

FENILCETONURIA

Stanislav Groppa
Angela Gavriliuc
Diana Coropceanu

CHIȘINĂU 2006

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
NICOLAE TESTEMIȚANU

Stanislav Groppa Angela Gavriliuc Diana Coropceanu

FENILCETONURIA

Chișinău
Centrul Editorial-Poligrafic *Medicina*
2006

CZU 616.155.19 (075.8)

G 87

Aprobat de Consiliul metodic central al USMF *Nicolae Testemițanu*
cu nr. 4 din 20.05.06

Autori:

Stanislav Groppa – dr. hab., profesor universitar.

Angela Gavriiuc – doctor în științe biologice.

Diana Coropceanu – doctorand.

Recenzenți:

N. Barbova – dr.șt.med., conferențiar universitar.

Ion Artemii – dr.șt.med. conferențiar universitar.

Redactor: Silvia Donici

Corector: Lidia Căssa

Machetare computerizată: Svetlana Cersac

Coperta: Viorel Popa

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Gropa, Stanislav

Fenilcetonuria / Stanislav Groppa, Angela Gavriiuc, Diana Coropceanu; Univ. de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”. – Ch.: CEP “Medicina”, 2006. – 128 p.

Bibliogr. p. (170 tit.)

ISBN 978-9975-907-04-0

100 ex.

-- 1. Fenilcetonuria. 2. Boli – Fenilcetonuria

616.155.19(075.8)

ISBN 978-9975-907-04-0

© S. Groppa, A. Gavriiuc, D. Coropceanu, 2006

© C.E.P. *Medicina*, 2006

CUPRINS

Introducere.....	6
CAPITOLUL I	7
Fenilcetonuria.....	7
Istoricul cercetării fenilcetonuriei.....	8
Patogenia fenilcetonuriei	9
Manifestările clinice ale FCU.....	10
Forme maligne prin deficit de tetrahidrobiopterine (BH4)	14
Fenilcetonuria de tip I.....	14
Fenilcetonuria de tipul II.....	16
Fenilcetonuria de tipul III	17
Fenilcetonuria maternă	17
Hiperfenilalaninemiile	18
Disfuncțiile metabolice specifice fenilcetonuriei.....	24
Bazele moleculare ale FCU.....	26
Structura moleculară a genei FAH	26
Mutațiile genei fenilalaninhidroxilazei	27
Polimorfismul zonei de amplasare a genei FAH	32
Repartiția mutațiilor genei FAH în populațiile de pe glob și asocierea acestora cu haplotipurile RFLP.....	36
Diagnosticarea fenilcetonuriei.....	42
Investigații biochimice.....	42
Tratamentul și profilaxia FCU.....	43
Dietoterapia	44
Produse speciale.....	45
Tratamentul medicamentos.....	47
Aplicabilitatea testului de analiză a polimorfismului locilor ADN-lui în lănțuiți cu genele maladiilor ereditare pentru cercetările medico-genetice și investigații populaționale.....	49
CAPITOLUL II.....	52
Caracteristica materialului prevelat pentru cercetare	52
Caracteristica familiilor cu fenilcetonurie forma clasică.....	52
Metodele de cercetare	53
Investigarea genealogică.....	53

Separarea ADN-ului din leucocite.....	54
Separarea ADN-ului din amniocite	55
Reacția de polimerizare în lanț (RPL).....	55
Analiza restricțională	58
Electroforetarea și vizualizarea rezultatelor.....	59
CAPITOLUL III	61
Incidența fenilcetonuriei în Republica Moldova	61
Polimorfismul alelic al ADN din domeniul 12q24.1 în populația sănătoasă a Republicii Moldova.....	63
Analiza distribuției alelelor polimorfe VNTR ale genei FAH	63
Analiza distribuției alelelor polimorfe Msp I(a) ale genei FAH	67
Estimarea incidenței alelelor polimorfe Pvu II(a) ale genei FAH printre locuitorii Republicii Moldova	70
Analiza incidenței alelelor polimorfe Bgl II ale genei FAH	73
Studiul comparativ al incidenței alelelor locusurilor polimorfe VNTR, Msp I(a), Pvu II(a) și Bgl II în familiile cu fenilcetonurie din Republica Moldova.....	76
Studierea incidenței locusului polimorf pe cromozomii normali și cei mutanți	76
Analiza incidenței alelelor Msp I(a) pe cromozomii normali și cei mutanți	79
Analiza incidenței alelelor Pvu II (a) pe cromozomii mutanți și cei normali	82
Analiza incidenței alelelor Bgl II ale genei FAH pe cromozomii normali și cei mutanți.....	84
Studiul molecular genetic al mutațiilor genei FAH la bolnavii de FCU și în familiile cu risc major de dezvoltare a maladiei	87
Frecvența celor mai răspândite mutații ale genei FAH	87
Analiza incidenței asocierii diferitelor haplotipuri cu mutațiile genei fenilalaninhidroxilazei	99
Utilitatea practică a testului de detecție a mutațiilor și a haplotipurilor genei FAH pentru diagnosticul prenatal și detecția portajului heterozigot.....	103
Concluzie.....	109
Literatura	110

Lista abrevierilor

RM	- Republica Moldova
PAH	- fenilalaninhidroxilază
FCU	- fenilcetonurie
HFA	- hiperfenilalanemie
FA	- fenilalanină
AFP	- acid fenilpiruvic
IQ	- coeficient intelectual
A	- adenină
G	- guanină
C	- citozină
T	- timină
bp	- pereche de baze
kb	- o mie perechi de baze
Bgl II, Pvu II, Xmn I, EcoR I, Msp I, EcoR V, Hind III	- fermenți de restricție
VNTR	- repetări minisatelite înaltpolimorfe
STR	- repetări microsatelite înaltpolimorfe
SSC	- tampon standard salin
TBE	- tampon tris-borat
EDTA	- acid etilendiamintetrasuccinic
SDS	- sodium dodecil sulfat
TEMED	- tetrametiletildiamină
DTT	- ditiotriol
RPL	- reacția de polimerizare în lanț
PLFR	- polimorfismul lungimilor fermenților de restricție
GPAA	- gel poliacrilam
ICȘOSMșiC	- Institutul de Cercetări Științifice în domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului

Introducere

Progresul tehnico-științific și realizările înregistrate în domeniul biologiei moleculare de la sfârșitul secolului XX au schimbat radical viziunile clasice în diagnosticul și tratamentul multor boli.

În lucrarea dată este descris istoricul, structura, patogenia, diagnosticul și tratamentul fenilcetonuriei.

Fenilcetonuria este o maladie gravă cu transmitere autozomal-recesivă, caracterizată prin disfuncția sistemului nervos central, crize epileptice, tulburări de comportament.

Manifestările clinice ale acestei maladii pot fi prevenite sau ameliorate, dacă diagnosticul este pus rapid și este inițiat prompt un tratament adecvat.

Monografia „Fenilcetonuria” este rezultatul consecutiv unui lucru efectuat pe parcursul a mai multor decenii de către colectivul de autori și colectivul centrului genetic în conformitate cu primul Program Național în domeniul geneticii medicale.

În Republica Moldova se efectuează screeningul neonatal de masă și consultul medico-genetic al pacienților cu fenilcetonurie, incidența acestei afecțiuni fiind de 1 caz la 9000 locuitori. Deosebit de sensibil la acțiunea produselor dismetabolice este creierul copiilor mici, astfel că simptomul major al maladii este deficitul intelectual.

Eficiența tratamentului depinde nu doar de vârsta pacientului, termenul de inițiere și durata curelor, dar și de gravitatea lezării cerebrale la momentul inițierii tratamentului.

În lucrare sunt expuse materiale deosebit de utile pentru a analiza maladia dată sub aspect genetic. Ea poate fi de folos unui cerc larg de cititori interesați de medicină, la fel studenților și rezidenților.

CAPITOLUL I

Fenilcetonuria

Fenilcetonuria este o boală congenitală caracterizată prin retard mintal, sindrom epileptic și depigmentarea pielii și părului. Este cea mai răspândită aminoacidopatie, generată de o tulburare metabolică a fenilalaninei, constituind 0,5-0,1% dintre encefalopatiile tratate clinic.

Este o maladie gravă cu transmitere autozomal-recesivă, determinată de un defect ereditar al enzimei fenilalaninhidroxilaza (PAH, EC 1.14.16.1). Simptomul dominant este deficitului intelectual, care atinge la majoritatea pacienților gradul de imbecilitate și idioție, ce conduce la invaliditate psihică profundă.

Riscul de malformație fetală este întâlnit la mamele cu fenilcetonurie al căror deficit enzimatic nu a fost diagnosticat sau la fetele fenilcetonurice nesupravegheate medical la etapa de procreare. Riscul se corelează cu concentrația serică a fenilalaninei materne și constă în retard mintal al copilului, microcefalie, malformații cardiace și atrezie de esofag.

Indiferent de efectul evident dezadaptant al alelelor homozigote mutagene, FCU și hiperfenilalanemiile (HFA) familiale persistă în mai multe populații umane (*tab. 1*).

Incidența fenilcetonuriei constituie 1:10 000 variind în funcție de țară: Irlanda - 1:4 560, Japonia - 1:100 000, Rusia - 1:7 000, Belarus - 1:5 600, Italia - 1:12 000, Marea Britanie - 1:14 000, Elveția - 1:16 000, Olanda - 1:16 000, Turcia - 1:5 000, România - 1:7 700, SUA - 1:14 000, Grecia - 1:18 460, Mexic - 1:45 610, Polonia - 1:9 248.

Mecanismele, care determină incidența înaltă a maladiiei, sunt efectul determinantului și fluctuația genetică, selecția heterozigotă și cea reproductivă.

Incidența FCU printre popoarele lumii

Incidența FCU	Țara
1:4 000 – 1:5 000	Irlanda, Turcia, Polonia
1:5 000 – 1:6 000	Belarus, Estonia, Belgia
1:6 000 – 1:7 000	Germania, Rusia, Ucraina
1:7 000 – 1:8 000	Slovenia, regiunile Moscova și Sankt Petersburg
1:8 000 – 1:9 000	Scoția, Israel, Republica Moldova
1:9 000 – 1:10 000	Ungaria, Danemarca, Spania, Cehia, Bașcortostan
1:10 000 – 1:12 000	Australia, Austria, Italia, Bulgaria
1:12 000 – 1:14 000	Norvegia, Egipt, Lituania
1:14 000 – 1:16 000	Marea Britanie, Noua Zeelandă, Franța, SUA
1:16 000 – 1:18 000	Olanda, Iugoslavia, China, Elveția
1:18 000 – 1:20 000	Tadjichistan
1:20 000 – 1:30 000	Suedia, Grecia, Canada
1:30 000 – 1:70 000	Finlanda, Mexic, Suedia
1:70 000 – 1:100 000 și >	Japonia, Finlanda

Istoricul cercetării fenilcetonuriei

Ca afecțiune metabolică, ce suscită dereglări intelectuale ireversibile, FCU clasică a fost relatată în premieră de medicul-biochimist norvegian *Fölling* în 1934. Interesat să precizeze cauza unui miros murin specific la doi sibiși cu retard mintal, autorul a descoperit în urina acestora acid fenilpiruvic (AFP). Dată fiind asemănarea structurală dintre AFP și aminoacidul esențial fenilalanina (FA), *Fölling* a presupus că FA ar fi cea mai probabilă sursă de exces al AFP în urină. Această ipoteză s-a construit în baza unor cercetări anterioare ale lui *Kotake*, care a demonstrat că iepurii alimentați cu hrană cu un conținut ridicat de FA elimină cu urina AFP. *Fölling* a continuat aceste cercetări, urmărind nivelul AFP la bolnavii cu FCU cărora li se administrau concomitent FA și rații alimentare bogate în protide. Examenle de laborator au arătat creșterea excreției de AFP cu urina. În urma acestor observații *Fölling* a presupus existența unei dereglări în metabolismul FA, pe care a numit-o *imbecilitas phenylpyruvica*. Accesibilitatea metodei de diagnostic, propusă de *Fölling* pentru depista-

rea bolnavilor cu oligofrenie fenilpiruvică, a favorizat cercetarea amplă a acestei maladii.

În 1937 *Penrose* și *Quastel* au propus termenul de *phenylketonurio*, care, în opinia lor, reflectă pe deplin esența maladii.

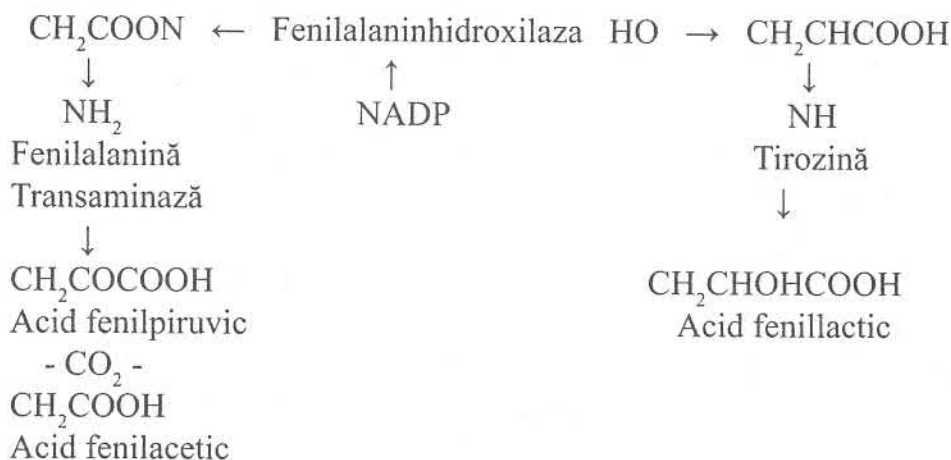
În 1939 *Jervis* a realizat investigații minuțioase de ordin clinic și biochimic al familiilor, în care s-au depistat bolnavi de FCU, și a demonstrat că maladia se transmite autozomal-recesiv. Mai târziu s-a constatat că în ficatul bolnavilor de FCU lipsește fermentul fenilalaninhidroxilaza - FAH [*Лебедев*, 1972].

Bickel, în 1953, reieșind din cele mai importante dereglări biochimice ce definesc FCU, a propus ca terapia acestei maladii să includă limitarea aportului de fenilalanină. Eficiența terapiei dietetice în tratamentul nou-născuților marcați de acest flagel au impus necesitatea de a opera diagnosticarea în masă a FCU la nou-născuți. În 1961 *Güttler* a elaborat un test microbiologic original de evaluare a concentrației sangvine de fenilalanină, care a favorizat aplicarea diagnosticului de masă al maladii printre nou-născuți.

Patogenia fenilcetonuriei

În organismul nou-născutului conținutul fermentului fenilalaninhidroxilaza este scăzut sau acesta în genere lipsește. El transformă fenilalanina în tirozină. Dereglarea acestei transformări induce un surplus de fenilalanină în sânge și în lichidul cefalorahidian (*schema 1*). Surplusul acestui ferment se elimină cu urina, ceea ce deseori conduce la dezaminare. În sânge uneori se acumulează peste 20 mg/dl de semialalină și fenilcetone în urină. Derivații fenilalaninei acționează toxic asupra sistemului nervos central. Administrarea unui inhibitor al monoaminoxidazei, care împiedică degradarea fenilalaninei, agravează tulburările neurologice, în special tremurăturile și hiperreflexibilitatea. Fenilalaninei i se atribuie efecte convulsivante. Tulburările de pigmentație sunt consecința inhibării sistemului tirozinazic, implicat în sinteza melaninei. Se dereglează metabolismul triptofanului și sinteza serotoninei, care are un rol important în funcționarea sistemului nervos central. În creier se determină microgerie, dereglări ale procesului de mielinizare.

Blocajul metabolismului fenilalaninei



Manifestările clinice ale FCU

Primele semne clinice ale maladiei apar imediat după naștere sau în primul an de viață. Uneori copilul este normal la naștere și în primele săptămâni după naștere. Apar mai întâi tulburări neuropsihice sub formă de iritabilitate excesivă, uneori crize epileptice. Sugarul șede, merge cu întârziere, începe să vorbească abea la vârsta de 3–4 ani, însușind pronunțarea câtorva cuvinte pe care le repetă neîncetat. Întârzierea în dezvoltarea psihomotorie progresează. Retardul mental este evident și apare, de regulă, la vârsta de 4–6 luni. Copilul este agitat, irascibil, hiperactiv, hipertonic, își mișcă mâinile, balansează trunchiul dinainte-înapoi, merge cu pași mici, aplecându-se înainte. În fenilcetonurie dereglările psihice vizează nu doar sfera intelectuală, dar și comportamentul. În primele luni copiii țipă, au un somn agitat, prezintă rigiditate și hipertonie de tip extrapiramidal, tremurături, clonus rotulian. În 1/3–1/4 din cazuri survin crize epileptice, uneori spasme în flexie. Tulburările neurologice și psihice sunt asociate cu un fenotip specific: păr blond depigmentat, ochi albaștri-deschiși și piele uscată și aspră, dermatită, eczemă, transpirație abundentă, uneori vărsături precoce ca manifestări primare. Urina și sudoarea au un miros specific murin (de șoarece). La copiii mai mari dereglările de comportament se caracterizează prin excitație cu mișcări stereotipice, autism, la aproximativ 50% din pacienți se pot determina convulsii. Paroxismele deseori au un

caracter impulsiv sau apar ca crize minore, crize non convulsive, spasme în flexie, pierderi de cunoștință de scurtă durată, tresăriri. Simptomatologia neurologică la bolnavii cu fenilcetonurie este nespecifică și poate include microcefalie secundară, schimbări de tonus muscular cum ar fi hipotonie, care trece treptat în hipertonie, hiperreflexie, clonusul plantar, semne piramidale, hiperchinezie, ataxie, pareze centrale. Obezitatea poate fi prezentă la vârsta de un an. Semnele clinice de boală se fac vizibile pe măsura acumulării produselor de metabolism aminoacidic. Deosebit de sensibil la acțiunea produselor dismetabolice este creierul copiilor mici, astfel că deficitul intelectual reprezintă simptomul morbid major. Conform aprecierilor lui *Jervis* (1963), marea majoritate a bolnavilor cu FCU (96,6%) suferă de idiotism (IQ=10-20) și imbecilitate (IQ=21-50). La 3,2% din copii coeficientul intelectual este minim și numai 0,2% prezintă capacități intelectuale normale (forma atipică) [*Лебедев, Блюмина, 1972*]. Prin urmare, peste 90% din bolnavii netratați sunt cu intelect profund indemn și inapți de instruire. În lipsa tratamentului specific, dereglările psihice se amplifică gradual în cursul primilor 2-3 ani de viață, mai grav fiind lezate structurile cerebrale ce se formează mai târziu (regiunile frontale și temporale). La majoritatea bolnavilor de FCU se atestă diferite disfuncții psihice: autism, excitație sau fenomene substuporoase. În FCU se dezvoltă și leziuni complexe corticale și subcorticale ale funcției de vorbire, complicate de caracterele particulare ale maladiei propriu-zise.

Convulsiile se situează pe locul doi ca frecvență simptomatică după deficitul intelectual. Circa 1/3 din copii suferă de paroxisme epileptice. La unii acestea se produc episodic, la alții sistematic, uneori până la vârsta de 10 ani. Comportamentul copiilor cu FCU se deosebește de cel al copiilor cu alte forme de demență. La 80-90% din copii este evident defectul de pigmentație. Majoritatea bolnavilor de FCU sunt blonzi cu ochii albaștri și piele albă, lipsită de pigment. La unii se atestă defecte tegumentare sub formă de eczeme și dermatite.

Problema polimorfismului clinic și a heterogenității FCU reflectă în primul rând dezvoltarea unor modificări mutagene divergente ale moleculei FAH, dovadă a unei corelații dintre anomaliile moleculare și gravitatea leziunilor generate. La multe dintre popoarele de pe glob s-a constatat prevalența mutațiilor R158Q, R252W, P281L, R408W, IVS12nt1, IVS1-0nt546, care condiționează manifestarea clinică gravă a maladiei [*Fölling, 1994*]. Mutația R408Q, identificată la populația Chinei, este prezentă pe

5% din cromozomii mutați și în stare homozigotă conduce la o formă clinică ușoară a maladiei, în timp ce mutațiile R408W și F299C produc forma gravă a maladiei [Eiken, 1992]. Conform datelor din literatura de specialitate, se întâlnesc bolnavi homozigoți după mutațiile ce provoacă forma gravă a bolii precum și persoane cu aceleași mutații ADN, dar care nu prezintă nici un semn de FCU. Spre exemplu, Kleiman (1992) a identificat femei homozigote după mutația R261Q și cu titre critice pentru FA în sânge, dar care aveau o dezvoltare intelectuală normală. La copiii acestora s-au manifestat toate simptomele clinice de FCU.

Heterogenitatea fenotipică, biochimică și clinică a FCU prin carența de FAH a fost reflectată în numeroase clasificări clinice ale maladiei. Mai frecvent se recurge la clasificarea propusă de Güttler (1987). Conform acesteia, la forma clasică de FCU se referă cazurile în care titrele serice de FA depășesc 1200 μM și la care în lipsa terapiei dietetice se dezvoltă forma gravă a maladiei. FCU clasică se divide în varianta severă și moderată. Dacă titrele serice de FA sunt cuprinse între 800 și 1200 μM , se vorbește despre o FCU moderată. Acești bolnavi suscită doar ușoare corective dietetice pentru a preveni dezvoltarea debilității intelectuale. Hiperfenilalaninemia (HFA) se atestă în caz de nivele serice de FA cuprinse în intervalul 250 - 800 μM și cu indicii clinici în limitele normei fără intervenții dietetice.

Diagnosticul se pune în baza tabloului clinic și a datelor biochimice. Metoda fluorimetrică și cromatografică pe hârtie demonstrează o creștere progresivă a concentrației de fenilalanină.

La testele urinare clasice se referă: reacția cu perclorura de fier (testul Fölling), care este pozitiv când la amestecarea a 5 ml de urină cu 1 ml de reactiv în câteva secunde apare o colorație verde, mai mult sau mai puțin intensă.

Depistarea nou-născuților homozigoți după gena fenilalaninhidroxilazei în cadrul programului de screening și urmarea dietoterapiei permite evitarea complicațiilor secundare.

Există mai multe forme ale bolii. Unii bolnavi sunt homozigoți, alții heterozigoți după două alele mutante diferite ale aceluiași locus. Heterozigoții după o singură alelă sunt fenotipic normali. În forma clasică de defect enzimatic al fenilalaninhidroxilazei, care apare la homozigoți, fenilalanina serică este stabil crescută peste 20 mg/dl, norma fiind de 0,7-3,5 mg/dl, iar fenilcetonuria și intoleranța la fenilalanină sunt evidente din primele săptămâni de viață.

Fenilcetonuria ușoară apare la heterozigoții după două alele mutante diferite ale aceluiași locus. Deși toleranța la fenilalanină este mai mare, dietoterapia este necesară pentru prevenirea retardului mental. Fenilcetonuria tranzitorie se caracterizează prin dispariția intoleranței la fenilalanină în cursul primului an de viață, dietoterapia fiind necesară numai în perioada respectivă. Tirozinemia nou-născutului, caracterizată prin fenilalaninemie și tirozinemie, este semnalată, de obicei, la prematuri, fiind determinată de deficiența de fenilalanintransaminază. Așadar, hiperfenilalaninemia poate avea o varietate de cauze, ce pot fi depistate prin programe de screening de masă.

Se cunosc 3 forme de fenilcetonurie:

- forma clasică (netratată);
- forma tratată;
- forme maligne prin deficit de tetrahidrobiopterine.

Forma clasică. Copilul afectat este normal la naștere. Principalele simptome clinice sunt reprezentate de retardul mental, tulburările psihice, anomaliile neurologice și simptomele din partea altor organe. Cea mai constantă și cea mai importantă manifestare clinică prin gravitatea sa este suferința neuropsihică caracterizată prin retard psihic constant, tulburări de comportament (automutilare, agresivitate, tulburări psihotice). Aproximativ 25% din pacienți prezintă epilepsie generalizată (crize tonicoclonice, spasme infantile, epilepsie-absență). Anomaliile EEG sunt prezente în 78-95% din cazuri, în spasmele infantile se constată hipsaritmie.

Hipertonia este constantă, reflexele osteotendinoase exagerate. Leziunile mintale sunt profunde QI sub 35 sau moderate QI 36-37, numai 5% dintre pacienți prezentând un QI mai mare de 68. Limbajul este incoercibil, se atestă ecolalie. Urina are un miros caracteristic de șoarece. În majoritatea cazurilor, dezvoltarea somatică este normală, se poate constata uneori microcefalie, prognatism maxilar și alte anomalii.

Forma tratată. Instituirea precoce a tratamentului (înainte de împlinirea vârstei de 3 luni) reduce manifestările neuropsihice ale bolii. Inteligența este cel mai frecvent normală, fiind însă condiționată de un regim dietetic strict și regulat. S-au observat însă anomalii minore de tipul tulburărilor în procesul instructiv-educativ, fapt ce impune continuarea regimului dietetic cu reducerea fenilalaninei pe o perioadă mai lungă. Anomaliile EEG sunt frecvente. Studiile efectuate prin MRI și spectroscopie au pus în evidență anomalii ale mielinei, suprimate printr-o terapie corectă.

Forme maligne prin deficit de tetrahidrobiopterine (BH₄)

Forme maligne ale fenilcetonuriei sunt hiperfenilalaninemiile.

Există trei deficite enzimatice principale ale sintezei și regenerării BH₄: de guanozină trifosfat ciclohidroxilază, de 6-piruvoiltetrahidropterin reductază, de dehidropterin reductază.

În deficitul BH₄ simptomele clinice apar între 2-12 luni. Se atestă regres psihic cu hipotonie asociată cu crize epileptice refractare la tratament, frecvent mioclonice, microcefalie, mișcări coreoatetozice și distonice. Dintre tulburările de comportament se constată apatie, adinamie sau iritabilitate. Sunt prezente concentrații scăzute de metaboliți dopaminici și serotoninici în plasmă și urină ce nu pot fi corectate prin scăderea concentrației sanguine de fenilalanină.

Diagnosticul prenatal poate fi stabilit prin determinarea activității enzimelor la nivelul amniocitelor sau prin cercetarea prezenței mutațiilor când acestea au fost determinate la unii din membrii familiei.

Tratamentul trebuie început cât mai precoce și se bazează pe un regim sărac în fenilalanină cu menținerea concentrației acesteea între 1,5 și 3 mg/100 ml.

În hiperfenilalaninemiile maligne regimul dietetic este înlocuit cu administrarea de tetrahidrobiopterină în doză de 5mg, cu excepția de dehidropterin reductază. Corecția deficitului dopaminergic se face prin administrarea de L-Dopa cu carbidopa 10 mg și 5-hidroxiltriptofan 5mg.

Se disting 3 tipuri de fenilcetonurie.

Fenilcetonuria de tipul I

Patogenie. La baza fenilcetonuriei stă deficitul fermentului fenilalanin-4-hidroxilaza care asigură transformarea fenilalaninei în tirozină. În urma blocării metabolismului fenilalaninei are loc o acumulare evidentă a acesteia în țesuturi și în lichidul intercelular. Surplusul de fenilalanină acționează toxic asupra SNC, dereglează metabolismul proteic, lipo- și glicoproteidic hormonal, transportul aminoacizilor. Un rol primordial în patogenia fenilcetonuriei îl are dereglarea metabolismului neuromediatorilor monoaminici (serotonina, catecolamina) soldată cu lezarea SNC. Practic nu se întâlnește la rasa negroidă și la evrei.

Clinic se manifestă în primul an de viață, de obicei la vârsta de 2-6 luni. Primele manifestări sunt hiperexcitabilitatea, agitația, voma, dereglări de tonus, semne de dermatită alergică. Se dezvoltă retardul psihomotor. Apar crizele epileptice, deseori paroxisme generalizate sau acestea pot fi absente. Se determină dereglări de tonus muscular (deseori hipotonia musculară). Urina și sudoarea au miros de șoarece. Un simptom inițial poate fi și voma. La copiii mai mari, netratarea poate conduce la hiperactivitate, atetoză.

La examen fizic se determină piele apigmentară, ochi albaștri, hipertonus, hiperreflexie, microcefalie.

Date de laborator. La analiza biochimică se determină mărirea nivelului de fenilalanină în sânge până la 900-1200 $\mu\text{M/l}$ (norma fiind 80-120 $\mu\text{M/l}$).

În urină sunt prezente produsele transaminării și decarboxilării fenilalaninei. Sunt prezente și unele modificări biochimice și morfologice, precum disproteinemie, hiperaminacidemie, reacție sporită la difenilamină, acidoză metabolică compensată. EEG prezintă o activitate paroxistică; RMN - atrofie corticală și subcorticală, asimetria ventriculilor laterali.

Criteriile de diagnostic se bazează pe datele genealogice, rezultate clinice și biochimice. În prezent sunt implementate metode molecular genetice de evidențiere a defectului genetic. Obiectul de cercetare pot fi limfocitele, amniocitele, celulele corionului. Depistarea heterozigoților se poate face pe câteva căi.

Testul biochimic include surplusul de fenilalanină în doză de 25 mg/kg. Rezultatele testului se analizează complex: conținutul în sânge a fenilalaninei și tirozinei, repetarea analizei (cu carbon marcat) peste 1, 2, 3 ore după surplus. Cercetările au arătat că la purtătorii heterozigoți activitatea fenilalaninei-4-hidroxilaza alcătuiește 30% din normă.

Patomorfologia. La cercetarea morfologică a țesutului creierului se determină dereglări de mielinizare, glioză substanței albe, hipopigmentarea substanței negre. În ficatul pacientului sunt prezente semne de distrofie proteică și lipidică.

Tratamentul. Măsura principală de tratament este dietoterapia, constând în limitarea proteinelor și fenilalaninei. În alimentație se includ legume, fructe, sucuri, produse speciale (pâine, crupe) preparate pe bază

Studierea fenilcetonuriei a arătat la dezvoltarea retardului mental printre femeile bolnave de fenilcetonurie și netratate cu dietoterapie la vârsta fertilă.

Clinic se caracterizează prin retard mental (73-92% copii), microcefalie înăscută (68-73%), masa mică la naștere (40-56%), microanomalii. 20-30% din sarcini sfârșesc cu avorturi spontane.

Datele de laborator arată o creștere a nivelului fenilalaninei în sânge (norma fiind de 120-240 $\mu\text{M/l}$), în unele cazuri poate crește până la 480 $\mu\text{M/l}$. În prima zi nivelul fenilalaninei se micșorează până la 40-110 $\mu\text{M/l}$. La RMN se determină hipoplazia regiunilor cerebrale.

Criteriile de diagnostic. 1. Fenilcetonurie la mama gravidă mai mare de 400 $\mu\text{M/l}$; 2. Retard mental; 3. Microcefalie; 4. Masă mică la naștere.

Diagnosticul diferențial se face cu formele izolate de microcefalie, encefalopatiile perinatale, infecțiile intrauterine, dereglarea metabolismului aminoacizilor.

Tratamentul presupune reducerea conținutului de fenilalanină la gravide sub 300-400 $\mu\text{M/l}$. În alimentație trebuie să prevaleze produsele de proveniență vegetală. Proteina totală recomandată nictemeral constituie 1,4 g/kg, fenilalanina 15-17 mg/kg. Valoarea energetică totală atinge 500-600 kDJ, suplimentar se indică vitamine din grupa B, preparate de calciu, fosfor, microelemente, L-carnitină.

Hiperfenilalaninemiile

Hiperfenilalaninemiile rezultă din dereglarea conversiei fenilalaninei în tirozină. Importanță clinică prezintă fenilcetonuria, caracterizată printr-o concentrație mare de fenilalanină în sânge, concentrații mari de fenilalanină și produse secundare (ca fenilpiruvatul, fenilacetatul, fenilactatul și fenilacetilglutamina) în urină și retardări mintale severe.

Etiologia și patogeneza Hiperfenilalaninemiile rezultă dintr-o activitate redusă a *fenilalaninhidroxilazei*. La om, acest sistem enzimatic complet se regăsește doar în ficat. Fenilalanina și oxigenul molecular sunt substraturi, iar o pteridină, tetrahidrobiopterina redusă, cofactor. Tirozina și dihidrobiopterina sunt produse ale acestui sistem catalitic, ultima fiind reconvertită în tetrahidrobiopterină printr-o a doua enzimă, dihidropteridinreductaza. În fenilcetonuria clasică activitatea apoenzimei hidroxilaza, codificată în gena din regiunea q22-q24,1 a cromozomului 12 este aproa-

pe total deficitară. Se cunosc șase mutații diferite care conduc la o astfel de deficiență completă. Acestea includ schimbările de sens sau deleții parțiale. Hiperfenilalaninemia benignă rezultă dintr-o deficiență mai puțin completă și hiperfenilalaninemia tranzitorie (numită uneori *fenilcetonurie tranzitorie*) cauzată de o maturare întârziată a apoenzimei hidroxilaza. În hiperfenilalaninemia malignă, diminuarea persistentă a activității hidroxilazice rezultă nu din anormalitatea apohidroxilazei, ci din deficiența tetrahidrobiopterinei ca urmare a blocării căilor pe care tetrahidrobiopterina este sintetizată din GTP sau deficiența dihidropteridinreductazei, enzimă care regenerează tetrahidrobiopterina din dihidrobiopterină. Acest sistem de reductază este de asemenea utilizat de tirozinhidroxilază și triptofanhidroxilază (fig. 1).

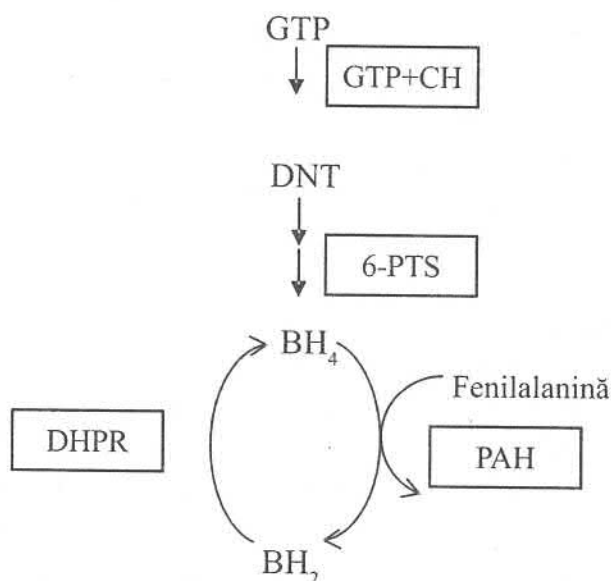


Fig.1. Căile, enzimele și coenzimele implicate în hiperfenilalaninemii. Abrevieri: GTP - guanozintrifosfat; GTP-CH - guanozintrifosfatciclohidrolază; DNT - dihidroneopterintrifosfat; 6-PTS 6-piruvoiltetrahydropterinsintetază; BH_4 , -tetrahydrobiopterină; BH_2 , - dihydrobiopterină; DHPH - dihydropteridinreductază; PAH - fenilalaninhidroxilază.

Hiperfenilalaninemiile se transmit autozomal-recesiv și apar aproximativ la 1 din 10000 de nașteri. Fenilcetonuria clasică, ce apare aproape în două treimi din cazuri, are o incidență mai mare printre albi și orientali,

la negri apare rar. Activitatea fenilalaninhidroxilazei la heterozigoți este mică, dar mai mare decât la homozigoții afectați. Heterozigoții purtători sunt clinic sănătoși, dar pot avea concentrații ușor crescute de fenilalanină în plasmă. Acumularea de fenilalanină în sânge și urină și formarea redusă de tirozină sunt consecințe directe ale insuficienței hidroxilării. În fenilcetonuria netratată și în variantele cu deficit de tetrahidrobiopterină, concentrațiile de fenilalanină în plasmă devin suficient de mari (peste 1200 $\mu\text{mol/l}$ (20 mg/dl) pentru a activa căi alternative ale metabolismului și a conduce la formarea de fenilpiruvat, fenilacetat, fenillactat și alte derivate care sunt rapid acumulate de rinichi și eliminate cu urina.

Concentrațiile în plasmă a câtorva aminoacizi sunt reduse moderat, probabil, după inhibiția absorbiției gastrointestinale sau alterarea reabsorbției tubulare renale prin exces de fenilalanină. Leziunea severă a creierului este cauzată de câteva din consecințele acumulării fenilalaninei: inhibiția completă a transportului altor aminoacizi, necesari pentru sinteza proteinelor, diminuarea formării poliribozomilor, sinteza redusă de mielină și formarea neadecvată de norepinefrină și serotonină. Fenilalanina este un inhibitor competitiv de tirozinază, o enzimă cheie în sinteza melaninei. Acest blocaj, în asociere cu disponibilitatea redusă a precursorului melaninei, tirozina, determină hipopigmentația părului și a pielii.

Manifestări clinice. La naștere nu se decelează nici o anormalitate, dar copiii cu fenilcetonurie clasică netratați ajung să se dezvolte încet și demonstrează lipsa progresului funcției cerebrale. Mulți necesită instituționalizare la câțiva ani de la naștere ca urmare a crizelor comițiale și a retardului mintal sever. Anormalitățile electroencefalografice, mirosul „de șoarece” al pielii, părului și urinei (din cauza acumulării de fenilacetat) și tendința spre hipopigmentare și eczeme completează tabloul clinic. În comparație, copiii afectați, dar tratați prompt, nu prezintă nici una din aceste abateri. Copiii cu hiperfenilalaninemie tranzitorie sau cu varianta benignă nu riscă consecințe clinice de fenilcetonurie clasică netratată. Copiii cu deficiențe ale tetrahidrobiopterinei sunt cei mai afectați. Crizele apar devreme, fiind urmate de disfuncții progresive cerebrale și a ganglionilor bazali (rigiditate, coree, spasme, hipotonie). Mulți sucombă prin infecții secundare în câțiva ani, în pofida diagnosticului prompt și a tratamentului adecvat. Câteva femei cu fenilcetonurie, care au fost tratate încă din copilărie, au ajuns la maturitate și au putut rămâne însărcinate. Mai mult de 90% din copiii născuți de aceste femei sunt retardați min-

tal, mulți prezintă anomalii congenitale, cum ar fi microcefalia, retardare psihosomatică și malformații congenitale ale inimii. Întrucât acești copii sunt heterozigoți, pentru o mutație de fenilcetonurie, manifestările clinice trebuie atribuite leziunilor produse de concentrații materne ridicate de fenilalanină la care au fost expuși în uter. Acest sindrom alarmant este numit *fenilcetonurie maternă*.

Diagnostic. Concentrațiile fenilalaninei din plasmă sunt de obicei normale la naștere în hiperfenilalaninemii, dar cresc rapid după introducerea hranei cu proteine și de obicei sunt anormale după ziua a 4-a. Întrucât diagnosticul și instituirea tratamentului cu dietă clasică trebuie început până la vârsta de 30 de zile, pentru prevenirea retardării, cei mai mulți nou-născuți din America de Nord și Europa sunt supuși unor teste screening prin determinarea concentrației de fenilalanină din sânge, folosind tehnica de inhibare bacteriană Guthrie. Copiii cu valori anormale sunt urmăriți prin teste cantitative fluorometrice sau cromatografice. În fenilcetonuria clasică și în deficiența tetrahidrobiopterinei se observă valori mai mari de 1200 $\mu\text{M}/1$ (20 mg/dl) în mod regulat. În hiperfenilalaninemia tranzitorie sau benignă, concentrațiile sunt de obicei scăzute, dar peste valorile de control de mai puțin de 60 $\mu\text{M}/1$ (20mg/dl). Diferențierea fenilcetonuriei clasice de variantele benigne depinde de concentrațiile plasmatice de fenilalanină determinate de vârstă și restricții în dietă. În hiperfenilalaninemia tranzitorie, valorile plasmei revin la normal în 3 sau 4 luni. În hiperfenilalaninemia benignă, restricția în dietă produce o scădere mai profundă a fenilalaninei plasmatice decât în fenilcetonuria clasică. Deficiența tetrahidrobiopterinei trebuie luată în considerare la orice copil cu hiperfenilalaninemie la care se dezvoltă o diminuare neurologică progresivă, în ciuda diagnosticului prompt și a dietei. Aceste variante, care constituie de la 1 până la 5% din copiii cu fenilcetonurie, pot fi diagnosticate prin teste enzimatic pe fibroblaști cultivați. Copiii cu fenilcetonurie clasică (care nu prezintă nici un răspuns chimic), spre deosebire de cei cu deficiență de tetrahidrobiopterină (care au o scădere acută în fenilalanina plasmatică), pot fi depistați și prin administrarea orală de tetrahidrobiopterină. Diagnosticul prenatal al fenilcetonuriei clasice se poate pune după efectuarea unor teste bazate pe ADN, capabile să detecteze mutații specifice. Deficiența dihidropteridireductazei, blocajele în sinteza tetrahidrobiopterinei pot fi de asemenea detectate în uter folosind teste pe cultură de amniocite (*tab. 2*).

Stări ale sugarului ce pot fi însoțite de hiperfenilalaninemie
(după Menkes, 1985)

Stări nosologice	Aspecte clinice	Defect enzimatic	Fenilalanina în ser	Tirozina în urină	Alte semne
Fenilcetonuria	Se naște normal, dacă nu se tratează apare retard mintal, convulsii, eczemă, reducerea pigmentației	Insuficiența fenilalaninhidroxilazei	Cu dietă obișnuită mai mare de 20 mg/dl	normă	Crește fenilalanina și derivații ei
Fenilalanină moderată persistentă	În limitele normei sau în cazuri grele retard mintal	Scade activitatea fenilalaninhidroxilazei (anomalie a izoenzimei)	De obicei 4-20 mg/dl	normă	Asemănător ca la fenilcetonurie
Fenilalaninemie tranzitorie	În limitele normei	Scade activitatea fenilalaninhidroxilazei	Aproximativ ca la fenilcetonurie, apoi se normalizează	normă	Ca la fenilcetonurie, apoi devine normală
Defect al transaminazei	În limitele normei	Deficit al feniltransaminazei	De la normă până la 30 mg/dl	normă	Cresc în dieta bogată în proteine
Tirozinemie tranzitorie	Copil prematur sau hipotrofie congenitală. Efect pozitiv la Vit. C	Inhibiția oxidazei P-hidroxifenilpiruvic	Crește tranzitor până la 4-12 mg/dl	Crește tranzitor, 5-50 mg/dl	Crește tirozina și derivații ei
Tirozinoze	Ficatul cronic bolnav, fără răspuns la Vit. C	Defect al oxidazei P-hidroxifenilpiruvic și alte cazuri necunoscute	2-4 mg/dl	Creștere persistentă 4-12 mg/dl	Tirozinurie și indici măriți ai altor aminoacizi
Defect al dehidropterinreductazei	Convulsii cu retard mintal	Defect al dehidropterinreductazei, hidroxilaza hepatică în limitele normei	7-46 mg/dl	normă	Crește acidul fenilpiruvic
Defect al hidroxilării aminoacizilor aromatici	Afectarea SNC, convulsii mioclonice, hipertonus muscular, spasmul mușchilor oculomotori	Deficit al 7,8-dehidrobipterinsintetazei	47 mg/dl	normă	Lipsește acidul hidroxiindolilacetic

Tratamentul. Fenilcetonuria clasică este prima tulburare metabolică ereditară în care profilaxia acumulării de metaboliți a ajutat la prevenirea consecințelor clinice. Aceasta se poate realiza printr-o dietă specifică, în care cantitatea de proteine este înlocuită cu o combinație de aminoacizi artificiali și o cantitate mică de fenilalanină. Dieta se poate completa cu o cantitate mică de hrană naturală, rezultând o cantitate suficientă de fenilalanină pentru creșterea normală, dar care nu poate induce consecințele unor cantități mari de fenilalanină în sânge. În mod normal, concentrațiile de fenilalanină plasmatică se mențin între 180 și 700 $\mu\text{M/l}$ (3 și 12 mg/dl).

O astfel de dietă terapeutică trebuie instituită chiar din prima lună de viață, când se atestă adesea disfuncții modeste ale sistemului nervos. Deoarece hiperfenilalaninemia necontrolată produce dereglări cerebrale în timpul copilăriei (poate și la adulți), această dietă ar trebui continuată pe o perioadă nedefinită în fenilalaninemia tranzitorie și benignă, ce nu necesită o restricție în dietă pe termen lung. La copiii cu o deficiență în tetrahidrobiopterină starea de sănătate continuă să se înrăutățească în pofida instituirii dietei cu fenilalanină. În prezent se studiază înlocuirea acesteia cu cofactorul pteridină. Astfel de pacienți pot fi ajutați printr-un regim în care restricția în dieta cu fenilalanină este combinată cu suplimentarea de levodopa și 5-hidroxitriptofan.

Consecințele fenilcetonuriei materne pot fi minimalizate prin instituirea unor restricții în dieta cu fenilalanină înaintea concepției și continuând acest tratament pe toată durata sarcinii. Ar fi bine venit ca femeilor cu fenilcetonurie să li se instituie o dietă restrictivă de fenilalanină de la naștere și până când dau naștere copiilor.

Pe lângă fenilcetonurie, în serul sanguin al nou-născuților și copiilor de vârstă fragedă se depistează o fenilalaninemie ușoară persistentă. Rata nivelului de fenilalaninemie variază între 4 mg/dl și 20 mg/dl. La acești copii deficitul de fenilalaninhidroxilază variază între 1,5%-34,5% de la conținutul normal. De obicei, la acești copii intelectul se afectează rar, chiar dacă nu sunt tratați. Însă în SUA și alte state dezvoltate pacienții în cauză sunt supuși unei diete sărace în fenilalanină în decurs de 4-6 ani, pericolul retardului intelectual excludându-se astfel complet.

Majoritatea deficitelor enzimactice genetice depistate, pe lângă faptul că sunt transmise recesiv tind să afecteze enzime care participă la căile ca-

tabolice. Adeseori aceste enzime degradează moleculele organice ingerate pe cale digestivă (tab. 3), cum ar fi galactoza (galactozemie), fenilalanina (fenilcetonoria) sau acidul fitanic (sindrom Refsum).

Tabelul 3

Varietatea tulburărilor metabolice

Denumirea enzimei	Denumirea deficienței enzimaticice
Fenilalanina-aminoacizi cu catenă ramificată	Fenilcetonurie Boala urinei cu mirosul siropului de arțar
Galactoză	Galactozemie
Fructoză	Intoleranță ereditară la fructoză
Lactoză	Deficiența lactozei
Acid fitanic	Boala Refsum

Disfuncțiile metabolice specifice fenilcetonuriei

Proteinele alimentare conțin de la 5 până la 8% de FA. În condiții normale, o mică parte din FA se utilizează pentru asamblarea proteinelor propriu-zise, masa principală urmând să se transforme în tirozină. Necesarul mediu de FA la om se apreciază la nivelul de 90 mg/kg în zi la copii, 0,22 g/zi la femei și de 0,3-1,1g/zi la bărbați [Анненков, 1980].

Reacția de transformare a FA în tirozină este catalizată de fermentul FAH, alcătuit din fracțiuni stabile și labile. Frațiunea stabilă se conține în toate țesuturile organismului (ficat, rinichi, inimă), iar cea labilă este prezentă doar în ficat.

Experimental s-a demonstrat că FAH începe să funcționeze doar după nașterea copilului, iar la finele primei luni de viață ajunge să activeze la cote caracteristice persoanei mature [Лебедев, 1972].

În cazul bolnavilor de FCU, este perturbată transformarea FA în tirozină, boala a fost descrisă pentru prima dată de Jervis la 1953. Cauza acestei patologii este diminuarea drastică a activității fracțiunii labile a fermentului FAH. Blocarea metabolică a FA la acești bolnavi nu este completă. Până la 10% de FA totuși se transformă în tirozină. În caz de FAH concentrațiile de FA în toate mediile lichide ale organismului se majorează de zeci de ori, iar nivelul tirozinei sangvine scade continuu.

Calea principală de transformare a FA la bolnavii de FCU este transaminarea acesteia în acid fenilpiruvic (AFP) și decarboxilarea în feniletilamină cu participarea transaminazei și decarboxilazei, fermenți practic

neantrenați în metabolismul normal al FA. Drept urmare, la bolnavii de FCU cca 10% din FA alimentară este eliminată în stare pură, 30% sub formă de AFP, 20% - de acid fenilactic, 15% - de fenilacetilglutamină, 10% - de acid hidroxifenilacetic (fig. 2).

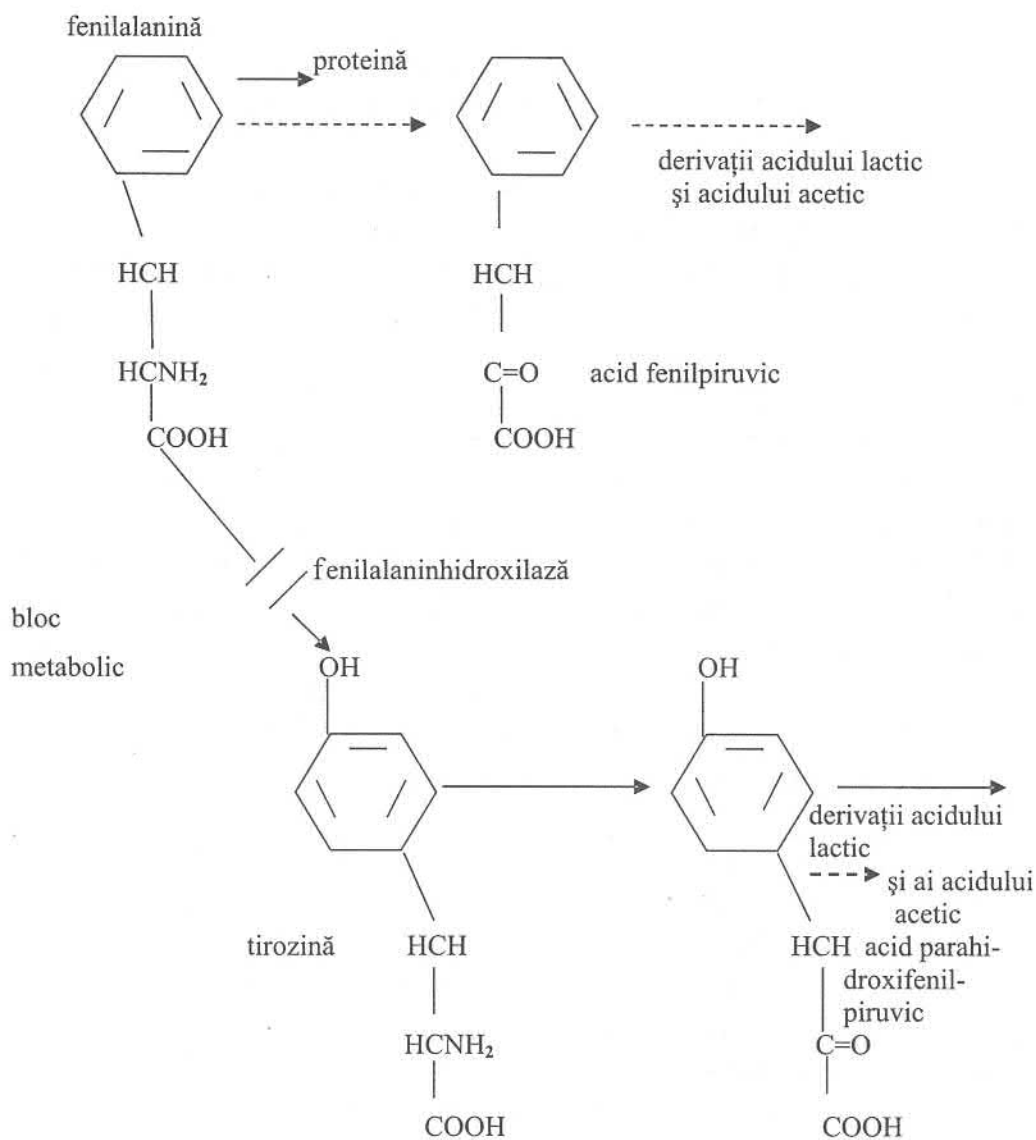


Fig. 2. Dereglarea metabolismului în caz de fenilcetonurie.

Concentrația medie de FA apreciată în sângele bolnavilor cu FCU netratată atinge 26,6 mg (variațiile fiind încadrate în intervalul 15-60 mg). La copiii sănătoși acest indice este egal cu 1,5 mg. Concentrația tirozinei la bolnavii de FCU constituie 0,1-3,0 mg%, la indivizii sănătoși - 2,1 mg% [Лебедев, 1972].

Bazele moleculare ale FCU ***Structura moleculară a genei FAH***

În 1985 *Lidsky* și coaut., prin analiza ADN genomic izolat din celulele hibride om/șobolan, care conțin diferite combinații de cromozomi umani, au determinat că gena FAH se situează pe brațul lung al cromozomului 12. Ulterior, prin metoda hibridizării *in situ* a preparatelor de cromozomi metafazici, izolați din limfoblaste de cariotip normal, s-a evidențiat că gena este ancorată în regiunea 12q22-24.1 [Lidsky, 1985].

Woo și colaboratorii au reușit să izoleze câteva clone de cADN FAH uman, folosind în calitate de probă specifică de hibridizare clona anterior depistată de ADNc, FAH murin. Astfel, s-a demonstrat că cea mai lungă clonă din cele menționate, notată phPAH247, include un cadru de lectură, care începe de la poziția ATG 227 și se încheie în poziția TAA 1579. Zona de codare a acestei clone se compune din 1353 bp și codifică proteina compusă din 451 aminoacizi, cu masa moleculară de 51,86 kD [Woo, 1983]. Cercetările ulterioare au arătat că ph PAH247 conține toată informația genetică suficientă pentru codarea enzimei FAH normo-funcționale [DiLella, 1986].

S-a mai precizat că gena FAH are lungimea de cca 90 kb și conține 13 exoni, iar dimensiunea zonei de codare constituie 2448 bp. Intronii cu lungimi între 1 și 23 kb divizează aria codificatoare a genei în exoni cu lungimi de la 57 până la 892 bp. Toți intronii genei FAH încep și sfârșesc cu dinucleotide canonice GT și , respectiv, AG. 17 nucleotide finale 3' de pe capătul fiecărui intron conțin doar o singură dinucleotidă și abundă în pirimidine. Exonii 6-13 sunt încorporați compact într-un fragment de genă cu dimensiunea de 20 kb, în timp ce exonii 1-5 sunt separați prin introni mari. Coraportul de secvențe codante și necodante ale ADN este unul dintre cele mai reduse dintre genele de eucariote. Gena FAH se transcrie în hepatocite cu formarea de ARNm cu dimensiunea de cca 2,4 kb [DiLella, 1986].

Mutațiile genei fenilalaninhidroxilazei

Güttler și colab. (1987) au emis supoziția cum că la originea diferențelor fenotipice prezente în deficiențele de FAH s-ar afla heterogenitatea de nivel molecular. Cercetarea genelor mutante a permis evidențierea a 462 de mutații ale genei FAH.

Se presupune că secvența centrală a proteinei, codificate de exonii 4-11, este de o valoare esențială pentru funcționarea normală a enzimei FAH, inclusiv pentru cuplarea oxigenului cu cofactorul și conversia catalitică a substratului, specificitatea de substrat situându-se în afara acestei zone.

Astfel, domeniile responsabile atât de cuplarea tetrahidrobiopterinei cofactor cu grupul protidic, cât și de stabilitatea conformațională a proteinei sunt dispuse în secvența codată de exonul 7. Conform datelor relatate de *Dworniczak* (1992), peste 80% din mutațiile genei FAH alterează secvența codată de exonii 5 - 12, iar cca 20% din totalitatea mutațiilor cunoscute interesează exonul 7.

Actualmente s-a constatat că majoritatea modificărilor genei FAH sunt mutații mononucleotidice, inclusiv mutații misense (60%), non-sens (6,0%), deleții (13%), mutații splicing (13%) și polimorfisme neutre (7,0%) (<http://pahdb.mcgill.ca>) (fig. 3). Circa 20 de mutații misense interesează dinucleotidele CpG supramutagene. Celelalte mutații apar în urma delețiilor sau inserțiilor de diferite tipuri.

Uneori se întâlnesc deleții ale unui exon integru, care se produc prin omiterea exonului din cauza splicing-ului [*Dianzani*, 1993] sau a altor mutații de pe limitanta intron/ exon (13,6%). Astfel, la evreii iemeniți cu FCU s-au evidențiat deleții mari, care determină ruperi de cca 7 kb pe exonul 3 și regiunea de flancare a intronului [*Kleiman*, 1992]. La bolnavii de FCU din Scoția s-au depistat deleții ale secvenței ce include exonii 1 și 2 [*Svensson*, 1993]. La câțiva pacienți cu FCU din Japonia s-au determinat deleții mari ce interesează exonii 5 și 6 ai genei FAH [*Okano*, 1992].

Delețiile mai mărunte includ deleția a 22 bp din exonul 6, deleția de 15 bp în liniuța cadrului de lectură al exonului 11 [Jaruzelska, 1992], deleția de 11 bp a exonului 7 [Dworniczak, 1992], deleția de 4 dinucleotide și 10 mononucleotide [Svensson, 1992; Guldborg, 1993], 3 deleții de monocodoni [Bethelon, 1991; Guldborg, 1993].

Pe gena FAH s-au determinat 5 tipuri de inserție (1,2%). Două apar prin formarea de siteuri noi de splicing, generate de mutații misens în interiorul intronilor [Dworniczak, 1992], și două prin interpunerea unei nucleotide în succesiunea exonului. Ultimul tip de inserție se condiționează prin interpunerea de 4 bp în exonul 10.

Pentru a determina dacă modificarea de succesiune a genei este o mutație sau un polimorfism, se impune cercetarea acțiunii acesteia asupra funcției proteinei. Pentru a reuși o caracterizare biochimică minuțioasă a proteinei mutante sunt necesare mostre de ficat al subiecților homozi-goți după alelele mutante, deoarece expresia proteinei FAH se limitează la ficat, dar asemenea probe nu se pot obține nu doar din motive de ordin etic, dar și din considerente genetice: majoritatea bolnavilor de FCU și HFA sunt heterozigoți după două alele mutante diferite. De aceea, pentru a depăși aceste limite, se utilizează adesea analiza de expresie a genei *in vitro*, care arată cum deteriorarea genetică conduce la modificarea funcției proteinei. Prin această procedură s-a examinat influența a 30 de mutații misense și non-sens [DiLella, 1988; Okano, 1991; Eisensmith, 1992a; Svensson, 1992], a mutațiilor de splicing [Dworniczak, 1991] și a deleției unui codon [Svensson, 1993]. În urma acestor studii s-a demonstrat că 15 din aceste mutații finalizează cu sinteza unei proteine FAH cu activitate fermentativă reziduală. Mutațiile, ce nu au fost studiate încă, în principal non-sens și de splicing, probabil pot conduce la inactivarea proteinei. Consecința mutațiilor sunt constituirea diverselor fenotipuri cu diferite grade de severitate.

Mutațiile misens și delețiile minore se divid, în funcție de lezarea fragmentelor aminoacide ale enzimei, în cinci grupuri: 1) mutații care modifică aminoacizii din centrul activ; 2) mutații care afectează aminoacizii structurali; 3) mutații care perturbază legăturile interdomeniale din monomer; 4) mutații care preschimbă aminoacizii cuplați în consecutivitate autoreglatorie N-terminală; 5) mutații care interesează corelațiile dimerului sau tetramerului [Erlandsen & Stekens, 1999].

La primul grup se referă mutațiile ce afectează aminoacizii responsabili de cuplarea cofactorului cu atomul de Fe sau substrat și de activitatea catalitică a fermentului. Obișnuit acestea conduc la dezvoltarea FCU clasice, diminuând substanțial activitatea fermentativă a FAH. Astfel, cea mai frecventă mutație din statele sudeuropene P281L generează manifestări fenotipice care variază de la HFA până la FCU de formă gravă. Prolina este un aminoacid antrenat în formarea unui centru activ în centrul atomului de Fe. Substituirea prolinei cu leucina rigidă modifică conformația centrului activ, reducând activitatea enzimei până la cota de 1% [Dworniczak, 1991a; Okano, 1991].

Mutațiile din grupul II afectează preponderent aminoacizii care transcriu domeniile reglatorii și catalitice. Substituirea unui aminoacid cu altul conduce la restructurarea domeniului și, în consecință, la diferite tipuri de HFA sau FCU. Astfel, arginina 158 se leagă printr-o punte salină cu glutamina 280 și printr-o joncțiune hidrogenică - cu tirozina 268. Ambele relații sunt necesare pentru menținerea formală a centrului activ. De aceea substituția argininei prin glutamină sau triptofan (R158Q și R158W) afectează substanțial structura centrului activ. Mutația R158Q va reduce cu 90% activitatea enzimei [Okano, 1990]. Arginina 252 formează o punte ionică cu acidul asparagic 315 și o legătură hidrogenică cu oxigenul carbonil al alaninei 313, constituind structura catalitică rezistentă a domeniului. Orice substituție a argininei cu un alt aminoacid (mutațiile R252W, R252Q, R252G) poate destabiliza legăturile domeniului catalitic, activitatea enzimei reducându-se până la 0,5% [Bjorgo, 1998].

Cel de-al treilea grup mutagen interesează conexiunile restanțelor aminoacide din diferite domenii, perturbând corelațiile dintre acestea și structurarea enzimei în ansamblu. Mutația R408W determină un tip metabolic rigid de FCU și scade funcția enzimei până la 3%, deoarece prin substituția argininei 408 cu triptofanul mai voluminos se modifică rețeaua de punți hidrogenice care mențin la un loc domeniile tetrameric și catalitic [DiLella, 1987; Svensson, 1993].

Mutațiile din cel de-al patrulea grup, care alterează colaborarea cu succesiunea autoreglatorie N-terminală, suprimă prestația funcțională a centrului activ. De exemplu, tirozina 377 a domeniului catalitic contactează cu succesiunea autoreglatorie N terminală și joncționează prin punte hidrogenică de serina 23 a domeniului reglator și triptofanul 326. Acest detaliu este important pentru reglarea accesului la centrul activ al

substratului și pentru ascendența cofactorului spre fierul catalitic. Mutația Y377C afectează legăturile hidrogenice, lezând pe această cale activitatea centrului activ și adițiunea cofactorului la substrat. Mutațiile asociate cu arginina 252 pot, de asemenea, secunda cu ruperea legăturilor de hidrogen cu acidul asparagic 27 și arginina 252, ceea ce va modifica accesul substratului sau cofactorului spre centrul activ [John, 1989].

Mutațiile celui de al cincilea grup perturbă corelațiile dintre monomerii din tetramerul sau dimerul FAH, alterând structura enzimei și suprimând activitatea ei. Mutațiile R297H și R297C dereglează legăturile hidrogenice, care stabilizează dimerul, iar drept rezultat se constituie FAH instabilă [Eiken, 1992a, 1992b].

Mutațiile *non-sens* și cele *splicing* dau naștere proteinelor "scurtate" și celor cu delețiuni lungi. Mutațiile de decalare a fazei de lectură de asemenea se soldează cu formarea de proteine "scurtate". Majoritatea delețiilor, inserțiilor și mutațiilor fazei de lectură conduc la scurtarea fermentului și, deci, la o activitate nulă a FAH [Erlandsen & Stekens, 1999].

Informațiile despre structura proteinelor rezultate din mutații permit estimarea acestora. Astfel, mutațiile *non-sens*, cele de *splicing*, mutațiile de cadru determină forme severe de maladie. Mutațiile, ce modifică structura domeniilor și a legăturilor acestora, conduc la diferite variante fenotipice. Mutațiile, ce interesează structura domeniului catalitic, spre deosebire de cele care modifică domeniul reglator sau interacțiunea dimerilor, generează forme grave de FCU.

Mutațiile, care deteriorează aminoacizii domeniului tetramerizant, au o acțiune diferită asupra activității FAH renale și hepatice, ceea ce se explică prin faptul că FAH sintetizată în ficat este mai activă în formă de tetramer, iar FAH renală de dimer [Erlandsen & Stekens, 1999].

La bolnavii de FCU printre popoarele europene și asiatice s-au demonstrat corelații stricte între fenotipul clinic și activitatea predictivă a FAH [Okano, 1989; Eisensmith, 1996]. Genotipul locusului FAH este determinantă principală a fenotipului metabolic în deficiența de FAH. O serie de cercetări recente asupra corelației genotip-fenotip au relevat faptul că nu întotdeauna genotipul poate explica fenotipul mutagen, ceea ce probabil se datorează factorilor antrenați în menținerea homeostazei plasmatică [Lionnet, 1989]. Determinarea genotipului pacienților după screeningul de masă al nou-născuților se folosește mai ales pentru caracterizarea clinică și biochimică a fenotipurilor și facilitează alegerea terapiei optime.

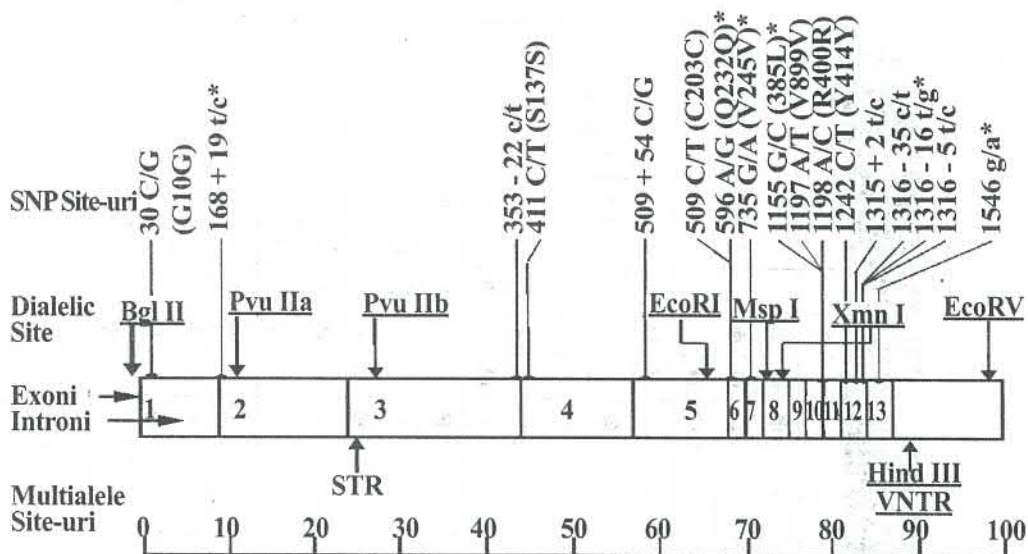


Fig. 4. Modelul și site-urile polimorfe ale genei FAN.

Msp I(a) este un sistem polimorf din două alele situate la distanța de 268 bp de capătul 5 al exonului 8 al genei FAH. Conform relațiilor din literatura de specialitate, acest polimorfism denotă deosebiri considerabile în populații și se conjugă cu anumite mutații ale genei FAH [Dworniczak, 1991]. Locusul polimorf bialelic Pvu II(a) se situează pe intronul II la distanța 1,4 kb de capătul 3' al exonului 2 al genei FAH [Dworniczak, 1991], (fig. 4).

Bgl II este un locus polimorf amplasat la un interval de 55 bp de capătul 3' al primului exon de pe gena FAH. Distribuția alelelor polimorfe Pvu II(a) și Bgl ale genei FAH în diferite populații relevă discrepante importante [Dworniczak, 1991c).

Goltsov (1992a), examinând un fragment din gena FAH, ce includea un sector Hind III polimorf, a descoperit că caracterul dat se datorează unei regiuni AT minisatelite (70%), incluse între două Hind III site-uri permanente la o distanță de 3 kb sub exonul 13 al genei FAH. Această regiune conține un număr variabil de VNTR - tandemuri repetitive (*variability of number tandem repeat*). La analiza restrictivă a acestei regiuni s-au depistat 6 fragmente de ADN de lungimi diferite 380, 470, 500, 530, 560 și 650 bp. Examenul secvențial al acestor fragmente a relevat că diferențele de lungime au la bază existența a 3, 6, 7, 8, 9 și respectiv 12 copii repetitive cu 30 nucleotide. Trei copii repetitive corespund alelei Hind III cu dimen-

siunea 4,0 kb, 12 copii repetitive alelei cu dimensiunea 4,4 kb, iar copiile 6, 7, 8 și 9 - alelei de 4,2 kb.

Examinarea familiilor purtătoare de FCU a arătat transmiterea mendeliană a alelelor VNTR și un dezechilibru manifest al asocierilor cu anumite mutații ale genei FAH.

Gradul înalt de heterozigoție după mai mulți loci polimorfi, corelarea strânsă a haplotipurilor după polimorfismul de lungime a fragmentelor restricționale (RFLP) cu anumite mutații ale genei FAH denotă înalta informativitate a analizei RFLP în realizarea diagnosticului prenatal în majoritatea popoarelor de pe glob. Printre popoarele europene analiza RFLP a genei FAH s-a dovedit a fi informativă pentru 86% din familiile cu FCU [Daiger, 1989a], în țările asiatice acest examen este sugestiv numai pentru 42% din cazuri [Daiger, 1989b]. În acelaș timp informativitatea analizei RFLP asupra haplotipurilor, care urmărește combinațiile de polimorfisme PRFL, VNTR și STR, atinge cota de 80% în familiile asiatice [Goltsov, 1993] și de 95% în cele europene [Eisensmith, 1992a]. Elevarea informativității testelor diagnostice de analiză asupra haplotipurilor este posibilă în cazul când în interiorul sau în preajma locusului FAH există și alte asemenea sisteme polimorfe.

Deși analiza haplotipurilor este destul de înaltă și informativă, metoda are și un șir de restricții. Astfel, diagnosticul prenatal prin haplotipizare este informativ doar în familiile în care FCU deja s-a manifestat. Întrucât în majoritatea cazurilor noi (peste 95%) bolnavii sunt descendenți ai purtătorilor nedepistați, ei nu pot fi depistați cu ajutorul acestei metode. De aceea, la examinarea indivizilor fără antecedente familiale de FCU trebuie să se atragă atenția la detectarea leziunilor moleculare ale genei FAH, responsabile de FCU și HFA înrudită cu aceasta.

Haplotipurile genei FAH se pot utiliza nu doar pentru diagnosticul FCU, dar și pentru studiul istoric al raselor umane. Astfel, deosebirile dintre rasele africană, asiatică și europeană au fost documentate prin analiza haplotipurilor pentru gena FAH. Structura genetică particulară a locusului FAH într-o populație concretă se poate descrie prin intermediul configurației haplotipice și se folosește la elucidarea istoriei demografice. Haplotipurile se pot interpreta și ca amprente migraționale în multe regiuni geografice, și ca limite temporale care indică intervalul de afișare a alelelor primordiale [Eisensmith, 1992b].

Repartiția mutațiilor genei FAH în populațiile de pe glob și asocierea acestora cu haplotipurile RFLP

Generalizând datele despre diversitatea și incidența mutațiilor generatoare de FCU în 10 popoare europene, *Eisensmith* a determinat prevalența universală a 5 specii de mutații: R408W, R261Q, IVS10nt546, R158Q și IVS12nt1 (*tab. 6 și fig.5*). Frecvența acestor mutații la diferite popoare europene nu este aceeași, iar patru dintre ele țin de anumite grupuri etnice și de migrația lor. Fiecare mutație se asociază doar cu unul din haplotipurile RFLP ale genei FAH, ceea ce permite a presupune că apariția fiecăreia este determinată de preexistența “efectului fondator”, produs cu câteva sute sau chiar mii de ani în urmă. La compararea incidenței diferitelor haplotipuri de site-uri restrictive polimorfe și de mutații ale genei FAH în diferite popoare, s-a determinat că majoritatea s-au produs după separarea raselor umane [*Eisensmith*, 1992a]. Incidența populațională înaltă a mutațiilor specifice pentru gena FAH se datorează, probabil, nu doar “efectului fondator” și/sau existenței unor mecanisme endogene de mutagenезă exagerată, ci și prevalenței heterozigoților. *Woolf*, spre exemplu, a presupus că starea de purtător de mutații FAH sporește rezistența organismului la efectul toxic al oratoxinei A produse de unele specii de mucegaiuri - *Aspergillus* și *Penicillium*. Astfel, gravidele heterozigote după mutațiile genei date au șanse mai reduse de avort spontan, indus prin acțiunea toxică a acestei micotoxine teratogene. Probabil că și incidența înaltă a FCU în Irlanda și Scoția de Vest se poate explica în parte prin climatul umed și temperat, care favorizează creșterea intensă a ciupercilor de mucegai [*Горбунова*, 1997]. La moment nu poate fi exclusă existența altor mecanisme, ce condiționează prevalența heterozigoției în FCU.

**Incidența celor mai răspândite mutații ale genei FAH
la unele popoare ale lumii**

Țara	R408W (exon 12)	IVS12 (intron12)	IVS10 (intron11)	P281L (exon 7)	R261Q (exon 7)	R252W (exon 7)	R158Q (exon 5)	I65T (exon 3)
Polonia (ZYGULSKA, 1991a)	54,9	2,7	4,9	0,54	2,2	1,5	6,6	ND
Spania (PEREZ, 1994)	0	0	28,6	2,3	3,9	0,8	ND	10,1
Portugalia (CAILLAUD, 1992)	1,6	0	ND	0	9,8	3,3	ND	ND
Regiunea Moscova (CHARICOVA, 1993)	56,4	16,0	-	-	3,2	-	8,1	-
Turcia (OZGUC, 1993b)	1,2	0	32,0	-	6,8	1,1	2,3	-
Danemarca (GULDBERG, 1993)	18,2	37,3	5,2	1,0	1,6	-	2,9	-
Marea Britanie (TYFIELD, 1994)	32,8	22,7	4,1	3,0	2,7	-	1,8	-
Lituania (KUCINSKAS, 1994)	58,3	0,7	0,4	-	10,4	-	9,3	-
Cehia (KOZAK, 1995b)	55,3	0	2,6	-	1,6	2,6	5,6	0,5
Slovenia (KADASI, 1995)	45,9	10,2	0	-	7,1	2,6	7,1	-
Australia (RAMUS, 1995)	50,3	2,3	-	1,0	2,0	1,0	-	1,7
Siberia (SMAGULOVA, 2000a)	65,5	4,4	1,5	7,3	5,9	1,5	2,9	ND
Moldova	49,0	1,7	2,5	5,1	3,4	3,4	2,5	0

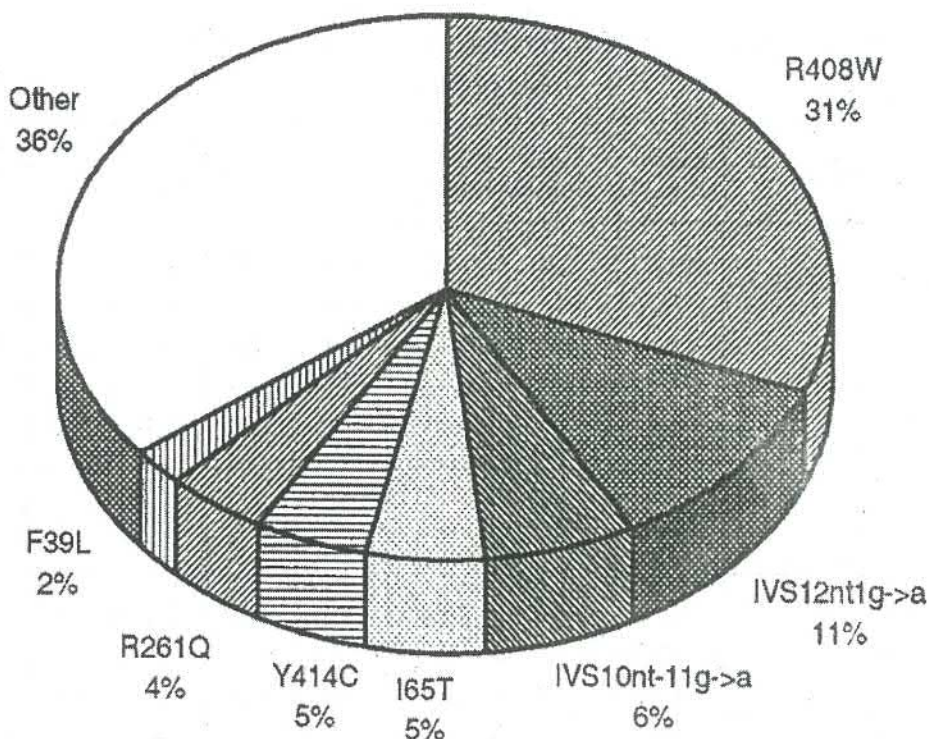


Fig. 5. Spectrul și frecvența mutațiilor genei FAH printre popoarele europene (n=3630).

Mutația site-ului *splicing* IVS12nt1 a fost prima mutație depistată a genei FAH. Examenul de expresie a sistemelor eucariotice a arătat că această mutație determină instabilitatea structurală a proteinei și, ca urmare, se reduce activitatea enzimei până la limita de 1% [DiLella, 1987]. Forma de maladie, corespunzătoare acestei mutații este o FCU "clasică". Incidența mutației IVS12nt1 s-a dovedit a fi mai înaltă în Danemarca, constituind 1/3 din toate alelele mutante. În țările vecine din Europa de Nord și de Vest incidența mutației respective constituie 10 și, respectiv, 20%; la alte popoare europene această mutație se întâlnește rar sau lipsește. S-a determinat, de asemenea, o corelație strânsă a mutației IVS12nt1 cu haplotipul 3 RFLP. Prezența acesteia a fost atestată pe 95% din cromozomii mutanți cu acest haplotip și aproape nici când nu se întâlnește pe cromozomii de alte haplotipuri. Aceste observații au confirmat presupunerea că această mutație a apărut în Danemarca acum 1000 de ani, fiind răspândită printre popoarele vecine de către vikingii danezi [Güttler, 1987].

Misens mutația R408W este cea mai răspândită mutație a genei FAH printre popoarele est-europene, precum și în Grecia, Irlanda, unde reprezintă circa 50% din alelele mutante, provocând o formă gravă a FCU. Cea mai înaltă frecvență a mutației R408W s-a atestat printre locuitorii orașelor Sankt Petersburg (72,1%) [Барановская, 1996], Moscova (56,4%) [Чарикова, 1995], în Belarus (70%) [Tsukerman, 1996], Letonia (84%) [Lkusinskas, 1994] Siberia (65,5%) [Смагулова, 2000]. Reducerea frecvenței mutației R408W în zonele situate mai spre sud-est (Samara - 58%, Kazan - 51%) denotă faptul că respectiva mutație a fost importată decurând printre popoarele asiatice ca urmare a migrării slavilor spre est [Барановская, 1996].

În mai multe țări est-europene s-a constatat o asociere a acestei mutații cu haplotipul 2 [Eisensmith, 1995]. În Danemarca [Guldborg, 1994a], Franța [Berthelon, 1991], Marea Britanie [Tyfield, 1994], Norvegia [Eiken, 1992b], Suedia [Svensson, 1993a] mutația R408W se asociază cu haplotipul 1, în Portugalia cu haplotipul 34 [Caillaud, 1992], iar în China cu haplotipurile 4 și 44 [Fang, 1992]. Mai mulți cercetători consideră că cel mai verosimil mecanism al răspândirii spațiale a acestei mutații în limitele unor popoare europene este "efectul fondator" [Daiger, 1989a]. Pentru mutația R408W asociată cu haplotipul PRFL 1 și VNTR 8, populația fondatoare este cea din Europa de Nord [Tyfield, 1994], iar pentru mutația R408W, asociată cu haplotipurile 2 și VNTR 3 popoarele slavo-baltice [Giannattasio, 1997].

Mutația *splicing* IVS10nt546, identificată pe intronul 10 al genei FAH, este mai răspândită în țările sud-europene și se face responsabilă de 39,2% din alelele mutante înregistrate printre locuitorii Turciei și de 10-20% din cromozomii mutanți din Spania, Italia, Sicilia și Bulgaria. Această mutație ține de haplotipul 6 (85%) și doar în 0,5% din cazuri de haplotipuri [Desiat, 1997b]. La studierea răspândirii mutației IVS10nt546 printre locuitorii Italiei s-a constatat că aceste alele mutante au apărut inițial în regiunile italiene, ceea ce indică originea lor italiană [Romano, 1994a].

Mutația R261Q se atestă practic în toate statele europene, cu o frecvență mai mare în Elveția și Turcia (32% și, respectiv, 10%). Această mutație se asociază cu haplotipul RFLP 1 și interesează punctul vulnerabil de mutagenază: dinucleotidul CpG. Se consideră că mutația dată s-a manifestat în premieră în Elveția de unde s-a răspândit în statele vecine [Kleiman, 1993].

Mutația R158Q de asemenea este prezentă în toate țările europene, fiind asociată cu haplotipul 4. Mutația interesează dinucleotidul CpG și

generează forma moderată de FCU. Geneza acestei mutații nu a fost precizată [Eisensmith, 1992b].

Printre popoarele asiatice (Japonia, China și Coreea) au fost detectate opt mutații ale genei FAH, care conduc la FCU: R111X, IVSnt1, Y243Q, IVSnt2, W326X, Y356X și R413P [Okano, 1992]. Datele din *tab. 7* atestă o distribuție similară a acestor mutații printre japonezi și chinezi, iar printre coreeni are caractere ceva mai speciale. Se estimează că predominarea mutației IVSnt1 în Coreea și China de Sud este condiționată de "efectul fondatorului". Reieșind din caracteristicile de frecvență ale acestor deficiențe genetice, este cel mai probabil că mutațiile IVSnt1 și Y204C să fi apărut inițial în Coreea, de unde cu valurile migraționale s-a extins în Japonia și China. În mod analog se poate deduce originea japoneză a mutației R243Q, și chineză a mutației R413P. Printre popoarele asiatice nu au fost identificate mutații specifice pentru europeni (*fig. 6*), dovadă a faptului că mutațiile esențiale s-au dezvoltat după separarea raselor [Eisensmith, 1992a].

Analiza variantelor de asociere a mutațiilor genei FAH cu diferite haplotipuri RFLP efectuată în diferite comunități etnice a arătat că cromozomii purtători ai mutațiilor FCU țin de câteva haplotipuri [Chakraborty, 1987]. În populațiile europene, de exemplu, din 71 haplotipuri RFLP, determinate pe gena FAH, doar 7 (haplotipurile 1-7) sunt prezente la peste 80% din cromozomii mutageni și numai 5 sunt asociate cu 76% de cromozomi normali [Eisensmith, 1992a]. Relativ comune pentru cromozomii normali ai popoarelor europene, asiatice și polineziene sunt haplotipurile 1, 4 și 7, care, probabil, s-au constituit până la separarea rasială [Hoffman, 1991]. Haplotipurile 2 și 3 se atestă cel mai frecvent pe cromozomii mutageni ai popoarelor nord-europene [Chakraborty, 1987; Svensson, 1991] și central europene, relativ mai rar pe cromozomii normali. În țările din Europa de Est haplotipul 2 se atestă prevalent pe cromozomii mutageni [Daiger, 1989a; Zygulska, 1991b; Барановская, 1996], în timp ce printre popoarele sud-europene majoritatea cromozomilor mutanți poartă haplotipul 6 [Kalazdjieva, 1991].

Incidența relativă a mutațiilor genei FAH (Okano, 1992)

Țara	R11X	IVSnt1	Y204C	R243Q	IVSnt2	W326X	Y356X	R413P
Japonia	10,7	7,7	11,5	18,3	1,0	2,0	6,7	8,7
China	8,3	5,6	8,3	8,3	1,4	-	4,2	18,1
Coreea	-	25,0	20,0	5,0	-	-	-	5,0

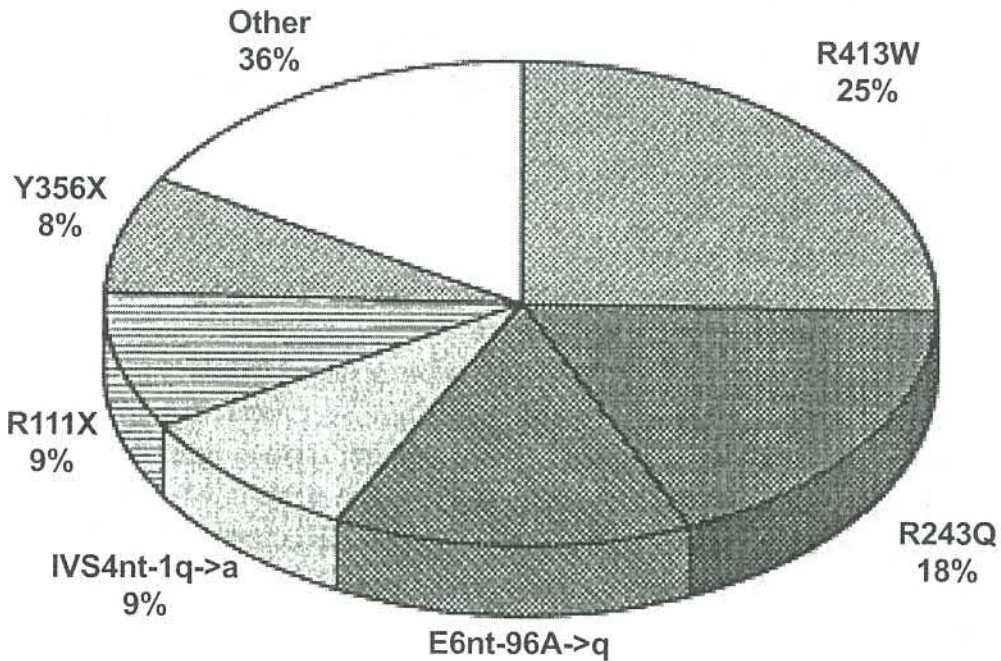


Fig. 6. Spectrul și frecvența mutațiilor genei FAH printre popoarele asiatice (n=185).

Haplotipurile 5 și 7 sunt mai frecvent depistate pe cromozomii normali. Indiferent de aceste deosebiri de sediu ale haplotipurilor PRFL pe cromozomii mutanți și cei normali la diferite popoare, în cadrul fiecărei populații se atestă corelarea strânsă dintre anumite haplotipuri RFLP și fenotipurile FCU [Güttler, 1987; John, 1992; Svensson, 1991].

Diagnosticarea fenilcetonuriei

Diagnosticul se bazează pe tabloul clinic și metode speciale de depistare a hiperfenilalaninemiei.

Testele urinare clasice de depistare a FCU cuprind:

- reacția cu perclorură de fier și reacția cu hârtie reactivă Phenistix
- reacția cu perclorură de fier, testul Fölling. Este pozitivă când la amestecarea a 5 ml de urină cu 1 ml de reactiv în câteva secunde apare o colorație verde mai mult sau mai puțin intensă, ori 3–5 picături de perclorură de fier de 10% la 1 ml de urină.

La nou-născuți, înaintea externării din maternitate, la a 5-ea, a 7-ea zi, se face testul sanguin de inhibiție bacteriană, bazat pe inhibarea unei tulpini de *Bacillus subtilis* cu Beta-2-fenilalanină, antagonist al fenilalaninei. Acesta este *testul screening de rutină*.

Alte teste sanguine sunt:

- metoda fluorimetrică;
- metoda enzimospectrofotometrică;
- metoda cromatografică pe hârtie.

Cu ajutorul acestor teste se poate depista o creștere excesivă a fenilalaninei. În cazul testelor screening pozitive se precizează conținutul aminoacizilor în urină și sânge cu ajutorul testelor cromatografice.

Metoda cromatografică permite investigarea până la 18–20 de aminoacizi ca urmare a faptului că în hiperaminoacidurii crește rapid excreția cu urina a unuia sau a câtorva aminoacizi (fenilalanina, tirozina, serina, cisteina, treonina).

Investigații biochimice

Pentru precizarea diagnosticului de FCU se montează reacția calitativă la prezența fenilcetonelor în urină și determinarea cantitativă a FA în serul sanguin.

Pentru depistarea AFP în urină se utilizează *reacția Fölling* și proba cu 2,4-dinitrofenilhidrozină (2,4-DNPH). Nivelul de FA în serul sanguin se determină prin metodele cromatografică, enzimatică, fluorimetrică și microbiologică (*testul Güttler*).

Diagnosticul de FCU este confirmat de următoarele date biochimice: 1) nivelul FA din sânge de peste 15 mg%, la un nivel al tirozinei sub

5 mg%, ceilalți aminoacizi avânt cote normale; 2) concentrația FA din urină de peste 100 mg%; 3) prezența în urină a peste 10 mg% de acid hidroxifenilacetic [Анненков, 1980].

Tratamentul și profilaxia FCU

Pentru tratamentul FCU, *Woolf* și *Vulliamy* (1951) au propus un regim dietetic cu doze minime de FA, *Bickel*, *Gerard* și *Hickmans* au transpus în practică această idee în 1953. S-a constatat că pentru a menține titre normale de FA în serul sangvin, rațiile bolnavului de FCU trebuie să includă 11-88 mg/kg de FA/24 ore, în funcție de vârsta celui afectat. Fiecare produs proteic conține 5-8% de FA. Proteine cu doze minime de FA și cu doze normale de alți aminoacizi esențiali în natură nu există, de aceea nu se poate alcătui meniul unui bolnav de FCU din produse alimentare obișnuite. Preparatele aplicate în prezent pentru tratamentul FCU conțin hidrolizate proteice cu titre reduse de FA (0,01-0,4 g%), în care se suplimentează tirozină, triptofan și cisteină, vitamine, hidrați, grăsimi și săruri minerale. Necesitățile de FA se determină individual, la începutul curei de tratament. Dietoterapia se efectuează sub controlul permanent al FA și al conținutului total de proteine în serul sangvin [Лебедев, 1972].

Eficiența tratamentelor depinde nu doar de vârsta bolnavului, termenul de inițiere a tratamentului și durata curelor, dar și de gravitatea leziunii cerebrale la momentul inițierii tratamentului. Aceasta se poate manifesta cu sindrom convulsiv și depinde de dereglările de dezvoltare intrauterină ale copilului.

Disfuncțiile psihice ale copilului cu FCU pot fi atenuate prin trecerea cât mai timpurie la un regim dietetic specific. Terapia dietetică s-a dovedit a fi favorabilă și în cazul copiilor mai mari. Deși nu previne debilitarea intelectuală, reducerea aportului de FA normalizează comportamentul și anihilează sau atenuează manifestările sindromului paroxistic.

Dietoterapia

Pentru a preveni degradarea intelectuală, dietoterapia trebuie începută până la vârsta de 3 luni: regim alimentar sărac în fenilalanină cu aport suplimentar moderat de tirozină și administrarea acidului glutamic sau a altor substanțe. Se recomandă o dietă sintetică sau hidrolizate de cazeină din care s-au înlăturat prin hidroliză fenilalanină, tirozina și triptofanul. În raport cu vârsta copilului, acest regim este completat cu hidrocarbonați sub formă de făinoase (amidon) și zahăr, ulei (de arahide, de măsline sau de porumb), legume (cu excepția cartofilor), săruri minerale, vitamine și o mică cantitate de lapte (10 ml/kg/zi), în scopul furnizării unei cantități de fenilalanină (o mică cantitate de fenilalanină previne degradarea proteinelor corporale. În lipsa fenilalaninei în dietă, proteinele din corpul copiilor se descompun invadând țesuturile cu fenilalanină).

Tratamentul dietetic al copiilor cu fenilcetonurie se efectuează sub controlul strict al fenilalaninei în sânge. Conținutul de FA nu trebuie să depășească 3-6 mg%. Dacă nivelul fenilalaninei în ser e mai mic de 2 mg% sau mai mare de 8 mg%, se efectuează corecția proteică a rației alimentare a bolnavului. Examenele de control la copiii mai mari de 1 an la atingerea indicilor stabili pot fi efectuate o dată la 2-3 luni. Nu se recomandă determinarea fenilalaninei în ser dacă copilul n-a respectat dieta necesară, deoarece rezultatele pot fi incorecte.

Actualmente nu e soluționată problema continuării tratamentului și finalizării lui. Dietoterapia poate fi substituită prin tratament suplimentar cu aminoacizi precum lecitina, izolecitina, valina, tirozina și triptofanul.

În rația alimentară se introduc fructe, legume, produse cu un conținut redus de proteine (pâine, crupe). În calitate de terapie de corecție în alimentație se introduc hidrolizate proteice lipsite de fenilalanină, dar care conțin aminoacizii necesari (*Cimogran, Berlofen, Hipofenat*). Laptele matern nu se exclude totalmente din rația alimentară.

Produse speciale

Aceste produse se fabrică pe bază de hidrolizate de cazeină sau amestecuri de aminoacizi: *Lofenalac*, *FenilFri*, *Nofelan*, *Tetrafen*. În ultimul timp, hidrolizatele de cazeină, obținute prin hidroliza acidă, sunt substituie de cele obținute pe cale enzimatică (*cymogramm* 10 mg fenilalanină la 100 g pulbere, *minaten* 20 mg fenilalanină la 100 g pulbere). Nivelul fenilalaninei se va monitoriza timp de câțva ani. Durata tratamentului de excludere este de 4-6 ani. Pentru sugari se recomandă *Lofenalac*.

Lofenalac - conținutul la 100 g

Energie 462 kkal

Proteine 15 g

Grăsimi 18 g

Glucide 60 g

Fenilalanină 16 mg/100 kkal

Tratamentul copiilor cu fenilcetonurie mai mari de 1 an practic este identic cu cel al copilului mic și presupune alimentație curativă pentru pacienții cu fenilcetonurie cu produse naturale.

Tetrafenul este indicat pentru alimentația dietetică a copiilor cu fenilcetonurie mai mari de 1 an. Produsul conține amestecuri de aminoacizi cu vitamine, minerale, glucide și o cantitate minimă de fenilalanină, bine solubile în apă (tab. 8, 9)

Tabelul 8

Compoența chimică a Tetrafenului

Ingrediente alimentare	Cantitatea în 100 g de amestec uscat	Ingrediente alimentare	Cantitatea în 100 g de amestec uscat
Echivalent proteic, g	40	Vitamine A, mg	1,7
Glucide, g	38	D ₂ , mg	0,011
Ingrediente minerale		E, mg	23
Calciu, g	1,1		
Fosfor, g	0,8	C, mg	125
Potasiu, g	3,2	PP, mg	1,5
Sodiu, g	1,1	B ₂ , mg	2,1
Magneziu, g	0,2	B ₃ , mg	11
Zinc, mg	16	B ₁₂ , mg	0,005
Iod, mg	0,13	Folați, mg	0,6
Fier, mg	23	Holin, g	0,5
Clor, g	0,013	Energia, kkal	312

Compozența aminoacidică a Tetrafenului

Aminoacizii	g la 16 g de azot	Aminoacizi	g la 16 g azot
Histidină	2,6	Tirozină	7,2
Izoleucină	4,6	Treonină	4,3
Leucină	9,9	Triptofan	2,0
Lizină	6,6	Valină	5,5
Metionină+Cisteină	4,2	Suma aminoacizilor	45,3
Fenilalanină	0,0-0,5	Taurină	–

Profilaxia FCU, inclusiv diagnosticul presimptomatic și prenatal, presupun identificarea mutațiilor genice prin aplicarea tehnologiilor moderne de diagnostic molecular-genetic.

Diagnosticul molecular al FCU este posibil atât prin metode directe, cât și indirecte. Avantajul metodei directe constă în precizia înaltă, care ajunge până la 100%. În acest caz decade necesitatea examinării tuturor membrilor familiei. Examenului molecular este supusă gena însăși, mai exact mutațiile prezentate de aceasta, identificarea căroră și este sarcina cercetării. Asemenea abord este mai eficient când suntem în posesia unor informații exacte despre natura, frecvența și poziționarea celor mai incidente mutații, precum și despre existența unor puncte “fierbinți” în cadrul genelor asociate cu maladia, care mutează deosebit de facil. Automatizarea metodelor de determinare a mutațiilor genice specifice maladiilor ereditare permite testarea concomitentă a câtorva mutații diferite, fiind reală identificarea până la 95% din cromozomii mutanți.

În caz de mutație necunoscută, este posibilă doar clonarea și descrierea prin segmentare a genei asociate cu maladia, acesta fiind un proces anevoios și destul de costisitor. În aceste situații se aplică metode indirecte, care folosesc conjuncția genei cu markeri polimorfi, prin care se realizează identificarea cromozomilor mutanți în familiile cu risc sporit, adică la părinții și rudele apropiate. Astfel, în familiile europene în care se întâlnesc FCU, s-a demonstrat eficiența diagnosticului de înlănțuire instabilă, care cercetează site-urile RFLP, și a repetărilor intragenice polimorfe în tandem ale genei FAH [Okano, 1990]. Gradul înalt de heterozigoție pentru mai multe locusuri polimorfe, corelarea strânsă a anumitor haplotipuri cu mutații concrete ale genei FAH determină informativitatea înaltă a analizei

RFLP în realizarea diagnosticului prenatal la majoritatea popoarelor de pe glob [Daiger, 1989; Eisensmith, 1996].

Cercetarea frecvenței alelelor cu locusuri polimorfe pe gena FAH pe eșantioane de sănătoși și în familiile bolnavilor de FCU a permis caracterizarea haplotipurilor înlănțuite cu diferite alele genice mutante, care generează FCU la diferite popoare [Eisensmith, 1992]. Informația despre haplotipurile descendenților afectați și neafectați din familiile marcate permite reconstituirea haplotipurilor parentale în vederea aprecierii răspândirii cromozomilor mutați în diferite populații [Daiger, 1989].

Întrucât unele populații denotă o eterogenitate înaltă în ceea ce privește frecvența și caracterul mutațiilor genei FAH, se impune cercetarea în cadrul fiecărei populații a spectrului de mutații specifice ale genei respective și incidența asocierii acestora cu anumite haplotipuri.

Tratament medicamentos

Se efectuează tratament patogenetic și simptomatic, tratament cu preparate nootrope, anticonvulsivante, preparate din grupele ATP, preparate cu acțiune premeditoare (Dapa, nacom, madopar).

Tratament suplimentar

Sunt bine venite curele de masaj și gimnastică curativă. În reabilitarea intelectuală rezultate favorabile dă folosirea tehnologiilor computerizate moderne: recunoașterea vocii, programe complexe de realitate virtuală. Sistemele computerizate permit copilului de a se integra într-o lume proprie.

Tabelul 10

Normele de alimentație recomandate la diverse grupe de vârstă în 24 ore

Ingrediente	Grupele de vârstă			
	1-3 ani	4-6 ani	6 ani	10 ani
Proteine, g	53	68	69	77
inclusiv animaliere	37	45	45	46
Grăsimi, g	53	68	67	79
inclusiv vegetale	7	9	13	16
Glucide, g	212	272	285	335
Energie, kkal	1540	1970	2000	2350

**Cantitatea nictemerală de fenilalanină pentru pacienții cu fenilcetonurie
de diferite vârste**

Vârsta	Cantitatea de fenilalanină (mg la 1 kg masa corporală)
1-1,5 ani	35-30
1,5-3 ani	30-25
3-5 ani	25-20
Mai mari de 5 ani	20-15

Particularitățile vitaminei B₆ în fenilcetonurie

Aprovizionarea optimă a organismului cu vitamina B₆ are o importanță deosebită pentru pacienții cu fenilcetonurie. Această vitamină joacă un rol important în reglarea proceselor de excitație și inhibiție în sistemul nervos central. Vitamina B₆, coferment al decarboxilazei, catalizează transformarea acidului glutamic în gamaaminobutiric, decarboxilează aminoacizii aromatici, participând la formarea catecolaminelor și serotonininei, histaminei și altor aminoacizi, participă și la reacția schimbului tirozinei.

Evoluția și pronosticul fenilcetonuriei sunt severe. Degradarea intelectuală, cu debut în primele luni de viață, progresează rapid. Depistarea precoce (din primele săptămâni de viață) și tratamentul corect pot asigura o dezvoltare intelectuală normală: se accentuează pigmentarea, dispar tulburările de comportament, convulsiile, se normalizează conducerea impulsurilor nervoase.

Profilaxia este decesivă și presupune un diagnostic precoce. În uter fătul este protejat de ficatul mamei, care compensează lipsa enzimei fătului. După naștere sunt necesare mai multe zile pentru dezvoltarea anomaliilor biochimice și mai multe săptămâni pentru a se produce tulburări ireversibile. Deci, timp pentru diagnostic și tratament precoce este îndeajuns.

Aplicabilitatea testului de analiză a polimorfismului locilor ADN-lui înălănțuiți cu genele maladiilor ereditare pentru cercetările medico-genetice și investigații populaționale

În prezent au fost studiate în populațiile umane atât locii ADN-lui dialelici, cât și hipervariabili [*Chakraborty*, 1987; *Deka*, 1991; *DiLela*, 1986a]. Dintre markerii dialelici RFLP o valoare deosebită pentru cercetările genetice populaționale prezintă cunoștințele despre locii ADN-lui cuplați cu genele anumitor afecțiuni ereditare. Este cunoscută valoarea diagnostică a markerului ADN-lui înălănțuit cu mutații ale genei purtătoare de afecțiuni ereditare care se investighează în cadrul examenului familial pentru detectarea stării de purtător homo- și heterozigot și care se definește de doi parametri: incidența alelelor în populația respectivă și frecvența asocierii lor cu gena maladiei concrete. Acești parametri denotă variații în diferite populații. De exemplu, rezultatele studierii frecvenței locusului polimorf Msp I(a) pe gena FAH în populațiile europene și în cele asiatice au relevat neomogenitatea distribuției alelelor și a gradului de asociere a acestora cu cromozomii purtători de mutații [*Daiger*, 1989a, 1989b].

Pe de altă parte, valoarea fiecărui marker al ADN-lui în parte este definită de numărul alelelor sale în respectiva populație și de heterozigoție care caracterizează informativitatea acestui sistem polimorf în desfășurarea sondajelor genetice populaționale și analiza structurii genetice. Întrucât majoritatea markerilor RFLP sunt dimorfi, heterozigoția unui asemenea sistem nu depășește rata de 50%, cealaltă jumătate de indivizi are una și aceeași variantă de RFLP pe ambii cromozomi omologi. Prin urmare, prestața markerilor RFLP dimorfi pentru examenul genetic este redusă, deoarece pentru confirmarea înălănțuirii veritabile se cere includerea în experiment a unui număr mare de indivizi. Rezultă că cei mai informativi markeri ai ADN-lui sunt locii ADN-lui polimorfi hipervariabili, care prezintă sisteme multialelice cu nivele de heterozigoție de 70-90% [*Deka*, 1991; *Goltsov*, 1993]. Grație nivelului marcat de polimorfism și simplității relative de analiză prin metoda reacției de polimerizare în lanț - RPL, succesiunile genomice minisatelite și microsatele de hipervariabilitate sunt markeri genetici moleculari suficient de sensibili și înalt informativi nu doar pentru diagnosticul molecular al maladiilor cu transmitere ereditară, ci și pentru studierea structurii genetice a populațiilor, pentru estimarea

înrudirilor genetice dintre acestea și reconstituirea relațiilor lor evolutive [Erlandsen, 1999].

O analiză de acest gen se bazează pe studierea frecvenței alelelor și genotipurilor pentru un șir de loci ai ADN-lui polimorfi și compararea lor în eșantioane diferite. La moment, analiza haplotipurilor se utilizează rar în cercetările genetice populaționale, deși anume studierea lor ar putea furniza informații calitativ diferite și mai exacte despre anumite evenimente traversate de acestea [Баранов, 1996].

Cromozomul, ca grupă de conexiune a anumitor alele a unor loci polimorfi, constituie un haplotip, care se dezintegrează în procesul de meioză prin evenimente de recombinare. Dacă am fixa un anumit locus de pe un cromozom în calitate de marker și am analiza haplotipul din succesiunile flancante ale acestuia, dispuse la o distanță genetică relativ mică de la marker, atunci probabilitatea recombinărilor din interiorul acestui haplotip va fi determinată de numărul meiozelor traversate de acest haplotip și de dimensiunea lui genetică. Prin urmare, dimensiunea haplotipului rămas neschimbat poate servi drept măsură temporală pentru intervalul ce s-a scurs de la un careva moment din trecut. Această modalitate analitică este posibilă în situațiile când a fost definit “efectul fondatorului”, în populație fiind identificați cromozomii de origine ancestrală.

Metoda își propune să descopere conexiunile interlocice dezechilibrate generate de “efectul fondatorului”. Analiza incidenței și determinarea vârstei de apariție a cromozomului fondator (primordial) într-o populație oferă posibilitatea de a urmări istoria acesteia și evenimentele ce au însoțit proliferarea și extinderea unei populații. Evident că asemenea informații prezintă un interes indiscutabil și o semnificație științifică enormă pentru cunoașterea istoriei populațiilor contemporane, pentru caracterizarea genofondului și aprecierea direcțiilor principale de evoluție a omenirii.

În căutarea anumitor haplotipuri și a locilor markeri, nelegați direct cu anumite manifestări fenotipice, ne aventurăm în căutări îndelungate, costisitoare și ineficiente. Folosind în calitate de marker gena responsabilă de transmiterea maladiei, asigurăm un nivel înalt de selecție preliminară și operarea cu un material genetic confortabil.

În populațiile mici cu o frecvență relativ înaltă pentru o maladie ereditară sau alta la majoritatea bolnavilor se pot detecta cromozomi purtători de mutații identice, conjugate cu haplotipuri identice sau similare din

cauza “efectului de fondator” [Ramus, 1992a]. În asemenea comunități profunzimea temporală a sondajului corespunde cu vârsta când populația era redusă numeric - etapa “istmului de expansiune”. În populațiile mari, care nu au cunoscut asemenea etape, “efectul fondatorului” se manifestă prin predominarea unui anumit haplotip, înlănțuit cu o mutație concretă. Asemenea haplotipuri pot fi amprenta unor evenimente străvechi, dimensiunea genetică a haplotipului persistent fiind mai redusă.

Apreciind în ansamblu informațiile oferite de aceste modalități de explorare, putem conchide că incidența crescută a anumitor haplotipuri pe cromozomii lezați în majoritatea cazurilor se datorește într-adevăr “efectului de fondator”, iar dimensiunea haplotipului rămas nemodificat reprezintă intervalul de timp ce s-a scurs din momentul, când cromozomul fondator a apărut și a început să prolifereze în populația respectivă [Баранов, 1996]. Frecvența și arealul de răspândire al acestor cromozomi pot caracteriza expansiunea genotipurilor unui grup populațional. Valoarea acestor informații pentru studierea istoriei popoarelor moderne este incontestabilă.

Prin urmare, analiza polimorfismelor Msp I(a), Pvu II(a), Bgl II și a VNTR de pe locii genei FAH în populația Republicii Moldova prezintă nu doar interes practic în vederea ordonării unui consulting genetic mai plenar și al diagnosticului prenatal al FCU, ea poate contribui de asemenea la studierea genofondului poporului nostru. Metoda se distinge și prin interes cognitiv, facilitând constatarea cauzelor de apariție și proliferare a mutațiilor ce generează fenilcetonuria.

CAPITOLUL II

Caracteristica materialului prevelat pentru cercetare

Pentru investigațiile molecular-genetice s-au prevelat mostre de ADN de la 59 de bolnavi de FCU de formă clasică, precum și de la membrii familiilor acestora (131 probe). Pentru diagnosticul prenatal al maladiei s-au cercetat 5 mostre de ADN recoltate din vilozitățile corioamniotice în urma procedurilor de amniocenteză și, respectiv, prin biopsia corionului. Pentru investigații de masă s-au cercetat mostre de ADN de la 68 de persoane, selectate aleatoriu dintre persoanele sănătoase din Republica Moldova.

Pentru screening-ul neonatal s-a utilizat sânge capilar, recoltat de la nou-născuți din aria plantară, acesta fiind impregnat pe o blanchetă de hârtie de filtru sub forma a două amprente cu diametrul de 12 mm. Recoltarea probelor de sânge se realiza în maternități în termene strict delimitate de timp postnatal (la 3-5 zile de viață). Probele erau expediate la Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului din Republica Moldova.

Caracteristica familiilor cu fenilcetonurie forma clasică

Investigațiilor au fost supuse 59 de familii, aflate la evidența Centrului Național de Reproducere Umană și Medicină Genetică al ICȘOSMC din RM. Dintre acestea 43 de familii erau complete, fiind constituite din proband, ambii părinți și sibiși (dacă asemenea existau), și 16 familii incomplete, constând din proband și unul din părinți.

Contingentul examinat includea 41 de bolnavi de FCU, depistați în urma screening-ului neonatal de masă în perioada anilor 1991-2003, și 18 pacienți, cărora diagnosticul de FCU li s-a emis în timpul examenelor de consulting medico-genetic în baza retardului psihomotor și intelectual, a hipopigmentației tegumentelor și a nivelelor ridicate de fenilalanină serică (peste 1200 $\mu\text{M/l}$).

Crearea băncii de ADN pentru familiile în care s-au înregistrat bolnavi de fenilcetonurie

Famiiliile cu acest diagnostic clinic, confirmat de probele biochimice ale nivelului de fenilalanină în sânge, au fost trecute în Registrul Național al Bolnavilor de FCU. Acest registru a fost întocmit pentru a acumula și sistematiza informațiile despre purtătorii heterozigoți depistați în familiile bolnavilor în vederea facilitării diagnosticului prenatal în grupele de risc sporit. Actualmente în Registru sunt incluse datele despre 96 de familii marcate de FCU, începând cu anul 1985.

Pentru constituirea băncii de ADN s-au prelevat probe de sânge de la toți membrii familiilor luate la evidență. Mostrele de ADN se pot păstra în congelator la -80°C timp îndelungat. Fiecare familie obține un număr de ordine. Gradul de rudenie al membrilor familiei se notează cu un indice secundar numărului de ordine. De exemplu, o familie a fost notată cu cifrul PKU 32, ceea ce înseamnă: 32.1 – probandul, 32.2 – mama, 32.3 – tatăl, 32.4 – sibisul. Ulterior toate manipulările de analiză a ADN-ului se realizau doar cu mostre marcate.

Metodele de cercetare

Screening-ul neonatal

Pentru estimarea nivelului de fenilalanină în sângele nou-născuților, s-a utilizat *metoda fluorimetrică McCaman & Robins* în variantă modificată, folosind dispozitivul supraproductiv Fluoroskan II (Labsystems, Finland) și 96 de plășete cu godeuri. Calculele și procesarea rezultatelor comensurative s-au efectuat computerizat în programul «Флюоран» (НПК Аналитика, Россия).

Investigarea genealogică

Pentru fiecare familie luată la evidență se completa o hartă genetică și obligatoriu arborele genealogic, notând datele despre locul de naștere al părinților bolnavului, sibișii de generațiile I și II, existența căsătoriilor consangvine, maladiile și cauzele decesului rudelor trecute în arborele genealogic, informații din anamneza obstetricală. Apartenența etnică a

probandului se înregistra cu indicarea apartenenței naționale a strămoșilor. Analiza datelor obținute a arătat că 71,65% dintre cromozomii mutați sunt de origine moldovenească, 8,1% – ucraineană, 7,7% – rusă, 5,2% – găgăuză, 2,9% – țigani și 1,5% – bieloruși, ciuvași și bulgari. Analiza originii etnice este unul din criteriile principale de definire a prepusului portaj heterozigotic.

Cu ajutorul metodei genealogice se efectuează examenul familial și selecția persoanelor care au nevoie de investigarea ADN-ului în vederea realizării diagnosticului prenatal.

Separarea ADN-ului din leucocite

Sângele venos (5 ml) prelevat se amestecă cu anticoagulant (5:1). Acest sânge, în caz de necesitate, poate fi congelat la -20°C pentru păstrare îndelungată. Se adaugă apoi 2 volume de tampon zaharat cu următoarea compoziție: 0,32 M $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 5mM MgCl_2 , 1% Triton X-100 și 10 mM tris-HCl, pH 7,5 pe gheață. Compoziția se amestecă și se lasă la frigider pe 10 min, apoi se centrifughează la 5000 turații/min timp de 20 min la $t-4^{\circ}\text{C}$. Supernatantul se extrage, se resuspendează cu 500 μl soluție fiziologică, apoi se centrifughează la microcentrifugă 1-2 minute în eprubete tip Eppendorf.

Sedimentul se resuspendează în 400 μl tampon cu compoziția: 75 mM NaCl și 24 mM EDTA, pH 8,0, în care se suplimentează 20 μl 10% SDS și 5 μl proteinază K (de conc. 25 mg/ml). Amestecul se agită și lasă în termostat la temperatura $+37^{\circ}\text{C}$ pentru 8-12 ore sau la $+55^{\circ}\text{C}$ timp de 3 ore.

Pentru separarea ADN-ului de proteinele histonice, se face extracția cu fenolcloroform [Manuamuc, 1984]. Cu acest scop se operează prelucrări pe etape cu fenol, fenolcloroform (1:1) și cu alcool cloroformizoaamil (24:1). La supernatant se adaugă 400 μl din componentele enumerate anterior și se agită timp de 10 min, apoi încă 2 min se centrifughează, lucrând doar cu faza hidrică. Procedura se repetă cu fiecare dintre componente. Deproteinizarea prin această procedură este mai eficientă, deoarece fenolul denaturează activ proteinele, dar nu inhibă complet ARN-aza, iar cloroformul elimină resturile de fenol. Alcoolul izoamilic, din compoziție reduce spumarea și astfel faza hidrică se delimitează de cea fenolică.

La supernatantul rezultat se adaugă 40 μ l 3,5M C₂H₃O₂Na, pH 5,5 și 800 μ l etanol. Acetatul de sodiu se folosește pentru formarea sărurilor ADN-ului, care precipitează bine cu etanol. Amestecul rezultat se centrifughează, se spală cu alcool, care apoi se scurge, ADN se usucă la temperatura camerei cel mult o oră, apoi se dizolvă cu 40 μ l TE - tampon ce conține: 10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 în cursul unei nopți.

Separarea ADN-ului din amniocite

Amniocenteza s-a efectuat nu mai devreme de 18 săptămâni gestaționale, deoarece în termene mai precoce cantitatea de ADN separat este insuficientă pentru diagnostic. Din lichidul amniotic ADN se separă după schema descrisă mai sus cu unele modificări. La etapa inițială, 40-50 ml de lichid amniotic prelevat se centrifugau la viteza de 5 mii tur/min timp de 20 min, apoi sedimentul se resuspendează în 1 000 μ l de tampon SSC unimomentan ce include: 0,15 M NaCl, 0,015 M C₆H₅O₇Na₃, pH 7,0 și se centrifuga 5 min la microcentrifugă. Procedura de extracție se continuă după scenariul descris anterior, începând de la alineatul doi.

Extragerea ADN-ului din vilozitățile corionice

Biopsia corionului se practică la termenul de 7-11 săptămâni gestaționale. Pentru a evita contaminarea, mostra de corion prelevată se detașează de țesutul matern sub microscop. Apoi vilozitățile selectate se spală de câteva ori cu soluții tampon unimomentane SSC și 10 mM EDTA.

Reacția de polimerizare în lanț (RPL)

Pentru examenul molecular-genetic s-a recurs la tehnica **RPL in vitro**, care fiind de sensibilitate înaltă permite obținerea de la o singură moleculă de ADN a peste 10 milioane de copii (dubleuri) ale succesiunilor necesare. Această metodă se bazează pe cuplarea a două oligonucleotide sintetice, ce conțin până la 50% perechi G-C, complementare la două secvențe adverse de lanțuri ale matricei monocatenare de ADN, astfel încât sinteza se efectuează doar între acestea, utilizându-se Taq ADN Polymerase, care va contribui la ancorarea dNTP pe extremitatea 3' a oligonucleotidei în succesiunea adecvată. Metoda reacției de polimerizare în lanț are o tehnică

simplă de executat, deoarece nu necesită marcarea radioactivă și permite efectuarea analizei unimomentane asupra unui mare număr de probe.

Ciclul de amplificare presupune incubarea mostrelor de ADN în trei etape cu termospecificitate pentru fiecare locus: denaturare, recoacere și sinteză. Denaturarea presupune ruperea legăturilor hidrogenice între lanțurile complementare prin încălzirea unimomentană a probei până la 92-96°C. În procesul de recoacere, probele fiind răcite până la 55-65°C, oligonucleotidele își regăsesc locul de ancorare pe lanțurile de ADN monocatenare. Pentru dezvoltarea procesului de sinteză a fragmentului specific temperatura se ridică din nou până la 70-72°C.

Reacția de polimerizare în lanț se montează în microeprubete tip Eppendorf cu ulei mineral după schema standard [Erich, 1991] cu unele modificări, la un aparat programat Thermal Cycler PHC-1A (Techne, Great Britain) tip termociclic.

Amplificarea fragmentelor specifice de ADN se execută în 25 μl de amestec reactiv ce conține câte 0,2 mM din fiecare dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq ADN Polymerase (recombinant), 0,5-1,0 μg ADN genomic, 1 μM din fiecare oligonucleotidă și tampon RPL de componență: 75 mM tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, pH 8,8.

Pentru identificarea mutației R408W (exonul 12) se foloseau oligonucleotidele, (tab. 12), propuse de Иващенко (1993). RPL se efectua în următorul regim termic: 93° (7 min) + 30 x (93° (0,7 min) + 55° (0,5 min) + 72° (1 min)).

Amplificarea locusului VNTR se efectua în următoarea succesiune oligonucleotidică (tab. 12), propusă de Goltsov (1992) și în regimurile termice expuse anterior.

Pentru identificarea a 8 mutații ale genei FAH s-a utilizat setul diagnostic, pus la dispoziție de laboratorul ADN-diagnostic al CG din or. Moscova. Pentru identificarea concomitentă a mutațiilor R252W și R261Q se făcea uz de praimer, (tab. 12), care să sintetizeze fragmentul exonului 7 în următoarele condiții de regim termic:

94° (5 min) + 30 x (94° (0,8 min) + 58° (0,8 min) + 72° (0,8 min)) + 72° (7 min).

Pentru depistarea mutațiilor R158Q și P281L se realiza amplificarea unimomentană folosind succesiunile oligonucleotidice (tab. 12), pentru sinteza fragmentelor exonilor 5 și 7, în condiții termice similare.

Identificarea concomitentă a mutațiilor IVS10nt546 și I65T se efectuează prin intermediul praimerilor de amplificare a exonului 3 și segmentului intronului 10 al genei FAH (tab. 12), în regim termic similar.

Tabelul 12

Dimensiunile locusului amplificat și succesiunile oligonucleotidelor utilizate pentru PCR

Locus	Praimeri (5'-3')	Fragment
3 exon	R: AAACGAGAAGGTCTAGACTCA F: GTTAGGTTTTCTGTTCTGG	112 bp
Pvu II(a)	R: GGC ATG ACT GGA TAC GAT TAG F: CTA GAC TCA GAA TGC CTG GG	374 bp
Bgl II	R: GCA GGA AAC TCT CTG ACT TTG G F: TGG CAG TTC TGG AGG CCA GA	290 bp
5 exon	R: ATC CTG TGT ACC GTG CAA GT F: TCA TGT TGG TAT TTT CAT CC	162 bp
Msp I	R: TGA GCA TAT TGT ATC TGC CC F: CAC ATG TCC CAA CAG CTC AT	425 bp
7 exon	R: CTT GCA CTG GTT TCC GCC TC F: CCC AAA CCT CAT TCT TGC AGC A	218 bp
10 intron	R: GTA GAC AAT GAG TCC ACT CT F: TGA GAG AAG GGG CAC AAA TG	222 bp
12 exon	R: ATG CCA CTG AGA ACT CTC TT F: TCG TAA GGT GTA AAT TAC GTA	245(177) b.p.
VNTR	R: AGA TTT TAA TGT TCT CAC CCG CC F: CTT GGA AAC TTA AGA ATC CCA TC	380+30n b.p.

Pentru depistarea mutației *splicing* IVS12nt1 s-au aplicat praimerii de amplificare a exonului 12 și a regiunii intronului flancant (tab. 12), în regimul termic descris anterior.

Amplificarea segmentului polimorf Msp I(a) cu utilizarea succesiunii de oligonucleotide (tab. 12), propuse de Dworniczak (1991d), se realizează în următorul regim termic:

94° (5 min) + 30 x (94° (1 min) + 55° (1 min) + 72° (1 min)) + 72° (10 min).

La amplificarea locusului Pvu II(a) se foloseau oligonucleotidele, propuse de Dworniczak (1991b), operând în următorul regim termic:

94° (5 min) + 35 x (94° (1 min) + 57° (1 min) + 72° (1 min)) + 72° (10 min).

Pentru amplificarea segmentului cu polimorfismul Bgl II, s-au utilizat succesiunile oligopeptidice (tab. 12), propuse de Dworniczak (1991c), respectând următorul regim termic:

94° (5 min) +35x (94° (1 min) +59° (1 min) +72° (1 min)) +72° (10 min).

La finalizarea RPL, dimensiunea fragmentelor sintetizate și cantitatea de amplificat se verifica cu ajutorul electroforezei în prezența markerului masei moleculare: ADN fagul λ, hidrolizat cu restrictaza Pst I sau ADN fagul pUC19, hidrolizat de Msp I. Se consideră că amplificarea s-a desfășurat cu succes, dacă se distinge o bandă hipercontrastantă la nivelul masei moleculare respective și nu există bande pe alte zone de gel, definite de poziționarea nespecifică a praimerilor.

Analiza restricțională

Evidențierea mutației R408W se efectua prin hidrolizarea fragmentului ADN amplificat de dimensiunea 245 bp cu restrictază Sty I în condiții standard [Mahiatic, 1984] cu unele remanieri (în amestecul reactivant se mărea cu 30% cantitatea de amplificat). Incubarea se realiza la 37°C timp de cel puțin 12 ore în tampon specific: 10 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8,5, suplimentând 5U din respectiva restrictază. În homozigoția după mutația R408W se obțineau fragmente cu dimensiunile de 148 și 97 bp, iar în caz de heterozigoție – fragmente cu lungimea de 245 și (148+97) bp.

Identificarea mutației IVS12nt1 se realiza prin hidrolizarea fragmentului cu dimensiunea de 177 bp amplificat cu ajutorul restrictazei Rsa I în tampon reactiv: 33 mM trisacetat, 10 mM Mg(C₂H₃O₂)₂, 66 mM C₂H₃O₂-Na, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9. Fiind prezentă mutația, dispărea site-ul de restricție (GT/AC), prezent în normă (fragmentul 154+23 bp), și se detecta fragmentul de dimensiunea 177 bp.

Pentru punerea în evidență a mutației R252W și R261Q se practica dubla restricție a amplificatului de mărimea 218 bp prin intermediul restrictazelor Ava I și, respectiv, Hinf II în tamponul reactant de ingrediența descrisă anterior. Fiind prezentă mutația R252W, se depistau fragmentele 136+82 bp, iar în prezența mutației R261Q dispărea site-ul de restricție pentru Hinf II și se decela fragmentul 218 bp.

Pentru identificarea mutațiilor R158Q și P281L se executa hidrolizarea concomitentă a două fragmente amplificate cu ajutorul restrictazei Msp I în condițiile de incubare descrise anterior. Fiind prezentă mutația R158Q, dispărea siteul de restricție al exonului 5, prezent în normă (fragmentele 141+21 bp), și se determina fragmentul cu dimensiunea 162 bp. Dacă proba include mutația P281L, dispărea site-ul de restricție, prezent pe fond normal pentru exonul 7 (fragmentul 195+23 bp), și se evidențiază fragmentul de mărimea 218 bp.

Pentru a decela mutațiile I65T și IVS10nt546 se realiza hidrolizarea concomitentă a două fragmente amplificate cu restrictaza Dde I în condițiile de incubare deja relatate. În prezența mutației, se identifică fragmentele 87+25 bp și, respectiv, 172+50 bp.

Pentru a identifica Msp I(a) al site-ului polimorf (C/CGG) amplificatul se incuba în tampon de componenta relatată anterior. În lipsa site-ului polimorf, se evidențiază fragmentul cu dimensiunea de 425 bp, care în prezența site-ului polimorf se expune hidrolizei fermentative, rezultând fragmente cu dimensiunile de 300 și 125 bp.

Pentru identificarea Pvu II(a) al site-ului polimorf (CAG/CTG), amplificatul se incuba în tampon: 10 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH7,5. În absența acestuia, se detectează fragmente cu dimensiunile de 374 bp, care în prezența site-ului polimorf este hidrolizat de enzime și rezultă fragmentele 225 și 149 bp.

Pentru identificarea Bgl II al site-ului polimorf (A/GA-TCT), amplificatul se incubează în tampon: 50 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5. În lipsa site-ului polimorf se descoperă fragmentul 290 bp, care în prezența mutației respective se supune hidrolizei enzimatică cu formarea fragmentelor cu lungimea de 209 și 81 bp.

Electroforetarea și vizualizarea rezultatelor

Separarea produselor de amplificare și a fragmentelor restricționale se efectua în gel poli-acrilamidic (GPAA) la aparatul de electroforetare verticală BV160/C cu sursă programabilă de alimentare BP500V (Serva GmbH, Germany).

Gelul se prepara pe tampon trisborat (TBE) cu următoarea componentă: 0,89 M tris-aminometan, 0,89 M H₃BO₃, 0,02 M Edta, pH 8,0 cu suplimentarea soluției-stok de 30% acrilamidă/bisacrilamidă (29:1), 10%

$(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ și Temed. În funcție de mărimea fragmentelor divizate, după tabelele standard, se alegea concentrația adecvată de soluție-stoc în gel. Pregătirea camerei și includerea în gel se efectua în procedura standard [Маниатис, 1984]. În investigațiile noastre s-a făcut uz de GPAA de 5-8% cu lungimea de 20–25 cm. În calitate de tampon electroforetic s-a utilizat 5xTBE.

Înainte de electroforezare, mostrele de ADN (5-15 μ l) se amestecau cu tamponul de aplicare a probelor cu următoarea compoziție: 0,25% bromfenol, 0,25% xilencianol și 40% $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, în proporție de 5:1 și se aplicau pe alveolele cu gel. În paralel se aplica și controlul pozitiv (mostrele nehidrolizate) sau markerul masei moleculare. La aplicarea electroforezei se va ține cont de faptul că ADN-ul are încărcătură negativă. Pentru a delimita un câmp clar, preforetarea se efectua la tensiunea de 80-100W (până la încorporarea mostrelor în gel), apoi tensiunea se creștea până la 250-270 W și se continua până la nivelul necesar, cu evidența lungimii fragmentelor separate.

Pentru vizualizarea fragmentelor de ADN prin metoda fluorescenței, gelul după electroforezare se colora cu soluție de $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ în 1xTBE) timp de 10 min, se spăla cu apă și se analiza în spectrul ultraviolet penetrant cu lungimea de undă 312 nm la transiluminatorul TFX-35M (Serva GmbH, Germany). Rezultatele se documentau prin fotografiere pe peliculă Микрат-200 sau Свема-64, folosind fotofiltrul de culoare oranj.

CAPITOLUL III

Incidența fenilcetonuriei în Republica Moldova

Întrucât informațiile relatate în literatura de specialitate despre incidența fenilcetonuriei în diferite regiuni de pe glob [Elisensmith, 1992a], prezintă variații esențiale, am decis să cercetăm acest indice pentru republica noastră.

În a. 1990 în cadrul ICȘOMC s-au inițiat cercetări diagnostice în baza metodei de fluorometrie cantitativă pentru depistarea FCU printre nou-născuți. În perioada 1993 - 2003 au fost supuși screeningu-lui 387 211 copii, 74,2% din toți nou-născuții din republică (tab. 13). În anul 2002 au fost examinați 95 % din totalul de nou-născuți în acest interval.

Prin screening-ul neonatologic de masă și consultingul medico-genetic au fost depistați 82 bolnavi de fenilcetonurie. Pornind de la cifra totală de nou-născuți din această perioadă în țara noastră (742 346), incidența FCU în Moldova este de 1 caz la 9000 locuitori.

Datele înregistrate sunt comparabile cu mediile de incidență a FCU în Europa (1:10 000) [Bickel, 1981], dar inferioare parametrilor determinați pentru populația din Belarus (1:6000) [Цукерман, 1986], Ucraina (1:8150) [Гнатейко, 1990] și pentru cea din regiunea Moscova (1:8300) [Герасимова, 1990]. Printre popoarele asiatice, fenilcetonuria se întâlnește rar sau în genere lipsește: în China – 1:16000 [Lin, 1992, în Japonia – 1:210800 [Elisensmith, 1994]. În Turcia, unde s-a înregistrat cea mai înaltă incidență a FCU de pe glob (1:4700) [Ozalp, 1986], maladia se atestă aproape de două ori mai frecvent decât în Moldova (tab. 1).

În baza datelor despre incidența maladiei și folosind raportul Hardy-Weinberg, am calculat frecvența genei mutante FAH în populația RM, care s-a dovedit a fi egală cu $q=0,0105$. Prin urmare, ceva mai mult de 1% din populația republicii suferă de FCU. Pentru a evidenția numărul de heterozigoți, am calculat incidența genotipului heterozigot ($2pq=0,0208$). Conform acestor calcule, fiecare al 48 individ din Moldova este purtător heterozigot al genei FAH.

**Eficiența screening-ului neonatal pentru depistarea FCU în Republica
Moldova**

Anul	Numărul de nou-născuți	Screening pentru FCU	Procentul de populație supusă examinării
1993	66 058	52 384	79,3
1994	63 638	51 113	80,3
1995	56 716	40 369	71,2
1996	53 326	36 361	68,2
1997	49 364	30 680	62,2
1998	44 410	32 042	72,2
1999	42 854	26 491	61,8
2000	36 942	24 784	67,1
2001	36 452	26 034	71,4
2002	35 705	34 001	95,2
2003	36 472	32 952	90,3
Total	521 937	387 211	74,2

Datele screening-ului neonatal și informațiile furnizate de serviciile de consulting medico-genetic au fost acumulate în cadrul Secției de Reproducere Umană și Genetică Medicală pentru a fi catalogate într-un Registru de Stat al Bolnavilor de Fenilcetonurie. Registrul conține informațiile privind istoricul familial al bolii, anamneza bolnavului concret, arborele genealogic, titrele FA în dinamică și datele testului molecular-genetic pentru fiecare membru al familiei luate la evidență. În prezent în registru sunt incluse 96 familii cu FCU din RM. Datele din registru pot fi utilizate pentru consultarea medico-genetică adecvată, diagnosticul prenatal și evidențierea purtătorilor heterozigoți în familiile cu risc înalt de fenilcetonurie.

În cadrul Laboratorului de Diagnostic Molecular al Maladiilor Ereditare s-a fondat banca de ADN aparținând membrilor a 59 de familii cu formă clasică de fenilcetonurie. În total sunt depozitate 192 mostre, care se vor păstra la temperaturi joase (de la -80°C până la -20°C) timp îndelungat. Mostrele se folosesc pentru cercetarea rapidă și sigură a ADN fetal în diagnosticul prenatal pentru familiile unde deja există copii bolnavi de fenilcetonurie. În astfel de situații se recurge la informativitatea anterior stabilită a familiei cercetate și nu se mai analizează toate mutațiile locilor

polimorfi ai genei FAH. Astfel se reduc considerabil termenele de realizare a diagnosticului prenatal, lucru destul de important în situațiile când se impune întreruperea sarcinii cu un fetus bolnav. Mostrele din banca de ADN se pot utiliza și la depistarea altor mutații, caracteristice pentru populația RM, operând secvențierea mostrelor de ADN ale bolnavilor pentru care nu s-au identificat mutații incluse în tematica cercetărilor noastre.

Polimorfismul alelic al ADN-ului din domeniul 12q24.1 în populația sănătoasă a Republicii Moldova

Conform datelor din literatura de specialitate, în interiorul genei FAH sunt amplasate site-uri de restricție pentru 7 endonucleaze și VNTR minisatelite ultrapolimorfe (Variability Number of Tandem Repeat) și repetiții microsatelite în tandem STR (Shot Tandem Repeat) [DiLella, 1986b; Gol-tsov, 1992a, 1993]. S-a descoperit că haplotipurile pentru acești loci intragenici polimorfi se asociază neregulat cu anumite mutații ale genei FAH și denotă un grad înalt de heterozigotism. Prin urmare, analiza haplotipurilor genei FAH este o metodă de informativitate remarcabilă la realizarea diagnosticului ADN prenatal și presimptomatic indirect al maladiei. Pentru frecvența și incidența alelelor polimorfe este specifică o mare eterogenitate și diferențe interpopulaționale esențiale [Chakraborty, 1987; Eisensmith, 1994b]. Deci, diagnosticul molecular-genetic al unei populații concrete se va preceda obligatoriu de un studiu populațional genetic pentru polimorfismul locilor utilizați în eșantionul de sănătoși pentru precizarea particularităților de înlănțuire cu haplotipurile polimorfe. Rezultatele acestor investigații se pot folosi și pentru a caracteriza structura genetică a populației investigate.

Analiza distribuției alelelor polimorfe VNTR ale genei FAH

Pentru detecția polimorfismului tandemurilor repetitive minisatelite (VNTR) ale extremității 3' a FAH s-a efectuat analiza molecular-genetică, care include informațiile despre copiile VNTR. În cercetările anterioare această regiune a fost descrisă ca fiind sistemul trimorf Hind III al genei FAH. Pentru a caracteriza repartiția alelelor VNTR printre locuitorii republicii, am examinat un eșantion din 68 de persoane sănătoase.

Printre locuitorii republicii, incidența alelei 380 bp este mai înaltă (0,32) decât printre popoarele europene (0,28). Posibil că devierea ușoară a curbei de repartiție a incidenței VNTR pentru alela 380 bp în republică se datorează unei influențe asiatice în constituirea genofondului acestei regiuni. Cea de a doua maximă de vârf de 530 bp (0,43), care s-a dovedit a fi dominantă, este o dovadă în plus a originii europene a populației republicii noastre.

Alelele 500 și 560 bp se întâlnesc cu o frecvență practic egală (0,13 și, respectiv, 0,08). Celelalte alele ale locusului examinat se depistează rar. Alela 470 bp, descrisă anterior [Goltsov, 1992], dar neîntâlnită în Europa și China, a fost identificată într-un singur caz.

Comparând distribuția alelelor VNTR ale genei FAH în Europa și Republica Moldova, nu am constatat diferențe statistice concludente ($\chi^2 = 0,99$; $d = 2$, $p > 0,95$). Cea ce nu putem spune despre popoarele asiatice: ($\chi^2 = 71,82$; $d = 2$, $p < 0,001$).

Parametrii importanți ai sistemului polimorf sunt informativitatea acestuia în cadrul investigațiilor genetice populaționale și reflectarea structurii genetice a populației însăși, a heterozigotismului. Indicii heterozigotismului real și al celui teoretic, calculați în baza incidenței alelelor VNTR ale genei FAH printre locuitorii RM, au constituit 73,5% și, respectiv, 68,8%. Eșantionul examinat de noi se apropie după indicii heterozigotismului pentru locusul VNTR de pe gena FAH de popoarele europene (63%), deosebindu-se considerabil de popoarele asiatice (33%). Coeficientul de deviere a heterozigotismului real de cel teoretic s-a dovedit a fi neesențial, constituind 0,07. În eșantionul cercetat nu s-au constatat totuși diferențe de valoare statistică între heterozigotismul așteptat și cel apreciat ($\chi^2 = 0,32$; $p > 0,5$).

Indicele relevat de heterozigoți, precum și distribuția de frecvență a alelelor VNTR ale genei FAH, califică acest gen de locus polimorf al ADN-ului ca fiind un marker ultrainformativ și valabil pentru a caracteriza structurarea genetică a populației. Datele obținute denotă necesitatea unui studiu preliminar al distribuției alelelor polimorfe în populația de bază cu scopul de a le utiliza ulterior pentru determinarea portajului și diagnosticarea prenatală a fenilcetonuriei în familiile tarate din RM.

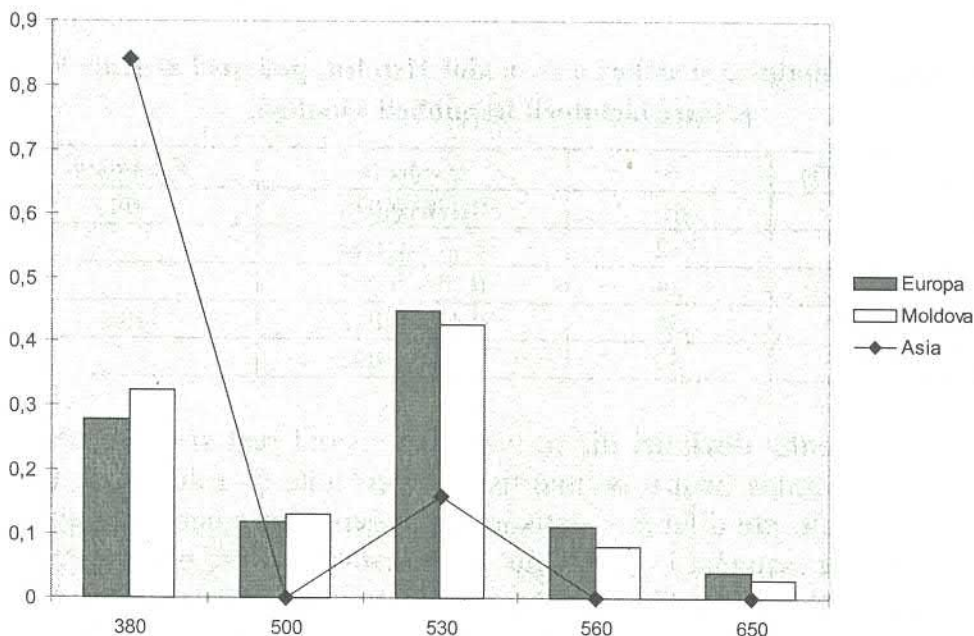


Fig. 8. Distribuția de frecvență a alelelor VNTR ale genei FAH în populațiile Europei, Asiei și Republicii Moldova.

Analiza distribuției alelelor polimorfe Msp I(a) ale genei FAH

Conform datelor din literatura de specialitate, polimorfismul Msp I(a) bialelic denotă diferențe considerabile între popoare și o angrenare instabilă cu mutațiile genei FAH [Daiger, 1989 a]. Pentru a evalua semnificația diferențelor apreciate printre locuitorii Moldovei, am analizat repartiția alelelor Msp I(a) într-un eșantion de populație sănătoasă, examinând astfel 136 de cromozomi neînrușiți. În urma cercetărilor am constatat că distribuția de frecvență a locusului Msp I(a) în populație s-a conformat distribuției Hardy-Weinberg (criteriul χ^2). În eșantionul de indivizi sănătoși cel mai răspândit s-a dovedit a fi genotipul A_1A_2 , apreciat cu frecvența de 0,47. Cel mai rar întâlnit genotip – A_1A_1 a fost depistat în 17,6% din cazuri (tab. 16). Indicele real al heterozigotismului (0,47) este prezentat în tabelul 16.

Heterozigotismul teoretic este cota de heterozigoți în populație care satisface echilibrul Hardy-Weinberg (0,48).

**Incidența genotipică și alelică a locusului Msp I(a) polimorf al genei FAH
printre locuitorii Republicii Moldova**

Genotipul/Alela	N	Incidența	Eșantionul
A_1A_1	12	$0,176 \pm 0,046$	68
A_1A_2	32	$0,471 \pm 0,060$	
A_2A_2	24	$0,353 \pm 0,057$	
A_1	56	$0,412 \pm 0,042$	136
A_2	80	$0,588 \pm 0,042$	

Coeficientul deviației dintre heterozigotismul real și cel teoretic a fost cel mai redus pentru polimorfismele cercetate și a constituit 0,02. Nu au fost relevate diferențe statistice concludente între heterozigotismul observat și cel așteptat în eșantionul examinat ($\chi^2 = 0,04$; $p > 0,8$). Printre locuitorii Moldovei coeficientul heterozigotismului teoretic coincide cu indicele populațiilor europene (0,48), dar devansează de peste două ori valorile populațiilor asiatice (0,20).

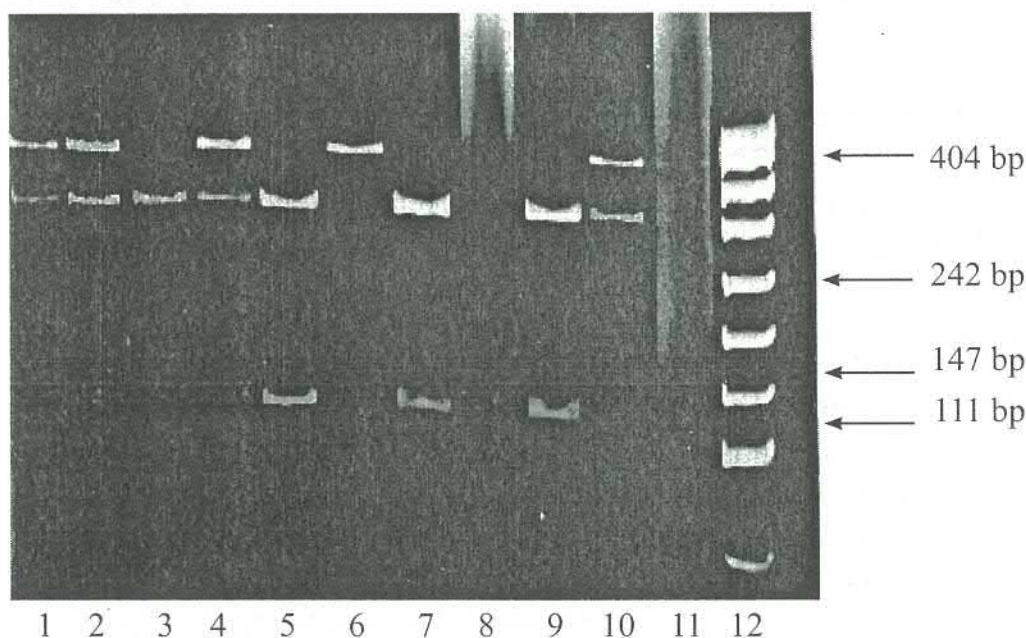


Fig. 9. Electroforegrama analizei RPFL asupra locusului polimorf Msp I(a) prin metoda RPL: 1, 2, 4, 10 - A_1A_2 ; 3, 5, 7, 9 - A_2A_2 ; 6 - A_1A_1 ; 12 - markerul masei moleculare (pUC19/Msp I).

Pe electroforegramă (fig. 9) sunt reprezentate rezultatele analizei RFLP locusului polimorf Msp I(a) prin metoda RPL, situat la distanța de 268 bp de la extremitatea 5' a exonului 8 de pe gena FAH [Dworniczac, 1991d]. În lipsa site-ului polimorf se detectă un fragment (alela A₁) cu lungimea 425 bp, care în prezența site-ului polimorf (a) se supune hidrolizei enzimatică prin restrictaza Msp I cu formarea de fragmente cu lungimea de 300 bp și 125 bp (alela A₂).

Formele alelice ale locusului Msp I(a) al genei FAH se atestau printre locuitorii Moldovei cu o incidență marcată. Cea mai răspândită a fost alela A₂, înregistrată pe 58,8% din cromozomii examinați (tab. 16, fig. 10).

Comparând rezultatele obținute cu informațiile din literatura de specialitate (tab. 17), am constatat că repartiția de frecvență ale alelei Msp I(a) ale genei FAH în populația cercetată de noi prezintă similitudini distributive cu unele popoare europene: Franța, Ungaria și Elveția [Daiger, 1989a] și diferențe esențiale cu popoarele din Japonia și China, pentru care este caracteristică o frecvență minimă a alelei A₂ [Daiger, 1989b].

Incidența alelelor Msp I(a) ale genei FAH pe cromozomii cercetați corespunde cu cea specifică pentru popoarele europene ($\chi^2 = 0,07$; $d = 1$, $p > 0,7$), deosebindu-se semnificativ de cea întâlnită printre asiatici ($\chi^2 = 67,00$; $d = 1$, $p < 0,001$).

Rezultatele analizei locusului polimorf Msp I(a) al genei FAH atestă înalta lui informativitate genetică, ceea ce determină valoarea sistemului respectiv atât pentru investigațiile populaționale genetice, cât și pentru diagnosticul FCU în familiile tarate.

Tabelul 17

Incidența alelelor Msp I(a) ale genei FAH printre popoarele europene și asiatice [Daiger, 1989a, 1989b]

Populația	Incidența	
	A ₁	A ₂
Danemarca	0,455±0,04	0,545±0,04
Elveția	0,417±0,04	0,583±0,04
Scotia	0,323±0,02	0,677±0,02
Germania	0,378±0,03	0,622±0,03
Franța	0,397±0,02	0,603±0,02
Ungaria	0,413±0,03	0,587±0,03
Cehoslovacia	0,346±0,02	0,587±0,02
Europa (valori medii)	0,393±0,022	0,607±0,022
China	0,905±0,04	0,095±0,04
Japonia	0,870±0,03	0,130±0,03
Asia (valori medii)	0,892±0,038	0,108±0,038

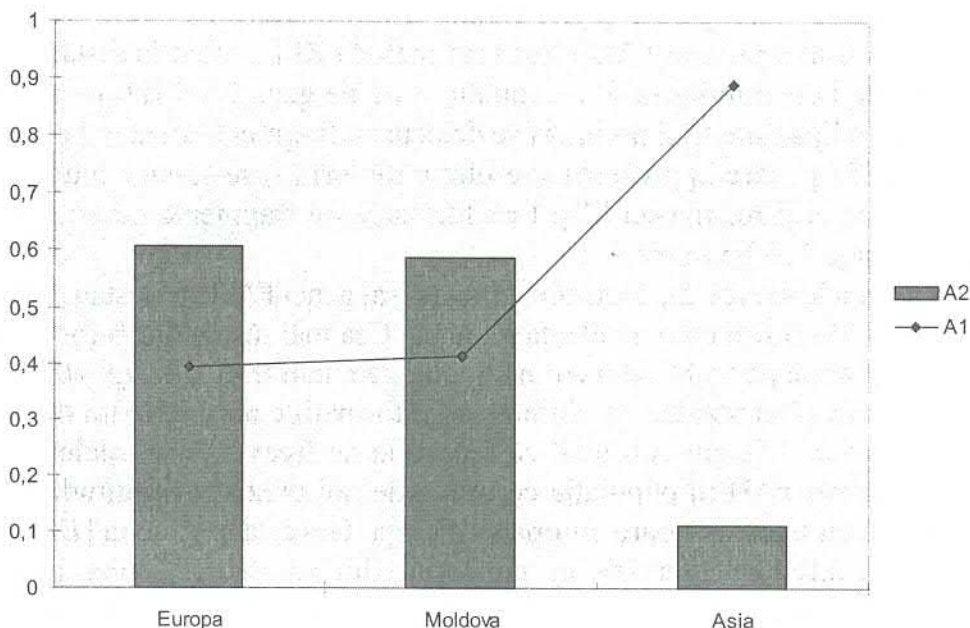


Fig. 10. Incidența alelelor Msp I(a) ale genei FAH printre locuitorii Europei, Asiei și Republicii Moldova.

Estimarea incidenței alelelor polimorfe Pvu II(a) ale genei FAH printre locuitorii Republicii Moldova

Cu scopul de a analiza repartiția populațional-genetică a alelei Pvu II(a) a genei FAH a fost examinat un eșantion din 67 de persoane, sănătoase, locuitori ai R.Moldova.

Cercetările au arătat că cel mai răspândit genotip este E_2E_2 , determinat la 59,7% dintre cei supuși examinării. Heterozigoții după acest locus polimorf au constituit 0,37%. Cel mai rar genotip a fost E_1E_1 , atestat la 3% dintre cei examinați (tab. 18).

Tabelul 18

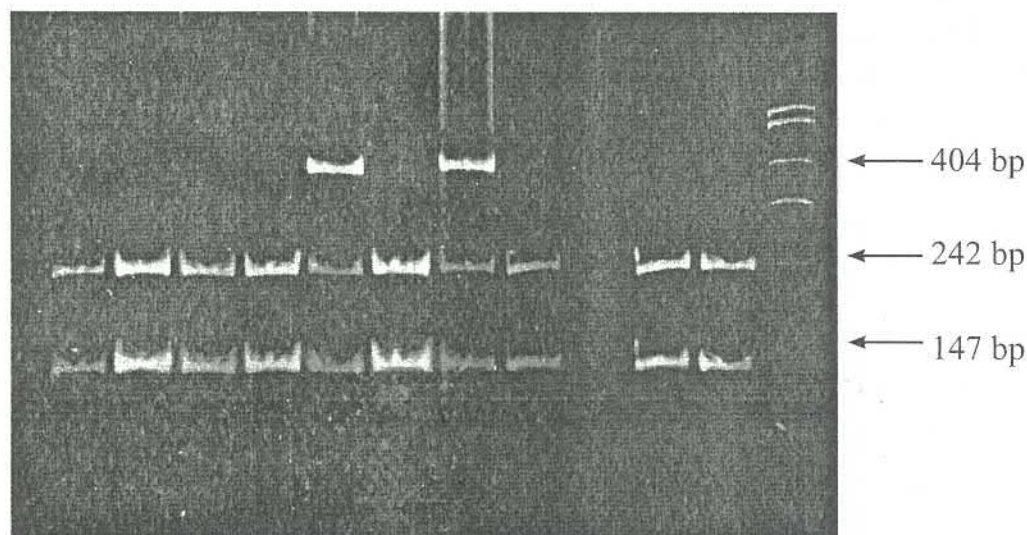
Incidența genotipică și alelică a locusului polimorf Pvu II(a) al genei FAH printre locuitorii Republicii Moldova

Genotipul/ Alela	N	Frecvența	Eșantionul (n)
E_1E_1	2	$0,030 \pm 0,020$	67
E_1E_2	25	$0,373 \pm 0,059$	
E_2E_2	40	$0,597 \pm 0,059$	
E_1	29	$0,216 \pm 0,035$	134
E_2	105	$0,783 \pm 0,035$	

În baza datelor obținute pentru incidența alelelor Pvu II(a) în eșan-
tionul cercetat, s-au estimat parametrii reali și cei teoretici ai heterozigo-
tismului (0,37 și, respectiv, 0,34). Coeficientul de deviere al heterozigoti-
sului real de cel teoretic a constituit 0,1.

În eșanționul examinat nu s-au determinat diferențe statistic conclu-
dente dintre heterozigotismul observat și cel așteptat ($\chi^2 = 0,36$; $p > 0,5$).
Coeficientul de heterozigotism printre locuitorii Moldovei ocupă o poziție
intermediară între parametrii înregistrați pentru popoarele europene (0,39)
și cele asiatice (0,31).

Pe electroforegramă (*fig. 11*) sunt reprezentate rezultatele testării
prin tehnica RPL a locusului polimorf Pvu II(a), ancorat pe intronul doi
al genei FAH la distanța de 1,4 kb de la extremitatea 3' a exonului 2
[Dworniczak, 1991b]. În lipsa site-ului polimorf se determina fragmen-
tul E_1 cu lungimea de 374 bp, care în prezența site-ului E_2 se expune
hidrolizei enzimatică prin restrictaza Pvu II din care rezultă fragmente
225 bp și 149 bp.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 11. Electroforegrama analizei RFLP asupra locusului polimorf Pvu II(a)
prin metoda RPL. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 - E_2E_2 ; 5, 7 - E_1E_2 ; 12 - markerul ma-
sei moleculare (pUC19/Msp I).

După locusul Pvu II(a) printre locuitorii Moldovei cea mai răspândită
alelă s-a dovedit a fi alela E_2 , depistată pe 78,3% din cromozomii studiați

(tab. 12). Aceste date se conformează cu informațiile publicate referitor la popoarele Europei și Asiei, unde de asemenea se atestă prevalența alelei E_2 (tab. 19, fig. 12).

Tabelul 19

Incidența alelelor Pvu II(a) ale genei FAH printre europeni și asiatici
[Daiger, 1989a, 1989b]

Țara	Incidența	
	E_1	E_2
Danemarca	$0,227 \pm 0,02$	$0,773 \pm 0,02$
Elveția	$0,278 \pm 0,02$	$0,722 \pm 0,02$
Scoția	$0,290 \pm 0,03$	$0,710 \pm 0,03$
Germania	$0,330 \pm 0,03$	$0,670 \pm 0,03$
Franța	$0,309 \pm 0,02$	$0,691 \pm 0,02$
Ungaria	$0,097 \pm 0,02$	$0,903 \pm 0,02$
Cehoslovacia	$0,250 \pm 0,03$	$0,750 \pm 0,03$
Europa (valoare medie)	$0,271 \pm 0,020$	$0,729 \pm 0,020$
China	$0,190 \pm 0,05$	$0,810 \pm 0,05$
Japonia	$0,200 \pm 0,05$	$0,800 \pm 0,05$
Asia (valoare medie)	$0,194 \pm 0,05$	$0,806 \pm 0,05$

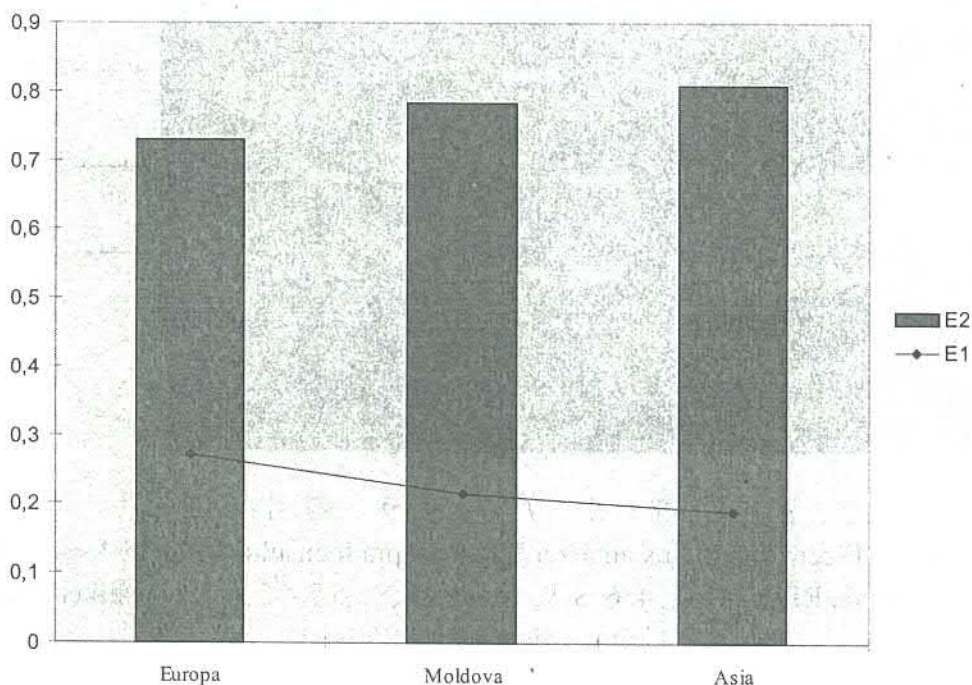


Fig.12. Incidența alelelor Pvu II(a) ale genei FAH printre locuitorii Europei, Asiei și Republicii Moldova.

La confruntarea datelor obținute cu cele publicate în literatura de specialitate (tab. 7), s-a constatat că frecvența alelei Pvu II(a) a genei FAH în populația studiată, înclină spre prevalența alelei E₂. Diferențe concludente cu privire la repartiția alelelor polimorfe Pvu II(a) printre europeni și asiatici nu s-au determinat ($\chi^2 = 1,29$ și, respectiv, 0,21, $p > 0,5$).

Rezultatele analizei efectuate asupra site-ului polimorf Pvu II(a) al genei FAH permit utilizarea acestui sistem atât pentru examenele molecular-genetice de masă, cât și pentru diagnosticul FCU în familiile tarate.

Analiza incidenței alelelor polimorfe Bgl II ale genei FAH

Pentru estimarea semnificației diferențelor de repartiție a alelelor Bgl II, a fost realizată analiza moleculară a unui eșantion din 67 de persoane sănătoasă din RM. Au fost studiați 134 de cromozomi neînruțiți.

Cercetările au arătat că distribuția incidenței locusului Bgl II corespunde repartiției după formula lui Hardy-Weinberg. În eșantionul dat cel mai întâlnit a fost genotipul D₁D₁, atestat cu frecvența de 0,55, iar cel mai rar genotip D₂D₂, depistat în 12 % din cazuri (tab. 20).

Un indice al diversității intrapopulaționale este ponderea de heterozigoți. În tabelul 8 sunt prezentați indicii heterozigotismului real (0,33). Heterozigotismul teoretic se determină ca fiind cel așteptat după formula lui Hardy-Weinberg pentru rata dată de heterozigoți în populație (0,41). Coeficientul de deviație a heterozigotismului real de cel teoretic a fost cel mai relevant pentru polimorfismele cercetate, constituind 0,19. În eșantionul examinat nu s-au relevat diferențe statistic concludente între indicii de heterozigotism real și cel teoretic ($\chi^2 = 1,49$; $p > 0,2$). Coeficientul proporției teoretice de heterozigoți printre locuitorii Moldovei coincide cu parametrul respectiv pentru popoarele europene (0,40) și devansează cu 30% valorile acestuia printre asiatici (0,29).

Tabelul 20

Incidența a Bgl II alelic și genotipic a site-ului polimorf al genei FAH printre locuitorii Republicii Moldova

Genotipul/Alela	Înregistrate	Incidența	Eșantionul, nr.
D ₁ D ₁	37	0,552 ± 0,060	67
D ₁ D ₂	22	0,328 ± 0,057	
D ₂ D ₂	8	0,120 ± 0,039	
D ₁	96	0,716 ± 0,038	134
D ₂	38	0,284 ± 0,038	

Incidența alelelor Bgl II ale genei FAH printre unele popoare din Europa și Asia [Daiger, 1989a, 1989 b]

Țara	Incidența	
	D ₁	D ₂
Danemarca	0,773 ± 0,02	0,227 ± 0,02
Elveția	0,750 ± 0,02	0,250 ± 0,02
Scotia	0,774 ± 0,03	0,226 ± 0,03
Germania	0,676 ± 0,03	0,324 ± 0,03
Franța	0,676 ± 0,02	0,324 ± 0,02
Ungaria	0,857 ± 0,02	0,143 ± 0,02
Cehoslovacia	0,786 ± 0,03	0,214 ± 0,03
Europa (valoarea medie)	0,729 ± 0,020	0,271 ± 0,020
China	0,829 ± 0,05	0,171 ± 0,05
Japonia	0,800 ± 0,05	0,200 ± 0,05
Asia (valoarea medie)	0,821 ± 0,051	0,179 ± 0,051

Pe electroforegramă (fig. 13) sunt prezentate rezultatele analizei RFLP a locusului polimorf Bgl II, situat la distanța de 55 bp de extremitatea 3' a primului exon al genei FAH [Dworniczak, 1991c]. În lipsa site-ului polimorf se depistează un fragment (alela D₁) cu lungimea de 290 bp, care în prezența site-ului polimorf este hidrolizat prin restrictaza Bgl II, din care rezultă fragmente cu dimensiunile de 209 bp și 81 bp (alela D₂).

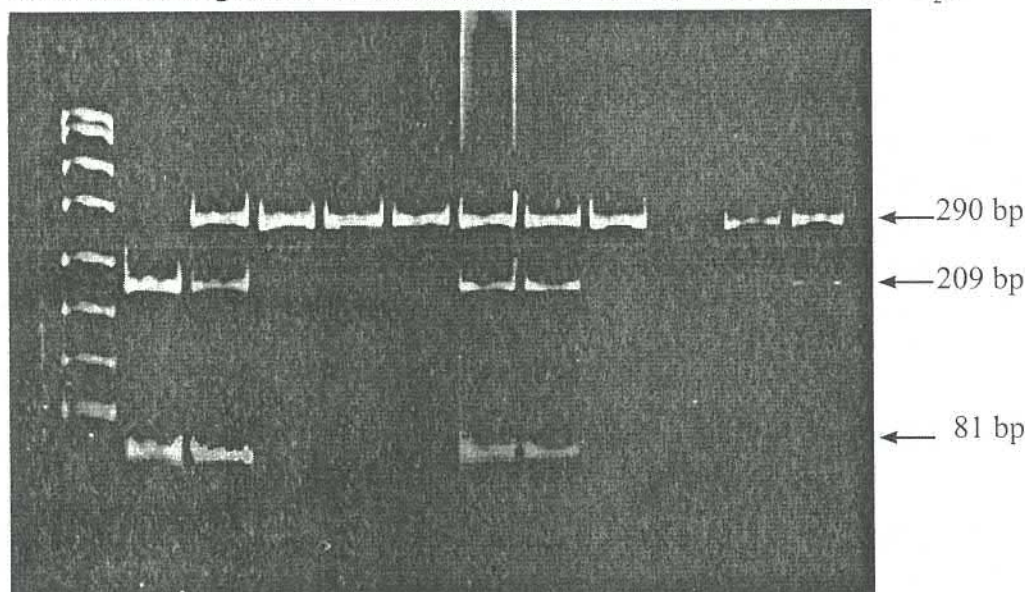


Fig. 13. Electroforegrama analizei PRFPL asupra locusului polimorf Bgl II prin metoda RPL, 1 - markerul masei moleculare (pUC19/Msp I); 2 - D₂D₂; 3,7,8,12 - D₁D₂; 4,5,6,9,11 - D₁D₁

Variantele alelice ale locusului Bgl II al genei FAH se atestă cu o frecvență majoră printre locuitorii Moldovei, cea mai întâlnită fiind alela D₁, prezentă pe 71,6% din cromozomii examinați (tab. 20, fig. 14).

Compararea rezultatelor obținute cu datele din literatura de specialitate (tab. 21) a arătat că repartiția de frecvență a alelelor Bgl II ale genei FAH în populația studiată are multe similitudini cu cea întâlnită printre popoarele europene [Daiger, 1989a]. Deosebiri esențiale s-au constatat cu popoarele asiatice [Daiger, 1989b].

Incidența alelelor Bgl II pe cromozomii studiați corespunde celei atestate printre europeni ($\chi^2 = 0,05$; d = 1, p>0,8), deosebindu-se esențial de cea întâlnită printre asiatici ($\chi^2 = 3,84$, df= 1, p<0,05).

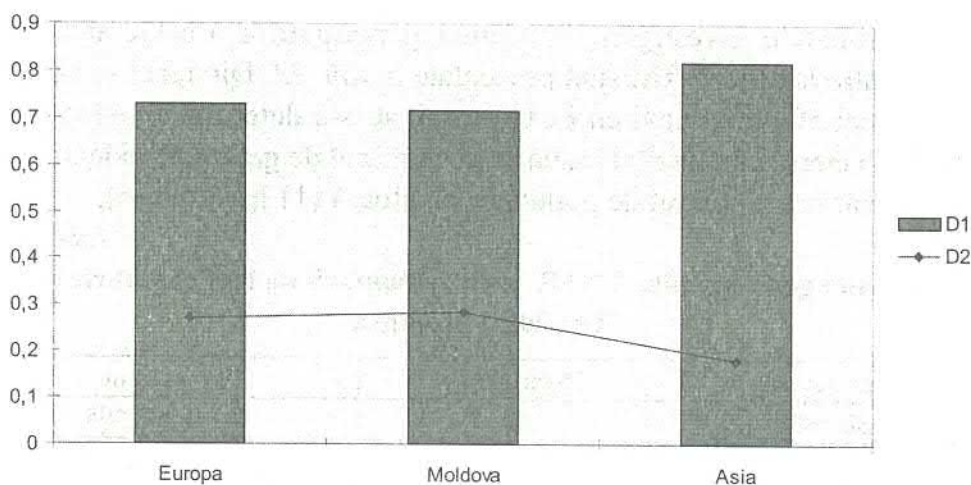


Fig. 14. Incidența alelelor Bgl II ale genei FAH printre locuitorii din Europa, Asia și Republica Moldova.

Rezultatele obținute referitor la locusul polimorf Bgl II de pe gena FAH printre locuitorii Moldovei relevă informativitatea genetică modestă a acestuia, ceea ce îl face inadecvat pentru diagnosticul molecular-genetic al FCU în familiile marcate de această maladie.

Studiul comparativ al incidenței alelelor locusurilor polimorfe VNTR, Msp I(a), Pvu II(a) și Bgl II în familiile cu fenilcetonurie din Republica Moldova

Studierea markerilor ADN polimorfi, agregați cu gena FAH, prezintă un interes deosebit în sensul ordonării unor acțiuni concrete de abordare molecular-genetică în practica consultingului medico-genetic pentru depistarea fenilcetonuriei în regiunea explorată.

Studierea incidenței locusului polimorf pe cromozomii normali și cei mutanți

Rezultatele investigării incidenței genotipurilor VNTR ale genei FAH printre locuitorii RM sunt prezentate în *tab. 22*. Din tabel se vede că la 9 din cei 59 de bolnavi cu FCU examinați s-a determinat genotipurile VNTR. O eterogenitate mai înaltă după numărul de genotipuri identificate s-a apreciat în eșantionul de populație sănătoasă (11 haplotipuri).

Tabelul 22

Incidența genotipurilor VNTR printre bolnavii de fenilcetonurie din Republica Moldova

Genotipul	Numărul	Frecvența
380/380	29	0,491 ± 0,065
380/500	7	0,119 ± 0,042
380/530	14	0,237 ± 0,059
380/560	1	0,017 ± 0,016
500/500	1	0,017 ± 0,016
500/530	2	0,034 ± 0,023
500/560	1	0,017 ± 0,016
530/530	3	0,051 ± 0,028
530/560	1	0,017 ± 0,016
Total	59	1

O frecvență mai înaltă de detecție pe cromozomii normali a prezentat genotipul 380/530 (0,32), în timp ce la bolnavii cu FCU acest haplotip era întâlnit în proporție de 23,4 % cazuri. Cu o frecvență egală (0,15) printre cromozomii normali se aprecia genotipul 500/530 și 530/530, iar la bolnavi acesta prezenta o frecvență de 3,4% și, respectiv, 5,1% din cazuri. De 4 ori mai frecvent (49,1% cazuri) se atesta la bolnavi genotipul 380/380,

care în populația sănătoasă prezenta o frecvență de 0,12. Din datele obținute putem deduce o înlănțuire dezechilibrată constantă pentru acest genotip între cromozomii normali și cei mutați. Incidența de atestare a genotipului 380/500 nu a prezentat deosebiri substanțiale între populația sănătoasă și contingentul de bolnavi (0,09 și, respectiv, 0,12). În grupul de control, genotipul 530/560 s-a determinat cu o frecvență de 6% din cazuri. Genotipurile 500/500, 380/560, 500/560 și 530/560 la bolnavii de FCU s-au determinat foarte rar cu o frecvență de 0,02 fiecare. În populația sănătoasă erau mai rare genotipurile 560/560 și 470/560, atestate cu aceeași frecvență – de 0,02, iar genotipurile 500/560, 530/650 și 560/650 s-au identificat cu o frecvență de 0,03 fiecare. Pentru estimarea semnificației diferențelor se aplica criteriul χ^2 , care a evidențiat cu o eroare de 0,999 că frecvențele genotipurilor de pe cromozomii mutați și normali diferă ($\chi^2 = 26,26$; $d = 3$, $p < 0,001$).

Din analiza polimorfismului sistemului VNTR s-a constatat că alela 380 bp prevalează atât pe cromozomii mutați, cât și pe cei normali (fig. 15). Astfel pe cromozomii mutați incidența acestuia a constituit 0,68, iar pe cei normali a fost de două ori mai redusă (0,32). Pe poziția secundă, după frecvența depistării pe cromozomii mutați și pe cei normali, s-a plasat alela VNTR 530 bp cu incidența de 0,20 și, respectiv, 0,43.

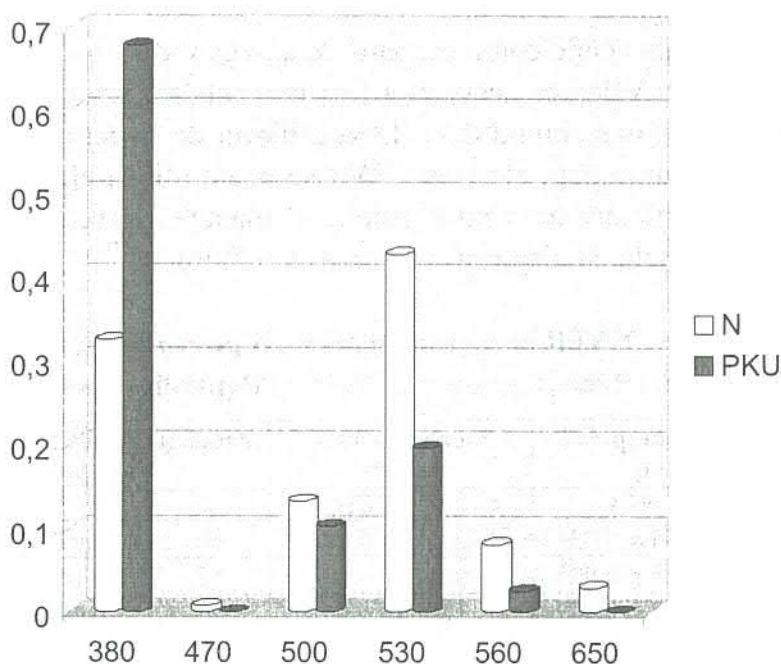


Fig.15. Incidența alelelor VNTR ale genei FAH pe cromozomii normali și mutați în familiile cu FCU din RM.

Similară a fost distribuția alelelor de lungimea 500 bp pe cromozomii mutanți și cei normali (0,10 și, respectiv, 0,13). Pe cromozomii normali este de trei ori mai frecventă alela VNTR de lungimea 560 bp (0,08). Numai pe cromozomii normali a fost determinată alela de dimensiunea 650 bp cu o frecvență de 0,03. Studiile realizate au arătat la o diferență concludentă în distribuția de frecvență a alelelor pe locusul examinat între cromozomii normali și mutanți ($\chi^2 = 3215$; $d = 2$, $p < 0,001$).

Pentru locusul VNTR cea mai răspândită s-a dovedit a fi alela 380 bp, atestată cu frecvența de 0,68. Aceste date se conformează cu datele din literatură privind distribuția de frecvență a alelelor VNTR pe cromozomii mutanți de origine europeană și chineză [Eisensmith, 1994a], (tab. 23). Deși prezintă această similitudine, la analiza comparată s-au determinat diferențe de valoare statistică între distribuția de frecvență a alelelor VNTR pe cromozomii mutanți ai bolnavilor din RM și Europa ($\chi^2 = 34,05$; $d = 2$, $p < 0,001$). În același timp distribuția alelelor pe toți cromozomii mutanți înclină spre creșterea incidenței alelei 380 bp (tab.23), ceea ce relevă influența componente asiatică în constituirea structurii genetice a populației RM. Analiza comparată a arătat că frecvența alelelor VNTR ale genei FAH printre locuitorii Moldovei și asiatici diferă concludent ($\chi^2 = 13,71$; $d = 2$, $p < 0,001$). Pentru a evidenția gradul de asociere a locusului polimorf cu mutațiile genei FAH am determinat coeficientul standard de agregare disproporționată Δst [Krawczak, 1988]. Valoarea acestuia a fost mai ridicată printre locusurile polimorfe studiate, constituind 0,35. Dezechilibrul de lincaj al sistemului VNTR polimorf cu mutații ale genei FAH se poate utiliza eficient pentru realizarea diagnosticului molecular-genetic al maladiei, precum și pentru identificarea portajului și diagnosticul prenatal al fătului.

Tabelul 23

Incidența alelelor VNTR pe locusul genei FAH pe cromozomii mutanți din Europa, China [Eisensmith, 1994a] și Republica Moldova

Alela	Populația europeană (n=361)		Populația Chinei (n=32)		Populația Republicii Moldova (n=118)	
	n	FCU	n	FCU	n	FCU
380	110	0,34 ± 0,044	25	0,771 ± 0,074	80	0,678 ± 0,043
500	80	0,21 ± 0,028	0	–	12	0,102 ± 0,027
530	146	0,38 ± 0,042	2	0,062 ± 0,042	23	0,195 ± 0,036
560	12	0,03 ± 0,018	5	0,167 ± 0,065	3	0,025 ± 0,014
650	13	0,04 ± 0,018	0	–	0	–

Notă: n – numărul de cromozomi supuși examinării.

Cu scopul de a evalua informativitatea sistemelor polimorfe studiate pentru diagnosticul prenatal al fenilcetonuriei, au fost examinate doar familii complete (43), adică era obligatorie prezența probandului, a mamei și a tatălui acestuia. Toate sistemele de alelele studiate se moșteneau în conformitate cu legile mendeliene. Pentru 48,8%(21) din familiile eșantionului de studiu, sistemul VNTR s-a arătat absolut informativ. În aceste familii este posibil diagnosticul prenatal fără cunoașterea naturii exacte a defectului molecular al genei FAH la proband, folosind doar analiza VNTR. Pentru 12 familii (30%) sistemul VNTR s-a prezentat parțial informativ. Prin urmare, 23,2% din familiile restante erau neinformative. Astfel, informativitatea generală pentru sistemul VNTR în populația RM a constituit 63,8%.

Analiza incidenței alelelor Msp I(a) pe cromozomii normali și cei mutanți

Incidența locusului polimorf Msp I(a) al genei FAH la bolnavii de FCU este prezentată în *tabelul 24*. În cadrul eșantionului cel mai răspândit a fost genotipul A_2A_2 , depistat cu o frecvență de 0,68. Pe cromozomii normali acest genotip s-a determinat cu o frecvență de 0,35. Cel mai rar, atât pe cromozomii mutanți, cât și pe cei normali, s-a identificat genotipul A_1A_1 (0,05 și, respectiv, 0,18). Analiza comparată a distribuției frecvenței Msp I(a) pe locusul polimorf al genei FAH a scos în evidență deosebiri între bolnavii de FCU și populația sănătoasă a Moldovei ($\chi^2 = 14,27$, $d = 2$, $p < 0,001$).

Din diagrama din *fig. 16* se vede că prevalentă pe cromozomii mutanți a fost alela A_2 , determinată pe 81,4% din cromozomii FCU. Pe cromozomii normali distribuția de frecvență a alelelor A_1 și A_2 a fost în proporție de 2:3 (0,41 și, respectiv, 0,59). Pentru a estima concludența diferențelor apreciate, s-a utilizat criteriul χ^2 , care a relevat cu marja de încredere 0,999, că frecvențele apreciate pentru alelele mutante și alelele normale sunt diferite ($\chi^2 = 15,00$; $d = 1$, $p < 0,001$).

Pentru a estima informativitatea sistemului polimorf cercetat pentru diagnosticul molecular-genetic și cel prenatal au fost examinate 43 de familii complete. Sistemul Msp I(a) s-a dovedit perfect informativ pentru patru familii (9,3%), parțial valabil – pentru 21(48,8%) de familii și neinformativ pentru 18(41,9%) familii. Prin urmare, informativitatea de ansamblu a sistemului Msp I(a) pentru familiile cercetate a constituit 33,7%.

Analiza incidenței alelelor Pvu II (a) pe cromozomii mutanți și cei normali

Caracterul repartiției alelelor polimorfe pe locusul RPFL Pvu II(a) al genei FAH s-a dovedit a fi unul special: cel mai incident în eșantioanele cercetate a fost genotipul E_2E_2 , depistat în 60% de cazuri pe cromozomi normali și în 81,4% din cazuri pe cromozomi mutanți. Genotipul E_1E_1 pe cromozomii mutanți nu s-a determinat în genere (tab. 26). Compararea incidenței genotipice Pvu II(a) pe locusul polimorf al genei FAH a arătat la diferențe semnificative între bolnavii de FCU și populația sănătoasă a Republicii Moldova ($\chi^2 = 7,63$; $d = 2$, $p < 0,05$).

Tabelul 26

Incidența genotipică și alelică ale locusului polimorf Pvu II(a) al genei FAH la bolnavii de FCU din Republica Moldova

Genotipul/ Alela	Numărul de cazuri înregistrate	Incidența	Eșantionul, N
E_1E_1	–	–	59
E_1E_2	11	$0,186 \pm 0,050$	
E_2E_2	48	$0,814 \pm 0,050$	
E_1	11	$0,093 \pm 0,026$	118
E_2	107	$0,907 \pm 0,026$	

Pe diagrama din fig. 17 sunt prezentate rezultatele comparative pentru incidența alelelor examinate pe cromozomii normali și cei mutanți. Analiza sistemului Pvu II(a) al genei FAH pe cromozomii mutanți a arătat la prevalența alelei E_2 (0,91). Alela E_1 este purtată de 21,6% din cromozomii normali și doar de 9,3% din cromozomii mutanți. Analiza comparată a repartiției alelelor pe locusul polimorf Pvu II(a) al genei FAH printre locuitorii RM a relevat diferențe statistic concludente între cromozomii mutanți și cei normali ($\chi^2 = 7,08$; $d = 1$, $p < 0,01$).

Rezultatele obținute cu privire la distribuția alelelor Pvu II(a) ale genei FAH corespund cu datele relatate pentru popoarele europene și cele asiatice, unde cea mai frecventă este alela E_2 (tab. 27).

Nu s-au apreciat diferențe esențiale nici pentru frecvența alelelor Pvu II(a) pe cromozomii mutanți între grupul examinat de bolnavi din RM și cromozomii analogi ai popoarelor europene și asiatice. La confruntarea rezultatelor obținute (tab. 26) cu cele din literatura de specialitate am constatat că distribuția de frecvență a alelelor Pvu II(a) ale genei FAH pe cromozomii mutanți în populația studiată ocupă o poziție intermediară între valorile atestate la popoarele europene și cele asiatice (tab. 27).

Tabelul 27

**Incidența alelelor Pvu II(a) ale genei FAH pe cromozomii mutanți
printre popoarele Europei și Asiei [Daiger, 1989a, 1989b]**

Țara	Incidențele	
	E_1	E_2
Danemarca	0,061 ± 0,01	0,939 ± 0,01
Elveția	0,053 ± 0,01	0,947 ± 0,01
Scotia	0,152 ± 0,02	0,848 ± 0,02
Germania	0,090 ± 0,01	0,910 ± 0,01
Franța	0,137 ± 0,02	0,863 ± 0,02
Ungaria	0,063 ± 0,01	0,938 ± 0,01
Cehoslovacia	0,063 ± 0,021	0,938 ± 0,01
Europa (valoarea medie)	0,087 ± 0,013	0,913 ± 0,013
China	0,095 ± 0,03	0,905 ± 0,03
Japonia	0,100 ± 0,04	0,900 ± 0,04
Asia (valoarea medie)	0,097 ± 0,038	0,903 ± 0,038

Diferențe concludente pentru parametrul respectiv între populația din Moldova și cea din Europa și Asia nu s-au determinat ($\chi^2 = 0,02$ și, respectiv, $0,01$, $d = 1$, $p > 0,8$).

În tentativa de a estima intensitatea de asociere a locusului cercetat cu mutațiile genei FAH s-a încercat estimarea coeficientului standard de asociere dezechilibrată Δ_{st} , care a constituit $0,18$. Disproporționarea ceva mai redusă pentru angrenarea locusului polimorf Pvu II(a) cu mutații ale

genei FAH, comparativ cu locii precedenți, face totuși pretabil acest însemn pentru stabilirea diagnosticului molecular-genetic al FCU și pentru detectarea statutului de portaj al mutațiilor genice.

Pentru a stabili informativitatea sistemului polimorf cercetat au fost examinate aceleași 43 de familii complete marcate de fenilcetonurie. Respectivul sistem s-a prezentat absolut neinformativ pentru 21 (48,8%) de familii. Informativitatea de ansamblu a locusului Pvu II(a) în diagnosticul prenatal la populația din Republica Moldova era de 29%.

Analiza incidenței alelelor Bgl II ale genei FAH pe cromozomii normali și cei mutanți

Incidența locusului polimorf Bgl II al genei FAH printre bonavii de fenilcetonurie este reflectată în *tabelul 28*. În eșantionul studiat cel mai întâlnit a fost genotipul D_1D_1 , constatat cu incidența de 0,78. Pe cromozomii normali acest genotip s-a depistat cu o frecvență de 0,55. Cel mai rar, atât pe cromozomii mutanți cât și pe cei normali, s-a determinat genotipul D_1D_2 (incidența de 0,19 și, respectiv, 0,33).

Analiza comparativă a caracterului repartiției locusului polimorf Bgl II al genei FAH, a arătat cu o marjă de încredere de 0,95, că incidențele genotipice printre bolnavii de FCU și la populația sănătoasă din Moldova diferă concludent ($\chi^2 = 7,73$; $df = 2$; $p < 0,05$).

Tabelul 28

Incidența mutațiilor genotipice și alelice ale locusului polimorf Bgl II al genei FAH la bolnavii de FCU din Republica Moldova

Genotipul / Alela	Cantitatea, n	Incidența	Eșantionul, n
D_1D_1	46	$0,780 \pm 0,053$	59
D_1D_2	11	$0,186 \pm 0,050$	
D_2D_2	2	$0,034 \pm 0,023$	
D_1	103	$0,873 \pm 0,030$	118
D_2	15	$0,127 \pm 0,030$	

Din diagrama din *fig. 17* se poate deduce că pe cromozomii mutanți, ca și pe cei sănătoși, prevalează alela D_1 , care s-a identificat cu o frec-

vență de 0,87 și, respectiv, 0,72. Pentru a estima veridicitatea diferențelor s-a aplicat criteriul χ^2 . Marja de probabilitate 0,99 arată la diferențe certe pentru repartiția alelelor Bgl II între cromozomii normali și cei mutați în populația RM ($\chi^2 = 9,22$; $df = 1$, $p < 0,01$).

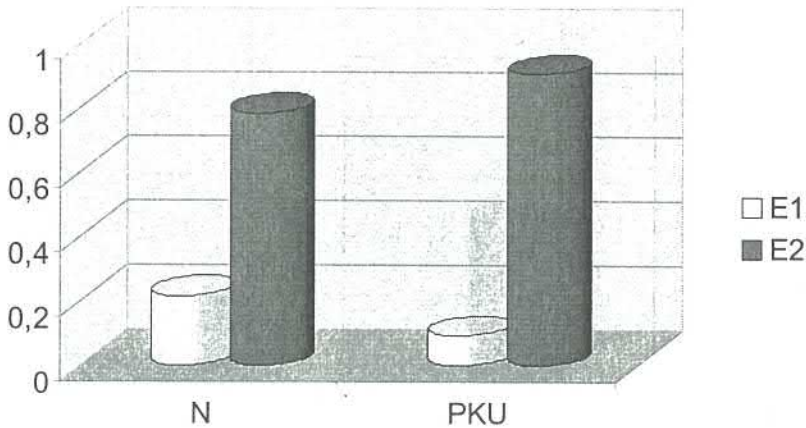


Fig. 17. Incidența alelelor sistemului Pvu II(a) ale genei FAH pe cromozomii normali și mutați în familiile marcate de FCU din Republica Moldova.

Tabelul 29

Incidența alelelor Bgl II ale genei FAH pe cromozomii mutați printre europeni și asiatici [Daiger, 1989a, 1989b]

Țara	Incidența alelelor	
	D ₁	D ₂
Danemarca	0,924 ± 0,01	0,076 ± 0,01
Elveția	0,947 ± 0,01	0,053 ± 0,01
Scotia	0,909 ± 0,01	0,091 ± 0,01
Germania	0,883 ± 0,02	0,117 ± 0,02
Franța	0,765 ± 0,02	0,235 ± 0,02
Ungaria	0,897 ± 0,02	0,103 ± 0,02
Cehoslovacia	0,969 ± 0,021	0,031 ± 0,01
Europa (valoarea medie)	0,891 ± 0,014	0,109 ± 0,014
China	0,929 ± 0,03	0,071 ± 0,03
Japonia	0,867 ± 0,02	0,133 ± 0,02
Asia (valoarea medie)	0,912 ± 0,037	0,088 ± 0,037

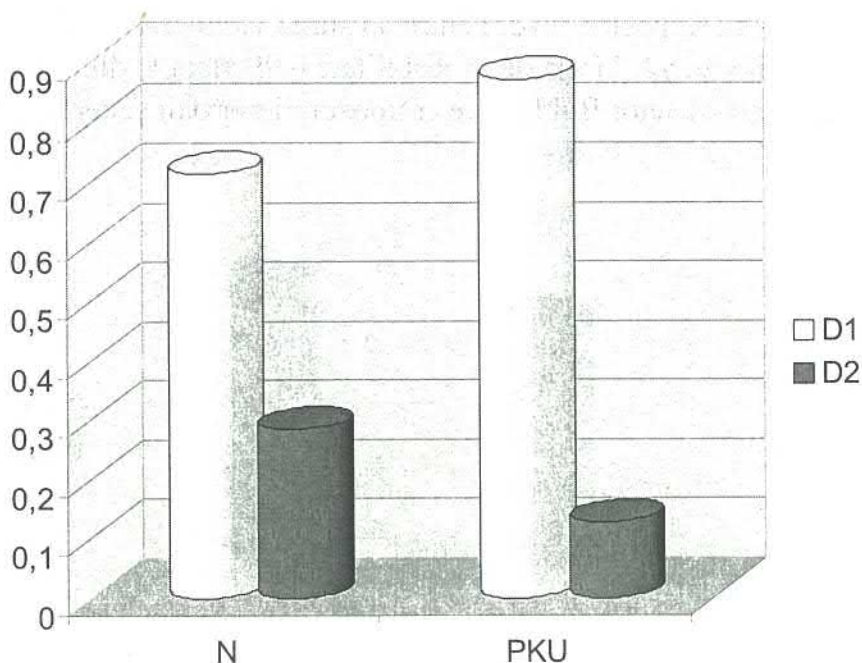


Fig. 18. Incidența alelelor Bgl II ale genei FAH pe cromozomii mutanți și cei normali în familiile cu FCU din Republica Moldova.

Compararea rezultatelor obținute cu informațiile prezentate în literatură (tab. 29) a arătat că repartiția de incidență a alelelor Bgl II ale genei FAH pe cromozomii mutanți printre locuitorii RM corespunde caracterului de repartiție a acestor alele printre europeni. Diferențe concludente pentru parametrul respectiv printre populația autohtonă și europeni nu s-au depistat ($\chi^2 = 0,20$; $d = 1$, $p > 0,8$). Nu s-au constatat diferențe semnificative pentru distribuția alelelor polimorfe Bgl II nici printre locuitorii Moldovei și popoarele din Asia ($\chi^2 = 0,95$; $d = 1$, $p > 0,7$).

În vederea aprecierii gradului de asociere a locusului polimorf cercetat cu mutațiile genei FAH, s-a calculat coeficientul standard de agregare disproporționată Δ_{st} . Valoarea acestuia a constituit 0,18, fiind comparabilă cu cea calculată pentru locusul polimorf Pvu II (a), dar diferită de datele obținute pentru locusul polimorf Msp I(a) – 0,25. O asemenea nesiguranță de angrenare a locusului polimorf Pvu II(a) cu mutațiile genei FAH îi diminuează cu mult valoarea diagnostică pentru detecția molecular-genetică a maladii.

Cu privire la studierea informativității diagnostice a sistemului polimorf, cercetat în cadrul aceluiași 43 de familii cu fenilketonurie, s-a constatat că sistemul Bgl II este absolut informativ pentru 3 familii (7%),

parțial informativ pentru 18(42%) și neinformativ pentru 22(51%). Informativitatea de ansamblu a sistemului Bgl II pentru examenul familiilor tarate de FCU a constituit 28%.

Investigarea celor patru locusuri polimorfe ale genei FAH a arătat, că cel mai susceptibil și de valoare practică în diagnosticul prenatal indirect și recunoașterea portajului heterozigot al fenilcetonuriei este sistemul VNTR. Dacă familia s-a dovedit a fi neinformativă după sistemul VNTR, este rațional de a utiliza în continuare locusul polimorf Msp I(a) pentru diagnosticul molecular-genetic al fenilcetonuriei.

Studiul molecular-genetic al mutațiilor genei FAH la bolnavii de FCU și în familiile cu risc major de dezvoltare a maladiei

Cea mai precisă metodă de diagnostic molecular este depistarea dereglărilor în succesiunea nucleotidică a ADN-ului. Orice tipuri de mutații se pot releva prin secvențierea ADN-ului. Depistarea genei complete a maladiei este adesea anevoioasă și costisitoare. De aceea, pentru a identifica mutațiile, se practică pe larg o tehnică mai simplă și mai ieftină – reacția de polimerizare în lanț (RPL), folosită și pentru diagnosticul prenatal al fătului, în baza ADN-ului recoltat din vilozitățile corionice și lichidul amniotic.

Frecvența celor mai răspândite mutații ale genei FAH

Cota înaltă de angajare a mutației R408W a genei FAH în dezvoltarea formelor severe de maladie printre popoarele europene (33–71%), ipoteza despre originea ei slavo-baltică, descoperirea metodei de detecție rapidă și sigură a acesteia [Иващенко, 1993] permit a utiliza respectivul locus pentru diagnosticul și identificarea portajului heterozigot al alelei mutante printre locuitorii RM.

Mutația dată constă în substituirea citozinei cu timină în poziția 1222 pe gena ADNc a FAH, care condiționează substituirea argininei prin triptofan în poziția 408 de pe molecula proteică (fig. 19), ceea ce determină pierderea a 97% din activitatea fermentului FAH [DiLella, 1987].

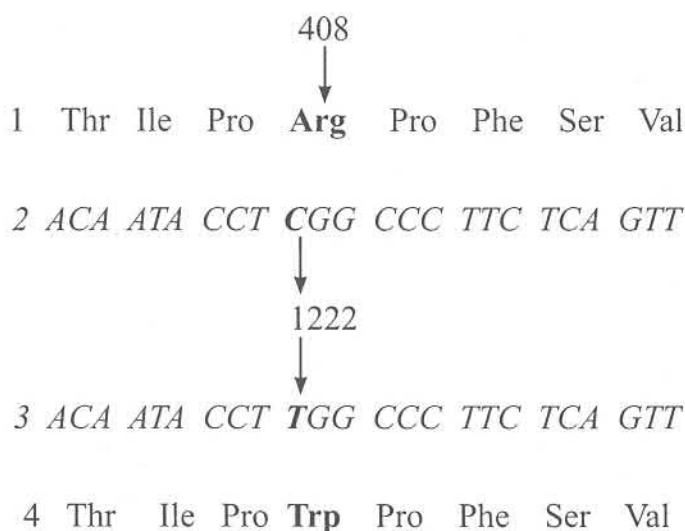


Fig. 19. Identificarea mutației R408W (caracterele negre indică nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă mutantă.

Mutația exonului 12, întâlnită frecvent în Europa de Est și de Nord, a fost identificată pe 58 din totalul de 118 cromozomi mutageni depistați printre locuitorii RM.

Asemeni altor popoare europene, R408W s-a dovedit a fi răspândit și printre moldoveni, constituind 49% din totalul de cromozomi mutanți (tab. 6). Reieșind din formula lui Hardy-Weinberg și în baza datelor obținute, s-a determinat incidența heterozigoților în eșantionul respectiv de familii cu risc pentru FCU (2pq=0, 4998). Prin urmare, fiecare al doilea examinat din respectivul eșantion este purtător heterozigot al mutației R408W.

La bolnavii de FCU și la părinții acestora s-a efectuat analiza RPFL pentru mutația R408W. Rezultatele acestui test sunt prezentate pe fig. 20 și în tab. 30.

Analiza realizată a arătat că la 43 din cele 59 de familii studiate dezvoltarea fenilcetonuriei s-a relaționat cu portajul mutației R408W în stare homo- și heterozigotă (25 și, respectiv, 48%). Deci, această mutație prezintă un grad înalt de informativitate în diagnosticul prenatal al maladii.

Datele incidenței R408W printre locuitorii republicii sunt comparabile cu cele obținute pentru populația unor țări europene: Slovacia (0,46),

Cehia și Polonia (0,55), dar diferă important de cele înregistrate în Siberia (0,66) și în Turcia (0,12), (tab. 6).

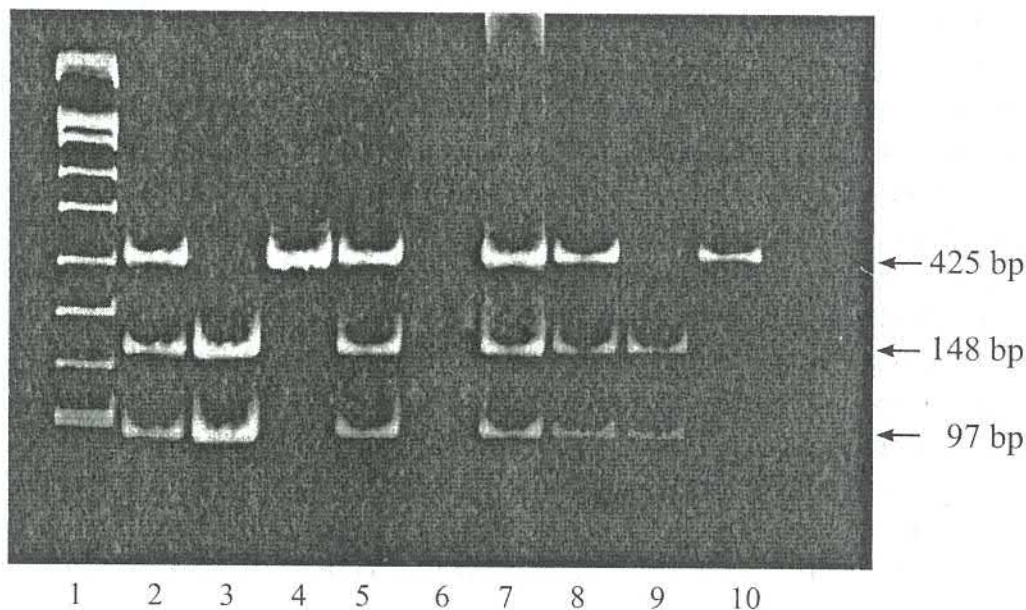


Fig. 20. Electroforegrama analizei ADN-nului exonului 12 de pe gena FAH (după restricția cu Sty I): 1- markerul masei moleculare pUC19/Msp I; 2, 5, 7, 8 - heterozigoți pentru mutația R408W; 4,10 - homoziigoți pentru alele normale;

În cazul bolnavilor cu fenilcetonurie, la care nu s-a depistat mutația R408W sau aceasta s-a apreciat în combinație heterozigotă pentru o mutație neidentificată, s-a recurs la analiza moleculară a 7 mutații ale genei FAH, cele mai răspândite printre popoarele europene.

Tabelul 30

Incidența mutației R408W a genei FAH în familiile cu bolnavi de FCN din Republica Moldova

Bolnavii de fenilcetonurie			Purtătorii heterozigoți ai mutației		
genotipul	nr.	frecvența	genotipul	nr.	frecvența
408/408	15	0,25	408/N	52	0,51
408/X	28	0,48	X/N	50	0,49
X/X	16	0,27	–	–	–

Notă. 408 – mutația R408W; X – alte mutații ale genei FAH; N – alela normală; nr. – numărul indivizilor examinați.

Printre locuitorii RM, pe locul doi după incidență s-a plasat mutația P281L, înregistrată în 5,1% din totalul de cromozomi mutanți pentru gena FAH (fig. 2). Reieșind din formula Hardy-Weinberg și în baza datelor obținute, s-a calculat incidența heterozigoților în eșantionul respectiv de familii cu risc pentru FCU ($2pq=0,0967$). Prin urmare, fiecare al zecelea individ din respectivul eșantion este purtător heterozigot al mutației P281L.

Mutația respectivă de patru ori a fost relevată în stare heterozigotă combinată cu mutația R408W (R408W/P281L) și de două ori în combinație cu o mutație neidentificată (P281L/X), (tab. 31). Mutația P281L interesează nucleotidul terminal al exonului 7 și apare în urma tranziției citozinei pe timină la nivelul bazei 842 a genei FAH, prin care se condiționează substituirea în produsul genetic a prolinei cu leucina (fig. 21) și astfel se reduce până la zero activitatea fermentului [Kalaydjieva, 1991].

Apreciind originea cromozomilor, pe care s-a depistat această leziune mutagenă, s-a constatat că cromozomii de geneză moldovenească constituie 71%, câte 12,5% de geneză găgăuză și ucraineană și 4% rusă.

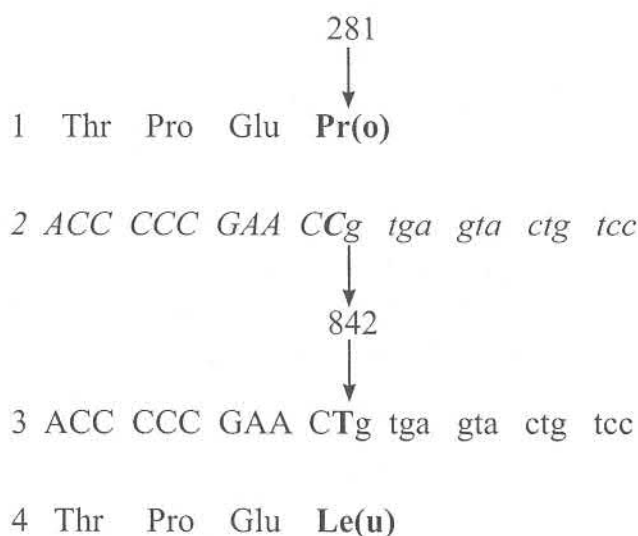


Fig. 21. Identificarea mutației P281L (cu caractere grase sunt marcate nucleotidele și amonoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune normală a genei; 3 – succesiune mutantă a genei; 4 – polipeptidă mutantă.

Mutația P281L a fost descrisă anterior la bolnavii din Europa de Sud-Est unde se atestă cu frecvență maximă în Horvatia (12%) [Baric, 1992] și în Grecia (10%) [Traiger-Synodinos, 1994]. Datele obținute pentru Mol-

dova sunt comparabile cu cele atestate printre locuitorii Sankt Petersburgului (4,3%) [Барановская, 995] și Germaniei (4,2%) [Zscocke, 1999].

Printre locuitorii Republicii Moldova mutația R261Q a fost depistată la patru bolnavi cu statut de heterozigoți. Prin urmare, frecvența mutației în eșantionul examinat este de 3,4%.

Reieșind din formula Hardy-Weinberg, și în baza datelor obținute s-a determinat incidența heterozigoților în eșantionul de familii cu risc pentru FCU ($2pq = 0,0656$). Prin urmare, fiecare al zecelea individ din eșantionul dat este purtător heterozigot al mutației R261Q

Defectul genetic este definit de substituirea guaninei cu adenină în poziția 782 a genei FAH, prin care se produce substituirea argininei cu glutamină, modificare ce se traduce prin reducerea activității enzimei FAH până la 47% [Tyfield, 1994], (fig. 22, 23). La doi bolnavi mutația R261Q s-a identificat în combinație heterozigotă cu mutația R408W (R261Q/R408W), iar la alți doi – cu o mutație neidentificată (R261Q/X).

Tabelul 31

Repartiția haplotipurilor mutante printre bolnavii de fenilcetonurie din Republica Moldova

Haplotipul	Nr. de bolnavi	Incidența, %
R408W/R408W	15	25,4
R408W/P281L	4	6,8
R408W/R252W	1	1,7
R408W/IVS12nt1	1	1,7
R158Q/R252W	1	1,7
R408W/R261Q	2	3,4
IVS10nt546/IVS10nt546	1	1,7
R252W/X	2	3,4
P281L/X	2	3,4
R158Q/X	2	3,4
R261Q/X	2	3,4
IVS10nt546/X	1	1,7
R408W/X	20	33,9
IVS12nt1/X	1	1,7
X/X	4	6,8
Total	59	100

Analizând genealogia cromozomilor, pe care s-a identificat mutația dată, s-a determinat că 62,5% din aceștia sunt de origine moldovenească și câte 12,5% revin cromozomilor de origine găgăuză și ucraineană.

Mutația R261Q se atestă practic la toate popoarele europene într-un diapazon procentual larg. Cea mai înaltă frecvență pentru această mutație se atestă în Elveția (32%) și Franța (17%) [Abadie, 1993]. Cota acestei mutații este relativ înaltă în Bașkortostan (9,8%) [Ahmetova, 2001], Portugalia (9,8%) [Caillaud, 1992] și în Slovenia (7,1%) [Kadasi, 1994]. Datele noastre sunt comparabile cu frecvența mutației în regiunea Moscova (3,2%) [Charicova, 1993] și în Spania (3,9%) [Perez, 1997] (tab. 6). Media de incidență a acestei mutații printre moldoveni corespunde cu datele din literatură pentru populațiile investigate anterior.

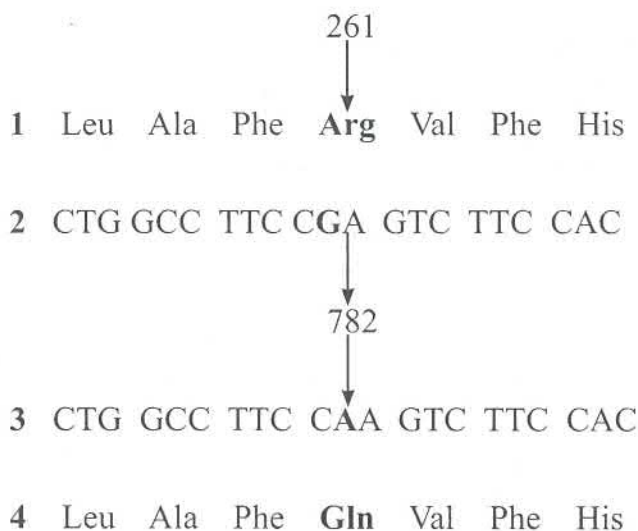


Fig. 22. Identificarea mutației R261Q (cu caractere negre sunt evidențiate nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă mutantă

Mutația R252W apare în urma transferului C spre T din baza 754 a genei FAH și conduce spre substituirea argininei cu triptofan în poziția 252 de pe molecula proteică (fig. 23 și 24). Această leziune mutațională generează stingerea completă a funcției FAH [Abadie, 1993].

În eșantionul cercetat, mutația în cauză s-a depistat pe patru cromozomi, ceea ce a constituit 3,4% din totalitatea cromozomilor mutanți circulanți în populația RM. Reieșind din formula Hardy-Weinberg și în

baza datelor obținute s-a determinat incidența heterozigoților în eșantionul respectiv de familii cu risc pentru FCU ($2pq=0,0656$). Rezultatele obținute indică faptul că fiecare al cincisprezecelea individ din respectivul eșantion este purtător heterozigot al mutației R252W.

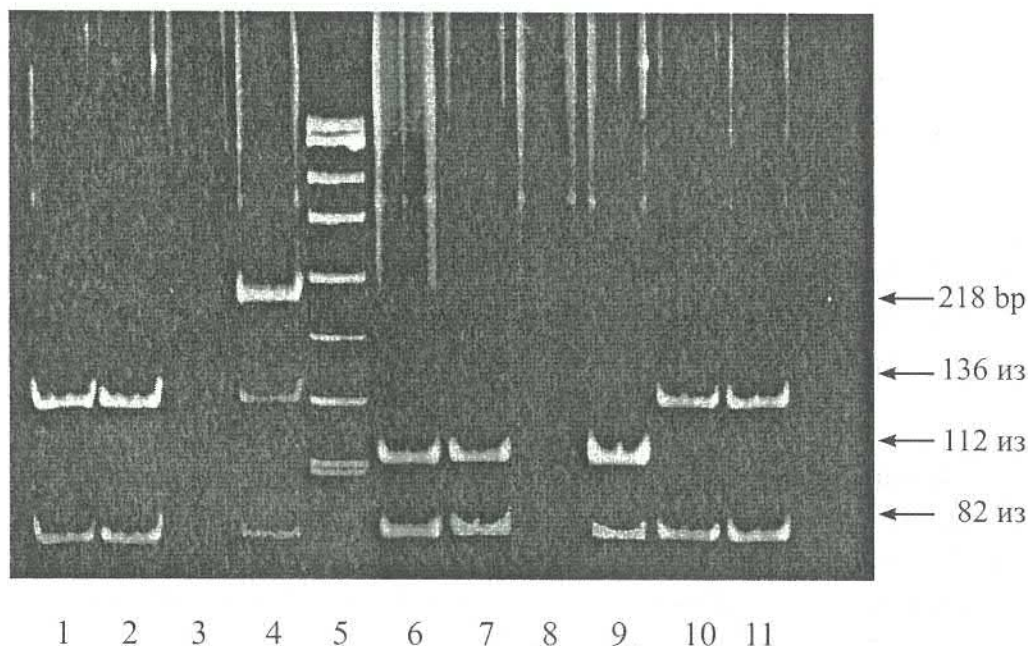


Fig. 23. Electroforegrama ADN-analizei exonului 7 al genei FAH (după restricția Hinf I și Ava I): 5 - markerul masei moleculare pUC19/Msp I; 1, 2, 6, 7, 8, 9 - bolnavi fără portajul mutațiilor R261Q și R252W; 4 - purtător heterozigot al mutației R261Q; 10, 11 - purtători heterozigoți ai mutației R252W.

Frecvența mutației R252W a fost mai înaltă la Sankt Petersburg (2,8%) [Барановская, 1995], în Bașkortostan (2,7%) [Ахметова, 2001] și în Portugalia (3,3%) [Cailaud, 1992]. Rezultă că frecvența de detecție a mutației R252W în RM este una din cele mai relevante din toate cele anterior atestate printre europeni.

La estimarea originii cromozomilor, pe care s-a identificat această mutație, s-a constatat că cromozomii de geneză moldovenească constituie 94%, iar restul – 6% sunt cromozomi de geneză rusească.

Printre bolnavii examinați, mutația dată s-a depistat o singură dată în combinație heterozigotă cu mutația R408W (R252W/ R408W), o dată în combinație cu mutația R158Q (R252W/ R158Q) și de două ori cu o mutație neidentificată (R252W/X).

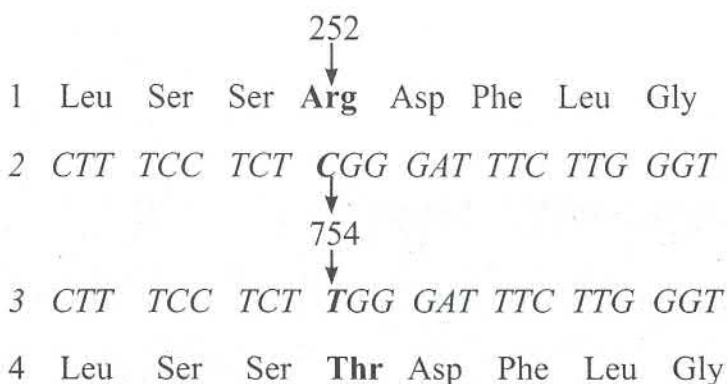


Fig. 24. Identificarea mutației R252W (cu caractere negre sunt indicate nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă mutantă.

Mutația R158Q este responsabilă de substituirea guaninei cu adenină la nivelul poziției 473 a genei FAH, care la rândul-i conduce la substituirea argininei cu glutamină în poziția 158 de pe molecula proteică a FAH. Prezența acestei mutații determină reducerea activității fermentative cu 90% [Okano, 1990], (fig. 25, 26). Cercetând originile cromozomilor pe care s-a detectat respectiva mutație, am determinat că 41,5% sunt de geneză moldovenească, 33% – găgăuză, 15,5% – rusească.

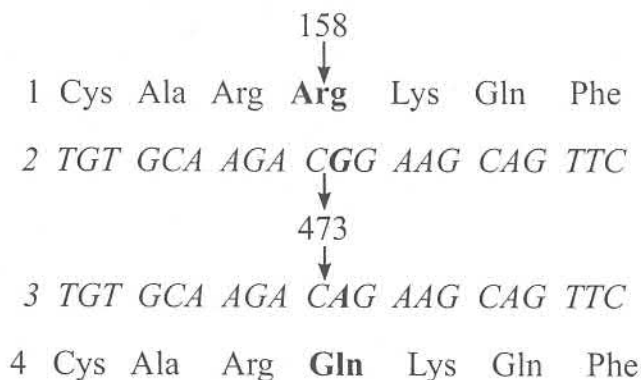


Fig. 25. Identificarea mutației R158Q (cu caractere negre sunt indicate nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă normală.

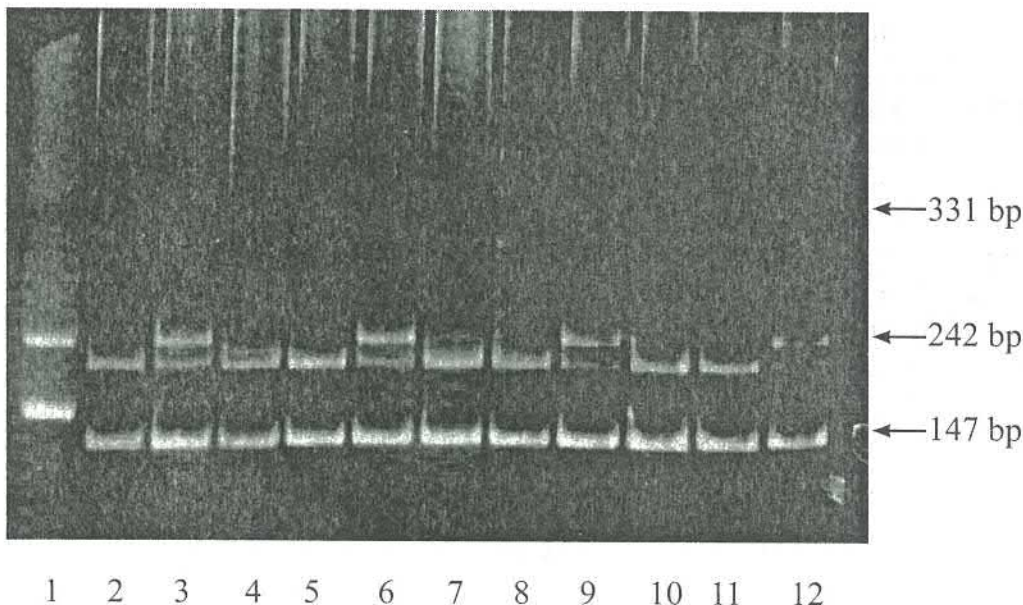


Fig. 26. Electroforegrama de analiză a ADN-ului exonilor 5 și 7 ai genei FAH (după restricția Msp I) 1 - markerul masei moleculare pUC19/Msp I; 1- probă pozitivă (218 și 162 bp); 2, 3, 4, 5, 6, 9 - bolnavi ce nu poartă mutațiile R158Q și P281L; 7,8 - purtătorii heterozigoți ai mutației R158Q; 10,11 - purtătorii heterozigoți ai mutației P281L.

În toate cazurile mutația R158Q a fost identificată în stare heterozigotă. Într-un caz, după cum am relatat anterior, în combinație heterozigotă cu mutația R252W (R158Q/252W) și în alte două – în componența unei mutații neidentificate (R158Q/X). Frecvența de detecție a acestei mutații în populația noastră este ceva mai redusă (2,5 %) decât în populațiile europene studiate anterior, dar comparabilă cu datele obținute pentru populația Turciei, în care R158Q s-a determinat cu frecvența de 2,3% [Ozguc, 1993b]. În Nederlande și Danemarca s-a înregistrat cea mai înaltă incidență a mutației respective (13,2%) [Meijer, 1993], comparativ înalte fiind valorile ei în Polonia (6,6%) [Zekanowski, 1994] și în Siberia (5,9%) [Смагулова, 2000].

Reieșind din formula Hardy-Weinberg și în baza frecvențelor deduse pentru respectiva mutație, a fost calculată incidența heterozigoților în eșantionul de familii cu risc înalt de FCU ($2pq = 0,0487$). Prin urmare, fiecare al douăzecelea individ din eșantionul examinat este purtător heterozigot al mutației R158Q.

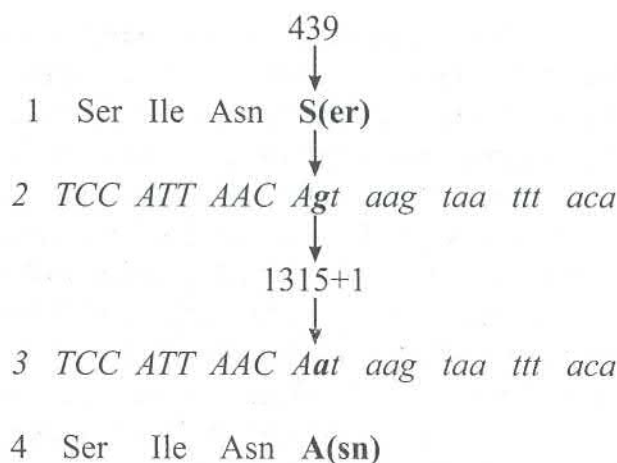


Fig. 30. Identificarea mutației de splicing IVS12nt1 (cu caractere negre sunt marcate nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă mutantă.

Analizând originile cromozomilor marcați de acest defect, am constatat o distribuție egală între cromozomii de origine moldovenească și țigănească.

Conform datelor din literatură, mutația IVS12nt1 este cea mai răspândită în Danemarca, unde a înregistrat 37,3% din totalul alelelor mutante [Guldberg, 1994 *ř*], și Marea Britanie, unde se atestă într-o proporție de 23% din cromozomi [Tyfield, 1994].

La doi bolnavi s-a depistat mutația splicing a intronului 12 în stare heterozigotică: la un proband în combinație heterozigotă cu mutația R408W (IVS12/R408W), la altul cu o mutație neidentificată (IVS12/X), ceea ce a constituit câte 1,7% din totalul haplotipurilor mutante, depistate printre populația RM.

În ansamblu, frecvența de detecție a mutației examinate a constituit 1,7%, proporție ce corespunde datelor atestate anterior pentru locuitorii Sankt Petersburgului (1,9%) [Барановская, 1995], Poloniei (2,3%) [Zygulska, 1991a].

Reieșind din formula Hardy-Weinberg și în baza datelor acumulate s-a calculat incidența heterozigoților în eșantionul respectiv de familii cu risc pentru FCU (2 pq = 0,0334). Cifra obținută indică că fiecare al treizecelea individ din eșantionul examinat este purtător heterozigot al mutației IVS12nt1.

Mutația I65T este indusă de substituirea timinei cu citozina în poziția 199 a exonului 3 al genei FAH, soldată cu substituirea izoleucinei prin treonină în poziția 65 a proteinei FAH (fig. 31). Această modificare generează reducerea activității funcționale a fenilalaninhidroxilazei cu 74% [John, 1992]. În eșantionul cercetat, această mutație nu a fost depistată. În Cehia această mutație a fost înregistrată într-un caz unic [Kozak, 1995a].

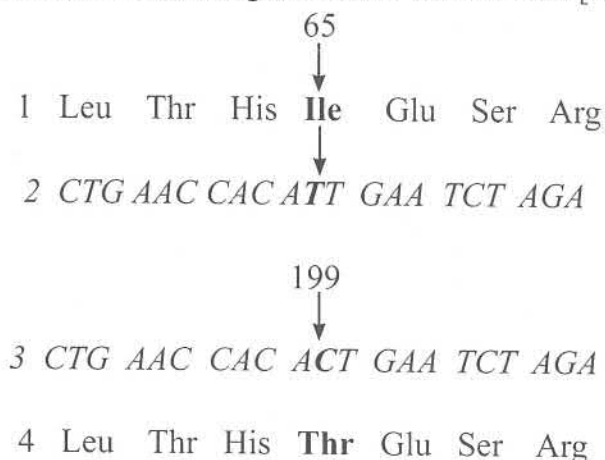


Fig. 31. Identificarea mutației I65T (cu caractere negre sunt notați nucleotidele și aminoacizii modificați): 1 – polipeptidă normală; 2 – succesiune genică normală; 3 – succesiune genică mutantă; 4 – polipeptidă mutantă.

În Spania s-a constatat cea mai înaltă incidență pentru mutația I65T, care atinge până la 10,1% [Perez, 1992]. În alte popoare investigate această mutație, ca și în Republica Moldova, nu a fost depistată.

Analiza incidenței asocierii diferitelor haplotipuri cu mutațiile genei fenilalaninhidroxilazei

Evidențierea modalităților de înlănțuire a mutațiilor cu haplotipurile genei FAH este necesară pentru a preciza originea mutației respective (timpul și mecanismul apariției) și pentru a urmări migrația populației (navigarea în derivă a mutațiilor caracteristice populației studiate). În acest context s-a efectuat analiza înlănțuirii dezechilibrată a patru haplotipuri de pe locusuri polimorfe VNTR – Msp I(a) – Pvu II(a) – Bgl II cu mutațiile evidențiate printre locuitorii RM (tab. 32). În urma acestei investigații s-a constatat că 49 din cei 58 cromozomi cu mutația R408W (84%) aveau

cel mai răspândit haplotip 380-A₂-E₂-D₁, care ține, conform datelor din literatură, de haplotipul RFPL 2 [Eisensmith, 1992; 1995]. Haplotipurile 380-A₂-E₁-D₁ și 530-A₂-E₂-D₁ purtau câte 7% cromozomi cu mutația R408W. Pentru precizarea aportului mutației R408W în formarea asocierii dezechilibrate cu gena maladiei pentru fiecare din locii studiați, s-a calculat valoarea coeficientului standard al înlănțuirii dezechilibrate în grupul de cromozomi mutanți. Valoarea maximă a Δst s-a înregistrat pentru alela VNTR 380 (0,58) și minimă pentru alela D₁ a locusului Bgl II (0,42).

Tabelul 32

Corelația haplotipurilor și a mutațiilor de pe gena FAH la bolnavii de fenilcetonurie din Republica Moldova

Haplotipul	R408W cantit.	P281L cantit.	IVS12 nt1 cantit.	R252W cantit.	IVS10 nt546 cantit.	R158Q cantit.	R261Q cantit.
380-A ₁ -E ₁ -D ₁	–	–	–	–	–	1	1
380-A ₁ -E ₂ -D ₁	–	–	–	–	–	1	–
380-A ₁ -E ₂ -D ₂	–	–	–	–	–	1	–
380-A ₂ -E ₁ -D ₁	4	–	–	–	–	–	–
380-A ₂ -E ₂ -D ₁	49	–	–	–	–	–	–
500-A ₂ -E ₂ -D ₁	–	3	–	–	–	–	–
500-A ₂ -E ₁ -D ₂	–	–	–	–	2	–	–
500-A ₂ -E ₂ -D ₂	–	–	–	–	1	–	–
530-A ₁ -E ₂ -D ₂	–	–	–	1	–	–	–
530-A ₁ -E ₂ -D ₁	–	–	1	–	–	–	–
530-A ₂ -E ₂ -D ₁	4	3	1	3	–	–	3
530-A ₂ -E ₂ -D ₂	1	–	–	–	–	–	–
Total	58	6	2	4	3	3	4

Potrivit lui Eisensmith (1992f), mutația R408W se atestă cu o frecvență înaltă în multe din statele europene, unde este asociată cu două haplotipuri diferite. În Europa de Nord-Vest mutația a relevat un înalt dezechilibru de înlănțuire cu haplotipul 1 RFPL (alela A₂ de pe locusul Msp I(a), alela E₂ de pe locusul Pvu II(a), alela D₁ de pe locusul Bgl II) și alela VNTR 530 bp. În statele est-europene, mutația R408W s-a prezentat strict asociată cu haplotipul RPFL 2 (alela A₂ de pe locusul Msp I(a), alela E₂

a locusului Pvu II(a), alela D₁ de pe locusul Bgl II) și cu alela VNTR 380 bp. Referindu-se la aceste probe, mulți autori susțin că ar exista două centre independente de inițiere a mutației R408W. Această presupunere este confirmată și de faptul că mutația respectivă afectează un nucleotid înalt mutagen – dinucleotidul CpG [Giannattasio, 1997]. Conform datelor din literatură, haplotipul 380-A₂-E₂-D₁, ce corespunde haplotipului RPFL 2, denotă o asociere exprimată cu mutația R408W (68%) în țările din Europa de Est și în cele din bazinul Mării Baltice, ceea ce indică originea slavo-baltică a mutației respective. Pe cromozomii normali acest haplotip se atestă cu o frecvență de valori moderate (6%).

Din analiza caracterelor de asociere a mutației R408W cu anumite haplotipuri ale cromozomilor mutați de pe locusurile studiate ale genei FAH, ar rezulta că această mutație în populația RM are rădăcini slavo-baltice, deoarece este agregată cu alela VNTR și haplotipul RFPL 2. În baza rezultatelor obținute se poate rezuma că mutația R408W a fost adusă în Moldova în urma valurilor migraționiste ale slavilor spre sud. Prezența în eșantionul de bolnavi din RM a altor haplotipuri asociate cu mutația R408W, se poate explica probabil prin aportul altor componente etnice în genofondul RM, în particular de geneză turcă (găgăuzii).

Mutația P281L s-a depistat pe șase cromozomi de etiologie diferită. Printre europeni această mutație se localizează pe cromozomii de haplotipul RPFL 1 sau 4, fiind cuplată cu diferite alele VNTR [Goltsov, 1992 a]. În eșantionul studiat s-a determinat asocierea mutației cu haplotipul RPFL 1, asociat cu VNTR 7 sau VNTR 8 (tab. 33).

Tabelul 33

Asocierea mutațiilor genei FAH cu alelele VNTR la bolnavii de fenilcetonurie din Republica Moldova.

Exonul/ intronul	Mutația	Alele mutante	Nr. de copii repetitive VNTR	Nr. de alele atașate
ex 12	R408W	58	3	58
ex 7	P281L	6	7 8	4 2
ex 7	R261Q	4	7 3	3 1
ex 7	R252W	4	8	4
ex 5	R158Q	3	3	3
int 11	IVS10	3	7	3
int 12	IVS12	2	8	2

Mutația R252W a fost depistată pe patru cromozomi de geneză moldovenească. În eșantionul examinat curent s-a determinat asocierea ei strânsă cu haplotipul RPFL 1, deoarece pe cromozomii determinați s-a atestat doar alela VNTR 530 bp. Conform datelor din literatură, această mutație se asociază cu haplotipul RPFL 1. Nu s-a identificat angrenarea ei cu anumite alele VNTR [Goltsov, 1992a].

Analiza corelației mutației R261Q cu haplotipul VNTR - Msp I(a) - Pvu II(a) - Bgl II a pus în evidență că trei cromozomi din cei patru (75%) se asociază cu haplotipul 530-A₂-E₂-D₁. Precum se știe, mutația R261Q este larg răspândită în multe state europene, unde se asociază cu haplotipul RPFL 1 și alela VNTR 530 bp [Meijer, 1993]. În eșantionul cercetat de noi am determinat un bolnav (haplotipul 380-A₁-E₁-D₁), la care, ca și la bolnavii de fenilcetonurie din Sankt Petersburg, această mutație s-a prezentat înlănțuită cu alela VNTR 380 bp [Барановская, 1996]. Prin urmare, asocierea acestei mutații cu două haplotipuri 1 sau 2 diferite presupune existența a două puncte independente de origine a acesteia în diferite populații de pe glob. Această ipoteză este confirmată de faptul că segmentul genic examinat este punctul mutagenic "fierbinte", deoarece conține dinucleotidul înalt mutagen CpG. În acest segment s-au depistat încă două mutații (R261X și R261P). Analiza datelor obținute a arătat că în eșantionul examinat mutația R261Q are două puncte de plecare diferite, într-un caz angrenată cu haplotipul 1 (530-A₂-E₂-D₁), analogic altor populații europene [Goltsov, 1992a], în alt caz - asociată cu haplotipul 380-A₁-E₁-D₁, asemeni afinității apreciate în eșantionul din Sankt Petersburg [Барановская, 1996]. Din cele relatate anterior rezidă că mutația R261Q a fost adusă în regiunea noastră prin migrația genei FAH atât din țările vest-europene, cât și prin filiera baltică.

Pe trei cromozomi, în temeii de origine moldovenească și găgăuză, s-a identificat mutația R158Q. Analiza informației despre incidența acestei mutații a arătat că în eșantionul cercetat, la fel ca și printre alte popoare europene, este evidentă asocierea intimă cu VNTR 3 și haplotipul RPFL 4.

Mutația splicing IVS10nt546 s-a determinat pe trei cromozomi, în majoritate de geneză găgăuză. În populațiile europene asemenea mutații comportă cromozomii cu diferite haplotipuri RPFL, asociate cu VNTR 6, VNTR 7 sau VNTR 8 [Goltsov, 1992 a]. Conform cercetărilor efectuate în populația Moldovei, mutația în cauză se asociază cu haplotipul RPFL 6 și se combină cu VNTR 7.

Mutația splicing IVS12nt1 s-a atestat pe un cromozom de geneză moldovenească și pe altul de origine țigănească. Din datele lui *Goltsov* (1992), în populațiile europene mutația este strâns asociată cu haplotipul RPFL 3, fiind combinată doar cu VNTR 8. În eșantionul cercetat s-a definit o asociere analogă.

Caracterul înlănțuirii haplotipurilor cu mutațiile genei FAH au relevat că mutațiile se asociază cu anumite haplotipuri, iar investigarea acestora poate facilita mult detectarea mutațiilor genei FAH, caracteristice populației din Republica Moldova.

Utilitatea practică a testului de detecție a mutațiilor și a haplotipurilor genei FAH pentru diagnosticul prenatal și detecția portajului heterozigot

Un procedeu eficient de prevenire a maladiilor ereditare este diagnosticul prenatal al acestora în familiile cu risc sporit care se bazează pe acumularea datelor exacte despre natura moleculară a genei și a succesiunilor sale flancante. Diagnosticul prenatal se poate realiza în două maniere tehnice: prin detecția directă a mutațiilor genei FAH și relevarea genei mutante prin analiza RPFL (diagnosticul indirect). Avantajul metodei directe constă în faptul că pentru evaluare nu se cere prezența copilului bolnav, iar precizia diagnosticului se apropie de cota absolută.

În cazul a 43 de familii complete s-a evaluat informativitatea sistemelor diagnostice studiate pentru bolnavii de FCU din RM. În toate aceste familii, folosind metode de diagnostic direct și indirect, au fost determinați purtătorii de cromozomi mutați. Rezultatele investigațiilor cu privire la distribuția genotipurilor mutagene la bolnavii de fenilcetonurie sunt expuse în *tabelul 31*. Estimând gradul de informativitate a celor 7 mutații examinate pentru diagnosticul prenatal, am constatat că metoda diagnosticului direct este informativă pentru 22 (51,1%) din aceste familii, parțial informativă pentru alte 19 (44,2%) și inpracticabilă în cazul a 2(4,7%) familii.

Pentru a majora rata de diagnosticare în familiile neinformative și parțial informative (48,9%), s-a recurs la diagnosticul indirect prin utilizarea locilor polimorfi examinați anterior, asociați cu gena FAH: VNTR, Msp I(a), Pvu II(a) и Bgl II.

Analiza sistemului VNTR a consemnat că printre familiile investigate pentru diagnosticul prenatal erau informative încă 10(23,3%) fami-

lii. După polimorfismul Msp I(a) au fost detectate două (4,7%) familii informative, iar după locusul Pvu II(a) polimorf, o altă (2,3%) familie. Informativitatea metodelor de diagnostic indirect a constituit 32,6% din informativitatea de ansamblu pentru diagnosticul FCU în populația Moldovei (fig. 32). Celelalte 7 familii au rămas parțial informative (16,3%), deoarece s-a reușit identificarea doar a unuia din cromozomii mutații.

În urma testelor de informativitate a metodelor de diagnostic direct și indirect s-a constatat că diagnosticului prenatal conform acestui sistem diagnostic s-au prestat total 81,4% și parțial (16,3%) practic toate familiile cu risc sporit de FCU din RM.

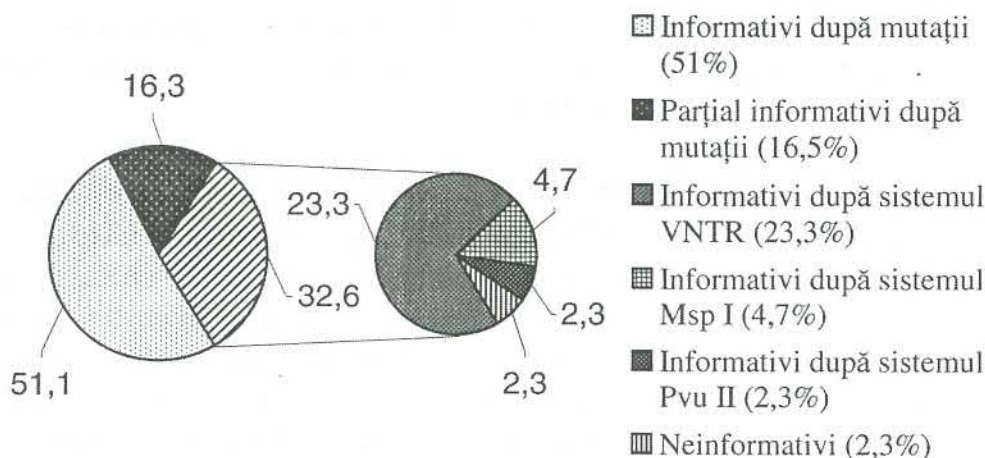


Fig. 32. Informativitatea sistemelor polimorfe VNTR, Msp I(a), Pvu II(a) și Bgl II pentru diagnosticul prenatal în familiile marcate de FCU.

În cadrul Laboratorului Diagnostic Molecular al Centrului Național Științifico-Practic de Sănătate Reproductivă, Genetică Medicală și Planificare Familială s-au efectuat teste de diagnostic prenatal pentru 5 familii cu FCU. Două familii s-au prezentat informative atât pentru diagnosticul direct (R408W), cât și pentru metodele indirecte (VNTR) de căutare a cromozomilor mutații. În ambele familii, probanzii erau purtători homozigoți ai mutației R408W și VNTR 3, iar la feții concepuți de aceștia s-a determinat starea de portaj heterozigot al R408W și prezența VNTR 3/8 nerelaționate cu gena FAH mutantă (fig. 33).

În celelalte familii diagnosticul prenatal s-a prestat numai testelor indirecte de identificare a haplotipurilor polimorfe, iar la probanzii din aceste familii s-au constatat mutații doar pe unul din cromozomii FCU. În

schimb aceste familii erau informative după sistemul VNTR. Diagnosticul prenatal a semnalat că în două familii feții sunt purtători heterozigoți ai genei FAH mutante, într-o altă familie fătul era sănătos, dar cu o probabilitate de 50% de a fi purtător heterozigot al genei mutante.

În 19 cazuri procedura de diagnostic a vizat decelarea portajului heterozigot al genei FAH la sibișii de generația I și II, în familiile cărora fusese descoperite mutații ale genei FAH, sau în cazul când acestea erau informative după haplotipurile polimorfe. În urma acestei analize s-a constatat că în 9 cazuri sibișii erau purtători ai genei mutante FAH. Li s-a recomandat aplicarea diagnosticului prenatal la viitorii descendenți.

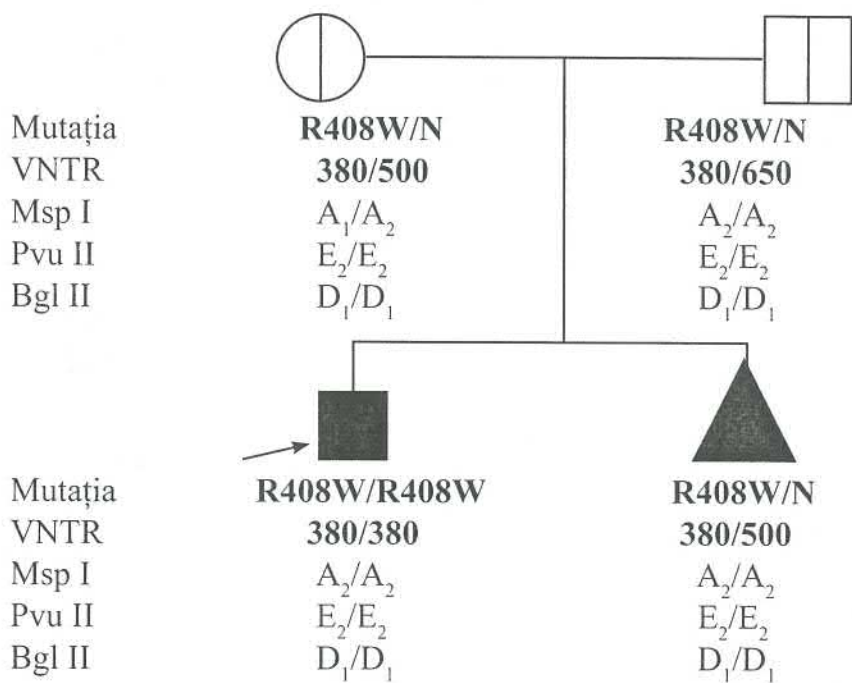


Fig. 33. Schema diagnosticului prenatal al FCU în familia K (sunt evidențiate alelele informative).

La 10 sibiși s-a constatat haplotip neangregat cu gena mutantă, prin urmare aceștia sunt liberi de portajul ereditar al maladii. Depistarea activă a heterozigoților cu ordonarea consulting-ului lor medico-genetic ulterior și monitorizarea prin banca de ADN poate deveni o modalitate rațională și foarte eficientă de profilaxie a acestei maladii ereditare.

Diagrama din *fig. 34* prezintă arborele genealogic al familiei P., în care probandul este purtător homozogot al mutației R408W, iar familia

de origine este informativă după locusul VNTR polimorf. În urma analizei haplotipului polimorf s-a dedus că sibisul este purtător heterozigot al mutației R408W și este purtător al aceluiaș set de alele polimorfe ca și mama probandului. Prin urmare, el este purtător heterozigot al genei FAH mutante. Probabilitatea că descendenții acestuia vor fi și ei purtători ai genei mutante este de cca 25%. În baza datelor investigației polimorfismului haplotipic și a mutațiilor genei FAH am elaborat schema etapelor diagnosticului prin metode moleculare-genetice în familiile cu risc sporit (fig. 35).

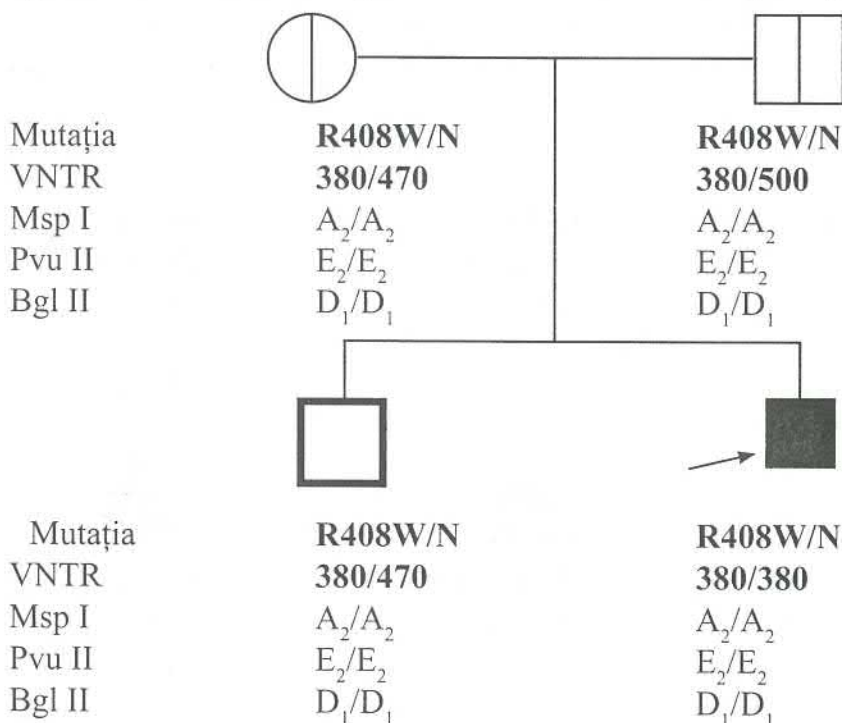


Fig. 34. Schema diagnosticului de portaj heterozigot al FCU în familia P. (cu caractere negre sunt evidențiate alelele informative).

Conform acestei scheme, investigația se va începe cu diagnosticarea directă a portajului mutației de incidență majoră printre locuitorii Republicii Moldova - R408W și a mutațiilor mai puțin răspândite de pe exonul 7 al genei FAH. În cazul când se atestă informativitatea plină a familiei cercetate, diagnosticul se va limita la metode de detecție directă.

În caz de informativitate parțială și neinformativitate absolută, se trece la diagnosticarea indirectă folosind haplotipii montați după locusurile polimorfe, asociate cu gena maladiei.

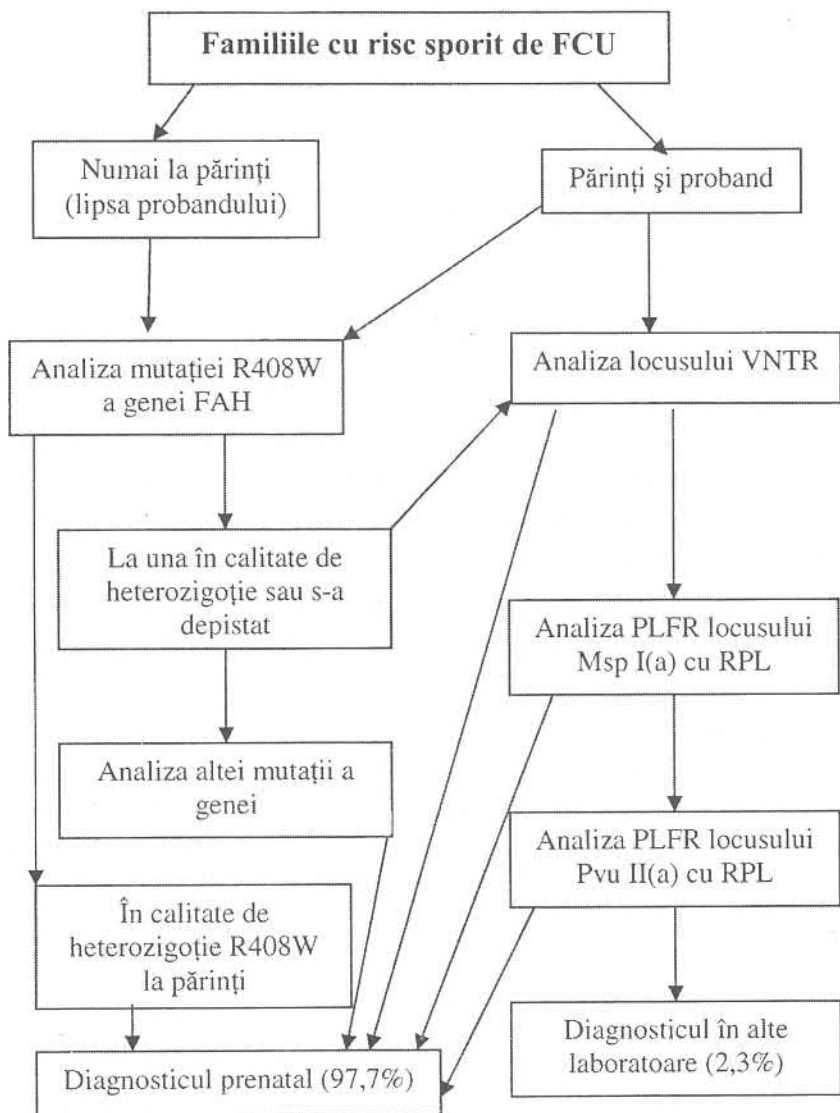


Fig. 35. Schema diagnosticului molecular-genetic al FCU printre populația Republicii Moldova.

Rezultatele studiului realizat atestă că evidențierea purtătorilor de alele mutante ale genei FAH în familiile bolnavilor de FCU prin analiza de frecvență a mutațiilor genei FAH și a haplotipurilor cu locusuri polimorfe VNTR și Msp I(a) se poate considera drept o metodă informativă și sigură de identificare a portajului heterozigot și de ordonare a diagnosticului prenatal al maladii cercetate.

Consultația genetică. Viitorii părinți, care se interesează despre riscul dezvoltării unei afecțiuni genetice la descendenții lor, pot veni la medic pentru o consultație genetică. De aceea, toți medicii trebuie să fie familiarizați cu principiile geneticii medicale în vederea consultării viitorilor părinți și acordării sfatului genetic. Prezintă un risc crescut de a avea descendenți cu o boală genetică cuplurile care au un copil bolnav sau rude apropiate bolnave. Dacă unul sau ambii părinți aparțin grupului cu risc sporit, mama este de vârstă înaintată, riscul nașterii unui copil bolnav crește. La prima etapă se determină valabilitatea diagnosticului. Aceasta necesită examinarea critică a datelor medicale existente sau evaluarea suplimentară a altor membri afectați ai familiei. Valabilitatea diagnosticului va fi influențată de existența etiologiilor multiple pentru un anumit fenotip și disponibilitatea investigațiilor diagnostice specifice.

Diagnosticul prenatal. Cuplul cu risc de a avea un copil cu o maladie genetică are mai multe opțiuni, care, în parte, depind de natura afecțiunii. În cazul unui cuplu cu 1 din 4 sau 25% șanse de a avea un copil cu fenilcetonurie, riscul în cazul însămânțării de la un donator va scădea la 1 din 130, sau la mai puțin de 1%, deoarece frecvența stării de purtător în populația generală este de 1 din 65. Dacă afecțiunea poate fi diagnosticată prenatal, cuplul poate decide realizarea actului reproductiv și poate folosi diagnosticul prenatal cu avortul selectiv al feților afectați. Cu ajutorul ecografiei se pot vizualiza numeroase malformații fetale și tulburări de creștere.

Concluzii

Diagnosticarea fenilcetonuriei permite de a iniția dietoterapia la timp și de a evita complicațiile. Pentru aceasta sunt necesare:

- screening-ul tuturor nou-născuților, identificarea riscului familial și efectuarea consultațiilor medico-genetice cu diagnosticarea ADN-ului;
- instruirea medicilor de familie în problema bolilor ereditare;
- crearea centrelor specializate pentru copiii cu fenilcetonurie.

Bibliografie

1. Abadie V. Jaruzelska J. Lyonnet S. Millasseau P. Munnich A. Rey J. Illegitimate transcription of the phenylalanine hydroxylase gene in lymphocytes for identification of mutations in phenylketonuria. *Human Molecular Genetics*, 1993, vol.2, no.1, p.31-34.
2. Apold J. Eiken G. Odland E. Fredriksen A. Bakken A. Lorens J. Boman H. A termination mutation prevalent in Norwegian haplotype 7 phenylketonuria genes. *American Journal of Human Genetics*, 1990, vol.47, p.1002-1007.
3. Apold J. Eiken H. Svensson E. Kunert E. Kozak L. Cechak P. Gil-tay J. Lichter-Konecki U. Melle D. The phehylketonuria G272X haplotype 7 mutation in European populations. *Human Genetics*, 1993, vol.92, no.2, p.107-109.
4. Baranovskaya S, Shevtsov S, Maksimova S, Kuzmin A, Schwartz E The mutations and VNTRs in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria in Sankt-Petersburg. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1996, vol.19, no.5, p.705.
5. Baric I. Mardesic D. Gjuric G. Sarnavka V. Gobel-Schreiner B. Lichter-Konecki U. Konecki D. Trefz F. Haplotype distribution and mutations at the PAH locus in Croatia. *Human Genetics*, 1992, vol.90, no.1-2, p.155-157.
6. Berthelon M. Caillaud C. Rey F. Labrune P. Melle D. Feingold J. Frezal J. Briard M. Farriaux J. Guibaund P. Journel H. Tron F. Rey J. Munnich A. Luonnet S. Spectrum of phenylketonuria mutations in Western Europe and North Africa, and their relation to polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus. *Human Genetics*, 1991, vol.86, p.355-358.
7. Bickel H. Bachman C. Beekers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *European Journal of Pediatrics*, 1981, vol.137, p.133-139.
8. Bjorgo E. Knappskog P. Apold J. Practical characterization and threedimensional structural localization of eight mutations in exon 7 of the human PAH gene associated with PKU. *European Journal of Biochemistry*, 1998, vol. 257, p.1-10.
9. Byck S. Morgan K. Tyfield L. Dworniczak B. Scriver C. Evidence for origin, by recurrent mutation, of phenylalanine hydroxylase R408W mutation on two haplotypes in European and Quebec populations. *Human Molecular Genetics*, 1994, vol.3, no.9, p.1675-1677.

10. Caillaud C. Vilarinho L. Vilarinho A. Rey F. Berthelon M. Santos R. Lyonnet S. Briard M. Osorio R. Rey J. Linkage disequilibrium between phenylketonuria and RFLP haplotype 1 at the phenylalanine hydroxylase locus in Portugal. *Human Genetics*, 1992, vol.89, no.1, p.69-72.

11. Carter K. Byck S. Waters P. Richards B. Nowacki P. Laframboise R. Lambert M. Treacy E. Scriver C. Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation: the Quebec experience. *European Journal of Human Genetics*, 1998, vol.6, p.61-70.

12. Chakraborty R. Lidsky A. Daiger S. Guttler F. Sullivan S. DiLella A. Woo S. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria. *Human Genetics*, 1987, vol.76, p.40-46.

13. Charicova E. Khalchitskii S. Antoshechkin A. Schwartz E. Distribution of some point mutations in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria patients from the Moscow region. *Human Heredity*, 1993, vol.43, no. 4, p. 244-249.

14. Charicova E. Novel mutation identified in the PAH gene. *Human Heredity*, 1996, vol.46, p.36-40.

15. Daiger S. Chakraborty R. Reed L. Fekete G. Schuler D. Berenssi G. Nasz I. Brdicka R. Karamyt J. Pijackova A. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in European families with phenylketonuria (PKU). *American Journal of Human Genetics*, 1989a, vol.45, p.310-318.

16. Daiger S. Reed L. Huang S. Zeng Y. Wang T. Lo W. Okano Y. Hase Y. Fukuda Y. Oura T. Tada K. Woo S. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in Asian families with phenylketonuria (PKU). *American Journal of Human Genetics*, 1989b, vol. 45, p.319-324.

17. De Lucca M. Perez B. Ugarte M. Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. *Human Mutation*, 1998, vol.11, no.5, p.354-359.

18. Degioanni A. Darlu P. Analysis of the molecular variance at the phenylalanine hydroxylase locus. *European Journal of Human Genetics*, 1994, vol.2, no.3, p.166-176.

19. Deka R. Chakraborty R. A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. *Genomics*, 1991, vol.11, p.83-92.

screening of phenylketonuria. *Prenatal Diagnosis*, 1994a, vol.14, no.12, p.1113-1118.

42. Eisensmith R. Okano Y. Dasovich M. Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *American Journal of Human Genetic*, 1992a, vol.51, no.6, p.1355-1365.

43. Eisensmith R. Woo S. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalanemias: mutation and polymorphism in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Human Mutation*, 1992b, vol.1, no.1, p.13-23.

44. Eisensmith R. Woo S. Population genetics of phenylketonuria. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994b, vol.407, p.19-26.

45. Eisensmith R. Martinez D. Kuzmin A. Goltsov A. Brown A. Singh R. Woo S. Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous southeastern US population. *Pediatrics*, 1996, vol.97, no.4, p.512-516.

46. Ellingsen S. Knappskog P. Apold J. Eiken H. Diverse PAH transcripts in lymphocytes of PKU patients with putative nonsense (G272X, Y356X) and missense (P281L, R408Q) mutations. *FEBS*, 1999, vol.457, no.3, p.505-508.

47. Erlandsen H. Stekens R. The structural basic of PKU. *Molecular Genetics&Metabolism*, 1999, vol.68, p.103-125.

48. Fang B. Analysis of RFLP haplotypes and point mutations at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in PKU families from north China. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1992a, vol.14, no.1, p.46-50.

49. Fang B. Yuan L. Wang T. Huang S. Wang T. Miao S. Ye J. Sun N. Lo H. Savio L. Detection of point mutations of the phenylalanine hydroxylase gene and prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Chinese Medical Science Journal*, 1992b, vol.7, no.4, p.205-208.

50. Folling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.4-10.

51. Giannittasio S. Surgelevicius V. PKU mutation sand linked haplotypes in the Lithuanian population: origin of the most common R408W mutation. *Human Heredity*, 1997, vol.47, no.3, p.155-160.

52. Goltsov A. Eisensmith R. Konecki D. Lichter-Konecki U. Woo S. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *American Journal of Human Genetics*, 1992a, vol.51, no.3, p.627-636.

53. Goltsov A. Eisensmith R. Naughton E. Jin L. Chakraborty R. Woo S. A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. *Human Molecular Genetics*, 1993, vol.2, no.5, p.577-581.
54. Goltsov A. Eisensmith R. Woo S. Detection of the Xmn I RFLP at the human (PAH) locus by PCR. *Nucleic Acids Research*, 1992b, vol.20, no.4, p.927.
55. Guldberg P. Rey F. Zschocke J. Romano V. Francois B. Michiels L. Ullrich K. Hoffmann G. Burgard P. Schmidt H. Meli C. Riva E. Dianzani I. Ponzzone A. Rey J. Guttler F. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotypebased prediction of metabolic phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 1998, vol.63, no.1, p.71-79.
56. Guldberg P. Guttler F. Mutation in the phenylalanine hydroxylase gene: methods for their characterisation. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994a, vol.407, p.27-33.
57. Guldberg P. Henriksen K. Guttler F. Molecular analysis of pheylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 1993, vol.17, no.1, p.141-146.
58. Guldberg P. Henriksen K. Mikkelsen I. Sapila I. PKU in a low incidence population: molecular characterization of mutations in Finland. *Journal of Medical Genetics*, 1995a, vol.32, p.976-978.
59. Guldberg P. Levy H. Koch R. Berlin C. Francois B. Henriksen K. Guttler F. Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency. Inheritance and expression of the hyperphenylalaninimias. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1994b, vol.17, no.6, p.645-651.
60. Guldberg P. Levy L. Hanley W. PAH gene mutation in the US: report from maternal PKU collaborative study. *American Journal of Human Genetics*, 1996, vol.59, p.84-94.
61. Guldberg P. Mikkelsen I. Henriksen K. Lou H. In vivo assessment of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene by phenylalanine loading: characterisation of seven common mutations. *European Journal of Paediatrics*, 1995b, vol.154, no.7, p.551-556.
62. Guttler F. Guldberg P. Mutation in the phenylalanine hydroxylase

gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.49-56.

63. Guttler F. Ledley F. Lidsky A. DiLella A. Sullivan S. Woo S. Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenylalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. *Journal of Pediatrics*, 1987, vol.-10, no.2, p.68-71.

64. Hitzeroth H. Niehaus C. Brill D. Phenylketonuria in South Africa. A report on the status quo. *South African Medical Journal*, 1995, vol.85, no.1, p.33-36.

65. Hoffman K. Steel G. Kazazian H. Valle D. Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *American Journal of Human Genetics*, 1991, vol.48, p.791-798.

66. Jaruzelska J. Matuszak R. Lyonnet S. Rey F. Filipowicz J. Borski K. Munnich A. Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *Journal of Medical Genetics*, 1993a, vol.30, no.3, p.232-234.

67. Jaruzelska J. Melle D. Matuszak R. Borski K. Munnich A. A new 15 bp deletion in exon 11 of the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Human Molecular Genetics*, 1992, vol.1, no.9, p.763-764.

68. Jennings I. Cotton R. Kobe B. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *European Journal of Human Genetics*, 2000, vol.8, p.683-696.

69. John S. Rozen R. Laframboise R. Laberge C. Scriver C. Novel PKU mutation on haplotype 2 in French-Canadians. *American Journal of Human Genetics*, 1989, vol.45, p.905-909.

70. John S., Scriver C., Laframboise R, Rozen R. In vitro and in vivo correlations for I65T and M1V mutations at the phenylalanine hydroxylase locus. *Human Mutation*, 1992, vol.1, no.2, p.147-153.

71. Kadasi L. Polacova H. Feracova E. Hudeciva S. Bohusova N. Szomolayova I. Hruscovich I. Moschonas N. Ferak V. Pku in Slovakia: mutation screening and haplotype analysis. *Human Genetics*, 1995, vol.95, no.1, p.112-114.

72. Kalaydjieva L. Dworniczak B. Kremensky I. Koprivarova K. Radeva B. Milusheva R. Aulehla-Scholz C. Heterogeneity of mutations in Bulgarian phenylketonuria haplotype 1 and 4 alleles. *Clinical Genetics*, 1992a, vol.41, no.3, p.123-128.

73. Kalaydjieva L. Dworniczak B. Geographical distribution gradients of the major PKU mutation at the linked haplotypes. *Human Genetics*, 1991, vol.86, p.411-413.

74. Kalaydjieva L. Kremensky I. Screening for phenylketonuria in a totalitarian state. *Journal of Medical Genetics*, 1992b, vol.29, no.9, p.656-658.

75. Kayalp E. Treacy E. Waters P. Byck S. Nowacki P. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a met analysis of genotype-phenotype correlations. *American Journal of Human Genetics*, 1997, vol.61, no.6, p.1309-1317.

76. Kirkman H. Carrol C. Fifteen year experience with screening for PKU with automated fluorometric method. *American Journal of Human Genetics*, 1982, vol.34, p.743-752.

77. Kleiman S. Avigad S. Vanagaite L. Shmuelevits A. David M. Eisensmith R. Brand N. Schwartz G. Rey F. Origins of hyperphenylalaninaemia in Israel. *European Journal of Human Genetics*, 1994, vol.2, no.1, p.24-34.

78. Kleiman S. Bernstein J. Schwartz G. Eisensmith R. Woo S. Shiloh Y. A detective splice site at the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria and benign hyperphenylalanemia among Palestinian Arabs. *Human Mutation*, 1992, vol.1, no.4, p.340-343.

79. Kleiman S. Li J. Schwartz G. Eisensmith R. Woo S. Shiloh Y. Inactivation of phenylalanine hydroxylase by a missence mutation, R270S, in a Palestinian kinship with phenylketonuria. *Human Molecular Genetics*, 1993a, vol.2, no.5, p.605-606.

80. Kleiman S. Vanagaite L. Bernstein J. Brand N. Woo S. Shiloh Y. Phehylketonuria: variable phenotypic outcomes of the R261Q mutation and maternal PKU in the offspring of a healthy homozygote. *Journal of Medical Genetics*, 1993b, vol.30, no.4, p.284-288.

81. Knappskog P. Eiken H. Martinez A. Flatmark T. Apold J. The PKU mutation S349P causes complete loss of catalytic activity in the recombinant phenylalanine hydroxylase enzyme. *Human Genetics*, 1995, vol.95, no.2, p.171-173.

82. Knappskog P. Eiken H., Martinez A., Bruland O, Apold J, Flatmark T. PKU mutation (D143G) associated with an apparent high residual enzyme activity: expression of a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase in three different systems. *Human Mutation*, 1996, vol.8, no.3, p.236-246.

83. Kozak L. Dvorakova D. Pijackova A. Kamaryt J. Haplotype distribution at the phenylalanine hydroxylase locus in PKU families from Moravian area of Czechoslovakia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1993, vol.16, no.2, p.451-456.

84. Kozak L. Kuhrova V. Blazkova M. Fajkusova L. Dvorakova D. Pijackova A. Advances in the diagnosis of phenylketonuria with the introduction of direct detection of PAH gene mutation. *Casopis Lecaru Ceskych*, 1995a, vol.134, no.12, p.385-387.

85. Kozak L. Kuhrova V. Blazkova M. Romano V. Fajkusova L. Dvorakova D. Phenylketonuria mutations and their relation to RFLP haplotypes at the PAH locus in Czech PKU families. *Human Genetics*, 1995b, vol.96, no.4, p.472-476.

86. Kucinskas V. Jurgelevicius V. Cimbaliene L. Holmgren G. Distributions of phenylalanine hydroxylase mutations and haplotypes in Lithuanian phenylketonuria patients. *Human Heredity*, 1994, vol.44, no.2, p.110-113.

87. Li J. Eisensmith R. Wang T. Lo H. Huang S. Zeng Y. Yuan L. Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. *Genomics*, 1992, vol.13, no.3, p.894-895.

88. Lidsky A. Ledley F. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in human genome. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1985, vol.82, p.6221-6225.

89. Lidsky A. Robson K. Thirumalachary C. The PKU locus in man is on Chr.12. *American Journal of Human Genetics*, 1984, vol.36, p.527-533.

90. Lin C. Hsiao K. Tsai T. Chao H. Identifications of a missense phenylketonuria mutation at codon 408 in Chinese. *Human Genetics*, 1992, vol.89, no.6, p.593-596.

91. Luonnet S. Caillaud C. Rey F. Berthelon M. Frezal J. Rey J. Munnich A. Molecular genetics of phenylketonuria in Mediterranean countries: a mutation associated with partial phenylalanine hydroxylase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 1989, vol.44, p.511-517.

92. Mallolas J. Guzzetta V. Mutational spectrum of PAH deficiency in the populations resident in Catalonia. *Human Genetics*, 1999, vol.3, no.3, p.297-299.

93. Mardesic P. Gjuric G. Jancikovic S. Screening for PKU in Yugoslavia (SR Croatia) in 1979-1984. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1986, vol.9, p.234-236.

94. McCabe E. McCabe L. Mosher G. Newborn screening for PKU: predictive validity as function of age. *Pediatrics*, 1983, vol.72, p.390-398.
95. Meijer H. Jongbloed R. Hekking M. Spaapen L. Geraedts J. RFLP haplotyping and mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Dutch phenylketonuria families. *Human Genetics*, 1993, vol.92, no.6, p.588-592.
96. Nicolini H. Cruz C. Camarena B. Fernanda Merino M. Bilbao G. Vela M. Velazquez A. Perez B. Desviat L. Ugarte M. Molecular analysis of phenylalanine hydroxylase gene in Mexican phenylketonuric patients. *Archives of Medical Research*, 1995, vol.26, no.1, p.53-57.
97. Okano Y. Hase Y. Lee D. Furruyamam J. Shintaku H. Oura T. Isshiki G. Frequency and distribution of phenylketonuric mutation in Orientals. *Human Mutation*, 1992, vol.1, no.3, p.216-220.
98. Okano Y. Wang T. Eisensmith R. PKU mutations among Caucasians. *American Journal of Human Genetics*, 1989, vol.45, p.211-212.
99. Okano Y. Wang T. Eisensmith R. Steinmann B. Gitzelmann R. Woo S. Missense mutations associated with RFLP haplotypes 1 and 4 of the phenylalanine hydroxylase gene. *American Journal of Human Genetics*, 1990, vol.46, p.18-25.
100. Okano Y. Wang T. Eisensmith R. Steinmann B. Gitzelmann R. PKU missense mutations in the Mediterranean. *Genomics*, 1991, vol.9, p.96-103.
101. O'neill C. Eisensmith R. Croke D. Naughten E. Cahalane S. Woo S. Molecular analysis of PKU in Ireland. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.43-44.
102. Orita M. Suzuki Y. Sekiya T. Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, vol.5, p.874-879.
103. Osorio R. Vilarinho L. Soares J. Neonatal screening for phenylketonuria, congenital hypothyroidism and congenital adrenal hyperplasia. *Acta Medica Portuguesa*, 1992, vol.5, no.3, p.131-134.
104. Ozalp Y. Coscun T. Ceyhan M. Incidence of PKU and hyperphenylalanemia in a sample of the Turkish newborn population. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1986, vol.9, no.2, p.237-239.
105. Ozguc M. Ozalp I. Coscun T. Yilmaz E. Ayter S. Frequency of the IVS10nt546 mutation in 44 Turkish phenylketonuria patients. *Turkish Journal of Pediatrics*, 1993a, vol.35, no.1, p.11-14.

106. Ozguc M. Ozalp I. Coscun T. Yilmaz E. Erdem H. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *Journal of Medical Genetics*, 1993b, vol.30, no.2, p.129-130.
107. Perez B. Destiviati L. Ugarte M. Analysis of the PAH gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *American Journal of Human Genetics*, 1997, vol.60, p.95-102.
108. Perez B. Desviati L. Delucca M. Ugarte M. Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.34-36.
109. Perez B. Desviati L. Ugarte M. Mutation analysis of phenylketonuria in Spain: prevalence of two Mediterranean mutations. *Human Genetics*, 1992, vol.89, no.3, p.341-342.
110. Perez B. Desviati L. Ugarte M. Expression analysis of mutation P244L, which caused mild hyperphenylalanemia. *Human Mutation*, 1995, vol.5, p.188-190.
111. Popescu T. Mutation spectrum and PAH RFLP/-VNTR background in 44 Romanian PKU alleles. *Human Mutation*, 1998, vol.12, no.5, p.314-319.
112. Ramus S. Forrest S. Cotton R. Illegitimate transcriptions of phenylalanine hydroxylase for detection of mutation in patients with phenylketonuria. *Human Mutation*, 1992a, vol.1, no.2, p.154-158.
113. Ramus S. Forrest S. Saleeba J. CpG Hotspot causes second mutation in codon 408 of the phenylalanine hydroxylase gene. *Human Genetics*, 1992b, vol.90, no.1-2, p.147-148.
114. Ramus S. Treacy E. Cotton R. Characterisation of phenylalanine hydroxylase alleles in untreated phenylketonuria patients from Victoria, Australia: origin of alleles and haplotypes. *American Journal of Human Genetics*, 1995, vol.56, no.5, p.1034-1041.
115. Rivera I. Leandro P. Lichter-Konecki U. Tavares De Almeida I. Lechner M. Population genetics of hyperphenylalaninemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *Journal of Medical Genetics*, 1998, vol.35, no.4, p.301-304.
116. Romano V. Dianzani I. Ponzzone A. Zammarchi E. Eisensmith R. Ceratto N. Bosco P. Indelicato A. Prenatal diagnosis by minisatellite analysis in Italian families with phenylketonuria. *Prenatal Diagnosis*, 1994a, vol.14, no.10, p.959-962.

117. Romano V. Cali F. Guldberg P. Guttler F. Indelicato A. Bosco P. Ceratto N. Association between haplotypes, Hind III-VNTR alleles and mutations at the PAH locus in Sicily. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994b, vol.407, p.39-40.
118. Romeo G. Menozzi P. Ferlini A. Incidence of classic PKU in Italy estimated from consanguineous marriages and from neonatal screening. *Clinical Genetics*, 1983, vol.24, p.339-345.
119. Rozen R. Mascisch A. Lambert M. Laframboise R. Scriver C. Mutation profiles of phenylketonuria in Quebec populations: evidence of stratification and novel mutations. *American Journal of Human Genetics*, 1994, vol. 55, no.2, p.321-326.
120. Saugstad L. Frequency of phenylketonuria in Norway. *Clinical Genetics*, 1995, vol.7, p.40-51.
121. Schwartz E. Khalchizky N. Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on Guthrie cards. *Lancet*, 1990, vol.136, p.639-640.
122. Sueoka H. Nagao M. Chiba S. Rapid mutation screening of phenylketonuria by polymerase chain reaction linked restriction enzyme assay and direct sequence of the phenylalanine hydroxylase gene: clinical application in northern Japan and northern China. *Genetic Testing*, 2000, vol.4, no.3, p.249-256.
123. Sucoka H. Zekanowski C. Mutation screening of PKU in Far East of Russia. *Journal of Human Genetics*, 1999, vol.22, no.6, p.368-371.
124. Svensson E. Eisensmith R. Dworniczak B. Von Döbeln U. Hagenfeldt L. Horst J. Two missense mutation causing mild hyperphenylalanemia associated with haplotype 12. *Human Mutation*, 1992, vol.1, no.2, p.129-137.
125. Svensson E. Von Döbeln U. Eisensmith R. Woo S. Relations between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia patients. *European Journal of Paediatrics*, 1993a, vol.152, no.2, p.132-139.
126. Svensson E. Von Döbeln U. Hagenfeldt L. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus and their relation to phenotype in Swedish phenylketonuria families. *Human Genetics*, 1991, vol.87, p.11-17.
127. Svensson E. Wang Y. Eisensmith R. Hagenfeldt L. Three poly-

morphisms but no diseasecausing mutations in the proximal part of the promoter of the phenylalanine hydroxylase gene. *European Journal of Human Genetics*, 1993b, vol.1, no.4, p.306-313.

128. Takarada Y. Yamashita K. Kagawa S. Zhang Q. Matsuoka A. Genetic diagnosis of phenylketonuria. III. Mutation of phenylalanine hydroxylase gene in Orientals. *Japanese Journal of Clinical Pathology*, 1994a, vol.42, no.11, p.1158-1164.

129. Takarada Y. Yamashita K. Kalanin J. Kagawa S. Matsuoka A. Genetic diagnosis of phenylketonuria. IV. Mutation of phenylalanine hydroxylase gene in Caucasian and Gypsy populations in Czech and Slovakia Republics. *Japanese Journal of Clinical Pathology*, 1994b, vol.42, no.11, p.1165-1171.

130. Traeger-Synodinos J. Kanavakis E. Kalogerakou M. Soulpi K. Missiou-Tsangarakis S. Preliminary mutation analysis in phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Human Genetics*, 1994, vol.94, no.5, p.573-575.

131. Treacy E. Byck S. Clow C. Scriver C. „Celtic” phenylketonuria chromosomes found? Evidence in two regions of Quebec Province. *European Journal of Human Genetics*, 1993, vol.1, no.3, p.220-228.

132. Tsukerman G. Kirilova I. Kanavakis E. Gusina N. Population control of Genetics diseases in Belarus: status and development. *Brazilian Journal of Genetics*, 1996, vol.19, no.2, p.75-77.

133. Tyfield L. Stephenson A. Bidwell J. Wood N. Cockburn F. Harvie A. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene using heteroduplex analysis with synthetic DNA constructs. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.47-48.

134. Wang T. Okano Y. Eisensmith R. Lo W. Huang S. Zeng Y. Yuan L. Liu S. Woo S. Missense mutations prevalent in Orientals with phenylketonuria: molecular characterization and clinical implications. *Genomic*, 1991, vol.10, no.2, p.449-456.

135. Wang T. Okano Y. Eisensmith R. Lo W. Huang S. Zeng Y. Yuan L. Liu S. Woo S. Identification of three novel mutations among Chinese: evidence for recombination or recurrent mutation at the PAH locus. *Genomics*, 1992, vol.12, no.1, p.230-231.

136. Weinstein M. Eisensmith R. Abadie V. Avigad S. Lyonnet S. Schwartz G. Munnich A. Woo S. Shiloh Y. A missense mutation, S349P, completely activates phenylalanine hydroxylase in North Afri-

can Jews with phenylketonuria. *Human Genetics*, 1993, vol.90, no.6, p.645-649.

137. Woo S. Lidsky A. Guttler F. Robson C. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*, 1983, vol.306, no.10, p.151-155.

138. Wood N. Tyfield L. Bidwell J. Rapid classification of phenylketonuria haplotypes by analysis of heteroduplexes, generated by PCR-amplifiable synthetic DNA. *Human Mutation*, 1993, vol.2, no.2, p.131-137.

139. Yao Y. Matsubara Y. Narisawa K. Rapid detection of phenylketonuria mutations by non-radioactive singlestrand conformation polymorphism analysis. *Acta Paediatrica Japonica*, 1994, vol.36, no.3, p.231-235.

140. Zekanowski C. Nowacka M. Zygulska M. Horst J. Cabalska B. Mazurczak T. Frequency of the most common mutations responsible for phenylketonuria in Poland. *Molecular & Cellular Probes*. 1994, vol.8, no.4, p.323-324.

141. Zschocke J. Graham C. Carson D. Nevin N. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. *American Journal of Human Genetics*, 1995, vol.57, no.6, p.1311-1317.

142. Zschocke J. Graham C. Mcknight J. Nevin N. The STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene: true fragment length obtained with fluorescent labelled PCR primers. *Acta Paediatrica*, Supplement, 1994, vol.407, p.41-42.

143. Zschocke J. Hoffman G. Pku mutations in Germany. *Human Genetics*, 1999, vol.48, p.791-798.

144. Zygulska M. Eigel A. Dworniczak B. Sutkowska A. Pietrzyk J. Horst J. Phenylketonuria in Poland: 66% of PKU alleles are caused by three mutations. *Human Genetics*, 1991a, vol.88, no.1, p.91-94.

145. Zygulska M. Eigel A. Aulehla-Scholz C. Pietrzyk J. Horst J. Molecular analysis of PKU haplotypes in the population of southern Poland. *Human Genetics*, 1991b, vol.86, p.292-294.

146. Анненков Г. Сафронова Е. Губерниева Л. Волкова Н. Определение активности фенилаланингидроксилазы в лейкоцитах и фибробластах человека. Вопросы Медицинской Химии, 1980, т.26, no.6, С.723-726.

147. Афанасьева Р. Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика пациентов с ФКУ в республике Крым. Цитология и Генетика, 1998, т.32, no.1, С.8-14.

148. Ахметова В. Викторова Т. Хуснутдинова Э. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма VNTR аллелей гена фенилаланингидроксилазы у народов Волго-Уральского региона. Генетика, 2000, т.36, no.8, С.1116-1165.
149. Ахметова В. Молекулярно-генетический анализ гена РАН у народов Волго-Уральского региона. Автореф. дис. канд. биол. наук, Уфа, 2001, 23 с.
150. Баранов В. Молекулярная диагностика наследственных заболеваний. Природа, 1996, no.5, С.26-36.
151. Баранов В. Проблемы пренатальной диагностики наследственных болезней и возможные пути их коррекции. Биополимеры и клетка, 1990, т.6, no.1, С.46-50.
152. Барановская С. Молекулярно-генетический анализ фенилкетонурии в Санкт-Петербурге. Автореф. дис. канд. биол. наук. С.-Петербург, 1996, 21 с.
153. Барановская С. Шевцов С. Максимова Л. Спектр мутационных повреждений гена ФАГ у больных ФКУ в Санкт-Петербурге. Доклады Академии Наук, 1995, т.340, no.5, С.709-711.
154. Горбунова В. Баранов В. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. С.-Петербург, 1997, 217 с.
155. Иващенко Т. Баранов В. Быстрый и эффективный PCR/Sty I тест для идентификации мутации R408W у пациентов с фенилкетонурией. Генетика, 1993, т.29, no.5, С.862-865.
156. Кайданов Л. Генетика популяций. М: Высшая школа, 1996, С.64-70.
157. Корнеев С. Повторяющиеся последовательности генома человека. Генетика, 1988, т.24, no.6, С.965-976.
158. Лакин С. Биометрия. М: Высшая школа, 1990, С.126-133.
159. Лебедев Б. Блюмина М. Фенилкетонурия у детей. Москва: Медицина, 1972.
160. Маниатис Т. Фрич Э. Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984, 420с.
161. Масленников Ф. Смагулова Ф. Эффективность рестрикционного анализа при типировании мутантного гена ФАГ. Генетика человека и патология, 2000, вып.5, С.152-157.

162. Меркурьева Е. Биометрия в животноводстве. М: Колос, 1964, С.216-230.

163. Мурзабаева С. Фенилкетонурия в Республике Башкортостан (Клинико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение). Автореф. дис. канд. мед. наук. Пермь, 1997, 21 с.

164. Мусиенко А. Лившиц К. Анализ мутаций и полиморфизмов 30-нуклеотидных tandemных повторов гена PАН в семьях с высокой степенью фенилкетонурии. Журнал Академии медицинских наук Украины, 1996, т.2, по.3, С.488-495.

165. Сарычева Е. Фенотипические эффекты гетерозиготного носительства мутаций гена фенилаланингидроксилазы. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 1999, 22 с.

166. Скрыбин Б. Ковальчук С. Определение природы мутационных повреждений в 12 экзоне гена ФАГ у больных ФКУ. Биоорганическая химия, 1989, по.12, С.1690-1692.

167. Смагулова Ф. Масленников А. Морозов И. Китайник Г. Мутации в структуре экзона 7 гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией Новосибирской области. Генетика, 2000, т.36, по.6, С.849-852.

168. Смагулова Ф. Морозов И. Новые полиморфные сайты в структуре гена фенилаланингидроксилазы человека. Генетика, 2000, т.36, по.12, С.1716-1718.

169. Цукерман Г. Генетическая эпидемиология фенилкетонурии в Белорусской ССР. Автореф. дис. канд. мед. наук. Москва, 1986, 27 с.

170. Чарикова Е. Изучение спектра точечных мутаций в гене PАН у больных ФКУ в Москве и Московской области. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 1995, 22с.

1. Гаврилюк А.П., Гроппа С.А. Диагностика фенилкетонурии молекулярно-генетическими методами. Materialele conferinței practice-științifice consacrate aniversării de 20 ani de activitate a spitalului Clinic Municipal „Sfânta Treime”; Chișinău, 1996, martie, p.54-55.

2. S. Gargaun, A. Berzoi, E. Holobudenco, L. Corduneanu, A. Gavriliuc, S. Groppa. Particularitățile fenilcetonuriei în Republica Moldova. Materialele conferinței științifice anuale a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”, Chișinău, 1996, octombrie, p.423.

3. Гаврилюк А., Гроппа С. Определение частоты мутации R408W,

сцепленной с геном фенилаланингидроксилазы, в популяции Молдовы. Materialele științifice ale Congresului VII (jubiliar) al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova. Chișinău, 1999, septembrie, p.65-68.

4. Angela Gavriliuc. Diagnosticul prenatal al fenilcetonuriei prin metode molecular-genetice. Buletin de perinatologie. Revista științifico-practică. Chișinău, 2001, no. 1, p.149.

5. Angela Gavriliuc. Most common mutation from phenylketonuria patients and possibility of prenatal diagnosis in population of Moldova. *Buletin de perinatologie* (Materialele Conferinței a II-a Națională de Medicină Perinatală cu participare internațională). Chișinău, 2001, no. 3, p.67-69.

6. А.П. Гаврилюк, С.А. Гроппа. Неонатальный скрининг как наиболее эффективный метод выявления и установления частоты заболевания в популяции. Materialele conferinței internaționale “Instruirea specialiștilor pentru Asistența Medicală Primară”. Chișinău, 2003, aprilie, p.264-266.

7. A.P. Gavriliuc, S.A. Groppa. Phenylketonuria mutations at the phenylalanine hydroxylase gene in population of Moldova. European Journal of Human Genetics (Abstracts of the European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, England), Volum 11, Supplement 1, p.171.

8. A.P. Gavriliuc, S.A. Groppa. Associations between mutations and VNTR alleles at the PAH gene in population of Moldova. European Journal of Neurology (Abstracts of the 7th Congress of the European Federation of Neurological Societies, August-September 2003, Helsinki, Finland), Volume 10, Supplement 1, p.189.

9. Angela P. Gavriliuc, Stanislav A. Groppa Distribution of Msp I(a) alleles at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in Republic of Moldova. Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics, Kiev, Ukraine, September 2003, p.241.

10. N. Ușurelu, V. Țurea, V. Gordiiciuc, O. Ușurelu, V. Sacară, A. Gavriliuc. Fenilcetonuria—forme persistente. Pericolul depistării tardive. Materialele Conferinței Pediatriilor cu participare internațională, consacrată jubileului de 40 ani de activitate a catedrei Pediatrie a Facultății de Perfecționare a Medicilor. Chișinău, 2003, noiembrie, p.149-154.

11. Аничкина А.А. Гаврилюк А.П. Тверская С.М. Поляков А.В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенила-

ланигидроксилазы у больных фенилкетонурией. Медицинская генетика. Москва, 2003, Т.2, N4, с.175-181.

12. S. A. Groppa, Angela P. Gavriiuc, Elena A. Holobudenco, Mariana L. Sprincean, Ludmila Gh. Ciubotaru. Consultul medico-genetic, diagnosticul prenatal, metodele de profilaxie și tratamentul fenilketonuriei. Elaborare metodică. Chișinău, Centrul Editorial Poligrafic *Medicina*, 2004, 28 p.

13. A.P. Gavriiuc. Distribution the VNTR alleles at the PAH gene in population of Moldova. European Journal of Human Genetics (Abstracts of the European Human Genetics Conference-EMPAG, June 2004, Munich, Germany), Volume 12, Supplement 1, p.301.

14. S. Groppa, S. Gargaun, P. Stratulat, M. Stratilă, S. Ghimbovschi. Fortificarea asistenței genetico-medicale în Republica Moldova. Buletin de perinatologie. Chișinău, 1998, no. 2, p.20-23.

Com. 9581

Î.S. Firma editorial-poligrafică "Tipografia Centrală"

MD-2068, Chișinău, str. Florilor, 1

Tel. 43-03-60, 49-31-46