Slominsky P.A. — https://orcid.org/0000-0003-3530-0655; e-mail: paslominsky@bk.ru
Meshkov A.N. — https://orcid.org/0000-0001-5989-6233; e-mail: meshkov@lipidclinic.ru
Drapkina O.M. — https://orcid.org/0000-0002-4453-8430; e-mail: odrapkina@gnicpm.ru
Corresponding author: Kurilova O.V. — e-mail: olga_kurilova81@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Kurilova OV, Klimushina MV, Kiseleva AV, Ershova AI, Sotnikova EA, Divashuk MG, Khlebus EYu, Skirko OP, Efimova IA, Shalnova SA, Slominsky PA, Meshkov AN, Drapkina OM. Carrier frequency of heterozygous phenylketonuria mutations in the population-based cohort study (ESSE-VOLOGDA). *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2021;39(2):38–45. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/molgen20213902138

Фенилкетонурия (ФКУ) — аутосомно-рецессивное заболевание обмена веществ, связанное с недостаточной активностью фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ). ФКУ характеризуется нарушением умственного развития, а также может сопровождаться такими симптомами, как атопический дерматит, аутизм, задержка моторного развития, судороги. Психомоторные нарушения появляются с первых месяцев жизни ребенка [1].Частота ФКУ значительно варьирует в зависимости от популяции: средняя частота в РФ, по данным неонатального скрининга, составляет 1:7000 новорожденных [2].

Причиной развития ФКУ являются патогенные мутации в гене ФАГ (*PAH*). В настоящее время описано более 1100 вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH* [3]. Частота и спектр патогенных вариантов может варьировать в зависимости от региона и этнической принадлежности [4, 5]. По данным молекулярно-генетических исследований, проводившихся среди больных ФКУ в различных областях РФ, наиболее частыми являются варианты: R408W (rs5030858), Y414C (rs5030860), P281L (rs5030851), A300S (rs5030853), IVS12+1G>A (rs5030861), IVS10-11G>A (rs5030855) R261Q (rs5030849) [5—9]. Наблюдается высокая частота гетерозиготного носительства вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH* среди здорового населения РФ и в среднем составляет 1:35 [10, 11]. Однако популяционные исследования ранее не проводились. Все это делает актуальным изучение состава и частоты полиморфных вариантов, вызывающих развитие ФКУ, в различных регионах России, а также поиск метода, пригодного для проведения широкого скрининга не только в семьях высокого риска, но и у людей с неотягощенным семейным анамнезом, планирующих беременность. В связи с этим целью данного исследования была разработка специализированной панели для диагностики гетерозиготного носительства вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH* и ее апробация на популяционной выборке ЭССЕ-Вологда.

Материал и методы

Участники исследования. В исследование случайным образом было включено 642 человека из популяционной выборки (1642 человека, возраст 25 лет —64 года) исследования «Эпидемиоло-

гия сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах Российской Федерации» (ЭССЕ-РФ), проведенного в Вологодской области (ЭССЕ-Вологда). Взятие крови из локтевой вены проводили натощак после 12 ч голодания. Образцы биологического материала замораживали и хранили при температуре не выше –20 °С до момента отправки в федеральный координационный центр (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России), для проведения анализов крови. Кровь собирали в пробирки с ЭДТА. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Исследование было одобрено этическими комитетами федерального и регионального центров. Информированное согласие на участие в исследовании пациенты подписывали на этапе проведения ЭССЕ-Вологда.

Молекулярно-генетическое тестирование, разработка диагностических панелей для моногенных заболеваний. Выделение ДНК проводили с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия). Панели для генетической диагностики с помощью ПЦР в реальном времени были разработаны для анализа на приборе Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США), который себя хорошо зарекомендовал в качестве высокопроизводительного при генотипировании и анализе экспрессии генов [12]. По рекомендациям фирмы-производителя необходимая для системы Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR концентрация ДНК составляет 50 нг/мкл, кроме того требуется оценка чистоты образцов ДНК на спектрофотометре и соотношение показателей А260/А280 и А260/А230 должно быть между 1,7 и 1,9. Было выявлено, что при концентрации образцов ДНК менее 10 нг/мкл в среднем доля выявленных генотипов (call rate) составляет 50%, что является низким показателем для такого метода. Для концентраций выше 10 нг/мкл доля выявленных генотипов составляла в среднем 90%, оптимальной была концентрация 30—50 нг/мкл. Анализ проводили с использованием методики TaqMan (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам производителя. Найденный вариант подтверждался методом секвенирования по Сэнгеру на Applied Biosystem 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием реактивов и протоколов фирмы-производителя.

Результаты и обсуждение

Создание перечня генетических вариантов гена PAH для диагностической панели. Для создания панели были использованы данные о частотах патогенных вариантов *PAH*, выявленных в проведенных ранее исследованиях больных ФКУ в Воронеже, Самаре, Курске, Москве, Ростовской и Московской областях и Центральном регионе России [5—9, 13, 14], а также данные о частотах гетерозиготного носительства вариантов *PAH* в различных когортах жителей РФ [10, 11]. После анализа данных спектра и распространенности патогенных вариантов, отбирали наиболее частые и характерные для российской популяции. Всего в диагностическую панель вошло 23 варианта нуклеотидной последовательности гена *PAH* **(табл. 1)**. Наиболее частые из них: R408W — частота среди больных в разных регионах России варьирует от 47,9 до 75%, IVS12+1G>A (от 3,3 до 4,2%), R158Q (от 1,5 до 2,7%), R261Q (от 0,7 до 9,9%), P281L (от 0,7 до 9,1%), R252W (от 1,7 до 2,2%), IVS4+5G>T и Y414C (от 0,8 до 2,8%). Эффективность детекции носителей (detection efficiency of carriers или detection rate) с помощью данной панели составляет примерно 90%.

Обоснование выбора технологии для диагностической панели. Диагностическую панель разработали с использованием технологии Open Array (Thermo Fisher Scientific, США), с помощью которой возможно создавать форматы, позволяющие единовременно анализировать от 12 до 240 вариантов нуклеотидных последовательностей, используя систему Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в современном формате нанофлюидного слайда. Технология Open Array обеспечивает высокую пропускную способность и низкую трудозатратность при невысокой стоимости анализа. Этот метод используется для лабораторных исследований в медицине: при изучении болезни Паркинсона [15], для анализа экспрессии генов, связанных с развитием злокачественных образований [16], а также для проведения молекулярно-генетического тестирования на наличие мутаций, связанных с потерей слуха [17].

Апробация диагностической панели на носительство гетерозиготных вариантов нуклеотидной последовательности гена PAH. Определение носительства гетерозиготных вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH* выполнили у 642 (44% мужчин) участников исследования, средний возраст которых составил 44±11 лет.

В результате исследования выявлено 17 гетерозиготных носителей вариантов, ассоциированных с ФКУ, частота в выборке — 2,65% (95% ДИ 1,55—4,21), или 1:38, что согласуется с данными другого исследования, проведенного в Москве и включающего 2168 здоровых индивидов, где частота носительства мутаций гена *PAH* составила 1:33 [11].

Всего было выявлено шесть гетерозиготных вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH:* R408W (rs5030858), A403V (rs5030857), I306V (rs62642934), L48S (rs5030841), IVS12+1G>A (rs5030861), R261Q (rs5030849_C_T) **(табл. 2)**.

Таблица 1. **Аннотация вариантов нуклеотидных последовательностей гена *PAH*, включенных в диагностическую панель**

№	Мутация в гене *PAH*	rs ID	Аннотация	ID зонда	Аллельная частота ExAC	Аллельная частота у европейцев (кроме финов) ExAC	Частота у российских пациентов с ФКУ (%)	Регион исследования
1	R408W	rs5030858	missense	C__32329998_10	0,0006594	0,001109	62,31	Ростовская область [8]
							48,6	Центральный регион [6]
							55,4	Воронеж [13]
							50	Самара [13]
							50	Московская область [13]
							75	Курск [13]
							47,9	Москва [9]
2	A403V	rs5030857	missense	C__27863418_20	0,0005358	0,0009294	1,1	Центральный регион [6]
							0,4	Ростовская область [7]
3	Y414C	rs5030860	missense	ANGZJJD	0,0004945	0,0008243	2,8	Москва [9]
							0,4	Ростовская область [7]
							0,8	Центральный регион [6]
4	A300S	rs5030853	missense	C__27863387_20	0,0004462	0,0007209	0,7	Москва [9]
							0,79	Ростовская область [7]
5	IVS12+1G>A	rs5030861	splice donor	C__32329996_10	0,0003465	0,0006	3,85	Ростовская область [8]
							3,97	Ростовская область [7]
							3,3	Центральный регион [6]
							4,2	Москва [9]
6	R261Q	rs5030849	missense	AN9HNAZ	0,0002719	0,0004196	3,85	Ростовская область [8]
							3,57	Ростовская область [7]
							6,5	Самара [13]
							6,3	Курск [13]
							0,7	Данные МГНЦ3 [13]
							5,3	Центральный регион [6]
							9,9	Москва [9]
7	IVS10-11G>A	rs5030855	intron variant	C__32330003_20	0,0002727	0,0004053	3,85	Ростовская область [8]
							2,2	Центральный регион [6]
8	R158Q	rs5030843	missense	C__32330008_10	0,00009896	0,00018	2,69	Ростовская область [8]
							2,7	Воронеж [13]
							2,2	Самара [13]
							1,5	Данные МГНЦ3 [13]
							2,5	Центральный регион [6]
							3,5	Москва [9]
9	P281L	rs5030851	missense	C__27863379_10	0,00009884	0,0001798	2,69	Ростовская область [8]
							5	Центральный регион [6]
							2,7	Воронеж [13]

Окончание табл. 1 см. на след стр.

Таблица 1. **Аннотация вариантов нуклеотидных последовательностей гена *PAH*, включенных в диагностическую панель** *(окончание)*

							4,3	Самара [13]
							9,1	Московская область [13]
							6,3	Курск [13]
							7,5	Данные МГНЦ3 [13]
							0,7	Москва[9]
10	L48S	rs5030841	missense	C__61900229_20	0,00008238	0,0001499	2,1	Москва [9]
							0,4	Ростовская область [7]
							1,7	Центральный регион [6]
11	R243X	rs5030846	stop gained	C__27863366_10	0,00004952	0,0000901	1,4	Центральный регион [6]
							0,4	Ростовская область [7]
12	R252W	rs5030847	missense	C____657294_10	0,00004945	0,00008995	1,92	Ростовская область [8]
							2,2	Самара [13]
							1,5	Данные МГНЦ3 [13]
							1,7	Центральный регион [6]
							2,1	Москва [9]
13	S349P	rs62508646	missense	ANCE79N	0,00003332	0,00004534		
14	IVS2+5G>C	rs62507288	splice region	ANAAENR	0,0000412	0,00004496	0,6	Центральный регион [6]
15	E280K	rs62508698	missense	ANDJ2UK	0,00004118	0,00004495	0,7	Москва [9]
							0,8	Центральный регион [6]
16	IVS4+5G>T	rs62507321	splice region	C__89758964_10	0,00004118	0,00004495	2,8	Москва [9]
							0,79	Ростовская область [7]
							1,1	Центральный регион [6]
17	R243Q	rs62508588	missense	C__64676825_10	0,00007428	0,00003003	0,8	Центральный регион [6]
18	R111X	rs76296470	stop gained	C__33221788_10	0,00004943	0,00002997	2,1	Москва[9]
19	I306V	rs62642934	missense	C__27863391_20	0,000008251	0,00001501	0,4	Ростовская область [7]
20	c,47_48delCT	rs62642906	frameshift	C__89759003_20	0,000008238	0,00001499	0,4	Ростовская область [7]
21	c,664_665del-GA	rs62514936	frameshift	C_104519192_20	0,000008239	0,00001499	2,1	Москва [9]
22	R261X	rs5030850	stop gained	C__27528517_10	0,000008239	0,00001498	1,2	Ростовская область [8]
							0,8	Центральный регион [6]
							1,4	Москва [9]
23	EX5del	Рп19::chr12:103260374-103260441		ANH6D4A			1,92	Ростовская область [8]

Примечание. MAF — частота редкого аллеля; [a] – MAF согласно базе данных ExAC (http://exac.broadinstitute.org/); [b] — MAF среди европейского населения (кроме финнов) согласно базе данных ExAC.

Таблица 2. **Результаты апробации разработанной диагностической панели на популяционной выборке ЭССЕ-Вологда, *n*=642**

№	Название мутации	rs ID	Частота гетерозигот, %	MAF в выборке ЭССЕ-Вологда, %	MAF (gnomAD)[a], %	MAF (gnomAD-EUR)[b], %
1	R408W	rs5030858	1,56	0,779	0,09	0,172
2	A403V	rs5030857	0,31	0,156	0,06	0,074
3	I306V	rs62642934	0,31	0,156	0,002	0,004
4	L48S	rs5030841	0,16	0,078	0,01	0,017
5	IVS12+1G>A	rs5030861	0,16	0,078	0,04	0,081
6	R261Q	rs5030849_C_T	0,16	0,078	0,02719	0,04
	Всего	—	2,65	—	—	—

Примечание. MAF — частота редкого аллеля; [a] — MAF согласно базе данных gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/); [b] — MAF среди европейского населения (кроме финнов) согласно базе данных gnomAD.

Средняя точность генотипирования, доля выявленных с помощью системы Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR генотипов (call rate), составила 93,5%. Воспроизводимость результатов генотипирования оценивали на двух плашках Open Array в разные дни разными сотрудниками, с использованием разных микродозаторов. В результате доля выявленных генотипов (call rate), полученных на одной плашке, составила 93%, на второй — 99%. Воспроизводимость результатов по параллелям составила в среднем 90%.

В качестве подтверждающего метода проводили автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру выборочных гетерозиготных образцов, выявленных с помощью разработанной панели, а также гомозиготных образцов дикого типа в качестве контролей. Всего было получено 15 последовательностей с прочтением с прямого и обратного праймеров, во всех случаях генотипы по 6 вариантам нуклеотидных последовательностей гена *PAH* подтвердились **(рисунок)**.

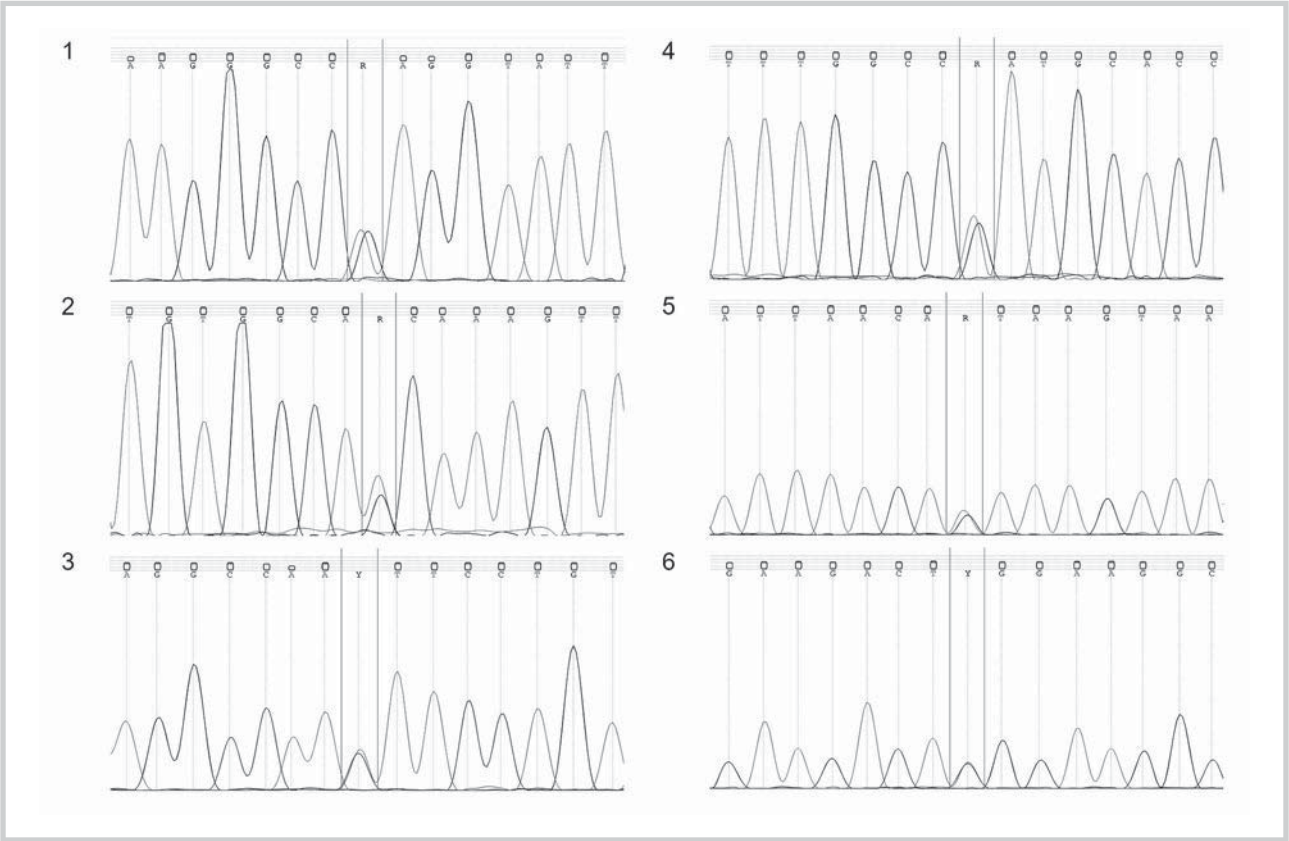
Самым распространенным среди выявленных вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH* был вариант R408W (частота гетерозигот — 1,56%), что согласуется с данными, полученными на других европейских популяциях и свидетельствующими о том, что вариант R408W является наиболее частой причиной развития ФКУ [4, 18]. R408W (rs5030858) — миссенс-мутация в 12-м экзоне, приводящая к замене аргинина на триптофан в кодоне 408. Популяционных данных о частоте гетерозигот варианта R408W в РФ нет, однако в исследовании, включающем 400 здоровых жительниц Санкт-Петербурга, показано, что частота мутации R408W составила 0,75% [19], а в исследовании, включающем 1000 доноров крови, идентифицирующих себя как русских, частота носительства варианта R408W составила 2,4% [10].

Частота гетерозиготного носительства вариантов A403V (rs5030857) и I306V (rs62642934) в нашем исследовании составила 0,31%. Частота данных мутаций среди больных Ростовской области составляет 0,4% [7].

Описано, что данные варианты связаны с легкими проявлениями ФКУ [20].

Более редкими в нашем исследовании были гетерозиготные варианты L48S (rs5030841), IVS10-11G>A (rs5030855) и R158Q (rs5030843), частота которых составила 0,16%. Вариант L48S является самой частой причиной ФКУ в Сербии, а также он распространен у турецких и итальянских пациентов с ФКУ [21]. Вариант IVS12 + 1G>A имеет европейское происхождение [22]. Его частота у больных ФКУ центрального региона РФ составляет 2,3% [14]. Вариант R261Q является вторым по встречаемости в выборке больных ФКУ Московского региона [9], в Ростовской области частота мутации R261Q у больных ФКУ составляет 3,57% [7]. Вариант R261Q один из наиболее распространенных в странах Южной Европы, а также в Нидерландах и Швейцарии [4].

Таким образом, в Вологодском регионе в среднем на каждые 38 человек приходится 1 здоровый носитель варианта нуклеотидной последовательности, связанного с развитием ФКУ. Это означает, что приблизительно 1 пара из 1400 состоит из двух носителей гетерозиготных вариантов, соответственно, риск рождения ребенка, больного ФКУ, составляет 1:5600. Снижение частоты рецессивных заболеваний можно достичь с помощью проведения преконцепционной профилактики, т.е. скрининга носительства рецессивных аллелей на этапе планирования деторождения. Прямые затраты на лечение больного с ФКУ в течение 16 лет, включающие в себя расходы на медицинские (в том числе диагностические) услуги и диетотерапию (лечебные смеси) составляют около 4,3 млн руб. [23]. В то же время при применении в терапии ФКУ, в соответствии с современными рекомендациями [24], аналога тетрагидробиоптерина (сапроптерина), затраты на лечение возрастают до 15,9 млн руб. [23]. Учитывая себестоимость скрининга на носительство вариантов, ассоциированных с развитием ФКУ, с помощью разработанной диагностической панели, составляющую около 1500 руб., преконцепционная профилактика, направленная на снижение рождаемости детей, больных ФКУ, представляется экономически целесообразной.



Верификация результатов генотипирования с помощью секвенирования по Сэнгеру.

На хроматограммах представлены последовательности: 1 — rs5030858 (G\A); 2 — rs5030857 (G\A); 3 — rs62642934 (T/C); 4 — rs5030841 (A/G); 5 — rs5030861 (G/A); 6 — rs5030849 (C/T).

Заключение

В результате исследования была разработана панель для выявления гетерозиготного носительства вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAH*. Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте гетерозиготного носительства вариантов *PAH* в российской популяции. Метод определения генотипов с помощью системы Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR характеризуется высокой воспроизводимостью, скоростью выполнения и имеет относительно невысокую стоимость анализа. Предложенная панель позволяет одномоментно проводить анализ по 23 вариантам гена *PAH* и может быть использована для скрининга носительства ФКУ.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The authors declare no conflicts of interest.

Финансирование. Отсутствует.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010;376(9750):1417-1427. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0
2. Волгина С.Я., Яфарова С.Ш., Клетенкова Г.Р. Фенилкетонурия у детей: современные аспекты патогенеза, клинических проявлений, лечения. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2017;62(5):111-118. Volgina SJa, Yafarova SSh, Kletenkova GR. Phenylketonuria in children: modern aspects of pathogenesis, clinic, treatment. *Ros Vestn Perinatoli Pediatr*. 2017;62(5):111-118. (In Russ.). https://doi.org/10.21508/1027-4065-2017-62-5-111-118
3. http://www.biopku.org/home/pah.asp — база данных PAHvdb международного консорциума по изучению фенилкетонурии (дата обращения 05.02.20).
4. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003;21(4):345-356. https://doi.org/10.1002/humu.10192
5. Гундорова П., Кузнецова И.А., Куцев С.И., Голихина Т.А., Аксянова Х.Ф., Ненашева С.А. и др. Результаты программы генотипирования больных фенилкетонурией и гиперфенилаланинемией. *Медицинская генетика*. 2018;17(12):14-24. Gundorova P, Kuznetsova IA, Kutsev SI, Golihina TA, Aksyanova HF, Nenasheva SA, et al. Results of genotyping program of PKU and HPA patients. *Medical Genetics*. 2018;17(12):14-24. (In Russ.).
6. Гундорова П., Степанова А.А., Щагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новых медицинских технологий «Детекция основных точковых мутаций гена РАН методом мультиплексной лигазной

реакции» и «Детекции десяти дополнительных точковых мутаций гена PAH методом мультиплексной лигазной реакции» в ДНК-диагностике фенилкетонурии. *Медицинская генетика.* 2016;15(2):29-36.
Gundorova P, Stepanova AA, Shchagina OA, Polyakov AV. Results of the new medical technologies «Detection of major PAH gene point mutations by multuplex ligase reaction» and «Detection of ten additional mutations in PAH gene by multuplex ligase reaction» application in the DNA-diagnostics of phenylketonuria. *Medical Genetics.* 2016;15(2):29-36. (In Russ.).

7. Амелина М.А., Степанова А.А., Поляков А.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Спектр и частота встречаемости мутаций в гене PAH у больных фенилкетонурией Ростовской области. *Медицинская генетика.* 2015;14(8):30-36.
Amelina MA, Stepanova AA, Polyakov AV, Amelina SS, Zinchenko RA. Spectrum and frequency of mutations in RAH gene in patients with phenylketonuria from Rostov region. M*edical Genetics.* 2015;14(8):30-36. (In Russ.).

8. Амелина М.А., Зинченко Р.А., Степанова А.А., Гундорова П., Поляков А.В. Амелина С.С., и др. Изучение взаимосвязи генотипов (PAH) и фенотипов у больных фенилкетонурией Ростовской области. *Медицинская генетика.* 2016;6:3-10.
Amelina MA, Zinchenko RA, Stepanova AA, Gundorova P, Polyakov AV, Amelina SS, et al. Examine the relationship genotypes (PAH) and phenotype in patients with phenylketonuria Rostov region. *Meditsinskaya genetika.* 2016;6:3-10. (In Russ.).

9. Никифорова А.И., Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Зобкова Г.Ю., Огурцова К.А., Брюханова Н.О. и др. Определение частоты встречаемости мутаций в гене pah с применением комбинации технологий ПЦР «в реальном времени» и высокопроизводительного секвенирования у больных фенилкетонурией Московского региона. *Вестник РГМУ.* 2017;4:38-44.
Nikiforova AI, Abramov DD, Kadochnikova VV, Zobkova GU, Ogurtsova KA, Brjuhanova NO, et al. Determining the frequency of PAH mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of Real-time PCR and Next-Generation sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2017;4:38-44. (In Russ.).

10. Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Якимова Е.Г., Белоусова М.В., Маерле А.В., Сергеев И.В. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена CFTR, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена PAH, ассоциированных с фенилкетонурией. *Вестник РГМУ.* 2015;4:32-35.
Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV, et al. High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2015;4:32-35. (In Russ.).

11. Зобкова Г.Ю., Кадочникова В.В., Абрамов Д.Д., Донников А.Е., Демикова Н.С. Определение частоты носительства мутаций в генах CFTR, PAH, GALT и GJB2 среди 2168 индивидов без клинических признаков наследственных заболеваний. *Медицинская генетика.* 2019;18(10):30-35.
Zobkova GYu, Kadochnikova VV, Abramov DD, Donnikov AE, Demikova NS.Determination of the carrier frequency of mutations in the CFTR, PAH, GALT and GJB2 genes among 2168 individuals without clinical signs of hereditary diseases. *Medical Genetics.* 2019;18(10):30-35. (In Russ.).
https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.10.30-35

12. Broccanello C, Gerace L, Stevanato P. QuantStudio 12K Flex OpenArray System as a Tool for High-Throughput Genotyping and Gene Expression Analysis. Methods. *Mol Biol.* 2020;2065:199-208.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_15

13. Аничкина А.А., Гаврилюк А.П., Тверская С.М., Поляков А.В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией. *Медицинская генетика.* 2003;2(4):175-181.
Anichkina AA, Gavriliuc A, Tverskaya SM, Polyakov AV. Analysis of most prevalent mutations of PAH gene in phenilketonuria patients. *Medical Genetics.* 2003;2(4):175-181. (In Russ.).

14. Степанова А.А., Тверская С.М., Зинченко Р.А., Поляков А.В. Молекулярно-генетическое исследование гена фенилаланингидроксилазы в группе российских больных фенилкетонурией. *Медицинская генетика.* 2006;5:2(44):32-39.
Stepanova AA, Tverskaya SM, Zinchenko RA, Polyakov AV. Molecular genetic study of phenylalanine hydroxylase gene in a group of Russian PKU-patients. *Medical Genetics.* 2006;5:2(44):32-39. (In Russ.).

15. Ross JP, Mohtashami S, Leveille E, Johnson AM, Xiong L, Dion PA, et al. Association study of essential tremor genetic loci in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2018;66:178-e13—178-e15.
https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.001

16. Gnani D, Romito I, Artuso S, Chierici M, De Stefanis C, Panera N, et al. Focal adhesion kinase depletion reduces human hepatocellular carcinoma growth by repressing enhancer of zeste homolog 2. *Cell Death Differ.* 2017;24(5):889-902.
https://doi.org/10.1038/cdd.2017.34

17. Martins FT, Ramos PZ, Svidnicki MC,Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan OpenArray Genotyping platform. *BMC medical genetics.* 2013;14(1): 112.
https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-112

18. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(6):655-671.
https://doi.org/10.1586/14737159.2014.923760

19. Цыбакова Н.Ю., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Суспицын Е.Н., Имянитов Е.Н. Анализ встречаемости повторяющихся мутаций в генах BRCA1, CHEK2, NBS1, CFTR, PAH и CX26 у здоровых жительниц Санкт-Петербурга. *Трансфузиология.* 2011;12:1329-1341.
Tcybakova NY, Sokolenko AP, Iyevleva AG, Suspitsin EN, Imyanitov EN. BRCA1, CHEK2, NBS1,CFTR, PAH и CX26 founder mutations in healthy female residents of St. Petersburg. *Transfusiology.* 2011;12:1329-1341. (In Russ.).

20. Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, Korem S, Yardeni T, Gal N, et al. Genotype — phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *J human genetics.* 2008;53(5):407-418.
https://doi.org/10.1007/s10038-008-0264-4

21. Dordević M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, et al. Molecular Genetics and Genotype-Ba sed Estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU Patients: Spotlight on Phenotypic Implications of p. L48S. *JIMD Rep.* 2013;9:49-58.
https://doi.org/10.1007/8904_2012_178

22. Eiken HG, Knappskog PM, Motzfeldt K, Boman H, Apold J. Phenylketonuria genotypes correlated to metabolic phenotype groups in Norway. *Eur J Pediatr.* 1996;155(7):554-560.
https://doi.org/10.1007/BF01957904

23. Куликов А.Ю., Рыбченко Ю.В. Фармакоэкономический анализ применения препарата куван у больных фенилкетонурией. *Фармакоэкономика: теория и практика.* 2015;3(1):17-19.
Kulikov AY, Rybchenko YV. Pharmacoeconomic analysis of the use of the kuvan drug product in phenylketonuric patients. *Pharmacoeconomics: theory and practice.* 2015;3(1):17-19. (In Russ.).

24. http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_fen.pdf — Клинические рекомендации «Фенилкетонурия и нарушения обмена тетрагидробиоптерина у детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации 2017 г.

Поступила в редакцию 08.04.2020
Received 08.04.2020
После доработки 17.04.2020
Revised 17.04.2020
Принята к публикации 20.08.2020
Accepted 20.08.2020