

УДК 575.1

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ
СРЕДИ НОВОРОЖДЕННЫХ****Р.Ф.МАМЕДОВА, М.Ш.БАБАЕВ***Бакинский Государственный Университет**rovshan.aku@mail.ru*

Проведен генетический скрининг недостаточности аминокислоты фенилаланин среди новорожденных города Баку. Диагностировано 4 случая гомозиготного состояния по дефектному гену фенилкетонурии у новорожденных. Анализ четырех родословных показал кровное родство между родителями новорожденных. Полученные результаты генетического скрининга патологического гена фенилкетонурии позволят врачам педиатрам своевременно проводить лечение больных детей до проявления клиники заболевания.

Ключевые слова: фенилкетонурия, фенилаланин, новорожденный, генетический скрининг, родословная, пробанд.

Фенилкетонурия (ФКУ) – тяжелое наследственное заболевание, которое характеризуется главным образом поражением нервной системы, наступающим вследствие врожденного дефекта фермента, отвечающего в организме человека за нормальный обмен одной из незаменимых аминокислот – фенилаланина, входящего в состав белка. В результате мутации гена, контролирующего синтез фенилаланингидроксилазы, развивается метаболический блок на этапе превращения фенилаланина в тирозин, вследствие чего основным путем преобразования фенилаланина становится дезаминирование и синтез токсических производных – фенилпировиноградной, фенилмолочной и фенилуксусной кислот. В крови и тканях значительно увеличивается содержание фенилаланина (до 0,2 г/л и более при норме 0,01-0,02 г/л) (1,3).

Для диагностики ФКУ, всех новорожденных обследуют по специальным программам скрининга, выявляющего повышение концентрации фенилаланина в крови уже в первые недели жизни. Скрининирующие тесты должны быть простыми, недорогими и информативными. Этим требованиям отвечают методы, используемые для ранней диагностики ФКУ: 1. микробиологический тест Гатри, 2. метод флюоресцирующих антител, 3. проба Фелинга на фенилпировиноградную кислоту в моче (прибавление нескольких капель 5% раствора треххлористого железа и уксусной кислоты к моче больного приводит к появлению зеленой окраски

пятна на пленке) и 4. метод тонкослойной хроматографии (2, 6).

При подтверждении диагноза ФКУ ребенок переводится на искусственную диету, основу которой составляют безфенилаланиновые препараты (4). При своевременном начале лечения безфенилаланиновой диетой в первые месяцы у детей, гомозиготных по гену недостаточности фенилаланингидроксилазы, не отмечается никаких клинических признаков задержки психического и физического развития (5). Отсюда ясно, насколько важна ранняя диагностика заболевания.

Материал и методы исследований

Исследования проведены в родильном отделении Центральной Больницы Нефтяников.

Для диагностики ФКУ среди новорожденных мы использовали пробу Фелинга и метод тонкослойной хроматографии. Для этого использовали мочу и капиллярную кровь 1827 новорожденных. Диагностику ФКУ на уровне мочи проводили пробой Фелинга, на уровне сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии. Капиллярная кровь, взятая из пальца (или из пятки – у новорожденных) уколом, немедленно промокается прямоугольными кусками (7x1,8 см) хорошо абсорбирующей фильтровальной бумаги (Ватман 3ММ). Кровь собирали на бумагу в виде дискретных пятен (гомогенно пропитывающих бумагу с двух сторон) диаметром 15мм; от одного обследуемого брали три таких пятна. Каждую бумажку предварительно подписывали, а после взятия крови – просушивали в подвешанном положении при комнатной температуре. Срок хранения образцов не более 2-3 недель.

Специальным пробойником из каждого образца выбивали два кровяных диска диаметром 12мм (третье пятно резервное). Каждый кровяной диск помещали в стеклянный цилиндрический микро-стаканчик вместимостью 1 мл и заливали 100 мкл смеси, элюирующей аминокислоты: 95% этанол, дистиллированная вода в соотношении 57:43 (по объему). 40 мкл элюата (соответствует 40мкл цельной крови, образующей дискретное пятно диаметром 12 мм) наносят на стартовую линию хроматограммы микропипеткой, но не полоской, а пятном, диаметр которого не должен превышать 8 мм. Аминокислоты элюируют с обоих кровяных дисков каждого образца отдельно и элюаты наносят на две хроматограммы. Для окраски использовали 0,2% раствор нингидрина в ацетоне.

Для правильной интерпретации хроматограмм необходима поставка контролей: а) стандартная смесь аминокислот позволяет идентифицировать на хроматограмме каждую аминокислоту исследуемого образца; б) нормальный образец крови той же возрастной группы позволяет выявить, какие аминокислоты (точнее, нингидрин-реагирующие соединения) присутствуют в исследуемом образце сверх нормы и какие из нормально присутствующих имеются в более высокой, чем в контроле, кон-

центрации (сравнение площади и интенсивности окраски пятна каждой аминокислоты в контрольном и исследуемом образцах).

Результаты и их обсуждение

Скрининг ФКУ, проводимый нами в моче среди 1827 новорожденных, позволил у четверых обнаружить на пеленке пятна зеленого цвета, что характерно для генного дефекта при ФКУ. Зеленый цвет появляется на месте контакта пробы Фелинга и мочи новорожденного.

Для подтверждения диагноза был произведен забор венозной крови у этих новорожденных и проведена тонкослойная хроматография сывороточных аминокислот. Во всех четырех случаях по сравнению с контрольной группой наблюдали значительное увеличение уровня ФКУ. Спектрофотометрическое определение уровней фенилаланина среди новорожденных с положительной реакцией на пробу Фелинга показало следующие распределения: новорожденный от матери М.А. – 0,18 г/л; новорожденный от матери К.Л. – 0,15 г/л; новорожденный от матери А.А. – 0,13 г/л и новорожденный от матери Р.А. – 0,19 г/л. На рисунках 1, 2, 3 и 4 представлены родословные новорожденных с диагностированной формой ФКУ. Во всех четырех случаях родители новорожденных состояли в кровном родстве. В семье М.А. супруги имели кровное родство второй степени, параллельный тип; матери которых являлись родными сестрами. Учитывая тот факт, что новорожденный от матери М.А. имеет гомозиготную форму по дефектному гену ФКУ, родители являются гетерозиготами.

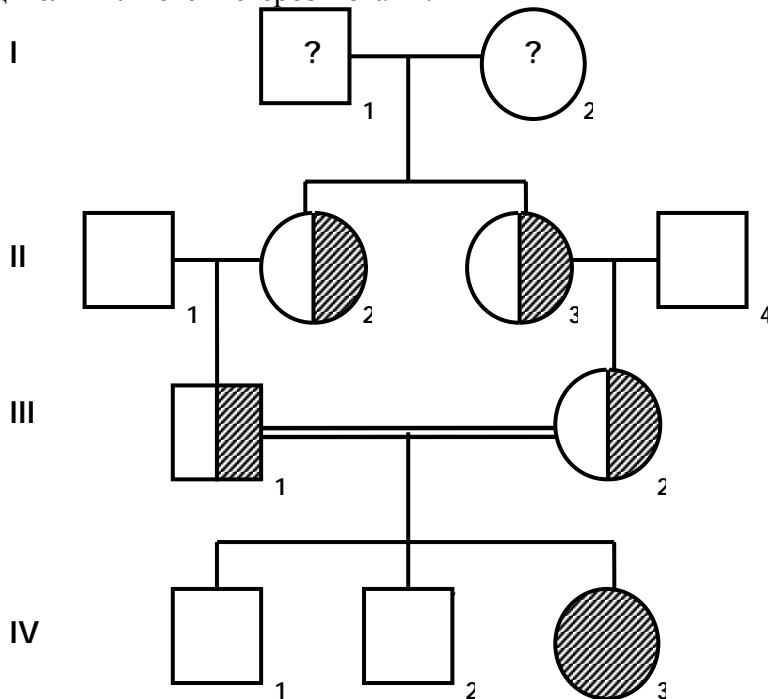


Рис.1. Родословная семьи новорожденного пробанда от матери М.А. с ФКУ.

На рисунке 1 представлена родословная семьи пробанда М.А. в четырех поколениях. Пробанд М.А. (IV-3) новорожденная девочка родилась от кровнородственного брака между брачной парой - III-1 (отец) и III-2 (мать), которые являются двоюродными сибсами. Родители пробанда М.А. являются детьми родных сестер. Следовательно, пробанд М.А. родился от кровнородственного брака второй степени, параллельного типа. По всей вероятности патологический ген ФКУ родители пробанда М.А. унаследовали от матерей – гетерозигот патологического гена ФКУ.

На рисунке 2 представлена родословная семьи пробанда К.Л. в пяти поколениях. Пробанд К.Л. (V-2), также новорожденная девочка родилась от кровнородственного брака троюродного типа между брачной парой - IV-1 (отец) и IV-2 (мать), которые являются троюродными сибсами. У родителей пробанда К.Л. дедушки являются родными братьями. Брак троюродный, тип параллельный. Следовательно, пробанд К.Л. родилась от кровнородственного брака третьей степени, параллельного типа. Анализ родословной семьи К.Л. показывает, что по всей вероятности патологический ген ФКУ родители пробанда унаследовали от дедушек (II-2, II-3) – гетерозигот патологического гена ФКУ.

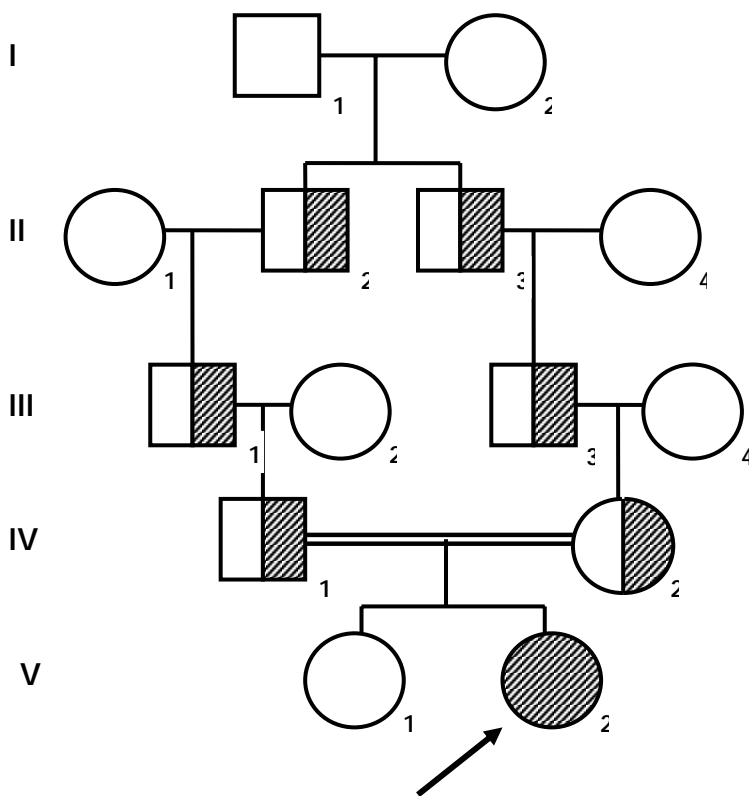


Рис. 2. Родословная семьи новорожденного пробанда от матери К.Л. с ФКУ.

На рисунке 3 представлена родословная семьи пробанда А.А. в четырех поколениях. Пробанд А.А. (IV-3) новорожденный мальчик родился от кровнородственного брака между брачной парой - III-1 (отец) и III-2 (мать), которые являются двоюродными сибсами. Родители пробанда А.А. являются детьми родного брата (III-1) и сестры (III-2). Следовательно, пробанд А.А. родился от кровнородственного брака второй степени, перекрестного типа. По всей вероятности анализ родословной показывает, что патологический ген ФКУ родители пробанда А.А. унаследовали от своих родителей. Отец пробанда от своего отца (II-2), мать пробанда от своей матери (II-3), которые по всей вероятности являются носителями (гетерозиготами) патологического гена ФКУ.

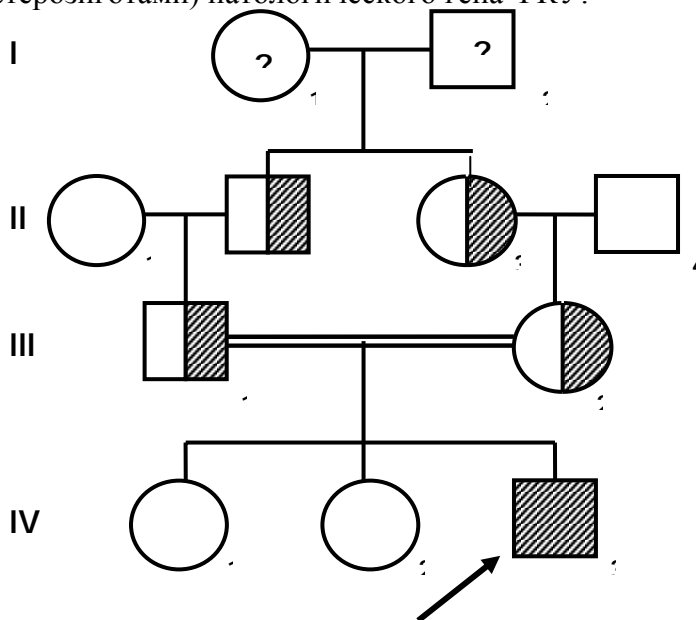


Рис. 3. Родословная семьи новорожденного пробанда от матери А.А. с ФКУ.

На рисунке 4 представлена родословная семьи пробанда Р.А. в пяти поколениях. Пробанд Р.А. (V-2), новорожденный мальчик родился от кровнородственного – троюродного брака. Брак между двоюродным дядей (III-1) и племянницей (IV-1). У родителей пробанда Р.А. дедушки являются родными братьями. Отец (II-2) отца пробанда является родным братом дедушки (II-3) матери пробанда. Брак троюродный, тип параллельный. Следовательно, пробанд Р.А. родился от кровнородственного брака третьей степени, параллельного типа. По всей вероятности патологический ген ФКУ пробанд унаследовал от дедушки по отцовской (II-2) и прадедушки (II-3) по материнской линии.

Таким образом, анализ четырех родословных с гомозиготной формой патологического гена ФКУ у новорожденных показал кровное родство между их родителями. Кровное родство второй и третьей степени, как параллельного так и перекрестного типа. В одном случае троюродного родства брак был заключен между двоюродным дядей и племянницей.

Следовательно, во всех случаях наблюдали эффект родоначальника.

Большое значение имеет специальное наблюдение за семьями риска, т. е. за такими семьями, где уже имелись дети с фенилкетонурией. Новорожденные из этих семей должны быть подвергнуты обязательному биохимическому обследованию и при показаниях к раннему лечению.

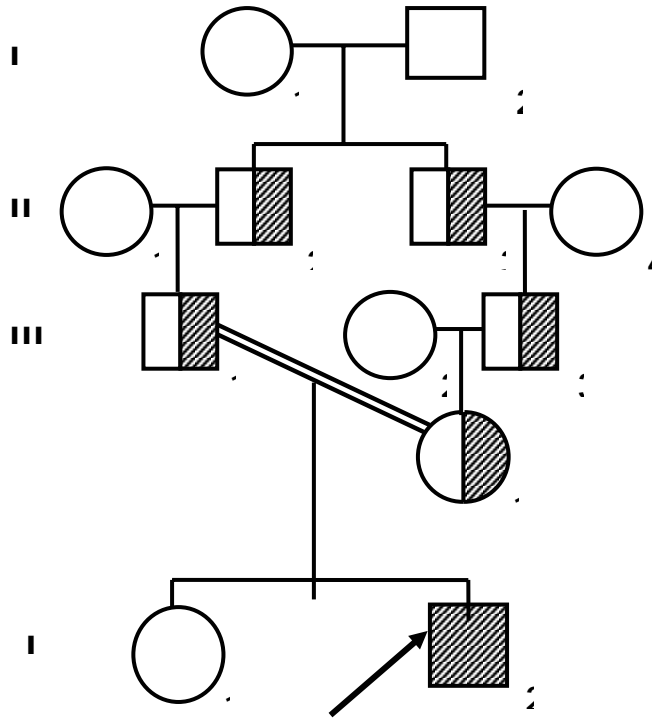


Рис. 4. Родословная семьи новорожденного пробанда от матери Р.А. с ФКУ.

Внедрение программ массового скрининга новорожденных играет важную роль в раннем выявлении ФКУ и своевременном назначении диетотерапии. Выявление и лечение детей по программам массового скрининга также позволяет предупредить развитие тяжелой психической инвалидности.

Таким образом, по данным проведенного генетического скрининга патологического гена фенилкетонурии в моче и в сыворотке крови новорожденных г. Баку установлено наличие патологического гена фенилкетонурии, что напрямую связано с дальнейшими нарушениями ЦНС, приводящими к психическим нарушениям у детей. Полученные результаты генетического скрининга патологического гена фенилкетонурии позволяют врачам педиатрам своевременно проводить лечение больных детей до проявления клиники заболевания. Своевременное медико-генетическое консультирование семей с наличием патологических генов – гетерозиготного носительства гена фенилкетонурии у супругов с целью профилактики гомозиготного состояния у ребенка крайне необходимо. Рекомендуется проведение пренатальной диагностики патологических ге-

нов у плода в первом триместре беременности.

Предлагается использование ДНК диагностики для пренатальной диагностики фенилкетонурии в семьях высокого риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Centerwall S.A. & Centerwall W.R. "The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two affected children, and a scientist". *Pediatrics*. 2000, №105, p.89–103.
2. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1999, №32, p.338-343.
3. Surtees, R., Blau, N. "The neurochemistry of phenylketonuria". *European Journal of Pediatrics*. 2007, №169, p.109–13.
4. Weglage J, Ullrich K, Pietsch M, Funders B, Zass R, Koch HG. Untreated non-phenylketonuric-hyper-phenylalaninaemia: intellectual and neurological outcome. *Eur. J. Pediatr*. 2004, №155, p.26-28.
5. Wilcken B, Wiley V, Carpenter K. Two years of routine newborn screening by tandem mass spectrometry (MSMS) in New South Wales, Australia. *J Inherit Metab Dis*. 2000, №23, p. 1.4-4.
6. <http://www.genenames.org> Phenylalanine hydroxylase (PAH) gene summary, retrieved September 8, 2006 .

YENİDOĞULMUŞLARDA FENİLKETONURİYANIN GENETİK SKRİNİNGİ

R.F.MƏMMƏDOVA, M.Ş.BABAYEV

XÜLASƏ

Bakı şəhərində yenidoğulmuşlar arasında fenilalanin aminturşusunun çatışmazlığının genetik skriningi aparılmışdır. 4 halda fenilketonuriya defektinin homoziqot forması aşkar olunmuşdur. Yenidoğulmuşların ailə şəcərəsinin təhlili onların valideynləri arasında qan qohumluğunu göstərmişdir. Fenilketonuriya patologiyasının genetik skriningin nəticələri həkimlərə xəstə uşaqların xəstəliyin klinikası üzə çıxmamış, vaxtında müalicəsinə imkan yaradacaqdır.

Açar sözlər: fenilketonuriya, fenilalanin, yenidoğulmuş, genetik skrining, ailə şəcərəsi, proband.

GENETIC SCREENING OF PHENYLKETONUREA AMONG NEWBORNS

R.F.MAMMADOVA, M.Sh.BABAYEV

SUMMARY

The genetic screening of phenylalanine aminoacid deficiency has been carried out among newborns in Baku city. Four cases of homozygous condition on faulty gene phenylketonurea among newborns have been diagnosed. Due to the analysis of four lineage structures, the consanguinity between the parents of every newborn has been detected. The results obtained from the genetic screening of pathological gene of phenylketonurea allow pediatricians to provide timely treatment of little patients until clinical presentations become apparent.

Key words: phenylketonurea, phenylalanine, newborn, genetic screening, lineage structure, proband.

Поступила в редакцию: 30.03.2011 г.

Принято к печати: 27.05.2011 г.