

На правах рукописи



ЗИНЧЕНКО
Людмила Васильевна

**ГЕНЕТИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ФЕНИЛКЕТОНУРИИ В ПОПУЛЯЦИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ**

03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2006

Работа выполнена в ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения РАМН и в ГУЗ Краевая клиническая больница № 1 им. С.В.Очаповского Департамента здравоохранения Краснодарского края.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Кучер Аксана Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Назаренко Людмила Павловна
кандидат биологических наук
Яковлева Юлия Сергеевна

Ведущая организация: Красноярская государственная медицинская Академия, г. Красноярск

Защита состоится «12» декабря 2006 г. в 10 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета K001.045.01 при ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, Набережная р. Ушайки, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН.

Автореферат разослан «10» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Кучер А.Н.

Актуальность темы

Фенилкетонурия (ФКУ; MIM 261600) – аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное нарушением обмена аминокислоты фенилаланин (ФА). Средняя частота фенилкетонурии в России составляет 1:7297 [Новиков, 2002]. Классическая форма заболевания вызвана дефицитом фермента фенилаланингидроксилазы (PAH, EC 1.14.16.1), осуществляющего превращение фенилаланина в тирозин. В настоящее время известно более 500 мутаций в гене фенилаланингидроксилазы (PAH), спектр и распространенность которых имеет межпопуляционные и этнические особенности [Чарикова, 1995; Барановская, 1996; Одинокова и др., 2000; Смагулова и др., 2000; Ахметова и др., 2003; Амелина и др., 2004; Степанова, 2005; Обабкова и др., 2005; Guldberg et al., 1993; Scriver et al., 2003]. Для жителей Европы мажорной в гене PAH является мутация R408W [DiLella et al., 1988]. Однако, наряду с этой мутацией, во многих европейских популяциях с относительно высокой частотой регистрируются и другие - IVS12nt1, R261Q, R252W, R158Q, P281L, IVS10nt546, I65T.

Несмотря на то, что исследования ФКУ в отношении клинических и молекулярно-генетических особенностей больных проводятся довольно активно, до настоящего времени ряд вопросов, касающихся причин клинической гетерогенности заболевания, не решены окончательно. Большое количество мутаций в гене PAH и, соответственно, многочисленность генотипических комбинаций, приводящих к ФКУ, вносят свой вклад в клиническую гетерогенность заболевания. Пациенты с одинаковым генотипом могут иметь разные клинические и метаболические фенотипы [Scriver et al., 1999; Waters et al., 2001; Pey et al., 2003], а раннее начало диетотерапии и соблюдение диеты не всегда сочетается с нормализацией уровня ФА в крови [Краснопольская, 1987; Копылова и др., 2004; Ramus et al., 1999; Enns, 1999; Griffiths et al., 2000].

Идентификация у больных ФКУ мутаций гена PAH позволяет исключить варианты формы болезни, обусловленные нарушением синтеза и рециклинга кофактора PAH – тетрагидробиоптерина (BH₄), которые, по данным разных авторов, составляют 2-3% от всех выявляемых случаев ФКУ. Практическая необходимость дифференциации форм ФКУ вытекает из потребности выбора тактики лечения, поскольку атипичные формы ФКУ резистентны к диетотерапии [Блюмина, 1980; Краснопольская, 1987; Копылова, 2004].

Вышесказанное указывает на актуальность проведения исследования по выявлению территориальной и этнической специфичности в распространении различных мутаций гена PAH в таком многонациональном регионе, как Краснодарский край, а также проведения комплексного анализа уровня фенилаланина в крови больных и выявление факторов, влияющих на данный количественный показатель.

Цель исследования: Изучить распространенность мутаций R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546, I65T гена PAH на тер-

ритории Краснодарского края и определить факторы, влияющие на динамику уровня фенилаланина в крови больных.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность мутаций гена фенилаланингидроксилазы (R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546, I65T) у больных фенилкетонурией, проживающих на территории Краснодарского края.
2. Определить территориальную и этническую специфичность в спектре и частоте мутаций в гене фенилаланингидроксилазы на территории Краснодарского края.
3. Оценить влияние миграционных процессов и особенностей брачной структуры на частоту, спектр мутаций и генотипов гена *PAH* на территории Краснодарского края.
4. Исследовать динамику уровня фенилаланина в крови больных и оценить ее зависимость от генотипа по гену *PAH*, времени начала диетотерапии, строгости соблюдения диеты, пола, возраста, национальности больного, а также региона проживания в крае и мест рождения родителей пробанда.

Новизна исследования: Впервые получены данные о встречаемости мутаций гена *PAH* (R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546, I65T) у больных ФКУ в Краснодарском крае. Определена мажорная для краснодарской популяции мутация - R408W. Показано, что регионы края различаются по спектру и частоте зарегистрированных мутаций гена *PAH*. Оценена значимость миграционных процессов в формировании генетического разнообразия по спектру мутаций гена *PAH* на территории Краснодарского края.

Проведен анализ динамики уровня фенилаланина в крови у больных классической формой ФКУ из Краснодарского края в зависимости от генотипа по гену *PAH*, пола, возраста, национальности и региона проживания больного, возраста начала диетотерапии, строгости соблюдения диеты, а также мест рождения родителей пробандов. Установлено, что динамика уровня фенилаланина в крови зависит от генотипа больного (более благоприятная динамика отмечалась у больных с генотипами R408W/R261Q, R408W/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546 гена *PAH*), возраста начала диетотерапии и строгости соблюдения диеты.

Практическая значимость: Полученные новые данные о распространенности мутаций R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546, I65T в гене *PAH* на территории Краснодарского края, их спектре у представителей различных национальностей, что может быть использовано при проведении геногеографических исследований, а также в генетической эпидемиологии для оценки величины генетического груза и генетической гетерогенности фенилкетонурии.

Создан краевой банк крови и ДНК семей, отягощенных ФКУ. Выявлены гетерозиготные носители изученных мутаций заболевания среди sibсов про-

бандов. Результаты выполненного исследования могут быть использованы в работе медико-генетических консультаций (медико-генетическое консультирование, прогноз рождения здорового ребенка, прогноз динамики уровня фенилаланина в крови, проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях, семьях родственников пробандов, выявление гетерозиготных носителей в популяции) и в настоящее время применяются в практической работе Кубанской межрегиональной медико-генетической консультации, в том числе и при проведении пренатальной ДНК-диагностики в отягощенных семьях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Больные фенилкетонурией в Краснодарском крае характеризуются специфичностью в распределении частот мутаций гена *PAH* в сравнении с другими популяциями России: распространенность мутаций убывает в ряду R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546; общая информативность хромосом по изученному спектру мутаций составила 65,7%.
2. Для Краснодарского края свойственны территориальные и этнические различия в спектре и частоте мутаций в гене *PAH*, которые определяются миграционными процессами и национальной принадлежностью мигрантов, особенностью их расселения по территории края.
3. Мигрантами в краснодарскую популяцию привнесены 37,4% мутаций гена *PAH*, уровень информативности по исследованным мутациям в данной группе составил 70,2%; мутация IVS10nt546 регистрировалась только среди мигрантов.
4. Динамика уровня фенилаланина в крови больных ФКУ зависела от генотипа по гену *PAH*, возраста начала диетотерапии и строгости соблюдения диеты.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на V съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, май 2005), на Краевой конференции, посвященной вопросам организации неонатального скрининга (Краснодар, март 2006), на межлабораторном семинаре ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (Томск, октябрь 2006)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 168 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы. Список литературы содержит 208 источников, из них 53 отечественных, 155 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 33 таблицами и 25 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе, из числа обследованных пробандов и их родственников, проживающих в Краснодарском крае, были сформированы три группы в соответствии с поставленными задачами.

- *Первая группа* включала 105 больных с установленным диагнозом ФКУ и использовалась для определения спектра и территориального распределения мутаций R408W, R158Q, P281L, IVS12nt1, R252W, R261Q, IVS10nt546, I65T в гене *PAH*.
- *Вторая группа*, состояла из 172 родственников первой степени родства пробандов (матери и отцы) и была включена в исследование для изучения структуры браков родителей больных ФКУ, роли миграционных процессов в распределении заболевания на территории края.
- *Третья группа* состояла из 80 больных с «классической» формой ФКУ, что подтверждалось выявлением мутаций, характерных для данной формы заболевания, и положительным ответом на диетотерапию с целью выявления факторов, влияющих на динамику уровня ФА в крови больных.

ДНК выделяли из цельной венозной крови и сухих пятен крови с помощью набора реагентов *DIAtom™DNAPrep100* (Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Для выявления наиболее частых мутаций в гене *PAH* (R408W, IVS12nt1, R261Q, R252W, R158Q, P281L, I65T, IVS10nt546) использовали метод ПЦР-ПДРФ-анализа. В работе использовали набор «PCU-8», производства ООО «Центр молекулярной генетики» (г. Москва). Полученные изображения документировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения «Gel Imager» (Россия).

Определение фенилаланина в сухих пятнах крови, контроль лечения осуществлялся регулярным исследованием ФА крови флюорометрическим методом при посещении больными Кубанской межрегиональной медико-генетической консультации и заочно по присылаемым бланкам с пятнами сухой крови.

Для количественного описания уровня ФА и его динамики в крови больного применен линейный регрессионный анализ. Возможность совместного действия факторов на общий уровень и динамику ФА оценивали с использованием корреляционного анализа. При статистической обработке результатов применялся также кластерный, дисперсионный анализы. Низкие значения частот аллелей и генотипов при проведении сравнений предварительно преобразовывали по Фишеру [Лакин, 1990].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Встречаемость наиболее частых при ФКУ мутаций в Краснодарском крае

С целью выявления наиболее частых мутаций гена *PAH* на территории края у 105 детей с установленным диагнозом ФКУ были определены семь типов мутаций (R408W, IVS12nt1, R261Q, R252W, R158Q, P281L, IVS10nt546), приводящих к данной патологии (рис.1). В обследуемой выборке больных ФКУ не обнаружена мутация I65T и, исходя из этого, ее можно исключить из системы анализа наиболее частых мутаций в популяции Краснодарского края.

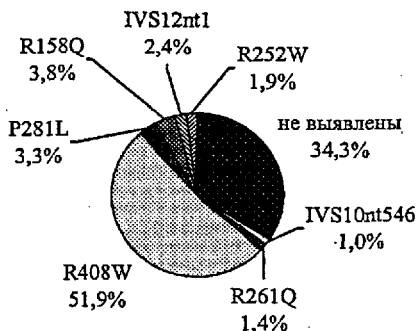


Рис. 1. Частота распространения изучаемых мутаций гена *PNH*

Как и для других популяций Европы, мажорной для краснодарской популяции является мутация R408W (51,9% от всех мутантных хромосом). Реже, чем в Краснодарском крае данная мутация встречалась только в Самарской области (50,0%) [Степанова, 2005]; в других российских популяциях мутация R408W регистрировалась с частотой от 53,0% в Башкортостане [Ахметова и др., 2003] до 75,7% в Свердловской области [Степанова, 2005]. 26,7% больных из Краснодарского края явились гомозиготными носителями мутации R408W, а у 73,3% больных данная мутация встречалась в компаундном состоянии с другими мутациями гена *PNH*.

Второй по частоте встречаемости в исследуемой выборке (3,8%) была мутация R158Q, которая регистрировалась только в компаундном состоянии с другими мутациями.

Мутация P281L среди больных ФКУ в изучаемой популяции была обнаружена на 3,3% мутантных хромосом в гомозиготном и компаундном состояниях. По частоте мутации P281L отмечаются широкие межпопуляционные различия: среди больных ФКУ из Вологодской и Свердловской областей данная мутация не была обнаружена, а у больных из Удмуртии зарегистрирована с частотой 12,5%, что, по-видимому, обусловлено локальным эффектом основателя или национальным составом данной территории.

Мутация IVS12nt1 у больных ФКУ из Краснодарского края регистрировалась с частотой 2,4%, она находилась только в компаундном состоянии с другими мутациями. Прочие мутации гена *PNH*, рассматриваемые как наиболее частые в европейских популяциях, в краснодарской выборке регистрировались редко. Мутация R252W встречалась с частотой 1,9%, что соответствует средней частоте указанной мутации в России (1,82%) [Степанова, 2005]. Мутацию R261Q, которая встречается во всех европейских популяциях и зарегистрированная в исследованных российских популяциях с частотой от

1,1% в Московской и Воронежской областях [Степанова, 2005] до 9,8% в Башкортостане [Ахметова и др., 2003] в краснодарской выборке содержали 1,4% всех мутантных аллелей.

Мутация сплайсинга IVS10nt546 определялась с частотой лишь 1,0%, во всех случаях она находилась в компаундном состоянии с другими мутациями. Высокая частота этой мутации отмечается в Самарской (8,7%), Ростовской (7,14%) областях, но она не регистрировалась в выборках больных ФКУ из Удмуртии и Вологодской области [Степанова, 2005; Амелина и др., 2004].

Информативными по изучаемому спектру мутаций в выборке больных ФКУ из Краснодарского края были 65,7% хромосом при средней информативности в других регионах России по аналогичному спектру мутаций 79,8% [Степанова, 2005] и 80,5% в соседней с Краснодарским краем Ростовской области [Амелина и др., 2004]. Приведенные выше результаты являются дополнительным подтверждением межпопуляционных различий в частотах мутаций гена *PAH*.

Территориальная и этническая специфичность в спектре и частоте мутаций гена *PAH*

Заболевание ФКУ зарегистрировано в 41 территориально административной единице края (не были зарегистрированы больные в Белоглинском (граничит с Ростовской областью), Отрадненском и Успенском (граничат со Ставропольским краем) районах). Анализ частоты и спектра мутаций был проведен для 6 регионов Краснодарского края (рис. 2), которые были выделены с учетом данных ранее проведенного исследования по распространённости ФКУ на территории Краснодарского края [Голихина, 2004]: Приазовский (I), Северный (II), Восточный (III), Центральный (IV), Южный (V), Причерноморский (VI). Регионы выделены путем объединения соседних районов с учетом территориально-исторического принципа заселения данных территорий и современной специализации производства.

Наибольшая информативность хромосом по исследованным мутациям (88,5%) показана для Приазовского региона, при этом зарегистрировано всего три типа мутаций, среди которых с более высокой частотой (76,9%) встречалась мутация R408W. Эта мутация в Приазовье регистрировалась в 1,8 раз чаще, чем в Южном регионе. Согласно данным официальной статистики, в разных районах Приазовского региона от 88% до 93% от общего населения составляют русские [Итоги Всероссийской переписи населения 2002 г. по Краснодарскому краю 2005]. Наименьшая информативность хромосом (57,1%) установлена в Причерноморском регионе, территория которого характеризуется более редкой (1,32 на 100 тыс. населения), в сравнении с другими регионами края встречаемостью заболевания (1,56 на 100 тыс. населения в Центральном регионе; 2,00 – в Южном; 2,15 в - Восточном; 2,91 – в Приазовском и 3,29 в Северном регионах). На территории Причерноморского региона сконцентрировано

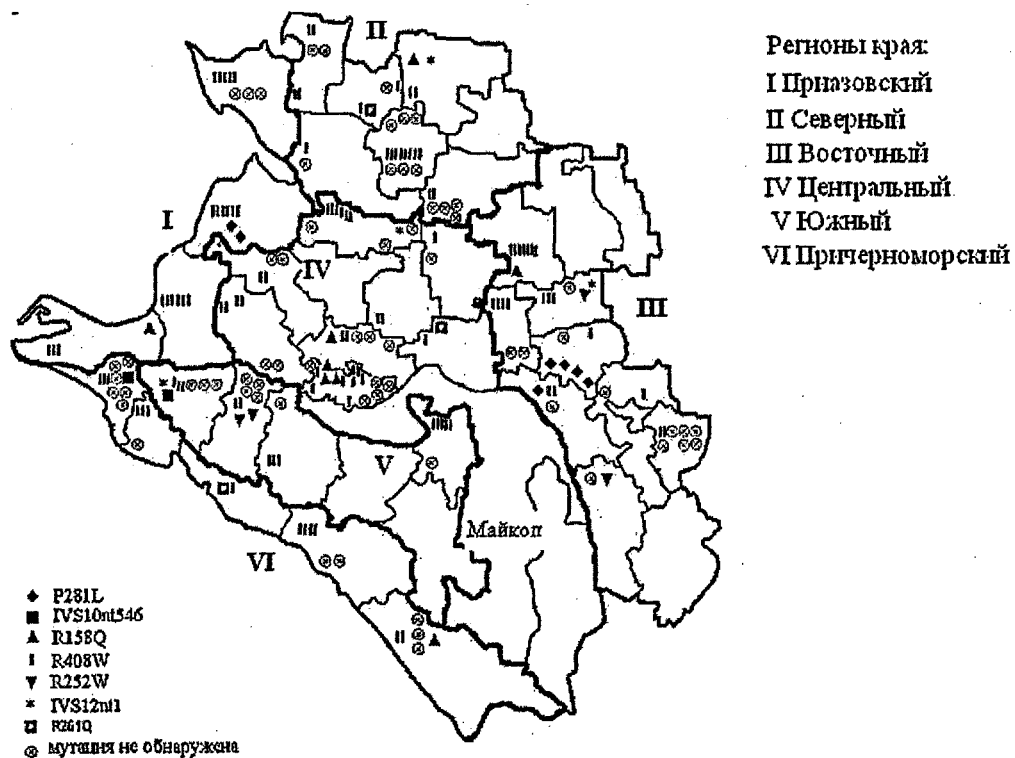


Рис. 2. Территориальное распространение мутаций в Краснодарском крае.

около 70% здравниц, домов отдыха, турбаз. Русские в различных районах составляют от 68 до 86% от общей численности населения. Для остальных четырех регионов информативность хромосом по изученному спектру мутаций была примерно одинаковой: для Восточного региона - 68,2%; Центрального - 64,0%, Северного - 61,1% (в данном случае 52,8% хромосом несли мутацию R408W) и Южного - 57,7%. Полученные результаты показывают, что в регионе края с исторически более ранним заселением (Приазовский регион, заселен в конце VIII в.) частота мутации R408W значительно выше (76,9%) средней частоты по краю (51,9%). Возможно, носители этой мутации гена РАН оказались среди ранних эмигрантов при переселении Черноморского казачьего войска в Прикубанье (1792 г.) на западную часть правобережной Кубани (Приазовский регион). В различных регионах края регистрировалось от 3 до 5-ти типов мутаций в гене РАН.

Большинство больных ФКУ (78%) являлись потомками от однонациональных семей, среди которых преобладали русские (71,0%), а турецкие и армянские семьи составили, соответственно 1,0 и 6,0%. На долю межнациональных браков пришлось 22,0%. Среди русских родителей пробандов зарегистрировано шесть типов мутаций гена РАН, 62,5% от всех хромосом в данной этнической группе содержали мутацию R408W. Эта мутация была зарегистрирована также у украинцев (50,0%) и казахов (100%). У потомков армян с высокой частотой встречались мутации P281L (21,0%), IVS12nt1 (10,5%) и IVS10nt546 (10,5%). Неинформативными по изучаемым мутациям были 30% «русских» хромосом, среди остальных национальностей не удалось идентифицировать 40% и более хромосом. Результаты показывают, что в популяциях смешанного этнического состава увеличивается разнообразие мутантных аллелей гена РАН.

Для определения значимости миграционных процессов в формировании генетического разнообразия по спектру мутаций, определяющих развитие ФКУ, было проведено изучение структуры браков в отношении места рождения родителей, дети которых больны ФКУ, с учетом их национальной принадлежности (табл.1).

Таблица 1

Структура (в %) типов брака родителей, имеющих детей с ФКУ

Тип брака родителей, имеющих детей с ФКУ	Однонациональные		Межнациональные, 20 семей	Всего, 91 семья
	Русские, 65 семей	Прочие национальности, 6 семей		
Гомолокальный	56,9	16,6	10,0	43,9
Гетеролокальный	32,3	16,6	60,0	37,4
Оба родителя приезжие	10,8	66,7	30,0	18,7

Среди браков между русскими преобладали гомолокальные (56,9%), к числу которых были отнесены браки между уроженцами Краснодарского

края. Примерно в 50% случаев от их общего числа в такие браки вступали уроженцы одного района, что повышает вероятность инбридинга. Чаще всего браки в пределах одного района заключались в районах с высокой встречаемостью заболевания – Тихорецком, Брюховецком, Приморско-Ахтарском районах.

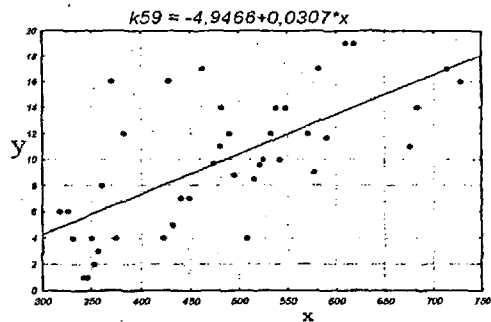
В межнациональных семьях преобладали гетеролокальные браки (60,0%), в однонациональных не русских семьях – браки между приезжими индивидами (66,7%). В целом по всей популяции 37,4% от всех хромосом были привнесены в Краснодарский край мигрантами из различных областей РФ и бывших республик СССР. Большинство семей мигрантов проживают вдоль побережья Черного и Азовского морей в Приазовском и Причерноморском регионах. Информативными по изучаемому спектру мутаций в группе мигрантов были 70,2% хромосом.

Характеристика динамики фенилаланина в крови больных ФКУ

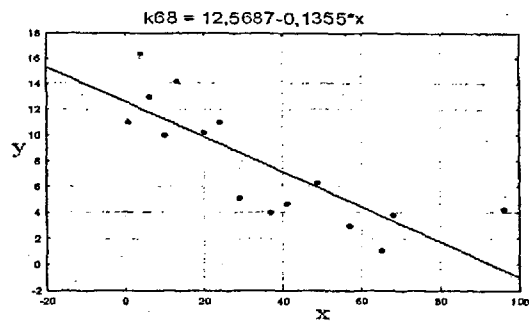
Для сравнительной характеристики динамики уровня ФА в крови больных использован линейный регрессионный анализ содержания ФА (мг%) на возраст больного (недель после рождения). Анализ выполнен индивидуально для 80-ти пациентов (44 мальчика и 36 девочек) с «классической» формой ФКУ. Для описания динамики ФА использованы все три показателя, входящие в уравнение линейной регрессии: «а» - свободный член уравнения регрессии, характеризующий общий уровень ФА, «b» - коэффициент линейной регрессии, отражающий скорость изменения (динамику) уровня его содержания, определялась также дисперсия отклонений (величина « δ^2 »), характеризующая регулярность динамики.

Установлено разнообразие типов динамики содержания ФА среди больных ФКУ по всем трем показателям регрессии. Показатель «а» варьирует в пределах от -12,9 до +73,8, границы изменчивости коэффициента b составляют -1,2 до 0,5, величина дисперсии отклонений от линии регрессии (δ^2) меняется в пределах от 0,3 - до 39,8. Рисунок 3 (а, б) отражает существенные различия типов динамики ФА в крови.

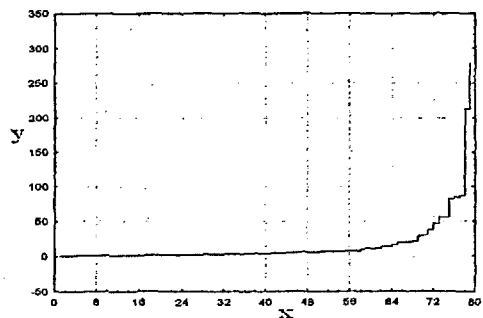
Все три показателя линейной регрессии были объединены в линейные комбинации – I и II главные компоненты. По их значениям выполнен кластерный анализ 80-ти пациентов, задача которого состояла в оценке степени разнообразия динамики уровня ФА в крови. Результат анализа отражен в виде иерархической дендрограммы (рис. 3 в, г), разделение которой по предварительно выбранному оптимальному уровню и приводит к выделению кластеров - групп больных, наиболее сходных по комплексу трех параметров линейной регрессии. Выполненная кластеризация выявила минимум 6 различных типов динамики ФА. Проверка правильности кластерного решения с помощью дисперсионного анализа показала, что все 6 кластеров статистически достоверно различаются по средним значениям параметров регрессии а,



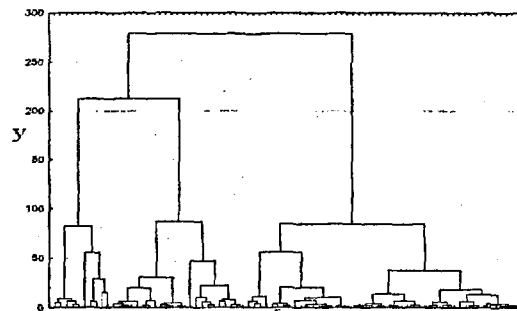
а



б



в



г

Рис. 3. а, б - эмпирические значения и теоретическая линия регрессии содержания ФА у двух больных. По оси x - возраст больного в неделях, y - уровень ФА (мг%), в - кривая зависимости уровня сходства объектов, объединяемых в кластеры от шага группировки объектов, x - шаг кластерной процедуры, y - уровень слияния, на котором объекты объединяются в кластеры, г - результат кластерного анализа больных ФКУ, по оси x - больные ФКУ, y - расстояние слияния, усл. ед.

b и δ^2 (F-критерий равен, соответственно 35,4; 10,4 и 77,4; $p < 0,01$). Ни один из кластеров не представлен единичным объектом, что свидетельствует о существовании факторов, объединяющих больных ФКУ в группы по динамике ФА.

Оценка эффекта изученных факторов динамики уровня ФА в крови больных ФКУ

С целью выявления факторов, возможно влияющих на динамику уровня ФА в крови больных ФКУ, изучены следующие признаки: генотип больного по гену *PAH* (m); национальность больного (n); пол больного (s), его возраст (y); территория (t) и регион (r) проживания больного в крае; места рождения родителей пробанда (a); возраст начала диетотерапии (ndi) и строгость соблюдения диеты (di). С помощью однофакторного дисперсионного анализа оценены эффекты изучаемых факторов на изменчивость слагаемых комплексной оценки динамики уровня ФА и статистически достоверные межгрупповые различия установлены для четырех факторов: «соблюдение диеты» «территория проживания больного», «генотип», «начало диетотерапии» и (табл. 2 - 5).

Таблица 2
Оценка эффекта «соблюдение диеты» на показатели регрессии содержания ФА в крови

Фактор, определяющий изменчивость	df	mS	F	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Показатель «a»					
Обусловленную строгостью соблюдения диеты	2	540,1	4,7*	15,9	12,1
Остаточную	77	115,6	-	115,6	87,9
Показатель «b»					
Обусловленную строгостью соблюдения диеты	2	0,013	0,5*	0,000	0,0
Остаточную	77	0,024	-	0,024	100,0
Показатель « δ^2 »					
Обусловленную строгостью соблюдения диеты	2	241,9	3,1*	6,1	7,2
Остаточную	77	77,8	-	77,8	92,8

Примечание. Здесь и в таблицах 3-5: * отмечены значения F-критерия Фишера, превосходящие стандартные для 5%-го уровня значимости, df – число степеней свободы, mS – средний квадрат.

Согласно результатам дисперсионного анализа, фактор «строгость соблюдения диеты» оказал влияние на все три показателя регрессии (a, b и δ^2) (табл. 2), что подчеркивает его значимость. Фактор «территория проживания» оказал влияние на показатель регулярности ответа организма на диету-

терапию (« δ^2 ») (табл. 3). Факторы «генотип» и «начало диеты» влияли на общий уровень ФА в крови (показатель «а») (табл. 4, 5).

Таблица 3

Оценка эффекта «территории проживания» больного на показатели регрессии содержания ФА в крови

Фактор, определяющий изменчивость	df	mS	F	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Показатель «а»					
Между территориями	42	290,6	0,7	0,0	0,0
Остаточную	37	400,1	-	400,1	100,0
Показатель «б»					
Между территориями	42	0,023	0,5	0,0	0,0
Остаточную	37	0,045	-	0,045	100,0
Показатель « δ^2 »					
Между территориями	42	149,2	3,1*	42,5	46,9
Остаточную	37	48,1	-	48,1	53,1

Таблица 4

Оценка эффекта «генотип» больного на показатели регрессии содержания ФА в крови

Фактор, определяющий изменчивость	df	mS	F	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Показатель «а»					
Между генотипами	11	276,1	2,7*	26,0	20,3
Остаточную	68	02,1	-	102,1	79,7
Показатель «б»					
Между генотипами	11	0,022	0,91	0,000	0,0
Остаточную	68	0,024	-	0,024	100,0
Показатель « δ^2 »					
Между генотипами	11	84,0	0,79	0,0	0,0
Остаточную	68	105,4	-	105,4	100,0

Дисперсионный анализ был завершен сравнением групповых средних в целях конкретизации межгрупповых различий. В случаях, где исходные группы содержали единичные объекты, для возможности применения стандартных статистических критериев групповых различий, наиболее близкие среди исходно выделенных групп объединялись в новые после ранжирования по тому показателю регрессии, по которому были установлены статистически достоверные различия.

Так, исходные территории края были разделены по среднему значению показателей « δ^2 » и установлен факт различия трех вновь образованных групп территорий края. Очевидно, что административное деление края на районы

само по себе не может влиять на уровень ФА, и для установления причин территориальных различий требуется оценка эффекта не отдельных факторов, а исследование взаимосвязи факторов.

Таблица 5

Оценка эффекта «начало диеты» на показатели регрессии содержания ФА в крови

Фактор, определяющий изменчивость	df	mS	F	Дисперсия	Доля в общей дисперсии, %
Показатель «а»					
Связанную с началом диеты	2	591,7	5,18*	17,9	13,5
Остаточную	77	114,3	-	114,3	86,5
Показатель «b»					
Связанную с началом диеты	2	0,013	0,55	0,000	0,0
Остаточную	77	0,024	-	0,024	100,0
Показатель «δ²»					
Связанную с началом диеты	2	118,9	1,16	0,00	0,0
Остаточную	77	102,0	-	102,00	00,0

По фактору «генотип» больные были ранжированы по величине, отражающей общий уровень содержания ФА в крови (от наименьшего к наибольшему). В результате были выделенные три группы больных, которые статистически достоверно различаются по средним значениям общего уровня ФА. Больные, которые являлись компаундными носителями мутаций R408W/R261Q, R408W/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546 гена *PAH*, вошли в группу, характеризующуюся наименьшим общим уровнем ФА в крови. Этот факт позволяет сделать предположение о том, что указанные генотипы с медицинских позиций принадлежат к более «благополучной» группе больных ФКУ. Генотип R408W/IVS12nt1 характеризовался неблагоприятной динамикой фе-нилаланина в крови при несоблюдении диеты или соблюдении с нарушениями.

Итоги сравнения групп по фактору «строгость соблюдения диеты» оказались следующими: средние значения показателя «а», отражающего общий уровень ФА в группе «1» со строгим соблюдением диеты составили $7,7 \pm 0,5$; при соблюдении диеты с нарушениями (группа «2») - $7,9 \pm 4,2$ и при несоблюдении диеты (группа «3») - $19,7 \pm 2,4$. Сравнение приведенных средних с использованием стандартного варианта критерия Стьюдента дали следующие его значения: $t=0,17$ при сравнении «1» и «2» групп, $t=4,89^*$ ($p<0,05$) при сравнении групп «1» и «3» и $t=2,44^*$ при сравнении групп «2» и «3». Иными словами, несоблюдение лечебной диеты однозначно приводит к статистически достоверному росту ФА в крови больного.

При анализе влияния фактора «начало диеты» рассматривались 3 группы больных, выделенных по данному фактору. К «1» группе причислены 13 больных в возрасте от 2 до 17 лет, прибывшие на территорию края, с точно

неизвестными сроками начала диеты и динамикой уровня ФА (или известными только со слов родителей); которые были поставлены на учет (назначено лечение) в Кубанской межрегиональной МГК с 9 мес. до 1,5 лет (в настоящее время диету соблюдают только 3 ребенка). В группу «2» отнесены 8 больных в возрасте от 2 до 16 лет, выявленных в ходе селективного скрининга. Детям из данной группы диета была назначена с 1 г. 1 мес. до 2 лет, на момент исследования диету соблюдали все дети. Группа «3» состояла из 59 больных в возрасте от 1 года до 15 лет, выявленных в ходе неонатального скрининга новорожденных, которым диета была назначена после обследования и консультации в МГК в первые месяцы жизни. При сравнении средних значений уровня ФА по группам отмечается, что в «1» группе среднее значение показателя «а» составляет $17,5 \pm 4,48$, во «2» - $6,6 \pm 1,40$, в «3» - $7,1 \pm 0,80$. Группа «1» отличалась от групп «2» ($t=2,32^*$) и «3» ($t=2,29^*$) ($p<0,05$) высоким уровнем ФА, так как диета многими детьми не соблюдалась, хотя и была назначена раньше, чем детям из 2-ой группы. Различия между «2» и «3» группами по средним значениям уровня ФА оказались недостоверными ($t=0,31$). Полученные результаты отражают важность для благоприятной динамики ФА в крови не только раннего начала диетотерапии, а также строгого соблюдения ее в дальнейшем.

При оценке результатов дисперсионного анализа в ряде случаев предполагалось, что положительный результат дисперсионного анализа обусловлен в действительности не собственным эффектом изучаемого фактора, а его связью с другим, реально действующим. Поэтому на следующем этапе был проведен анализ взаимодействия всех изучаемых факторов между собой.

Взаимодействие факторов, влияющих на динамику фенилаланина в крови больных ФКУ

В основу исследования был положен метод анализа двумерных распределений, основанный на оценке парных корреляций факторов, взятых во всех возможных сочетаниях. Статистически достоверная связь установлена для пар признаков: t-m ($K=0,58$), n-m ($K=0,50$), n-ndi ($K=0,31$), a-ndi ($K=0,25$), di-ndi ($K=0,39$). Все значимые корреляции относятся к средним по силе, при этом наибольшие значения коэффициента сопряженности были отмечены для пары признаков «территория - мутация» (t-m) и «национальность - мутация» (n-m).

Наличие сопряженности между парой признаков «территория - мутация» свидетельствует об опосредованном характере ранее отмеченной связи между территорией проживания и динамикой ФА в крови больного ребенка и обусловлен тем, что имеет место территориальная гетерогенность в распределении мутантных аллелей гена *PAH* в Краснодарском крае. Распределение мутаций по территории края связано с национальным составом, особенностями миграционных процессов и брачной структуры.

При описании пары признаков «национальность-мутация» отмечалось,

что по частоте большинства генотипов (R408W/R158Q, R408W/R261Q, R408W/P281L, R408W/IVS12nt1, IVS12nt1/R158Q, R158Q/X, R252W/X) статистически достоверных различий между больными разной национальности не установлено (все оценки, полученные с использованием ф-преобразования, значения t-критерия ниже стандартного для 5%-го уровня значимости). Различия установлены для генотипов P281L/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546, IVS10nt546/X, которые встретились только в армянских семьях. В русских и межнациональных семьях часто регистрировались больные с мутацией R408W в гомозиготном состоянии или в компаундном состоянии с не идентифицированной мутацией.

При изучении взаимодействия признаков «начало диеты – национальность родителей» (табл. 6) существенных различий по времени начала диеты в группах не отмечается. Основная группа больных всех национальностей была выявлена в ходе массового скрининга и диета начата в первые месяцы жизни.

Таблица 6

Зависимость признаков «начало диеты» и «национальность родителей»

Родители	Начало диеты			Всего
	A N (%)	B N (%)	C N (%)	
Русские	11 (17,1)	4 (6,25)	49 (76,5)	64
Армяне	0	0	4 (100,0)	4
Смешанные браки	2 (16,6)	4 (33,3)	6 (50,0)	12
Всего	13	8	59	80

Примечание. Здесь и в таблицах 7, 8 А - начало диетотерапии известно со слов родителей (или точно неизвестно); В - дети, выявленные при проведении селективного скрининга; С - дети, выявленные при проведении массового скрининга, N (%) - число (процент) больных от соответствующего класса.

Взаимодействие пары признаков «происхождение родителей - начало диеты» показало (табл. 7), что родители больных ФКУ, выявленных при массовом скрининге, чаще всего являлись местными жителями (93,3%).

Таблица 7

Зависимость признаков «начало диеты» и «происхождение» родителей

Родители	Начало диеты			Всего
	A N (%)	B N (%)	C N (%)	
Местные	0 (0,0)	2 (6,7)	28 (93,3)	30
Приезжие	9 (42,8)	4 (19,0)	8 (38,1)	21
Один местный, второй - приезжий	4 (13,8)	2 (6,9)	23 (79,3)	29
Всего	13	8	59	80

В семьях, где один из родителей местный, 79,3% детей выявлено при массовом скрининге. В приезжих семьях в 42,8% случаях точное начало диеты было известно со слов родителей.

Таблица 8

Частоты двумерного распределения больных ФКУ по факторам «начало диеты» и «строгость ее соблюдения»

Соблюдение диеты	Начало диеты			Всего
	A N (%)	B N (%)	C N (%)	
Строгое	1 (3,2)	0 (0,0)	30 (96,8)	31
Соблюдение с нарушениями	7 (17,1)	7 (17,1)	27 (65,8)	41
Несоблюдение	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	8
Всего	13	8	59	80

Результаты сравнения признаков «начало диеты» и «строгость ее соблюдения» (табл. 8) свидетельствуют о том, что в группе детей, строго соблюдающих диету, 96,8% составили дети, выявленные в ходе массового скрининга новорожденных; в этой же группе 65,8% детей соблюдают диету с нарушениями. Основной процент больных, не соблюдающих диету, составляют дети, прибывшие на территорию края (62,5%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить семь типов мутаций гена *РАН* из восьми изучаемых и идентифицировать 65,7% всех мутантных хромосом, что несколько ниже, чем информативность хромосом по аналогичному спектру мутаций среди больных ФКУ в большинстве исследованных популяциях: Московской (71,3%), Воронежской (78,3%), Ростовской (80,52%), Самарской (82,6%), Курской (82,6%), Архангельской (85,4), Свердловской (87,9%) областях, Удмуртии (94,6%) [Амелина и др., 2004; Степанова и др., 2005; Ахметова и др., 2003]. Большинство больных ФКУ в краснодарской популяции оказались компаундными носителями различных мутаций.

Полученные данные позволяют провести пренатальную диагностику заболевания и поиск гетерозиготных носителей с использованием прямых методов ДНК-диагностики в 39 семьях (42,9%). Для 43 семей (47,2%), где обнаружена только одна мутация в гене *РАН*, прямая пренатальная ДНК-диагностика невозможна. В таких семьях необходимо провести дополнительное исследование полиморфных маркеров, расположенных внутри или в непосредственной близости от гена *РАН* для выявления информативных маркеров. Принимая во внимание тот факт, что помимо классической ФКУ существуют атипичные формы заболевания, в 9 семьях (9,9%), где не выявлены частые мутации гена *РАН*, необходимо проводить поиск более редких мута-

ций гена *PAH* и исключить варианты формы заболевания (исследование генов *QDPR* и *PTS* и др.).

В результате проведенного молекулярно-генетического обследования больных установлены территориальные и межэтнические различия в спектре, частоте изученных мутантных аллелей гена *PAH* в Краснодарском крае.

Как следует из результатов выполненных в исследовании регрессионного и дисперсионного анализов, на динамику ФА в организме больного влияют генотип больного (более благоприятная динамика отмечалась у больных с генотипами R408W/R261Q, R408W/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546 гена *PAH*), начало диеты и строгость ее соблюдения (важным является не только раннее начало диетотерапии, а также строгость соблюдения диеты в дальнейшем).

Современный мировой и отечественный опыт показывают, что неонатальный скрининг, установление молекулярно-генетического дефекта гена *PAH* и своевременно начатая диетотерапия в большинстве случаев могут обеспечить пациентам с ФКУ нормальное физическое и психическое развитие. Но эта цель может быть достигнута только в результате совместных усилий врачей-генетиков и родителей больных детей, участие которых в строгом соблюдении детьми диеты имеет большое значение.

ВЫВОДЫ

1. В популяции Краснодарского края у больных фенилкетонурией определены семь из восьми изученных типов мутаций гена *PAH* со следующими частотами: R408W - 51,9%; R158Q - 3,8%; P281L - 3,3%; IVS12nt1 - 2,4%; R252W - 1,9%; R261Q - 1,4%; IVS10nt546 - 1,0%. Мутация I65T не была зарегистрирована.
2. Установлена территориальная гетерогенность в частоте и спектре изученных мутаций в гене *PAH* в Краснодарском крае. Мутация R408W регистрировалась во всех регионах с частотой от 42,3% в Южном до 76,0% в Приазовском регионе. Спектр других выявленных мутаций в регионах отличался: в Приазовском зарегистрированы мутации P281L и R158Q; в Восточном - мутации P281L, R158Q, R252W и IVS12nt1; в Южном - R252W, IVS10nt546 и IVS12nt1; в Причерноморском - IVS10nt546, R261Q и R158Q; в Центральном и Северном регионах - R261Q, R158Q и IVS12nt1. Общая информативность хромосом по изученному спектру мутаций составила 65,7% и варьировала от 57,1% в Причерноморском регионе до 88,5% в Приазовском регионе.
3. Больные ФКУ в 78,0% зарегистрированы в одноэтнических семьях (среди них 71% - в однопородных русских семьях) и 22,0% - в межнациональных семьях. Потомками от браков между жителями Краснодарского края являются 43,9% больных (из них в 19,8% случаев родители представлены выходцами одного района), в 18,7% - между уроженцами различных регионов России и стран СНГ. В зависимости от типа браков родителей отмечается различная информативность хромосом по изучаемому спектру

мутаций: в семьях между уроженцами края информативны 60,0% хромосом, в семьях, где только один из родителей происходит из Краснодарского края – 72,8% и в семьях мигрантов – 68,8%.

4. Выявлена этническая специфичность частоте и спектре по некоторым изучаемым мутациям и генотипам. Мутация R408W из десяти представленных национальностей чаще всего регистрировалась у русских (61,5%). В армянской этнической группе с высокой частотой регистрировались мутации P281L (21,0%), IVS12nt1 (10,5%) и IVS10nt546 (10,5%). Генотипы P281L/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546, IVS10nt546/X встретились только в армянских семьях.
5. Динамика ФА в крови больных ФКУ, исследованная в регрессионном анализе, характеризуется большим разнообразием (значения показателя «а», характеризующего общий уровень фенилаланина в организме, варьирует в пределах от -12,9 до +73,8), границы изменчивости коэффициента линейной регрессии, отражающего направление изучаемой динамики, составляют от -1,16 до 0,45, а величина дисперсии отклонений от линии регрессии меняется в пределах от 0,25 - до 39,8.
6. Установлено, что динамика уровня фенилаланина в крови больных фенилкетонурией определяется генотипом больного (более благоприятная динамика отмечалась у больных с генотипами R408W/R261Q, R408W/P281L, IVS12nt1/IVS10nt546 гена PAH); строгостью соблюдения диеты (в группе детей со строгим соблюдением диеты среднее значение показателя «а», отражающего общий уровень фенилаланина равен $7,7 \pm 0,5$; в группе, соблюдающей диету с нарушениями - $7,9 \pm 4,2$, среди детей, не соблюдающих диету - $19,7 \pm 2,4$) и сроками начала диетотерапии (важен не только возраст начала диетотерапии, а также соблюдение ее в дальнейшем).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зинченко Л.В., Голихина Т.А., Голубцов В.И., Матулевич С.А. Мутации гена PAH у больных ФКУ в Краснодарском крае. Тез. Всеросс. науч.-практ. конф. «Современные достижения клинической генетики» // Мед. генетика. - 2003. - Т. 2. - № 10. - С.416.
2. Матулевич С.А., Зинченко Л.В., Голихина Т.А., Голубцов В.И. Анализ мутаций гена PAH у больных фенилкетонурией в Краснодарском крае // Мед. генетика. - 2004. - № 10. - С. 466-469.
3. Голихина Т.А., Гусарук Л.Р., Голубцов В.И., Зинченко Л.В., Матулевич С.А. Оценка умственного развития больных фенилкетонурией на фоне проводимого лечения / Сборник научных трудов «Генетика человека и патология». Выпуск 7. - Томск: Печатная мануфактура. – 2004. - С.26-31.
4. Зинченко Л.В., Голубцов В.И., Матулевич С.А. Молекулярно-генетическое изучение мутаций у больных фенилкетонурией / Теоретич. и

прикладные проблемы медицины и биологии – Майкоп: Качество. - 2003. - С.223-227.

5. Матулевич С.А., Зинченко Л.В. Фенилкетонурия. Новые методы диагностики // Врач и аптека XXI века. - 2004. - № 6. - С. 26-27.
6. Зинченко Л.В., Матулевич С.А. Молекулярная генетика фенилкетонурии в Краснодарском крае // Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков (Часть I). - Мед. генетика. - 2005. - Т. 4. - № 4. - С. 189.
7. Зинченко Л.В., Матулевич С.А., Кучер А.Н. Территориальная распространенность и этническое разнообразие мутаций гена фенилаланингидроксилазы в Краснодарском крае // Кубан. науч. мед. вестн. - 2006. - № 3-4. (84-85). - С.39-42.

Отпечатано в ООО «НИП»
г.Томск, ул.Советская, 47, тел.: 53-14-70
заказ № 6011-70, тираж 100 экз.

