

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Đorđević

**Korelacija između genotipa i fenotipa bolesnika sa
hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd 2013. godine.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Maja Đorđević

**Genotype-phenotype corelation in Serbian patients with
hyperphenylalaninemia**

Doctoral Disserttation

Belgrade, 2013

Mentor:

Prof. dr Ivana Novaković

Članovi komisije:

Prof. dr Milena Đurić

Dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Prof. dr Borisav Janković

Kratak sadržaj

Korelacija između genotipa i fenotipa bolesnika sa hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije

Cilj rada: Ispitivana je korelacija genotipa i fenotipa bolesnika sa hiperfenilalaninemijom. Utvrđena je incidencija hiperfenilalaninemije u našoj populaciji. Prikazana je učestalost najčešćih mutacija u *PAH* genu i njihov uticaj na fenotip. Posebna pažnja je poklonjena ispitivanju metaboličkog i kliničkog fenotipa najčešće mutacije u našoj populaciji. Izneti su zaključci praćenja metaboličke kontrole kod naših bolesnika.

Materijal i metode: Za ispitivanje incidencije hiperfenilalaninemije korišćeni su rezultati Republičkog zavoda za statistiku. Korišćena je medicinska dokumentacija Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta i rezultati Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Biohemijske analize rađene su Guthrievim testom, Enzimskom metodom i Aminoanalizatorom. Za analizu dobijenih rezultata korišće su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Rezultati: Incidencija hiperfenilalaninemije na našim prostorima iznosi 1: 15 130. Najveći broj bolesnika (62%) ima klasičnu fenilketonuriju. Najčešće mutacije *PAH* gena u našoj populaciji su: p.L48S, p.R4OW, p.P281L, p.E3906 i p.1306V, i javljaju se u 2/3 svih bolesnika. Interesantno je da je naša najčešća mutacija L48S prisutna kod 31% obolelih, što do sada nije zabeleženo ni u jednoj populaciji. Homozigoti i funkcionalni hemizigoti za L48S mutaciju se mogu javiti kod svih kategorija hiperfenilalaninemije (blaga hiperfenilalaninemija, srednje teška fenilketonurija i klasična fenilketonurija). Pokazali smo i da tip mutacije nije značajan za konačan IQ bolesnika sa hiperfenilalaninemijom, već kontinuirano održavanje koncentracije fenilalanina u krvi u dozvoljenim granicama.

Zaključak: Naša zemlja pripada grupi sa srednjom incidencijom hiperfenilalaninemija u svetu. S obzirom da naša najčešća mutacija pripada grupi mutacija sa rezidualnom enzimskom aktivnosti, koja izgleda zavisi od brojnih faktora, tolerancija fenilalanina je najbolji način za kategorizaciju ovih bolesnika. Odluka oko primene terapije i dalje treba da se zasniva na koncentraciji fenilalanina u krvi, a ne na osnovu mutacije u *PAH* genu. Na osnovu analize genotipa, preko 50% naših bolesnika su kandidati za BH4 terapiju.

Abstract

Genotype-phenotype correlation in Serbian patients with hyperphenylalaninemia

Goal: Correlation between genotype and phenotype was tested in patients with hyperphenylalaninemia. Incidence of hyperphenylalaninemia in our population was calculated. Frequency of most common mutations in PAH gene was presented, along with its impact on phenotype. Special focus was put directed on exploration of metabolic and clinical phenotype of the most prevalent mutation in our population. Conclusions derived from metabolic follow-up of our patients were presented as well.

Materials and methods: To determine incidence of hyperphenylalaninemia, data from Statistical Office of the Republic of Serbia. Medical documentation of Mother and Child Health Care Institute for used along with genetic findings of Institute for Molecular Genetics and Genetical Engineering. Biochemical analysis were performed using Guthrie test, Enzyme assay and Aminoacid analyser. Statistical analysis included both descriptive and analytical methods. *Results:* Incidence of hyperphenylalaninemia in our population was estimated at 1: 15 130. Majority of patients (62%) have classic phenylketonuria. Most common mutations in PAH gene in Serbia are: p.L48S, p.R40W, p.P281L, p.E390G i p.1306V, found in 2/3 of all patients. Interesting finding refers to L48S being the most prevalent mutation (found in 31%), which is unparalleled finding worldwide. Homozygous and functionally hemizigous L48S carriers are found among all types of hyperphenylalaninemia (mild hyperphenylalaninemia, moderate hyperphenylalaninemia and classic phenylketonuria). It was also shown in these results that mutation type is not a valuable predictor for final IQ status of patients with hyperphenylalaninemia; on the other hand, metabolic control of disease was found as significant factor of final outcome.

Conclusion: Our country can be considered as having an average incidence of hyperphenylalaninemia. Considering the fact that most common mutation in Serbia relates to residual enzyme activity (determined by multitude of factors), tolerance of phenylalanine is the best way to classify severity of the disease. Thus, decision over treatment should be based on phenylalanine blood concentrations, and not on PAH gene mutation. According to genotype profiling, more than 50% of our patients could be candidates for tetrahydrobiopterine (BH4) treatment.

SADRŽAJ

<u>I UVOD U ISTRAŽIVANJA</u>	9
I 1. Istorijat	10
I 2. Incidencija	12
I 3. Biohemijske karakteristike i metabolizam fenilalanina	12
I 4. Patogeneza oštećenja centralnog nervnog sistema	14
I 5. Fenilalanin hidroksilaza	16
I 5. 1 Regulacija aktivnosti fenilalanin hidroksilaze	17
I 6. Tetrahydrobiopterin (BH4)	18
I 7. Gen za fenilalanin hidroksilazu	20
I 7.1 Uticaj mutacije na aktivnost fenilalanin hidroksilaze	21
I 8. Klinička slika nelečene fenilketonurije	21
I 9. Podela hiperfenilalaninemija	22
I 10. Genotipsko fenotipska korelacija	24
I 10.1. Odgovor na terapiju sa tetrahydrobiopterinom	26
I 11. Neonatalni skrining na fenilketonuriju	27
I 12. Terapija fenilketonurije	28
I 12.1. Terapija dijetom	28
I 12.1.1. Test opterećenja fenilalaninom	30
I 12.1.2. Ishod terapije dijetom	30
I 12.1.3. Maternalna fenilketonurija	30
I 12.2. Druge terapijske mogućnosti	31
I 12.2.1. Tetrahydrobiopterin	31
I 12.2.2. Duge neutralne aminokiseline	32
I 12.2.3. Novi terapijski pokušaji	32
<u>II CILJEVI RADA</u>	34
<u>III MATERIJAL I METODE</u>	35

III 1. Bolesnici	35
III 2. Biohemijske analize	36
III 3. Testovi za procenu inteligencije	37
III 4. Genetičke analize	37
III 5. Statističke metode	39
III 6. Ostale informacije	39
<u>IV REZULTATI</u>	41
IV 1. Incidencija	41
Tabela IV 1. Tabelarni prikaz osnovnih podataka bolesnika sa hiperfenilalaninemijom	42
IV 2. Pol	49
IV 3. Uzrast bolesnika	49
IV 3.1. Uzrast prilikom postavljanja dijagnoze hiperfenilalaninemije	50
IV 3.2. Uzrast bolesnika prilikom početka dijete siromašne fenilalaninom	51
IV 4. Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu	51
IV 5. Fenotipske karakteristike	58
IV 6. Genotipsko fenotipska korelacija	59
IV 6.1. Analiza genotipsko fenotipske korelacije bez L48S mutacije	61
IV 6.1.1. Homozigoti	61
IV 6.1.2. Heteroalna homozigotnost (složeni heterozigoti)	62
IV 6.2. Analiza genotipsko fenotipske korelacije za L48S mutaciju	62
IV 7. Metabolička kontrola	65
IV 8. Očekivani odgovor na BH4 terapiju kod naših bolesnika	73
<u>V DISKUSIJA</u>	74
V 1. Incidencija	74
V 2. Uzrast bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze hiperfenilalaninemije	74
V 3. Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu	74
V 4. Fenotipske karakteristike	76
V 5. Genotipsko fenotipska korelacija	77
V 5.1. Prikaz bolesnika sa istim genotipom a različitim fenotipom	78

V 5.1.2. Genotip p.[L48S];[null]	78
V 5.1.3. Genotip p.[L48S];[L48S]	79
V 5.1.4. Analiza odnosa genotipa i fenotipa	79
V 4. Odgovor na BH4 terapiju	80
V 5. Metabolička kontrola	81
<u>VI ZAKLJUČAK</u>	83
<u>VII LITERATURA</u>	85

I UVOD U ISTRAŽIVANJA

Povišene koncentracije fenilalnina u krvi preko 120 $\mu\text{mol/l}$ nazivamo hiperfenilalaninemijom (HPA). Fenilketonurija (PKU) se odnosi na oboljenje, koje ako se ne leči, dovodi do teškog i ireverzibilnog poremećaja nervnog sistema. Imajući u vidu ovu podelu razlikuju se „PKU” HPA i „ne-PKU” HPA, pri čemu se pod „ne-PKU” HPA podrazumevaju poremećaji za koje najverovatnije nije potrebna terapija, što do sada nije dovoljno jasno definisano.

Fenilketonurija je najčešća urođena bolest metabolizma (UBM) aminokiselina kod stanovništva bele rase. Prenosi se autozomno recesivnim putem, a posledica je poremećaja u hidroksilaciji fenilalanina u tirozin, zbog čega se fenilalanin nagomilava u organizmu. Za ovu metaboličku reakciju neophodno je prisustvo enzima fenilalanin hidroksilaze (PAH) i kofaktora tetrahidrobiopterina (BH₄). Mutacije u genu za PAH su kod najvećeg broja bolesnika odgovorne za nastanak bolesti. U svega 1 - 2% bolesnika sa hiperfenilalaninemijom povišena koncentracija fenilalanina je posledica poremećaja u metabolizmu BH₄. Težina kliničke slike zavisi od koncentracije fenilalanina u krvi i likvoru i dužine trajanja ovog poremećaja. Glavne kliničke manifestacije nelečene PKU su mentalna retardacija i konvulzije, a mogu se javiti oštećenja na drugim organima i organskim sistemima. Primena dijeta siromašne fenilalaninom, sa kojom se mora početi najkasnije do kraja prvog meseca života, sprečava loš ishod bolesti i omogućava normalan život obolelih osoba (1).

Kao što je već rečeno, svako povišenje koncentracije fenilalnina ne dovodi do kliničkih manifestacija bolesti. Kada su koncentracije fenilalnina u krvi preko 1200 $\mu\text{mol/l}$ verovatnoća oštećenja CNSa je velika, ali i pojave drugih kliničkih manifestacija bolesti. Kod ovih bolesnika terapija, odnosno dijeta je neophodna, a ovaj poremećaj je nazvan klasična fenilketonurija (cPKU). Međutim, kada su koncentracije fenilalnina u krvi niže razlikuju se preporuke oko započinjanja dijeta siromašne fenilalaninom (1).

Postoje brojni pokušaji da se na osnovu tipa mutacije kod bolesnika sa HPA utvrdi tip hiperfenilalaninemije i donesu praktični zaključci vezani za lečenje bolesnika. Neke mutacije sa velikom verovatnoćom mogu se povezati sa određenim tipom bolesti, dok je kod drugih donošenje zaključka manje pouzdano i povezano sa složenim algoritmom (1).

Kada dijeta počne da se sprovodi, postavlja se pitanje koji faktori imaju značaj za konačni fenotip, da li je presudan tip mutacije, pridržavanje dijete ili neki drugi faktori.

I.1. Istorijat

Otkriće UBM vezuje se za ime Sir Archibald Garroda koji je živio krajem 19. i početkom 20. veka u Engleskoj. Proučavajući bolesnike sa alkaptonurijom, otkrio je da je crna boja mokraće posledica izlučivanja homogentizinske kiseline koja nastaje u metaboličkom putu tirozina. Verovao je da je bolest posledica nedostatka enzima koji je neophodan za razgradnju homogentizinske kiseline. Uočio je da je bolest urođena i češća kod bliskih srodnika, na osnovu čega je zaključio da je nasledna. Zahvaljujući ovim saznanjima pretpostavio je da svaki enzim ima svoju informaciju za sintezu, odakle će kasnije proisteći teorija „Jedan enzim - jedan gen”. Ispitivanja bolesnika sa cistinurijom, albinizmom, pentozurijom i porfirijom dovela su ga do istog zaključka. Sir Archibald Garrod je sarađivao sa Williamom Batesonom, botaničarem, koji je bio jedan od najvećih pobornika mendelovskog načina nasleđivanja. Oni su u svojim prepiskama diskutovali o bolesnicima sa alkaptonurijom, o češćem javljanju bolesti kod bliskih srodnika i kod dece čiji su roditelji u bliskom srodstvu, i na osnovu toga zaključili da je u pitanju recesivni način nasleđivanja. Sir Archibald Garrod je svoja istraživanja objavio u radu „Urođene bolesti metabolizma” (*„Inborn errors of metabolism”*) koji je objavljen 1909. godine, a izdat je od strane Engleskog kraljevskog koledža. Garrod je takođe smatrao da bolesti dece treba da budu izdvojene u posebni deo medicine i objavio je knjigu o bolestima u dečijem uzrastu (*„Textbook of Pediatrics”*), koja je doživela više izdanja tokom narednih 40 godina. Kao i mnogi naučnici, koji su bili ispred svog vremena, nije bio shvaćen ni prihvaćen. Dobio je brojne nagrade i priznanja, ali nikada mu za života nije priznat značaj na polju otkrivanja i ispitivanja UBM, koji je svakako njegov najveći doprinos medicini (2-7).

Fenilketonuriju je prvi put opisao norveški naučnik Asbjörn Föling 1934. godine. Na insistiranje jedne majke na neprijatnom mirisu mokraće kod njena dva mentalno retardirana deteta, biohemijskom analizom, ferihloridnim testom, utvrdio je neuobičajenu promenu boje mokraće u tamno zelenu boju, umesto u crvenkasto braon. Kasnije je ustanovio da je ova promena boje posledica prisustva fenilpiruvične kiseline u urinu obolele dece. Nakon ovog otkrića istu analizu u mokraći je uradio kod još 430 osoba sa mentalnom retardacijom do tada

nepoznatog uzroka i kod 8 osoba dobio isti rezultat. Primetio je da ovi bolesnici pored mentalne retardacije imaju i druge sličnosti kao što su prisustvo ekcema, niži rast, široka ramena i spastički hod. Ispitivanjem porodičnog stabla došao je do zaključka da je u pitanju autozomno recesivno nasleđivanje. Doktor Föling je objavio svoja zapažanja, a bolest je nazvao „fenilpiruvična idijotija”(8). Nekoliko godina posle Penrose i Quastel menjaju ime bolesti u fenilketonurija (9). Jervis dokazuje smanjenu aktivnost enzima fenilalanin hidroksilaze u jetri bolesnika sa ovom bolesti (10,11).

Bickel 1954. godine dokazuje da ishrana siromašna fenilalaninom može da smanji koncentraciju fenilalanina i spreči razvoj mentalne retardacije kod bolesnika sa fenilketonurijom. Najbolji rezultati se postižu kada se sa dijetom počne u prvom mesecu života (12). Guthrie i Susi su početkom šezdesetih godina prošlog veka ustanovili da se jednostavnom metodom bakterijske inhibicije, iz uzorka krvi na filter papiru, može odrediti koncentraciju fenilalanina (13). Ovo otkriće je otvorilo put ranom, neonatalnom otkrivanju bolesti. Skrining na fenilketonuriju u SAD počinje 1962. godine (14,15). Pilot program na teritoriji tadašnje Jugoslavije, Vulović i saradnici sprovode 1967. godine, dok organizovani skrining na ovu bolest u našoj zemlji počinje 1983. godine (16). Test bakterijske inhibicije je semikvantitativna metoda za određivanje koncentracije fenilalanina koja se i danas koristi u nekim zemljama Evrope u programu masovnog ranog otkrivanja bolesti. Kriterijume za program ranog otkrivanja bolesti, koji su i danas su prihvaćeni od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), predložili su Wilson i Junger još 1968. godine (tabela I 1.) (17).

Tabela I 1. Kriterijumi za program ranog otkrivanja bolesti (Wilson i Junger)

Bolest predstavlja bitan zdravstveni problem

Postoji mogućnost lečenja

Populaciji su dostupne dijagnostičke i terapijske metode

Postoji latentni ili „rani” simptomatski period pre ispoljavanja jasne kliničke slike

Tehnika koja se koristi za skrining je pouzdana i dovoljno senzitivna

Testovi su prihvatljivi za populaciju prema kojoj je skrining usmeren

Dobro je poznata priroda bolesti

Postoje kriterijumi koje bolesnike treba a koje ne treba lečiti

Troškovi skrininga, uključujući troškove dijagnostike i lečenja su prihvatljivi

Ako se primeni terapija u latentnoj ili ranoj fazi bolesti, bolest ima dobru prognozu

Mali broj bolesti, kao što je PKU, idealno zadovoljavaju sve kriterijume za program ranog otkrivanja.

Kaufman, 10 godina kasnije otkriva tetrahidrobiopterin (BH₄), neophodni katalitički kofaktor za funkcionisanje enzima fenilalanin hidroksilaze (18). Kasnih sedamdesetih godina prošlog veka mnoge grupe naučnika rade na molekularnoj osnovi fenilketonurije. Woo i saradnici 1983. godine otkrivaju gen za PAH (19). Godine 1999. Erlandensen i Stevens kristališu enzim PAH i opisuju njegovu strukturu (20).

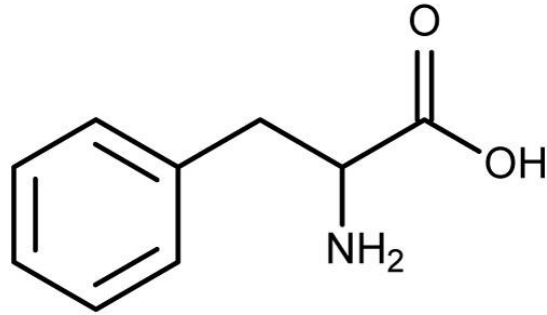
U kasnim devedesetim godinama prošlog i u prvoj deceniji ovog veka u brojnim populacijama opisuju se mutacije u genu za PAH pacijenata obolelih od HPA, analizira se korelacija genotipa i fenotipa, formiraju se baze podataka. Istovremeno se radi na ispitivanju novih terapijskih mogućnosti kao što su terapija BH₄, terapija dugim neutralnim aminokiselinama, enzimska terapija, genska terapija i drugo.

I.2. Incidencija

Incidencija PKU u beloj rasi u proseku iznosi od 1: 10 000 do 1: 20 000 (20). Visoka incidencija je u Turskoj (1: 2 600), Iranu (1: 3 300), Irskoj (1: 4 500), Estoniji (1: 6 000), Tunisu (1: 7 600), Latviji (1: 8 700), Mađarskoj (1: 9 000), a niska Finskoj (1: 100 000), Japanu (1: 125 000) i Tajlandu (1: 212 000) (1,21-23). Od zemalja bivše Jugoslavije smatra se da je najviša incidencija PKU u Sloveniji (1: 8 000) (24).

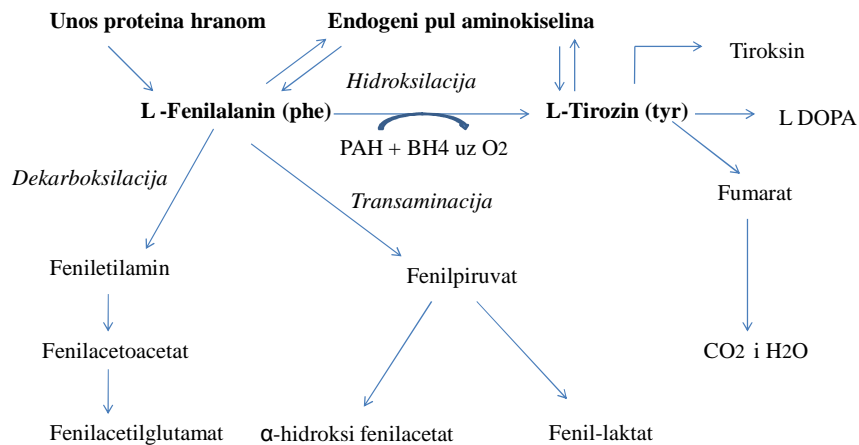
I. 3. Biohemijske karakteristike i metabolizam fenilalanina

Fenilalanin (phe) je esencijalna aminokiselina koja je neophodna za endogenu sintezu proteina (25). Pripada grupi α aminokiselina i ima hemijsku formulu C₆H₅CH₂CH(NH₂)COOH (slika I 1.). Prirodni oblik fenilalanina je L oblik, koji se nalazi u hrani, dok se D phe sintetise u laboratorijama. Pod pojmom LD phe podrazumeva se mešavina ova dva oblika fenilalanina koji se u komercijalne svrhe koristi zbog mogućih antidepressivnih svojstava.



Slika I 1. Biohemijska struktura fenilalanina

Koncentracija phe u krvi zavisi od unosa proteina putem hrane, recikliranja iz depoa aminokiselina, integracije u tkivne proteine i oksidacije u tirozin (tyr). Za katabolizam fenilalanina najvažnija reakcija je hidroksilacija, uz pomoć enzima fenilalanin hidroksilaze (PAH), kada fenilalanin prelazi u tirozin. Alternativni metabolički putevi podrazumevaju procese transaminacije i dekarboksilacije prilikom čega se nastali metaboliti izlučuju mokraćom (slika I 2.) (1,25). Ovi alternativni metabolički putevi se aktiviraju pri smanjenoj funkciji PAH.

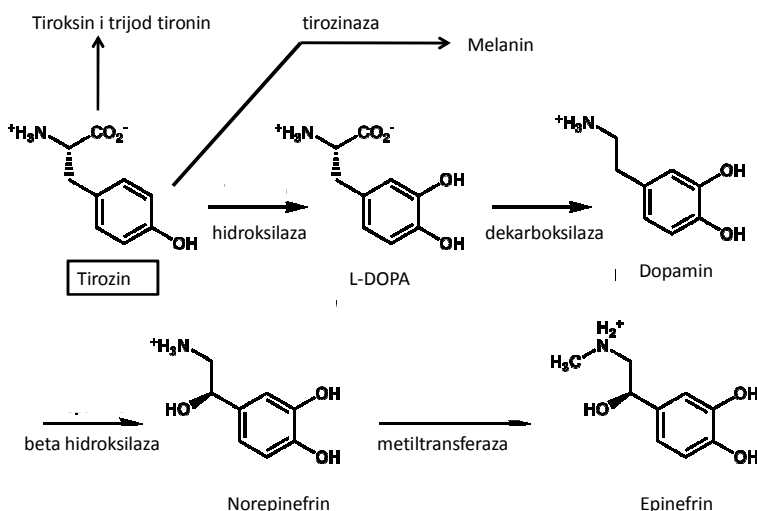


Legenda: PAH- fenilalanin hidroksilaza; BH4- tetrahidrobiopterin.

Slika I 2. Metabolizam fenilalanina

Pretvaranje phe u tyr omogućava kompleksan sistem za hidroksilaciju koji se sastoji od: PAH, BH₄ i enzima koji imaju ulogu da regenerišu BH₄ (dihidropteridin i 4 α -karbinolamin dehidrataza). Nakon procesa hidroksilacije nastavlja se nekoliko vezanih reakcija, preko fumarata, koje dovode do stvaranja ugljen dioksida i vode (1,25) (slika I 2.). Kod bolesnika sa hiperfenilalaninijom tirozin postaje uslovno esencijalna aminokiselina i mora da se egzogeno nadoknađuje.

Tirozin ima važne funkcije u organizmu. On je prekursor hormona tireoidne žlezde (trijod tironina i tiroksina), melatonina, neurotransmitera dopamina, norepinefrina i epinefrina. Deficit tirozina, koji postoji kod nelečenih bolesnika sa hiperfenilalaninijom, objašnjava nastanak jednog broja neuroloških poremećaja (deficit neurotransmitera), kao i svetlu boju kože, kose i očiju (deficit melanina) (slika I 3.) (1,25-27).



Slika I 3. Tirozin kao prekursor hormona štitne žlezde, melanina i neurotransmitera

I.4. Patogeneza oštećenja centralnog nervnog sistema

I danas nije jasno šta je u osnovi patofiziološkog oštećenja nervnog sistema kod bolesnika sa fenilketonurijom. Da li je u pitanju samo toksično delovanje fenilalnina na ćelije nervnog sistema ili su važni i drugi činioci (28) .

Kod bolesnika sa fenilketonurijom koji su na vreme počeli dijetu siromašnu fenilalaninom dokazana manja kongnitivna funkcija, mada u granicama proseka, u odnosu na zdrave osobe istog uzrasta koje čine kontrolnu grupu (29-31). Teorijski bi se kongnitivna disfunkcija kod bolesnika sa PKU mogla povezivati sa povišenim koncentracijama fenilalanina, ali i sa sniženim koncentracijama tirozina. Međutim, kao što je poznato koncentracija tirozina nije u korelaciji sa kongnitivnom funkcijom, a dodavanje samo tirozina, bez restrikcije fenilalanina neće sprečiti razvoj mentalne retardacije (32).

Poslednjih godina se sve više obraća pažnja na procese koji se dešavaju na krvno moždanoj barijeri, što nije slučajno, s obzirom da se najvažniji simptomi PKU odnose na centralni nervni sistem (1). Transport aminokiselina kroz krvno moždanu barijeru je dinamičan proces. Za transport dugih neutralnih aminokiselina (pored fenilalanina u ovu grupu spadaju valin, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, histidin, triptofan, lizin) koristi se jedan transporter, koji je označen kao LAT1 (33,34). Aminokiseline se vezuju za ovaj transporter po principu kompeticije. U višku fenilalanina, kao kod bolesnika sa hiperfenilalaninemijama, smanjuje se transport drugih dugih neutralnih aminokiselina (DNAK) kroz krvno moždanu barijeru u CNS. Istovremeno se povećava transport ovih aminokiselina iz CNS u krv (35,36). Dokaz o značaju deficita DNAK u patogenezi ove bolesti je i taj što se njihovom oralnom suplementacijom smanjuje koncentracija fenilalanina u mozgu, poboljšava EEG zapis i neurofiziološki nalaz. Kod zdravih osoba sve DNAK, izuzev tirozina su esencijalne, dok kod bolesnika sa PKU i ova aminokiselina postaje esencijalna i mora se nadoknađivati egzogenim putem.

Bolesnici sa PKU imaju smanjenu koncentraciju dopamina, kateholamina, serotonina i njihovih metabolita, kako u mozgu tako i u cerebrospinalnom likvoru. Ovaj deficit je najverovatnije posledica njihove smanjene sinteze usled deficita DNAK, prvenstveno tirozina i triptofana (36). Deficit dopamina dovodi do oštećenja bazalnih ganglija, tako da bolesnici sa nelečenom PKU mogu razviti horeju, tremor i distoniju (37,38). Deficit serotonina je odgovoran za uznemirenost i depresiju (29,39).

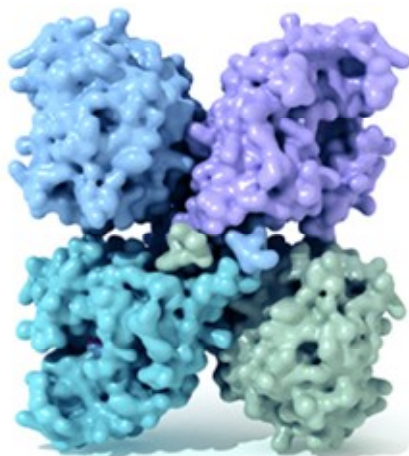
Snižena koncentracija DNAK, izuzev fenilalanina, dovodi do smanjene sinteze proteina u CNSu. U eksperimentima na životinjama dokazano je povećanje broja neaktivnih monoribozoma, redukcija poliribozoma, smanjenje polipeptidne elongacije (40,41). Takođe je dokazano smanjeno ugrađivanje leucina i lizina u ćelijske proteine. Smanjena sinteza proteina u CNSu može da objasni promene na beloj masi i smanjenu mijelinaciju. Takođe su viđene izražene promene na periventrikularnoj i subkortikalnoj beloj masi (36). Izgleda da je

smanjena mijelinacija posledica i poremećaja u sintezi holesterola, zbog smanjene aktivnosti 3-hidroksi-3-metil glutaril koenzim A reduktaze (HMGR) (42).

Verovatno da se ne može u potpunosti zanemariti i direktno toksično delovanje fenilalanina u patogenezi ove bolesti. Smatra se da L fenilalanin direktno vrši depresiju na glutaminičnu sinaptičku transmisiju preko smanjenja amplitude i frekvencije N metil D aspartatnih (NMDA) i ne NMDA komponentni glutamatnih receptora (GluR) (43). Mortell i saradnici ukazuju da u patogenezi bolesti značajno mesto zauzima direktno delovanje fenilalanina na propustljivost kalcijumskih kanala na membranama ćelijama CNSa (44).

I 5. Fenilalanin hidroksilaza

Fenilalanin hidroksilaza čoveka (hPAH, EC 1.14.16.1) je uglavnom proučavana u *in vitro* sistemima, ali je predhodno pokazano da njene kinetičke i fizičko-hemijske osobine odgovaraju osobinama enzima izolovanog iz jetre čoveka. Rekombinantni hPAHwt nalazi se u obliku homodimera i homotetramera, koji su u ravnoteži. Na pH 7,0 postiže optimalnu katalitičku aktivnost, a izoelektrična tačka je na oko pH 5,0 (45). Molekularna težina jedne subjedinice iznosi oko 50 kDa (između 50 i 53 kDa, u zavisnosti od fosforilacije na Ser-16) i sastoji se od 452 aminokiseline (AK). Sastoji se od 4 subjedinice (slika I 4.). Svaka subjedinica sastoji se iz tri domena: regulatornog (1-142 AK), katalitičkog (143 - 410 AK) i tetramerizacionog (411 - 452 AK). Regulatorni domen sadrži standardni α - β sendvič motiv, inače uobičajen za ovaj tip domena. Sa jedne strane β -ploče, koja se sastoji od četiri antiparalelna lanca, nalaze se dve kratke α -spirale, a sa druge strane je katalitički domen (46). Katalitički domen ima oblik korpe i sačinjen je od 14 α -spirala i 8 β -lanaca. Gvožđe (Fe III) koje je neophodno za funkcionisanje fenilalanin hidroksilaze, nalazi se u okviru aktivnog centra katalitičkog domena, koordinativno vezano za His285, His290 i Glu330. U blizini atoma gvožđa, nalaze se i mesta vezivanja supstrata (L-Phe) i kofaktora (BH₄) (47-49). Kratki tetramerizacioni domen sastoji se od dva antiparalelna β -lanca i jedne C-terminalne α -spirale koja se prepliće sa α -spiralama ostalih subjedinica (coiled-coil) formirajući jezgro tetramera.



Slika 14. Prikaz 4 subjedinice fenilalanin hidroksilaze

Generalno, protein se (bez obzira da li je mutiran ili ne) u svojoj završnoj fazi se „pakuje” u terciarnu strukturu i stvaraju se dimeri ili tetrameri. Samo pravilno formirana terciarna struktura proteina moći će da se spaja u dimere i tetramere. Podaci iz *in vitro* analiza su pokazale da veći broj mutacija u *PAH* genu dovodi do premećaja u stvaranju terciarne strukture proteina što vodi do njegove ubrzane degradacije i/ili agregacije (50-55). Tako nastali tetrameri mogu biti manje termodinamički stabilni (20,56) ili je efekat mutacija prvenstveno usmeren na procese savijanja (57). Efekti mutacija koje imaju više uticaja na sposobnost savijanja nego na termodinamičku stabilnost se mogu proučavati pomoću šeperona, što može imati i značajan terapijski uticaj.

I 5.1. Regulacija aktivnosti fenilalanin hidroksilaze

Aktivnost fenilalanin hidroksilaze je tesno regulisana pomoću fenilalanina, tetrahidrobiopterina i fosforilacije samog enzima na aminokiselini serin u poziciji 16 (Ser-16).

Fenilalanin se za fenilalanin hidroksilazu vezuje na dva različita mesta u katalitičkom domenu, kada ima ulogu supstrata, kao i u regulatornom domenu kada je pozitivni regulator.

Aktivacija fenilalaninom je najznačajniji mehanizam regulacije. Vezivanje fenilalanina za regulatorno mesto u enzimu dovodi do velikih konformacijskih promena, kako na tercijarnom (izmeštanje N-terminalne regulatorne sekvence ka aktivnom centru), tako i na kvaternom nivou (favorizovano formiranje tetramerne forme), što dovodi do značajnog povećanja enzimske aktivnosti. Vezivanje fenilalanina za PAH favorizuje i fosforilaciju (46,58,59).

Suptilnija regulacija aktivnosti PAH odvija se vezivanjem BH₄ za regulatorni domen ovog enzima. Fenilalanin hidroksilaza zauzima konformaciju u kojoj je njena aktivnost inhibirana. U toj konformaciji, aktivacija fenilalaninom je blokirana, a fosforilacija nije favorizovana (60,61).

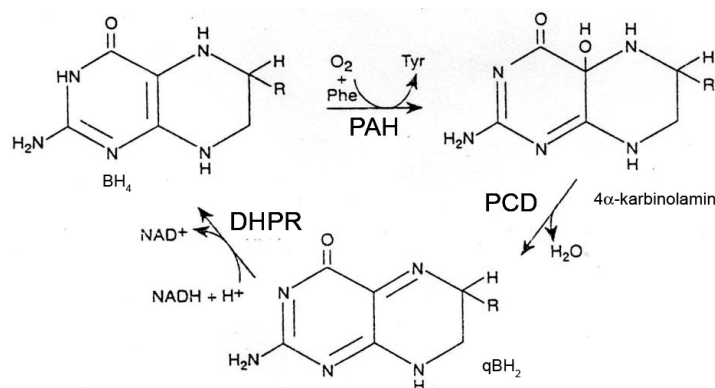
Kada je koncentracija fenilalanina niska nije neophodna visoka aktivnost PAH, vezivanje sa BH₄ stabilizuje enzim u konformaciji koja je potrebna za nisku aktivnost. Kada se koncentracija fenilalanina u hepatocitima poveća, on se vezuje za mesto u regulatornom domenu PAH, prevazilazi inhibiciju BH₄ i prevodi enzim u aktivnu konformaciju. Fosforilisana i defosforilisana forma PAH, predstavljaju inaktivna stanja, a veća koncentracija fenilalanina je potrebna za aktivaciju fenilalanin hidroksilaze u slučaju defosforilisane forme u odnosu na fosforilisanu (46).

Za većinu mutacija, kako blagih tako i teških po fenotipskom efektu, pokazano je da je smanjenje ili gubitak aktivacije supstratom glavni uzrok ometanja prenosa konformacione promene kroz strukturu enzima (58). Iz tog razloga, obično se specifična enzimska aktivnost *in vitro* meri u dve različite reakcije: prvoj, kada se enzim pre odpočinjanja reakcije inkubira fenilalaninom i drugoj, bez preinkubacije. Odnos specifičnih aktivnosti označava se kao aktivacioni nivo, koji je karakterističan za određenu formu mutiranog enzima (62).

I 6. Tetrahidrobiopterin (BH₄)

Tetrahidrobiopterin (BH₄, (6R)-L-erithro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina) je nekonjugovani pterin. Ova supstanca za sisare nije vitamin s obzirom da može da se sintetiše u organizmu. Sinteza se vrši iz guanozin trifosfata (GTP) u reakcijama koje sekvencijalno katalizuju GTP ciklohidrolaza I (GTPCH), 6-piruvoil-tetrahidropterin sintaza (6-PTPS) i sepiapterin reduktaza (SR). Prilikom konverzije L-fenilalanina u L-tirozin, BH₄, koji je esencijalni kofaktor fenilalanin hidroksilaze, oksiduje se u 4 α -hidroksitetrahidropterin (4 α -karbinolamin). Iz ovog jedinjenja nastaje kinonoid dihidropterin (qBH₂) u reakciji koju

katalizuje pterin 4 α -karbinolamin dehidrataza (PCD). Regeneraciju BH₄ iz qBH₂ katalizuje dihidropteridin reduktaza (DHPR) (Slika I 5.) (27,63).



Slika I 5. Ciklus regeneracije tetrahydrobiopterina (BH₄). Označena su dva intermedijera jedinjenja 4 α -karbinolamin i kinonoid dihidropterin (qBH₂), kao i tri enzima koji učestvuju u reakcijama: fenilalanin hidroksilaza (PAH), pterin 4 α -karbinolamin dehidrataza (PCD) i dihidropteridin reduktaza (DHPR).

Tetrahydrobiopterin ima više funkcija u organizmu. On je: kofaktor enzima fenilalanin hidroksilaze, ali i drugih enzima (tirozin hidroksilaza i triptofan hidroksilaza); negativni regulator aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, hemijski šaperon fenilalanin hidroksilaze koji stabilizuje strukturu normalnog i mutiranog enzima preko nekoliko mehanizama (videti objašnjenja u poglavlju I 5. Fenilalanin hidroksilaza). Zbog pomenutih funkcija on je za sada jedini medikament koji se koristi u lečenju bolesnika sa smanjenom funkcijom fenilalanin hidroksilaze, ukoliko se dobije pozitivan odgovor na test opterećenja BH₄ (27,61-64).

Tetrahydrobiopterin (BH₄) ima protektivni efekat sličan šaperonskom na fenilalanin hidroksilazu. On stabilizuje funkcionalne forme i sprečava proteolitičku degradaciju mutiranog proteina. Naime, BH₄ koji se nalazi u hepatocitima ne ostaje u slobodnom obliku, nego se vezuje za enzim PAH dovodeći ga u neaktivnu formu. Upravo taj kompleks ima značajnu fiziološku ulogu u stabilizaciji kako normalnog, tako i mutiranih proteina PAH i sprečavanju ubikvitin-zavisne degradacije (58,62,65,66). Tako, efekat BH₄ na mutirani protein PAH daje uvid u njegove biohemijske karakteristike u sistemu koji po svojim karakteristikama najviše odgovara *in vivo* uslovima. Još važnije, ovakav eksperimentalni pristup nudi mogućnost identifikacije onih mutacija koje su kandidati za BH₄ suplementacionu terapiju – novi pristup u lečenju fenilketonurije (66).

I 7. Gen za fenilalanin hidroksilazu

Gen za fenilalanin hidroksilazu nalazi se na hromozomu 12, u regionu 12q23.2 koji pokriva 1.5 Mbp i sem gena za PAH obuhvata još pet drugih gena nepoznate funkcije (67-69). Genomska sekvenca za PAH i njeni okolni regioni prostiru se na 171,266 bp, pri čemu 5'UTR pokriva oko 27 Kb, a 3' sekvenca nizvodno od poly(A) mesta u poslednjem egzonu oko 64,5 Kb. Trinaest egzona gena za PAH čine svega oko 2,88% genomske sekvence između start kodona i 3' poly(A) signala. Naime, postoje tri poliadenilaciona signala (AATAAA) u egzonu 13, s tim što se treći najčešće koristi. Najkraći egzon dug je 57 bp (egzon 9), a najduži 892 bp (egzon 13), pri čemu je srednja dužina egzona 170 bp. Svi egzoni su kodirajući, a dužina zrele iRNK je 2,4 kb. Što se tiče introna, najkraći je dug 556 bp (intron 10), a najduži 17,874 bp (intron2), što dovodi do srednje dužine introna od 6,390 bp. Ove veličine su uobičajene za sisarske gene (70).

Genomska sekvenca za *PAH* sadrži 40,7% GC nukleotida, što je nešto iznad prosečne vrednosti za tipičan gen kod čoveka (37 - 38%). Gustina intermedijernih nizova je oko 42,2%, što odgovara vrednosti za sisarske gene. Repetitivne DNK sekvence su prilično česte, što dovodi do velike delecije i duplikacije (71). Alu ponovci se, prema kompjuterskoj predikciji, takođe nalaze u genomskoj sekvenci za *PAH*. U genu za *PAH* ima 1198 CpG dinukleotida, koja predstavljaju potencijalna mesta rekurentne mutacije, tj. mesta na kojima bi ista mutacija mogla nezavisno da nastane više puta (70).

Do sada je identifikovano više od 500 mutacija u genu za *PAH* koje dovode do razvoja fenilketonurije (PKU mutacija). Sve mutacije zabeležene su u bazi podataka *PAH* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>). Mutacije u genu za *PAH* su pretežno "missense" tipa (63%) i dovode do zamene amino kiselinu u proteinskoj sekvenci. Male delecije (13%) i mutacije koje menjaju mesto iskrajanja introna - splajsing (11%) su relativno česte, dok su mutacije koje dovode do promene amino kiseline u stop kodon - "nonsense" (5%) i male insercije (1%) relativno retke (70). Ranije se smatralo da su velike delecije vrlo retke, ali je sa primenom MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) tehnike zabeležena njihova veća učestalost (oko 3%) (71).

I 7.1. Uticaj mutacije u *PAH* genu na aktivnost fenilalanin hidroksilaze

Mutacije u genu za PAH dovode do poremećaja u aktivnosti fenilalanin hidroksilaze. Međutim, nemaju sve mutacije isti efekat. Velike delecije i splajsing mutacije, koje remete obradu primarnog prepisa iRNK, dovode do velikih promena u primarnoj strukturi proteina i u potpunosti onemogućavaju njegovu aktivnost. Male delecije i insercije dužine koja nije deljiva sa 3, a pogotovo ako su na početku *PAH* gena, menjaju okvir čitanja genetičke informacije i uzrok su sinteze potpuno izmenjenog polipeptidnog lanca koji neće vršiti hidroksilaciju fenilalanina u tirozin. Tačkasta mutacija koja dovodi do formiranja prevremenog stop kodona onemogućava sintezu polipeptidnog lanca. Ove mutacije, označavaju se kao *funkcionalno nulte mutacije* (null mutacije). Sem ovih, u nulte mutacije ubrajaju se i neke “missense” mutacije za koje je u in vitro uslovima potvrđeno da imaju izuzetno nisku enzimsku aktivnost, <10% (72,73).

Ostale “missense” mutacije u manjoj ili većoj meri remete strukturu i/ili katalitičke osobine fenilalanin hidroksilaze dovodeći do manjeg ili većeg poremećaja u aktivnosti enzima. U *in vitro* analizama pokazano je da aktivnost mutiranih enzima PAH varira od 0% do skoro 100% u odnosu na normalnu aktivnost PAH (55).

Do sada je dobro poznato koje mutacije od registrovanih dovode do nulte enzimske aktivnosti.

I 8. Klinička slika nelečene fenilketonurije

Klinička slika HPA zavisi od koncentracije phe u krvi i dužine trajanja ovog poremećaja. Svaka koncentracija fenilalanina preko 120 $\mu\text{mol/l}$ se označava hiperfenilalaninemijom. Klinički simptomi bolesti se mogu javiti kada je koncentracija phe u krvi preko 360 $\mu\text{mol/l}$. Bez obzira na tip mutacije u genu za PAH i koncentracije phe u krvi deca sa HPA se rađaju bez kliničkih simptoma. Do povišenja koncentracije phe dolazi nakon prvih obroka, a klinički simptomi počinju da se registruju tek nakon prvih meseci života.

Mentalna retardacija je vodeća klinička manifestacija nelečenih bolesnika sa HPA, a IQ bolesnika može biti i ispod 35. Ona počinje da se registruje sa nekoliko meseci života gubitkom stečenih neuroloških funkcija. Kasnije se registruju vidne promene u ponašanju i eventualno epilepsija. Karakteristični su stereotipni pokreti, pojačani tetivni refleksi, tremor, a jedan broj bolesnika razvija sliku hemiplegije ili paraplegije koja podseća na cerebralnu

paralizu. Većina bolesnika je hiperaktivna i ima mikrocefaliju. Neurološke promene nisu reverzibilne, zbog čega je najvažnije da se sa dijete počne jako rano, već u prvom mesecu života (1,26,74-77).

Epilepsija se javlja kod oko 25% bolesnika, a po tipu može biti u obliku parcijalnih napada, infantilnih spazama ili miokloničnih napada. EEG nalaz može ukazivati na sporiju aktivnost, epileptiformna pražnjenja ili hipsaritmiju. Međutim, kod oko 50% bolesnika mogu se registrovati promene na EEGu koje ne moraju uvek biti u korelaciji sa konvulzijama. Epilepsija i promene na EEGu su reverzibilne na dijete siromašnu fenilalaninom (1,26).

Ređe, ali nekada vodeća klinička manifestacija bolesti može biti *eksplozivno povraćanje*.

Ekskrecija fenilalnina i njegovih metabolita, orto-hidroksifenilsirćetne i fenilpirogroždane kiseline u urinu i znoju dovode do neprijatnog *mirisa na „miševinu”*. Promene na koži se manifestuju slikom ekcema ili seboroičnog dermatitisa. Opisane promene na koži, za razliku od neuroloških promena, su reverzibilne nakon primene dijete siromašne fenilalaninom, a verovatno su posledica sekundarnih poremećaja u metabolizmu tirozina i triptofana kao i delovanja fenilketona. Usled poremećaja u metabolizmu tirozina mogu se javiti *smanjena pigmentacija kože i kose* (1,26).

Pored mikrocefalije bolesnici mogu imati izraženu maksilu sa široko razmaknutim zubima uz hipoplaziju gleđi. Nizak rast uz zastoje u razvoju takođe se može registrovati.

Veliki broj studija je pokazao da osobe sa nelečenom PKU imaju višu incidenciju *osteopenije*. Ovaj poremećaj na kostima se može javiti i u adolescentnom dobu kod bolesnika koji su prestali, ili se ne pridržavaju striktno dijete. Kod bolesnika bez dijete osteopenija se smatra sastavnim delom kliničke slike bolesti (78,79). Osteopenija može biti prisutna i kod bolesnika na dijete.

Deficit vitamina B12 kod jednog broja bolesnika sa HPA je najverovatnije posledica hipoproteinske dijete, a najčešće se registruje kada bolesnici odluče na prestanak unosa mešavine aminokiselina bez fenilalanina, a i dalje se pridržavaju smanjenog unosa proteina (80).

I 9. Podela hiperfenilalaninemija

Postoji više podela hiperfenilalaninemija. Podela se može izvršiti u odnosu na koncentraciju fenilalanina pre početka terapije i u odnosu na toleranciju fenilalanina.

Tolerancija predstavlja najveću količinu unetog fenilalanina kojim se održava koncentracija phe u krvi u normalnim vrednostima. Blaži oblici HPA imaju veću toleranciju fenilalanina.

Postoji velika razlika u toleranciji fenilalanina između bolesnika sa HPA. Za dva ekstremna oblika HPA se smatraju fenilketonurija (PKU) i blaga hiperfenilalaninemija (MHPA). Bolesnici sa PKU zahtevaju maksimalnu restrikciju phe u hrani, dok bolesnici sa MHPA ne zahtevaju restrikciju phe (81). Postoje razlike u mišljenju koja je najniža koncentracija fenilalanina u krvi pri kojoj treba započeti dijetu (videti poglavlje I 12.1 Terapija dijetom) (82).

Inicijalnu klasifikaciju HPA predložili su Kaylaap i saradnici 1997. godine (83). Do klasifikacije su došli analizom korelacije između mutacije u genu za *PAH* i fenotipa bolesnika. Studija je koristila podatke 365 bolesnika koji su imali 73 različite mutacije. Analiziran je efekat 48, pretežno „missense” mutacija, i na osnovu toga je izvršena podela u tri grupe:

- 1.) Fenilketonurija (PKU), najteži je oblik HPA. Koncentracija phe u plazmi nelečenih bolesnika ili bolesnika pre početka lečenja iznosi 1000 $\mu\text{mol/l}$ i više, a tolerancija phe nikad ne prelazi 500 mg dnevno. Nelečeni bolesnici su u velikom riziku da razviju težak neurološki deficit.
- 2.) Ne PKU hiperfenilalaninemija (ne-PKU HPA) podrazumeva da je pri normalnoj ishrani koncentracija phe u krvi iznad 120 $\mu\text{mol/l}$, ali uvek ispod 1000 $\mu\text{mol/l}$. Ove osobe imaju manji rizik da razviju mentalnu retardaciju u odnosu na bolesnike sa PKU.
- 3.) Varijantna PKU obuhvata osobe koje ne pripadaju ni jednoj ni drugoj kategoriji, tj. nalaze se između dve kategorije.

Od analiziranih 48 mutacija za 24 je zaključeno da uzrokuje PKU, 10 ne-PKU HPA, a 3 pripadaju grupi varijanta PKU. Za 11 mutacija utvrđeno je da imaju nestalan efekat; 9 se mogu naći u različitim fenotipskim grupama, a dve su se vidale u sve tri fenotipske grupe. Zaključeno je da većina mutacija u *PAH* genu ima stalni i nepromenljivi efekat na fenotip i da se on može predvideti na osnovu in vitro analiza. Kod manjeg broja mutacija je utvrđena inkonzistencija između in vitro i in vivo efekta, što je ukazuje da na fenotip HPA utiču i drugi faktori osim same mutacije u *PAH* lokusu.

Guldberg i saradnici 1998. godine su analizirali mutacije u genu za *PAH* kod 686 bolesnika sa HPA iz 7 Evropskih centara (72) i predložili podelu HPA na 4 kategorije:

- 1.) Klasičnu fenilketonuriju (cPKU), koja podrazumeva kompletan deficit aktivnosti PAH. Obolele osobe sa 250 - 350 mg fenilalanina unetim iz hrane u toku dana održavaju koncentraciju fenilalanina u krvi do 300 $\mu\text{mol/l}$. Bez restrikcije fenilalanina većina ovih osoba razvije tešku ireverzibilnu mentalnu retardaciju.
- 2.) Srednje tešku fenilketonuriju (mPKU). Obolele osobe tolerišu 350 - 400 mg fenilalanina dnevno.
- 3.) Blagu fenilketonuriju (MPKU), obolele osobe tolerišu 400 - 600mg fenilalanina dnevno i
- 4.) Blagu hiperfenilalaninemiju (MHPA) kada obolele osobe na normalnoj ishrani imaju koncentraciju fenilalanina ispod 600 $\mu\text{mol/l}$.

Waisbern i saradnici 2007. godine (84) smatraju za najprihvatljiviju podelom na klasičnu fenilketonuriju (koncentracije phe u krvi preko 1200 $\mu\text{mol/l}$), blagu fenilketonuriju (koncentracije phe između 600 i 1200 $\mu\text{mol/l}$) i ne PKU hiperfenilalaninemiju (koncentracija phe između 120 i 599 $\mu\text{mol/l}$).

I 10. Genotipsko fenotipska korelacija

Kod bolesnika sa PKU fenotip se može posmatrati sa više aspekata (85):

-*Klinički fenotip* podrazumeva intelektualni deficit i drugi navedeni klinički znaci bolesti ili toleranciju fenilalanina.

-*Metabolički fenotip* podrazumeva koncentraciju fenilalanina u krvi nelečenih bolesnika ili bolesnika pre početka lečenja.

-*Enzimski fenotip* označava rezidualnu enzimsku aktivnost, odnosno stepen PAH deficijencije.

Opisani fenotipovi su međusobno povezani: enzimski fenotip determiniše metabolički fenotip dok metabolički fenotip determiniše klinički fenotip. Sva tri fenotipa mogu se menjati terapijom; klinički i metabolički putem dijeta a enzimski, kod jednog broja bolesnika, primenom BH4.

Zschocke, 2008. godine (86) daje svoj doprinos u razumevanju genotipsko fenotipske korelacije u urođenim bolestima metabolizma, pa i kod smanjene funkcije PAH. On smatra da uticaj na enzimski i metabolički fenotip ima i međusobni odnos mutacija na obe genske kopije. Pokazano je da homozigoti ili složeni heterozigoti za null mutacije uvek dovode do

nulte enzimske aktivnosti. S druge strane enzimski fenotip složenih heterozigota sa jednom null i jednom blažom mutacijom dovodi do enzimske aktivnosti koja je uslovljena blažom mutacijom (*funkcionalna hemizogotnost*). Kod dece sa HPA još uvek se odluka oko terapije donosi na osnovu metaboličkog fenotipa, ali je genotipa značajna u predikciji terapijskog odgovora na BH4.

Treba imati u vidu da fenotip HPA nije tako jednostavan i da na njega utiču brojni faktori koji doprinose kompleksnosti čitavog problema. Kao što je poznato, mentalna retardacija je najvažnija klinička karakteristika bolesnika sa nelečenom PKU (klinički, odnosno kongintivni fenotip). Skorija ispitivanja su pokazala da jedan broj nelečenih bolesnika, i kada su u srodstvu, sa identičnim genotipom mogu imati različiti fenotip. U grupi sa istim genotipom opisuju se mentalno očuvane osobe, ali i osobe sa različitim stepenom mentalne retardacije. Interesantno je i da osobe mogu imati različiti klinički fenotip a isti metabolički fenotip, što se verovatno može objasniti razlikom u funkciji krvno moždane barijere ili metabolizmom slobodnog fenilalanina u mozgu. Verovatno je da uticaj na klinički fenotip ima i genotip t.j genetička kontrola supstanci koje su neophodne za transport fenilalanina u mozak (87,88). Dokaz da transport fenilalanina kroz krvno moždanu barijeru ima uticaja na klinički fenotip kod bolesnika sa istim metaboličkim fenotipom dat je još 1998. godine (89) Nuklearna magnetna spektroskopija glave je rađena kod četiri bolesnika koji nikad nisu bili na terapiji, a čija je koncentracija fenilalanina u krvi iznosila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$. Dva bolesnika su bila retardirana a druga dva su bila normalne inteligencije. Kod dva mentalno retardirana bolesnika metoda spektroskopije pokazala je visoke koncentracije fenilalanina u moždanom tkivu, dok je kod dva bolesnika sa normalnom inteligencijom ova koncentracija bila normalna. Razlika u degradaciji fenilalanina putem procesa transaminacije, kada je proces hidrosilacije poremećen, je moguće objašnjenje zašto dve osobe u srodstvu sa istom mutacijom u *PAH* genu imaju različitu toleranciju fenilalanina. Objašnjenje za razliku u toleranciji kod osoba sa istim genotipom mogu biti i varijacije u nosačima koji obezbeđuju ulazak aminokiselina, pa i fenilalanina, u jetru gde se vrši njiova razgradnja (87,88). Pominje se mogućnost da kod nekih osoba sa visokim koncentracijama fenilalanina u krvi postoje modifikatorni geni koji u najranijem detinjstvu „štite” mozak od oštećenja. Priroda ovih gena nije poznata (90)

Nutrigenetika izučava uticaj varijacija u pojedinačnim genima na sklonost (susceptibilnost) ka poremećajima i bolestima koje su povezane sa ishranom, a nutrigenomika se bavi interakcijom genoma i nutrijenata, odnosno uticajem ishrane na aktivnost gena. Uticaj

dijete na gensku ekspresiju se može određivati: prema produkciji iRNK (transkriptomika), merenjem proteina kao produkta gena (proteomika) i merenjem metabolita (metabolomika), kao naprimer fenilalanina kod bolesnika na dijete koji imaju mutaciju u *PAH* genu (91,92). Veliki doprinos u razumevanju ovih naučnih disciplina je dobijen praćenjem bolesnika sa fenilketonurijom (93).

I 10.1. Odgovor na terapiju tetrahidrobiopterinom

Odgovor na terapiju sa BH4 nije samo važan zbog mogućeg terapijskog efekta i liberalnije dijete, već može biti značajan za objašnjenje genetičkih pravila koja se vezuju za uticaje mutacija sa većom enzimskom aktivnosti u odnosu na mutacije sa manjom enzimskom aktivnosti (86).

Prvi put je 1999. godine pokazano da je kod nekih bolesnika sa hiperfenilalaninemijom (mutacija u *PAH* genu) primena BH4 dovela do značajnog smanjenja koncentracije fenilalanina u krvi dok su bili na normalnoj ishrani (94). Do tada je upotreba BH4 u terapiji bila ograničena samo na pacijente sa BH4 deficijencijom (95). Nakon ovog i drugih prijavljenih slučajeva (96-98), istraživanja su usmerena ka otkrivanju mehanizama pomoću kojih BH4 dovodi do snižavanja koncentracije fenilalanina u krvi pacijenata sa mutacijama u genu za *PAH*. (58). Pokazano je da tetrahidrobiopterin, inače, kao što je rečeno, esencijalni kofaktor i regulator aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, ima i ulogu sličnu šperonskoj na stabilizaciju aberantnih ali funkcionalnih formi enzima *PAH*. Štiteći polipeptide od degradacije, BH4 povećava količinu funkcionalnih proteina i tako omogućava razgradnju fenilalanina (66). Iz tog razloga, značajan fiziološki efekat tetrahidrobiopterina se može očekivati kod pacijenata kod kojih mutacije u genu za *PAH* dovode do delimično aktivnih enzima.

Rezidualna enzimska aktivnost, a samim tim i odgovor na BH4 terapiju se objašnjava stabilizacijom mutiranog proteina. Po definiciji null mutacija nikad nije udružena sa odgovorom na BH4. Kao što je već rečeno missense mutacije mogu dovesti do nulte, a druge mogu da ostvare izvesnu enzimsku aktivnost. Za neke bolesnike koji su homozigoti za mutacije sa rezidulanom enzimskom aktivnošću i funkcionalni hemizigoti (složeni heterozigoti sa jednom null i jednom ne null mutacijom) može se očekivati terapijski odgovor na BH4 terapiju (86,96,97).

I 11. Neonatalni skrining na fenilketonuriju

Cilj dijagnostike HPA je otkrivanje bolesti pre neuroloških simptoma, jer su promene na CNSu kod ovih bolesnika ireverzibilne. Neonatalni skrining program, kojim se otkriva HPA, kongenitalni hipotireoidizam ali i druge genetičke bolesti, prvenstveno jedan broj urođenih bolesti metabolizma, je danas sastavni deo obaveznih nacionalnih programa zdravstvene zaštite u mnogim zemljama sveta (99,100). U našoj zemlji, za sada, obavezan je skrining na fenilketonuriju i kongenitalni hipotireoidizam (16,101). Uzimanje uzoraka krvi novorođenčadi se u svim zemljama sprovodi između 3. i 5. dana života. Uzorak krvi se uzima na posebne filter papire.

Određivanje koncentracije fenilalanina je moguće pomoću više analitičkih biohemijskih metoda. *Guthrieva* semikvantitativna metoda (13), koja je danas prestala da se koristi u većini zemalja, se zasniva na inhibiciji rasta bakterija na agarnoj ploči. Što je viša koncentracija fenilalanina okrugla zona oko stavljenog uzorka krvi je veća. Dobijene okrugle zone se upoređuju sa standardima i na taj način se dolazi do približne koncentracije fenilalanina u krvi. Iako je ovaj metod bio finansijski veoma isplativ, problemi su bili: semikvantitativnost, mogućnost da drugi metaboliti kompetituju sa fenilalaninom u inhibiciji rasta bakterija i uticaj antibiotika, koji su korišćeni u lečenju infekcije majke ili deteta, na rast bakterija. *Enzimski* metoda, korišćenjem fenilalanin dehidrogenaze spada u grupu kvantitativnih metoda i daje mnogo preciznije informacije o koncentraciji fenilalanina (102) u odnosu na Guthrieov test. Uvođenjem *tandemske masene spektrometrije*, već početkom devedesetih godina prošlog veka pružena je mogućnost da se iz jednog uzorka krvi analizira veliki broj metabolita. Na ovaj način se pored aminokiselina mogu određivati i acil karnitini što daje mogućnost dijagnostike velikog broja urođenih bolesti metabolizma (103-105). Ovaj metod se danas koristi u gotovo svim zemljama zapadne Evrope i SAD. U centralnoj Srbiji do 2007. godine koncentracija fenilalanina određivana je Guthrieovim testom, a nakon toga enzimskom metodom.

Treba imati u vidu da povišena koncentracija fenilalanina u krvi koja se dobija bilo kojom metodom skrininga ne ukazuje obavezno na smanjenu funkciju enzima fenilalanin hidrosilaze kao posledice mutacije u genu. Svaki nalaz koncentracije fenilalanina iznad 180 $\mu\text{mol/l}$ zahteva ponavljanje ovog nalaza, a tek tada nastavak ispitivanja i postavljanje dijagnoze (106). Povišene koncentracije fenilalanina se mogu javiti kod prevremeno rođene dece, kod dece sa povišenim katabolizmom (naprimer kritično bolesne novorođenčadi) i kod

totalne parenteralne ishrane. U ovim situacijama potrebno je odrediti sve aminokiseline u krvi, koje su u pomenutim stanjima takođe povećane. Poznato je da kod sve novorođenčadi koja su rođena pre 33. nedelje gestacije skrining treba ponoviti posle 14 dana (99).

Iako je deficit BH4 biopterina (poremećaj u njegovoj sintezi ili recikliranju) uzrok povišenja koncentracije fenilalnina kod svega 2% bolesnika sa hiperfenilalaninemijom, kada se utvrdi povišena koncentracija fenilalanina savetuje se određivanje dihidropteridin reduktaze u eritrocitima i pterina u mokraći. Ako se dokaže poremećaj u metabolizmu biopterina uz dijetu siromašnu fenilalninom treba odmah početi terapiju sa BH4 i prekursorima neurotransmitera (107).

I 12. Terapija fenilketonurije

I 12.1. Terapija dijetom

Za sada se najbolji terapijski efekti u lečenju fenilketonurije postižu primenom dijete. Dijeta podrazumeva smanjeni unos fenilalnina, ali dovoljan unos drugih aminokiselina i proteina uopšte, u cilju obezbeđivanja normalnog rasta i razvoja i sazrevanja mozga. Prvi pokušaji dijetetskog režima dali su Bickel i saradnici 1953. godine. Oni su predlagali da se kiselim hidrolizom kazein oslobodi fenilalnina i da se primeni oralno aktivni ugalj sa ciljem da se odstrani eventualni „višak” fenilalnina (12). Danas se dijeta zasniva na mešavini aminokiselina bez fenilalnina dok se minimalne količine phe unose putem prirodnih proteina. Dokazano je da su rezultati lečenja dijetom kod novorođenčadi i odojčadi sa fenilketonurijom bolji kada je izvor prirodnih proteina majčino mleko, a ne adaptirane mlečne formule (108). U kasnijem uzrastu izvori fenilalnina su voće i povrće koji imaju manji sadržaj proteina u odnosu na meso, jaja, mleko, proizvode od mleka i žitarice. Posle prve godine života od velike pomoći u ishrani su niskoproteinski fabrički napravljeni preparati kao što su: brašno, mleko, jaja u prahu i testenine. Današnji je stav da dijeta treba da bude doživotna (109,110). Dobro kontrolisane studije su pokazale signifikatnu razliku u inteligenciji kod dece i neurološkim funkcijama kod odraslih između osoba koji su prekinuli dijetu u odnosu na one koji su ostali na dijeti posle adolescentnog uzrasta (111). Posebno je važno da se žene u toku trudnoće striktno pridržavaju dijete, jer u protivnom može doći do teških kongenitalnih anomalija ploda (99,112)

Ne postoji jedinstven internacionalni stav pri kojoj koncentraciji fenilalanina u krvi treba početi dijete ni koje su maksimalne koncentracije fenilalanina u krvi dozvoljene u odnosu na uzrast (tabela I 2.) (99,110,113,114) Za sada jedina saglasnost postoji da dijete u trudnoći mora biti veoma stroga.

Tabela I 2. Preporuke za uvođenje dijete siromašne fenilalaninom

Uzrast	Engleska **	Nemačka **	Francuska **	SAD **
Novorođenče *	>400	>600	>600	>600
2.meseca-10 godina	120-360	40-240	120-360	120-360
10-12 godina	<480	<600	<900	120-360
12-20 godina	<480	<600	<900	120-600
> 20 godina	<700	<1200	<900	120-900
Trudnoća	120-360	120-360	120-360	120-360

Legenda: *Odnosi se na uzrast kada se dobiju rezultati neonatalnog skrininga i na koncentracije pri kojima se pojedine zemlje odlučuju na početak dijete; ** Preporuke za maksimalne dozvoljene koncentracije fenilalanina u pojedinim zemljama Evrope a koncentracija fenilalanina je izražena u $\mu\text{mol/l}$

Dnevni unos fenilalanina je individualan za svakog bolesnika i označava se kao tolerancija (72,115,116). Tolerancija phe podrazumeva maksimalni dnevni unos fenilalanina koji održava koncentracije fenilalanina u krvi od 120 - 360 $\mu\text{mol/l}$. Prema Van Spronsenu (28), individualna tolerancija phe se može odrediti već u uzrastu od 2 godine.

Kada se prekorači dozvoljeni unos fenilalanina doći će do njegovog povećanja u krvi, a samim tim i u cerebrospinalnom likvoru i mozgu. Ove situacije su česte u školskom uzrastu kada deca nisu stalno pod kontrolom roditelja, a imaju želju da se ni po čemu ne razlikuju od svojih vršnjaka, pa ni po načinu ishrane. Manji unos proteina ili energetski najaktivnijih sastojaka hrane (kao što su masti i ugljeni hidrati) dovode do povećanog katabolizma i endogene produkcije fenilalanina. Ovo se dešava i u toku infekcija i trauma zbog čega bolesnici u tim situacijama treba da unesu manje fenilalanina nego obično, ali i da povećaju unos masti i ugljenih hidrata. Kod žena u toku menstrualnog ciklusa takođe se menja nivo fenilalanina u plazmi, a najviši je u toku lutealne faze (117).

I 12.1.1 Test opterećanja fenilalaninom

Do pre 10 godina svakom bolesniku sa povišenom koncentracijom fenilalanina rađen je test opterećenja fenilalaninom, kojim su se dobijali podaci kolike su maksimalne koncentracije fenilalanina u krvi pri neograničenom unosu proteina. Ovaj test se radio tako što se bolesniku omogućio neograničen unos fenilalanina iz prirodnih proteina ili se radio test opterećenja sa 180 mg/kg phe iz posebnih, veštački napravljenih preparata. Danas se ovaj test koristi samo kod bolesnika kod kojih nije sigurno da li treba započeti dijetu ili ne. To su bolesnici kod koji se skriningom dobiju koncentracije fenilalanina između 360 $\mu\text{mol/l}$ i 600 $\mu\text{mol/l}$ (118).

I 12.1.2 Ishod terapije dijetom

Normalan rast i razvoj je pokazatelj adekvatnog sprovođenja dijetе i dobre metaboličke kontrole. Evaluacija razvojnih količnika (QR, IQ) su najbolji pokazatelj dobre metaboličke kontrole. Za dobro sprovedenu dijetu očekuje se da IQ skor bude 101 ± 11 (119). Metabolička kontrolа putem dijetе je osnova za normalan intelektualni razvoj ovih bolesnika. Doživotna terapija dijetom je esencijalna za dobru metaboličku kontrolu i normalan rast ovih osoba. Ako pacijent ne unese dovoljno i ne rasporedi dobro unos mešavina aminokiselina u toku dana, ne samo da postoji opasnost od povećanja koncentracije fenilalanina zbog pojačanog katabolizma, već bolesniku pretili i poremećaj u rastu zbog energetsko proteinske malnutricije. Količina dnevnog unosa formula zavisi od dozvoljene količine prirodnih proteina, pri čemu treba obezbediti i dovoljan unos energije. Inače, za decu sa PKU koja su mlađa od 2 godine savetuje se unos proteina od najmanje 3g/kg, a posle druge godine 2g/kg (86,112). Razlog za ovu preporuku (veći unos proteina u odnosu na zdravu decu) je što kada se najveći unos proteina obezbeđuje iz mešavina aminokiselina, dolazi do brze apsorpcije aminokiselina što dovodi do smanjene sinteze proteina (120,121).

I 12.1.3 Dijeta siromašna fenilalaninom u trudnoći (maternalna fenilketonurija)

S obzirom na to da posledice loše kontrolisane dijetе u trudnoći mogu biti poražavajuće za plod uveden je pojam maternalna fenilketonurija. Problemi maternalne fenilketonurije nastaju zbog teratogenog delovanja fenilalanina na plod. U zavisnosti od koncentracije fenilalanina i dužine trajanja ovog poremećaja kod trudnice (a samim tim i

ploda) moguće su brojne kongenitalne malformacije, a najčešće su: mikrocefalija, urođene srčane mane, intrauterini zastoje u rastu, a kasnije se mogu javiti teškoće u učenju (112). Koncentracija phe u krvi fetusa je oko 1,5 do 2 puta veća u odnosu na krv trudnice. Ovo je razlog zašto u trudnoći treba težiti što nižim koncentracijama fenilalanina od oko 120 $\mu\text{mol/l}$, pa i niže (109). Treba imati u vidu da je kritičan period za razvoj fetalnog nervnog sistema između 5. i 8. nedelje gestacije. Velika kolaborativna studija je pokazala da su normalan intelektualni razvoj pokazala deca majki sa fenilketonurijom kada su koncentracije fenilalanina u krvi trudnice bili ispod 600 $\mu\text{mol/l}$ do desete nedelje trudnoće (122). Ovakvu metaboličku kontrolu nije lako postići i potrebni su obično vanredni napori trudnice. Jedan od problema je i taj što zbog specifičnosti trudnoće žene često nisu u stanju da popiju dovoljnu količinu mešavine aminokiselina, pa je nekad potrebno plasirati gastrostomu ili nazogastričnu sondu (123).

I 12.2 Druge terapijske mogućnosti

I 12.2.1 Tetrahidrobiopterin (BH4)

Kao što je već rečeno BH4 ima ulogu kofaktora fenilalanin hidroksilaze. Zaštićeno ime leka je Kuvan® i u pitanju je sintetska kopija H4 biopterina (BH4). On deluje tako što povećava afinitet PAH za phe putem stabilizacije tercijarne strukture ovog enzima. Od pre nekoliko godina dokazano je da kod nekih bolesnika sa smanjenom aktivnosti PAH, BH4 može da poveća aktivnost ovog enzima, a samim tim i toleranciju fenilalanina. Ova terapija može za oko 30% da smanji koncentraciju fenilalanina. Kako je do sada pokazano dobar terapijski odgovor ima samo jedan broj bolesnika sa mPKU (96,124,125) Pacijenti kod kojih BH4 smanjuje koncentraciju fenilalanina u krvi (često se koristi engleski naziv „responder”) mogu da povećaju dnevni unos fenilalanina za oko 500 - 100 mg ili za oko 18 - 40mg /kg telesne mase (126,127). Dnevna terapijska doza BH4 iznosi od 5 - 20mg/kg, u zavisnosti od rezidualne enzimske aktivnosti PAH (128). Kako se za sada pokazalo, osobe koje nisu bile na BH4 terapiji ili nisu učestvovala u kliničkim studijama) su u odrasloj dobi imale veću toleranciju fenilalanina (128). Visoka cena leka za sada predstavlja problem u mnogim zemljama sveta i prepreka je za njegovu primenu. U većini zemlja Evrope i SAD bolesnici sa mPKU primaju Kuvan®, ako je dokazan pozitivan terapijski odgovor.

I 12.2.2. Duge neutralne aminokiseline (DNAK)

Saznanje za kompeticiju DNAK (videti poglavlje I 4. Patogeneza oštećenja centralnog nervnog sistema) sa fenilalaninom za specifične nosače koji su neophodni za njihov transport kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta u krv i kroz krvno moždanu barijeru otvorilo je nove terapijske mogućnosti za bolesnike sa PKU. Kao što je već rečeno, s obzirom da je kompeticija zavisana od koncentracije, kod bolesnika sa visokim koncentracijama phe ova aminokiselina će biti u apsolutnoj prednosti prilikom vezivanja za nosač u odnosu na ostale DNAK. Dodavanje drugih DNAK pacijentima sa PKU smanjuje se prolazak fenilalnina kroz krvno moždanu barijeru kako je pokazano kvantitativnom spektroskopskom metodom pomoću nuklearne magnetne rezonancije mozga (129). Kada se bolesnicima obezbedi 250 - 500 mg preparata DNAK, dolazi do smanjenja koncentracije fenilalnina u krvi za 25 - 39%. Ovo je dobar način za smanjenje koncentracije fenilalnina kod bolesnika koji teže sprovede ili ne podnose dijetu, ne koriste mešavine aminokiselina bez fenilalnina, a imaju visoku koncentraciju fenilalnina u krvi (preko 1000 $\mu\text{mol/l}$). Primena DNAK ne povećava toleranciju fenilalnina. Uglavnom se nude odraslim osobama koji nisu otkriveni neonatalnim skriningom, ili iz nekog drugog razloga nisu na dijeti. Ovaj način lečenja može donekle popraviti i njihovu kongnitivnu funkciju (130,131).

I 12.3 Noviji terapijski pokušaji

Glikomakropeptid je protein koji se nalazu u surutki, a jedini je prirodni protein koji ne sadrži fenilalanin. Pored toga on sadrži u visokoj koncentraciji netoksične DNAK kao što su treonin, izoleucin i valin. Sa dodatkom još pet aminokiselina (arginin, histidin, leucin i tirozin) može da bude odličan i dovoljan izvor proteina za normalan rast i razvoj. Njegove prednosti su što je prirodni protein, prijatnog je ukusa i sa visokim sadržajem proteina. Još nije našao kliničku primenu (132,133).

Genska terapija, kako se pokazalo i kod drugih urođenih bolesti metabolizma, zbog brojnih tehničkih problema u humanoju populaciji za sada izgleda neizvodljiva (134,135). U eksperimentima na modelu miša sa fenilketonurijom, intravaskularna aplikacija rekombinatnog adenovirusa sa cDNK za murinu fenilalanin hidroksilazu dovela je do prolaznog pada u koncentraciji fenilalanina u krvi što obećava i podstiče dalja ispitivanja u humanoju populaciji (136,137).

Odlični rezultati *enzimske supsticione terapije* (EST) bolesnika sa Gaucherovom bolesti otvorila je novi terapijski model u lečenju urođenih bolesti metabolizma. Kod fenilketonurije najviše se istražuje primena enzima fenilalanin-amonium liaze (PAL) koji se izdvaja iz uzoraka nekih gljiva, biljaka i cianobakterija koji do energije dolazi putem procesa fotosinteze. Ovaj enzim (PAL) u krvi pretvara fenilalanin u trans cinamičnu kiselinu koja zatim prelazi u benzoičnu kiselinu. Benzoična kiselina nije toksična i izlučuje se putem mokraće. Enzim PAL je ujedno autokatalitički, tako da mu nije potreban kofaktor za degradaciju fenilalanina (138) Smatra se da ovaj enzim može da obavi svoju funkciju i u crevima kada se ordinira oralnim putem. Pored PAL prave se i pokušaji infuzije proteina na bazi fenilalanin hidroksilaze koji bi bili usmereni isključivo na target ćelije (139).

II Ciljevi rada

Neonatalni skrining na fenilketonurija i rana primena djeteta u cilju sprečavanja ispoljavanja ove bolesti, su svakako najbolji primeri kliničke prevencije urođenih bolesti metabolizma. Međutim, nije uvek lako doneti odluku da li treba primeniti djetetu siromašnu fenilalaninom. Odnos između genotipa i enzimskog, metaboličkog i kliničkog fenotipa su predmet brojnih istraživanja. Postavlja se pitanje koliko je detekcija mutacija u *PAH* genu dovoljna za donošenje odluke o terapiji.

Na osnovu prikupljenih podataka utvrdiće se:

1. Incidencija hiperfenilalaninemije na našim prostorima
2. Spektar mutacija u *PAH* genu na teritoriji Srbije i njihova učestalost
3. Uticaj genotipa na metabolički i klinički fenotip kod najčešćih mutacija na teritoriji Srbije
4. Koji faktor (maksimalna koncentracija fenilalnina ili tolerancija fenilalnina) ima veći uticaj u određivanju kategorije hiperfenilalaninemije.
5. Da li se na osnovu tipa mutacije kod dece sa umerenom hiperfenilalaninemijom i umerenom fenilketonurijom može doneti odluka o potrebi za terapijom.
6. Koji su faktori bitni za dobru metaboličku kontrolu kod bolesnika sa fenilketonurijom
7. Koje su mutacije u genu za *PAH* sa pretpostavljenim pozitivnim odgovorom na BH4 terapiju

III Materijal i metode

III 1. Bolesnici

Za ispitivanje incidencije hiperfenilalaninemije na teritoriji Srbije korišćeni su podaci iz medicinske dokumentacije bolesnika sa hiperfenilalaninemijom otkrivenih neonatalnim skriningom od 2000. do 2010. godine, bez obzira da li je određena mutacija u genu za *PAH*. S obzirom da je u Srbiji 98% novorođenčadi obuhvaćeno skrining programom, može se smatrati da ovi bolesnici predstavljaju i ukupan broj obolelih sa hiperfenilalaninemijom na našoj teritoriji. Podaci o broju živorođene dece u Republici Srbiji u periodu od 2000. do 2010. godine dobijeni su sa internet strane Republičkog zavoda za statistiku (<http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/Public/ReportResultView.aspx>).

U ostala istraživanja uključeni su bolesnici kod kojih je dijagnoza hiperfenilalaninemije postavljena biohemijskim metodama (Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta, Srbije „Dr Vukan Čupić”), a potvrđena analizom DNK (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo). Ukupno je bilo 61 bolesnika rođenih od 1974. godine do 2010. godine.

Osnovni podaci o bolesnicima podrazumevali su: pol, uzrast, genotip, maksimalne koncentracije fenilalnina (za bolesnike koji su na dijete koncentracija fenilalnina pre početka dijete, a za bolesnike koji nisu na dijete maksimalna koncentracija fenilalnina), koncentracije fenilalnina u krvi nakon testa opterećenja fenilalaninom, tolerancija fenilalnina, uzrast kada je započeta dijete (ako je osoba na dijete) izražena u danima, koncentracije fenilalnina u krvi kao jedan od parametara metaboličke kontrole kod bolesnika na dijete, razvojni količnici na kraju prve, druge, treće do sedme godine života i posle (u zavisnosti od uzrasta bolesnika), koncentracije fenilalnina u krvi majke, prisustvo/odsustvo epilepsije, eventualna udruženost sa drugim bolestima i druge primedbe.

Za određivanje maksimalnih koncentracija fenilalnina u krvi kod svih bolesnika rađen je test opterećenja sa fenilalaninom, uglavnom prirodnom ishranom. Ni kod jednog bolesnika klasifikacija tipa hiperfenilalaninemije nije izvršena na osnovu jedne koncentracije fenilalanina.

III 2. Biohemijske analize

Biohemijske analize koje su korišćene za potrebe određivanja koncentracije phe iz uzorka krvi na filter papiru su Guthriev test (do 2007. godine), enzimska kolorimetrijska analiza pomoću aparata „Quantase neonatal screening assay” (od 2007. godine). Aminoanalizatorom „Biochrom 30 AA+” određivana je koncentracija fenilalnina iz plazme.

Guthriev mikrobiološki, semikvantitativni test je korišćen za određivanje koncentracije fenilalnina u osušenom uzorku kapi krvi. Test se zasniva na rastu bakterija na specijalnoj agarnoj ploči ako su povišene koncentracije fenilalnina, fenilpiruvata i fenilacetata. Ploča se održava dodavanjem B-2-tienalanina koja inhibira rast *Bacillus subtilis* (ATCC 6051). Ako se na ploču doda mali krug filter papira sa osušenim uzorkom krvi u kojoj je koncentracija fenilalnina povišena, doći će do rasta bakterija. Pozitivan test će biti vidljiv golim okom jer dolazi do porasta prečnika kruga. Veličina prečnika kruga se upoređuje sa standardima i na taj način zaključuje o koncentraciji fenilalnina u krvi. Test je dosta pouzdan, a najveće prednosti su što je jednostavan i jeftin. Više od dvadeset godina se koristi kao metoda za određivanje koncentracije fenilalnina u neonatalnom skriningu.

Enzimska kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije L-fenilalanina u uzorcima kapilarne krvi se zasniva na enzimski (L-fenilalanin dehidrogenaza) katalizovanoj oksidativnoj deaminaciji L-fenilalanina u pirogrožđanu kiselinu uz istovremenu redukciju koenzima NAD^+ u NADH. Koncentracija produkovanog NADH je proporcionalna koncentraciji L-fenilalanina u krvi i određivana je kolorimetrijski na λ 570/690 nm. Kit korišćen u analizi je „Biorad neonatal quantase kit”.

Za određivanje koncentracije L-fenilalanin u fiziološkim uzorcima plazme korišćena je metoda jonoizmenjivačke tečne hromatografije („Biochrom 30 Amino Acid Analyser, Cambridge”). U cilju identifikacije i kvantifikacije ove aminokiseline ona je postkolonski derivatizovana sa ninhidrinom. Ninhidrinski derivat L-fenilalanina je detektovan fotometrijski na $\lambda=570,405$ nm. L-fenilalanin je kvantifikovan na osnovu koncentracija aminokiselina standardne smeše metodom internog standarda (L-norleucin).

III 3. Testovi za procenu inteligencije

Razvojni količnik je određivan je kod psihologa u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta, Srbije „Dr Vukan Čupić”. Za procenu inteligencije korišćeni su sledeći testovi:

1. Za decu do kraja 3. godine života nivo inteligencije se označava sa QR. Određuje se prema Brinnet-Lezine skali, koja je oformljena još 1951. godine, a svaka sredina je prilagođava svojim potrebama i u tim sredinama je uniformna. Ova skala se zasniva na proceni motornog i mentalnog razvoja dece od 2 do 30 meseci. Ona podrazumeva ocenu motorike, koordinacije, govora i socijalizacije. Normalne vrednosti su od 90 - 110.

2. Od 4. - 7. godine koristi se DUK (devijacioni umni količnik). Precizniji je od QR. Standardizovan je za svaku populaciju kao što je seoska, mali grad i grad. Klasifikacija: od 20 -40 teška mentalna retardacija; od 40 - 55 umerena mentalna retardacija; od 55 - 68 laka mentalna retardacija; od 68 - 87 granična inteligencija; od 84 - 90 širi okviri proseka; preko 90 - 110 normalna; preko 110 visoka inteligencija.

3. Posle 7. godine skraćena za inteligenciju je IQ. Ona se određuje prema REWISCU, odnosno prema revidiranom Wescerovom testu inteligencije za decu. Revizija je napravljena krajem osamdesetih godina prošlog veka. Standardizovana je za veličinu mesta različitih populacija i kulturnih sredina, pa i za našu zemlju. Klasifikacija je ista kao i kod DUK testa.

III 4. Genetičke analize

Genomska DNK je ekstrahovana iz periferne krvi na QIAamp koloni uz pomoć QIAGEN proteaze za izolaciju. Metode koje su se koristile za DNK analizu u cilju detekcije mutacija u *PAH* genu su sve bazirane na reakciji lančanog umnožavanja DNK (Polimerase chain reaction – PCR). Primenjene metode su 1.) elektroforeza na gelu sa denaturišućem gradijentom (skraćena: DGGE, engleski naziv: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (140); 2.) DNK sekvencioniranje; PCR-RFLP (Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) i PCR-ACRS (Polimerase chain reaction - Amplification-created restriction site).

Metoda DGGE nam samo ukazuje na prisustvo promene u okviru sekvence koja se ispituje. Ova metoda je korisna jer omogućava da se eliminišu one sekvence koje ne nose

promenu i dalju analizu nastavljamo samo na onim sekvencama koje sadrže promenu. Da bi se promena precizno identifikovala neophodno je primeniti i metode za direktnu detekciju mutacija poput sekvenciranja, PCR-RFLP i PCR-ACRS metode.

Metoda PCR-RFLP (Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, t.j kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restriktionog enzima. PCR-RFLP metodu korišćena je za detekciju R408W (141), L48S, R261Q, R261X i IVS10-11G>A mutacije (142,143); . www.geneticahumana.lt).

Metoda PCR-ACRS (Polimerase chain reaction –Amplification-created restriction site) je metoda koja se koristi kada ne postoji restriktioni enzim kojim se direktno može detektovati mutacija. U tom slučaju određeno restriktiono mesto može biti kreirano specifičnom mutagenezom pomoću PCR-a. Jedan od prajmera koji se koristi u PCR-u dizajniran je tako da bude komplementaran sekvenci DNK u blizini mesta gde se nalazi mutacija, ali ne potpuno. PCR-ACRS metoda korišćena je za detekciju R158Q mutacije (144).

PCR-RFLP i PCR-ACRS se izvode u dva koraka. Prvo se PCR-om pomoću specifičnih prajmera umnožava region DNK u kojem se nalazi određena mutacija, a zatim se tako dobijeni fragment DNK seče odgovarajućim restriktionim enzimom. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu, a rezultati su interpretirani u zavisnosti od toga da li restriktioni enzim seče ili ne seče DNK fragment. Napominjemo da se ove dve metode primenjuju za ciljanu detekciju već poznatih mutacija.

Sekvenciranje DNK je rađeno kitom BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksiribonukleotida koriste i 2',3'-dideoksiribonukleotidi (dd NTP) (145). Ovim kitom se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene, budući da je svaki tip dd NTP obeležen drugom fluorescentnom bojom.

Za interpretaciju promena u PAH genu i PAH lokusu (PAHdb, <http://www.pahdb.mcgill.ca>) korišćene su već poznate, referentne, mutacije (GenBank accession no. AF404777).

III 5. Statističke metode

Statistička analiza je obuhvatila deskriptivne i analitičke metode. Deskriptivne mere korišćene u obradi i prikazivanju podataka su bile srednje vrednosti, standardne devijacije, frekvencije izražene u apsolutnim i relativnim vrednostima,

Za procenu stope incidencije fenilketonurije i fenilalaninemije korišćeni su podaci o broju obolelih iz nacionalnog skrininga novorođenčadi za fenilketonuriju (dokumentacija Instituta za majku i dete) i podaci o vitalnoj statistici Republičkog zavoda za statistiku Srbije. Standardna devijacija je korišćena kao mera varijabilnosti koncentracije fenilalanina u krvi i pomoću ove vrednosti je kvantifikovana metabolička kontrola bolesti.

Utvrđivanje razlika u srednjim vrednostima (IQ, inicijalna koncentracija fenilalanina i koncentracija u različitim uzrastima, tolerancija) između različitih subpopulacija uzorka vršeno je korišćenjem t-testa i ANOVA testa. Navedeni testovi su korišćeni i u ispitivanju genotipsko-fenotipske korelacije (upoređivanje koncentracija fenilalanina i standardnih devijacija koncentracije fenilalanina između subpopulacija utvrđenih prema tipovima mutacija). Kada su upoređivani neparametarski podaci za obradu ovog tipa korišćen je Mann-Whitney-jev test.

Pearsonov koeficijent korelacije je korišćen da bi se ispitaio međusobni odnos inicijalnih vrednosti fenilalanina, prosečnih koncentracija fenilalanina i standardne devijacije koncentracije fenilalanina. Hi-kvadrat i Fisherov test su korišćeni prilikom utvrđivanja uticaja pola, tipa mutacije i broja pikova koncentracije fenilalanina na ishod bolesti (konačni koeficijent inteligencije).

Kao nivo statističke značajnosti uzeta je vrednost $P < 0.05$. Za grafičke prikaze korišćeni su histogrami frekvencija, "pie" grafikoni.. Za analizu podataka je korišćen statistički softver Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v.17.0.

III 6. Ostale informacije

Za bolesnike sa hiperfenilalaninemijom fenotip je podrazumevao: najviša koncentracija fenilalanina u krvi pre početka lečenja, za bolesnike koji nisu na dijeti najviša koncentracija phe u krvi, tolerancija fenilalanina i merenje razvojnog količnika.

S obzirom na već pomenute brojne klasifikacije HPA, i na nepostojanje jedinstvenog stava u podeli, mi smo se u ovoj studiji opredelili za podelu na:

- 1). *klasični fenilketonuriju* (CPKU) – bazalna koncentracija phe > 1200 $\mu\text{mol/l}$; tolerancija phe <20 mg/kg/dnevno – dnevna tolerancija phe 250 - 350 mg/dnevno),
- 2)*srednje tešku fenilketonuriju* (mPKU) – bazalna koncentracija phe 600 - 1200 $\mu\text{mol/l}$; tolerancija phe 20 – 25 mg/kg/dnevno, što odgovara unosu od 350 - 600 mg phe za dan),
- 3) *blaga hiperfenilalaninemija* (MHP) – bazalna koncentracija phe <600 $\mu\text{mol/l}$; tolerancija phe >25 mg/kg – što odgovara unosu phe > 600 mg dnevno) (146,72,147).

IV Rezultati ispitivanja

IV 1. Incidencija

U periodu od 2000. godine do 2010. prema podacima Republičkog Zavoda za statistiku živorođenih je 786 776 dece. Nenatalnim skriningom otkrivena su 52 novorođena deteta sa povišenim koncentracijama fenilalanina (koncentracija fenilalnina preko 180 $\mu\text{mol/l}$; HPA). Od ovog broja 10. dece je imalo koncentraciju fenilalnina između 180 i 480 $\mu\text{mol/l}$ (MHPA), a 42 bolesnika su stavljena na dijetu (koncentracija fenilalnina preko 480 $\mu\text{mol/l}$; grupa cPKU + mPKU). Kod 20 bolesnika koncentracija fenilalnina je bila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$ (cPKU).

Incidencija HPA se može proceniti na 1: 15 130 dok je incidencija cPKU 1:39 338. Jedan broj bolesnika sa koncentracijom fenilalnina u novorođenačkom uzrastu, između 600 i 1200 $\mu\text{mol/l}$, je kasnije imao na testovima opterećenja i na normalnoj ishrani koncentracije fenilalnina preko 1200 $\mu\text{mol/l}$, što ih je svrstavalo u grupu cPKU. Incidencija cPKU + mPKU iznosi 1: 18 732.

Na tabeli IV 1. prikazani su prikazani svi relevantni podaci o bolesnicima koje smo razmatrali u daljim istraživanjima izuzev metaboličke kontrole

Tabela IV 1. Tabelarni prikaz osnovnih podataka bolesnika sa hiperfenilalninemijom

58 pacijenata (117/118 hromozoma) + 3 u srodstvu (redni brojevi: 25 i 26; 34 i 35; i 46 i 47)

	Max phe ($\mu\text{mol/l}$)	Phe tol (mg/day)
cPKU	>1200	250 – 350
mPKU	600 – 1200	350 – 600
MHPA	=< 600	=> 600

DNS	Dijagnoza neonatalnim skriningom
KD	Kasna dijagnoza, >6 meseci
NPD	Nisko proteinska dijeta
LKD	Loše kontrolisana dijeta
NBD	Neopravdano bez dijete
OBD	Opravdano bez dijete (MHP)

20 - 40	TR, teška mentalna retardacija
40 - 55	UR, umerena mentalna retardacija
55 - 68	LR, laka mentalna retardacija
68 – 84	GI, granična inteligencija
84 - 90	PI, širi okvir proseka
90 - 100	NI, normalna inteligencija
> 100	visoka inteligencija

Redni broj	INICIJALI PACIJENTA I DATUM ROĐENJA	MUTACIJA 1	MUTACIJA 2	Maksimalna koncentracija fenilalanina ($\mu\text{mol/l}$)	Tolerancija fenilalanina (mg/dnevno)	Fenotip na osnovu maksimalne koncentracije fenilalanina	Fenotip na osnovu tolerancije fenilalanina	IQ	opis IQ	SKRINING i DIJETA	KOMENTARI
1	M.M. 03.05.1986.	R408W	IVS10+3 A>G	720	500	mPKU	mPKU	110	NI	DNS+NPD	Na dijete od 1. meseca do 12. godine
2	P.D. 20.10.1987.	P281L	P225T	>1200	300	cPKU	cPKU	60	LR	KD + LKD	Kasno otkrivena, u drugoj godini života, savetovana dijete, loša
3	H.R. 18.09.2001.	R408W	R408W	>1200	300	cPKU	cPKU	95	NI	DNS+NPD	Dijete početak drugog meseca
4	Š.M 13.09.1995.	L48S	R158Q	>1200	280	cPKU	cPKU	85	PI	DNS+NPD	Dijete u prvom mesecu, dobro kontrolisana prvih 5 godina
5	D.D. 23.01.1983.	IVS12+1G>A	R297H	780	520	mPKU	mPKU	95		DNS	Svega nekoliko meseci na dijete
6	T.S. 17.09.1994.	L48S	P281L	>1200	400	cPKU	mPKU	59	LR	KD+NPD	Dijete sa 6 godina, umerena mentalna retardacija, bez epi
7	I.M. 11.01.1986.	L48S	V177L	600	500	MHPA	mPKU	95	NI	DNS+NPD	Dijete od prvog meseca
8	P.P 20.12.1983.	L48S	L48S	>1200	310	cPKU	cPKU	77.5	GI	KD + NPD	Dijete sa godinu dana
9	S.M. 07.12.1990.	L48S	R408W	>1200	/	cPKU	/	90	/	DNS+NPD	Loši podaci metaboličke kontrole

10	K.S. 09.10.1994.	E390G	R261X	660	650	mPKU	MHPA	90	NI	KD+LKD	Dijeta od 1. godine, svega oko godinu dana
11	M.D. 07.08.1992.	R408W	R252Q	>1200	280	cPKU	cPKU	35	TR	KD+NPD	Otkriven posle 20. meseca
12	R.I. 15.02.1987.	R261Q	S16fs	>1200	300	cPKU	cPKU	92	NI	DNS+NPD	Na dijeti od 1,5 meseci
13	P.K. 21.04.2000.	E390G	R158Q	540	700	MHPA	MHPA	100	NI	DNS+NPD +OBD	Na dijeti do 3. meseca
14	S.M. 02.04.1990.	R408W	P225T	>1200	280	cPKU	cPKU	100	NI	DNS+NPD	Na dijeti od prvog meseca
15	S.M. 05.08.1986.	R261Q	I306V	720	750	mPKU	MHPA	110	NI	DNS+NPD +OBD	Dijeta samo prvih 5 meseci
16	J.M. 15.02.1993.	L48S	R261Q	>1200	300	cPKU	cPKU	50	UR	DNS+LKD	Dijeta sa 4 meseca, loše sprovedena, RPM, epi
17	O.V. 20.01.1988.	R408W	E390G	>1200	400	cPKU	mPKU	80	GI	DNS+ NPD + NBD	Dijeta sa 3 meseca do 3,5 godine
18	A.I. 25.06.1996.	L48S	R158Q	>1200	300	cPKU	cPKU	90	NI	DNS + NPD	Dijeta prvi mesec
19	M.S. 18.10.1992.	L48S	R408W	>1200	300	cPKU	cPKU	84	GI	DNS + LKD	Dijeta u prvom mesecu, dobra do oko 3. godine
20	P.M. 07.06.2000.	P281L	IVS12 +1G>A	2460	320	cPKU	cPKU	98	NI	DNS + NPD	Dijeta prvi mesec
21	N.J. 28.09.1981.	L48S	P281L	>1500	350	cPKU	cPKU	60	LR	KD + NPD	Kasno započeta dijeta u 20. mesecu

22	T.K. 01.06.2001.	P281L	P281L	>1200	340	cPKU	cPKU	30-35	TR	KD + NPD	Dijeta sa 13 meseci, epi
23	R.A. 30.05.1989.	R111X	R111X	>1200	290	cPKU	cPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta od 1. meseca
24	B.B. 27.09.2001.	R111X	IVS10-11G>A	>1200	300	cPKU	cPKU	30	TR	KD+NPD	Dijeta sa 27 meseci, epi
25	R.D. 30.01.2002.	R408W	E390G	>1200	300	cPKU	cPKU	95	NI	KD+NPD	Na dijeti od 17 meseci
26	R.K. 15.05.2003.	R408W	E390G	>1200	260	cPKU	cPKU	95	NI	DNS+ NPD	Na dijeti od 1. meseca
27	K.A. 28.03.2003.	L48S	R408W	>1200	350	cPKU	cPKU	105	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
28	S.M. 17.04.1981.	L48S	Q20X	>1200	300	cPKU	cPKU	89	PI	KD + NPD	IQ 45 pre dijete, dijeta u 3. godini : dobra dijeta; posle dve godine dijete IQ 74, posle 5 godina dijete IQ 89: vrlo dobar djak u školi
29	B.U. 18.02.1992.	L48S	L48S	1180	/	mPKU	/	90	NI/	KD+LKD	/
30	K.A. 23.03.2004.	V177L	Q20X	1200	600	mPKU	MHPA	90	NI	DNS + NPD	Dijeta u uzrastu od 2,5 meseca
31	P.J. 07.02.2005.	L48S	I306V	>1200	280	cPKU	cPKU	110	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
32	Ž.Ž. 06.05.2005.	R261X	I306V	600	=> 600	MHPA	MHPA	80	GI	DNS + NPD + OBD	Dijeta do kraja prve godine, roditelji prekinuli

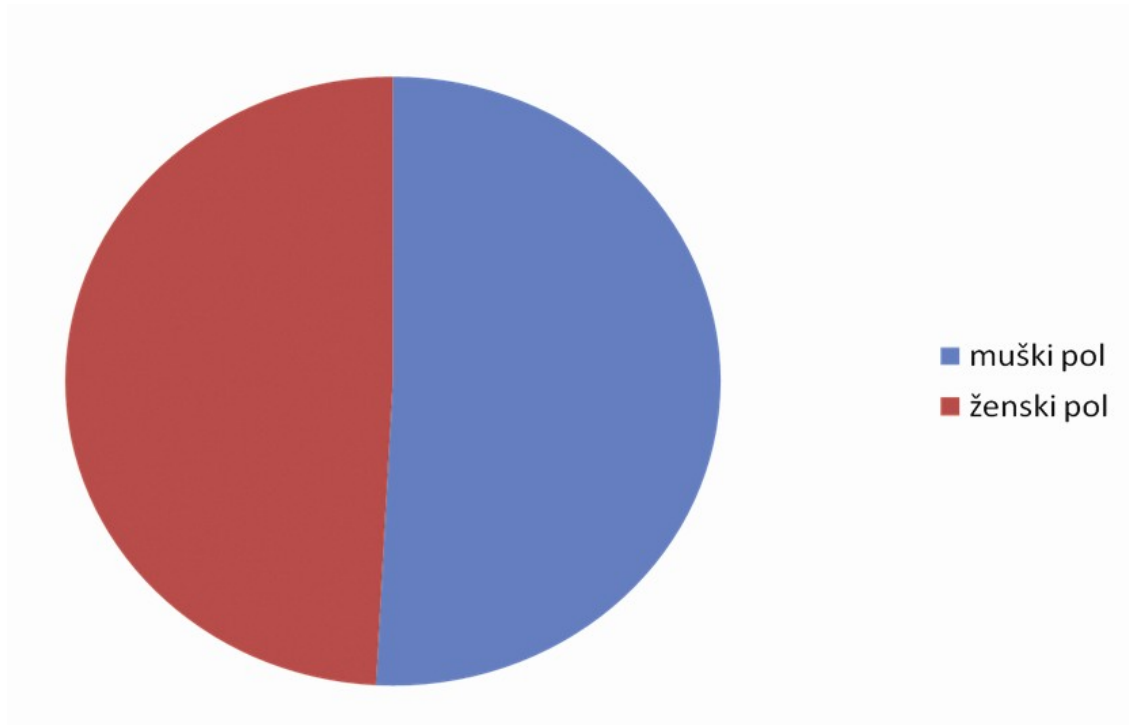
33	R.V. 14.06.2005.	R408W	E390G	900	400	mPKU	mPKU	75	GI	DNS + LKD	Dijeta u prvom mesecu, loša socijalna sredina, loša dijeta
34	K.D. 1999	L48S	S231F	>1200	230	cPKU	cPKU	20	TR	KD + NBD	Otkrivena u 5. godini, nije bila na dijeti
35	K.R. 28.02.2003.	L48S	S231F	>1200	240	cPKU	cPKU	25	TR	KD + NBD	Otkriven u 18. mesecu nije bio na dijeti
36	B.N. 07.09.2005.	R408W	R413P	>2000	260	cPKU	cPKU	103	NI	DNS + NPD	Na dijeti od 1. meseca
37	M.O. 10.12.1974.	L48S	R408W	>1200	500	cPKU	mPKU	110	NI	KD + NPD	Dijeta od 22 meseca do 5. godine i posle u trudnoći
38	C.D. 1985	L48S	L48S	700	/	mPKU	/	/	/	/	Nema karton
39	D.V. 06.02.2007.	R243X	R243X	1680	290	cPKU	cPKU	85	PI	DNS + LKD	Dijeta prvi mesec, loša
40	V.M. 03.06.2005.	L48S	I306V	1080	210 - 610	mPKU	mPKU	35	TR	KD + NBD	RPM, bez dijete, hraniteljska porodica, mogući drugi uzroci mentalne ratardacije
41	J.S. 14.04.2008.	L48S	R408W	>1200	350	cPKU	cPKU	102	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
42	S.N. 20.04.2007.	L48S	P225T	2400	280	cPKU	cPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu

43	S.E. 03.01.2008.	L48S	L48S	>1200	330	cPKU	cPKU	80	GI	DNS + LKD	Dijeta u 1. mesecu, loše se sprovodi. Majka L48S/L48S, phe 1200; bez dijete; IQ 80
44	R. N. 06.08.2007.	R408W	V177L	760	550	mPKU	mPKU	95- 100	NI	DNS + NPD	Dijeta prvi mesec
45	Š.L. 10.12.2007.	P281L	E390G	1200	400	mPKU	mPKU	95- 100	NI	DNS + NPD	Dijeta prvi mesec
46	J.S. 16.03.2007	L48S	L48S	1200	400	mPKU	mPKU	110	NI	DNS + NPD	Dijeta u 11. mesecu; unos phe i do 600mg, IQ bez promena
47	J.L. 16.03.2007.	L48S	L48S	1200	400	mPKU	mPKU	115	NI	DNS +NPD	Dijeta u 11. mesecu; unos phe i do 600mg, IQ bez promena
48	C.E. 14.05.2007.	L48S	L48S	1200	450	mPKU	mPKU	85	PI	DNS + NBD	Bez dijete (IQ određen u 15. mesecu)
49	Đ.G. 17.08.2008.	L48S	R158Q	>1200	300	cPKU	cPKU	87.5	PI	DNS + LKD	Dijeta u prvom mesecu, socijalno zapušteni, loša dijeta, phe majke 780-L48S/L48S, nikad na dijete, IQ majke 80
50	Š.N. 22.09.2007.	R408W	I306V	1440	350	cPKU	cPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta sa 2 meseca
51	Ž.A. 15.03.2009. a	R408W	A403V	420	=> 600	MHPA	MHPA	90	NI	DNS + OBD	Bez dijete

52	M.M. 03.04.2009.	I306V	P416Q	780	=> 600	mPKU	MHPA	95-100	NI	DNS + NPD + OBD	Dijeta do 5. meseca kada je urađen test opterećenja
53	M.L. 27.04.2010	IVS10-11 G>A	Y414C	>1200	280	cPKU	cPKU	95	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
54	V.F. 08.10.2010	L48S	L48S	900	550	mPKU	mPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
55	J.I. 13.11.2010	L48S	V177M	300	=> 600	MHPA	MHPA	100	NI	DNS + OBD	Nije na dijeti
56	S.S. 02.05.2011	L48S	R408W	>1200	300	cPKU	cPKU	97.5	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
57	V.L. 30.08.2011	L48S	R408W	>1200	340	cPKU	cPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta u prvom mesecu
58	A.U. 2011	L48S	L48S	540		MHPA	MHPA	/	95	/DNS	/Dijeta u prvom mesecu
59	L.V. 18.06.2009	Y414C	L213P	>1200	260	cPKU	cPKU	100	NI	DNS + NPD	Dijeta od 20. dana života
60	S.Z 1987	L48S	L48S	>1200	>600	cPKU	MHPA	84	GI	KD+NBD	Majka pacijenta pod rednim brojem 43
61	Đ.M. 1990	L48S	L48S	>1200	>600	cPKU	MHPA	82,5	GI	KD+NBD	Majka pacijenta pod rednim brojem 49

IV 2. Pol

Od ukupnog broja (61) analiziranih bolesnika 30 je ženskog pola, a 31 muškog pola.



Slika IV 1. Distribucija bolesnika po polu

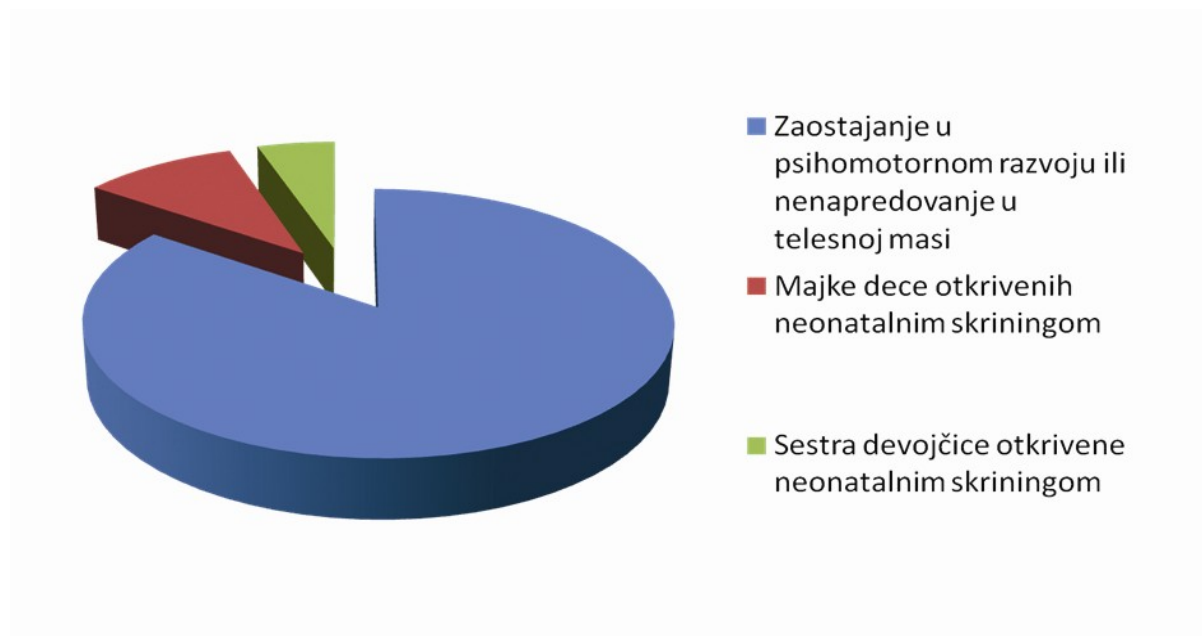
IV. 3 Uzrast bolesnika

Analizirani bolesnici su rođeni u periodu od 1974. godine do 2011. godine. Samo jedna bolesnica je rođena pre 1983. godine, odnosno pre zvaničnog početka skrininga na teritoriji Srbije. Najveći broj analizirane dece rođen je 2007. godine. Najveći broj bolesnika je u vreme analiziranja rezultata imao preko 2 godine što je značajno za tumačenje tolerancije fenilalnina.

IV.3.1. Uzrast prilikom postavljanja dijagnoze hiperfenilelninemije

Od ukupnog broja (61) bolesnika kod njih 43 (70,5 %) HPA je otkrivena neonatalnim skriningom (slika IV 2.).

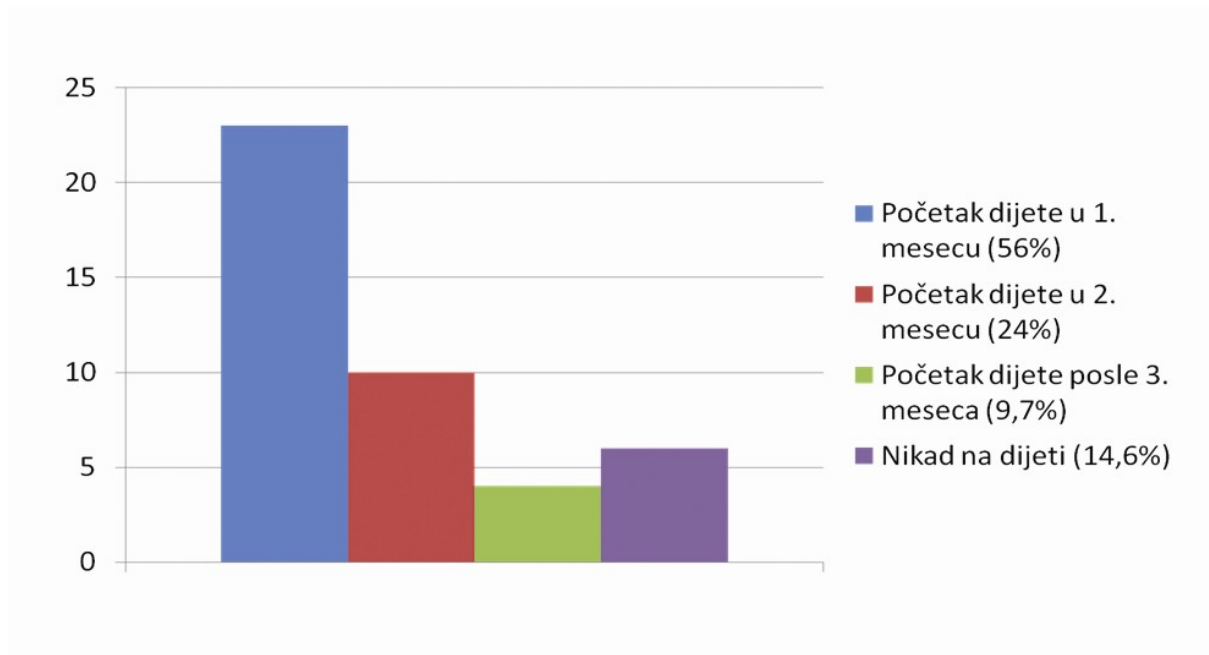
Kod ostalih 18 bolesnika dijagnoza je postavljena posle novorođenačkog uzrasta. Ispitivanjem etiologije zastoja u psihomotornom razvoju dijagnoza HPA je postavljena kod 14 bolesnika (77% u odnosu na ukupan broj sa kasno postavljenom dijagnozom). Kod dve majke (11%) do dijagnoze se došlo nakon postavljanja dijagnoze fenilketonurije neonatalnim skriningom kod njihove dece. Kod jedne devojčice (5,5%) iz Vojvodine dijagnoza hiperfenilalninemije postavljena je u osamnaestom mesecu života nakon utvrđivanja ove bolesti kod njene mlađe sestre neonatalnim skriningom. U vreme rođenja starije sestre (pre 2007. godine) u Vojvodini se nije sprovodio masovni skrining na fenilketonuriju.



Slika IV 2. Uzroci kasno otkrivenih pacijenata sa hiperfenilelninemijom

IV 3.2. Uzrast bolesnika prilikom početka dijete siromašne fenilalaninom

Kod 30 (69 %), od 43 bolesnika koji su otkriveni neonatalnim skriningom dijeta je započeta u prvom mesecu života, kod 3 (24%) u drugom mesecu života, kod 5 (9,7%) posle 2. meseca života, dok 6 (14,6%) bolesnika nikada nije bilo na dijete (slika IV 3.). Kod 5 od 6 bolesnika koji nikada nisu bili na dijete koncentracije phe u krvi nisu zahtevale dijete. Kod jednog bolesnika roditelji su odbili sprovođenje dijete.



Slika IV 3. Distribucija uzrasta započinjanja dijete

IV 4. Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu

PAH genotip nije urađen kod svih bolesnika sa hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije uglavnom zbog nezainteresovanosti bolesnika za ovu vrstu dijagnostike (davno postavljena dijagnoza hiperfenilalaninemije i prestanak terapije) ili zbog tehnički loše uzetih uzoraka krvi za analizu. Nekompletna medicinska dokumentacija kod manjeg broja bolesnika sa urađenim genotipom, je bila razlog da se ovi pacijenti ne uključe u studiju. Kod jednog bolesnika genetskim analizama nije utvrđena mutacija u *PAH* genu, a kako je kasnije potvrđeno bolesnik ima mutaciju u genu za 6-piruvoil tetrahidropterin sintetazu. Ovo je prvi bolesnik sa teritorije Srbije kod kojeg je dokazan deficit BH4.

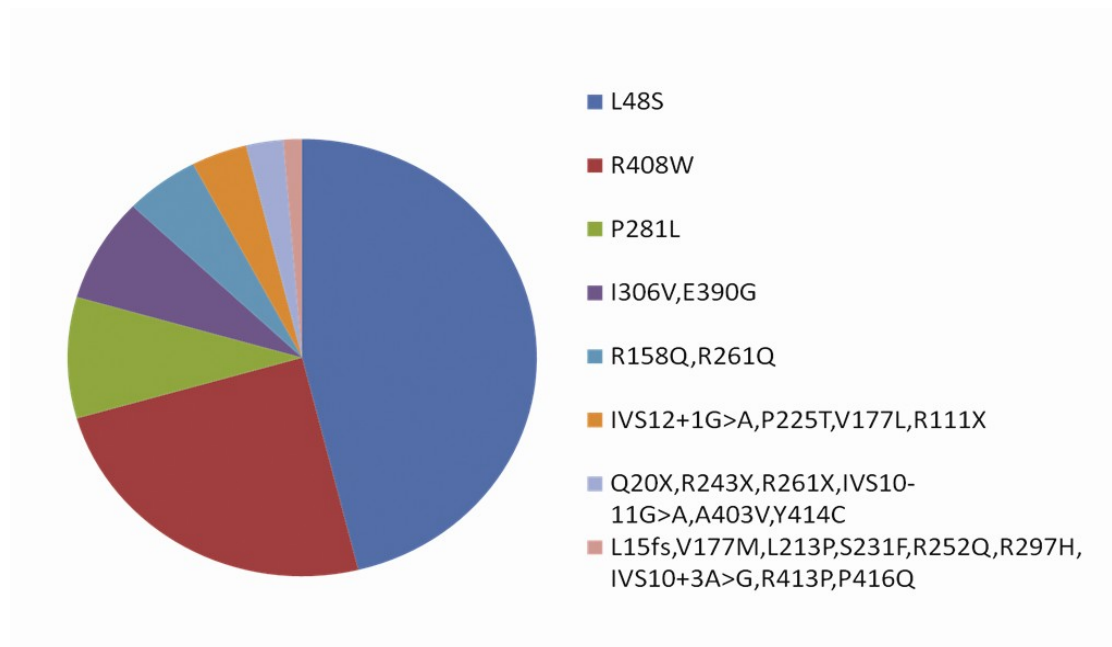
Od 61 analiziranih bolesnika bilo je tri para rođaka (rođeni braća i sestre; u tabeli IV1. pod rednim brojevima 25 i 26, 34 i 35, 46 i 47). Analizirano je ukupno 116 nesrodnih potencijalno mutiranih alela. Kod 113 alela utvrđeno je prisustvo po jedne patogene mutacije, dok je kod dva nesrodna alela utvrđeno da nose dve mutacije. Kod jedne majke deteta sa fenilketonurijom otkrivenog neonatalnim skriningom utvrđen je isti genotip (L48S/L48S) kao i kod deteta, dok je kod druge majke genotip (L48S/L48S) bio različit u odnosu na genotip kod deteta (L48S/R158Q). Kod obe porodice nije poznat genotip oca.

U populaciji od 61 bolesnika u Srbiji utvrđeno je prisustvo 26 različitih mutacije u genu za *PAH*. Ove mutacije su se javljale u vidu homoalelnih ili heteroalelnih homozigota (složeni heterozigot). Od ukupnog broja mutacija 18 su po tipu missense, 4 nonsense, 3 splice site i 2 nukleotidne delecije koje dovode do frameshift mutacije. Učestalost najčešće mutacije u srpskoj populaciji p.L48S je 31%. Po učestalosti slede: p.R408W (16.4%), p.P281L (6%), p.E390G (5.2%) i p.I306V (5.2%). *Ovih pet mutacija čine 2/3 ukupnog broja mutacija u našoj sredini.* Ostale mutacije (p.L15/S16fsCTdel, p.Q20X, p.R111X, p.R158Q, p.V177L, p.V177M, p.L213P, p.P225T, p.S231F, p.R243X, p.R252Q, p.R261Q, p.R261X, p.R297H, IVS10+3, IVS10-11G>A, p.A403V, p.R413P, p.Y414C, p.P416Q and IVS12+1G>A) se javljaju sa učestalošću manjom od 3.5%. Na tabeli IV 2. prikazane su mutacije, broj hromozoma sa određenim tipom mutacije i njihova učestalost u Srpskoj populaciji.

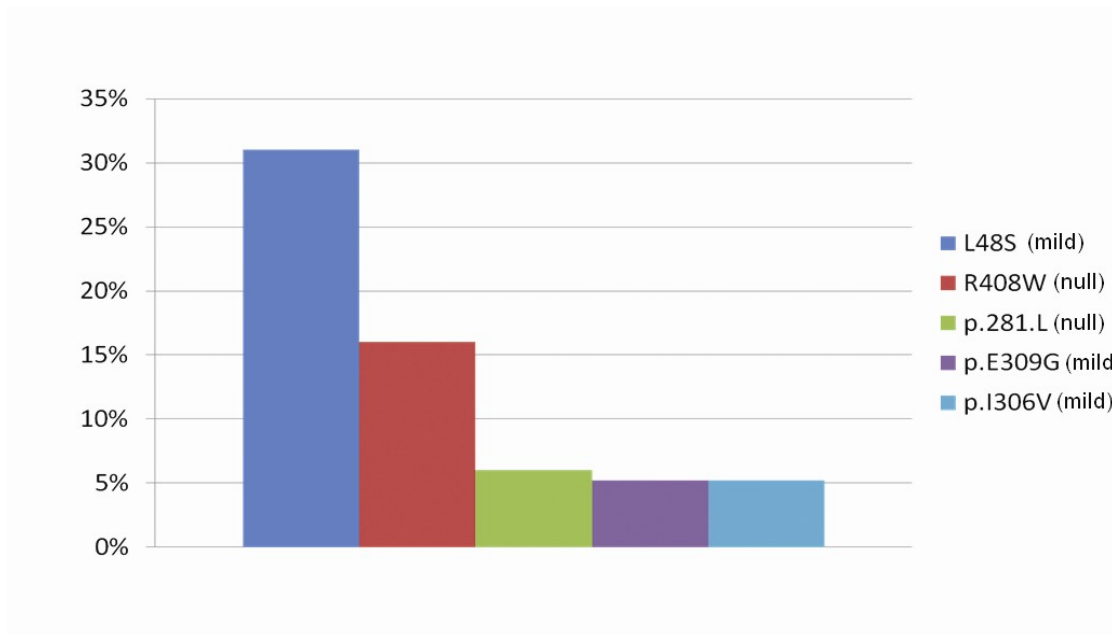
Tabela IV 2. Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu i njihova učestalost u populaciji Srbije

Mutacije		Ukupan broj hromozoma sa mutacijom	Relativna učestalost (%)	Tip mutacije
Na nivou proteina	Na nivou c.DNK			
p.L15fs	c.47_48delCT	1	0.9	frameshift
p.Q20X	c.58C>T	2	1.7	nonsense
p.L48S	c.143T>C	36	31.0	missense
p.R111X	c.331C>T	3	2.6	nonsense
p.R158Q	c.473G>A	4	3.4	missense
p.V177L	c.529G>C	3	2.6	missense
p.V177M	c.529G>A	1	0.9	missense
p.L213P	c.638T>C	1	0.9	missense
p.P225T	c.673C>A	3	2.6	missense
p.S231F	c.692C>T	1	0.9	missense
p.R243X	c.727C>T	2	1.7	nonsense
p.R252Q	c.755G>A	1	0.9	missense
p.R261Q	c.782G>A	4	3.4	missense
p.R261X	c.781C>T	2	1.7	nonsense
p.P281L	c.842C>T	7	6.0	missense
p.R297H	c.890G>A	1	0.9	missense
p.I306V	c.916A>G	6	5.2	missense
IVS10+3A>G	c.1065+3A>G	1	0.9	splice site
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	2	1.7	splice site
p.E390G	c.1169A>G	6	5.2	missense
p.A403V	c.1208C>T	2	1.7	missense
p.R408W	c.1222C>T	19	16.4	missense
p.R413P	c.1238G>C	1	0.9	missense
p.Y414C	c.1241A>G	2	1.7	missense
p.P416Q	c.1247C>A	1	0.9	missense
IVS12+1G>A	c.1315+1G>A	3	2.6	splice site

Na narednim slikama (slike IV 4. i IV 5.) prikazana je distribucija mutacija u genu za *PAH* kod ispitivanih bolesnika sa teritorije Srbije, kao i učestalost najčešćih mutacija. Uočljivo je da je daleko najčešća mutacija u našoj populaciji L48S.



Slika IV 4. Distribucija mutacija u populaciji bolesnika sa hiperfenilalaninijom.



Slika IV 5. Distribucija najčešćih mutacija u populaciji Srbije

Genotipska homozigotnost za p.L48S, p.R111X, p.R243X, p.P281L i p.R408W je utvrđena kod 12 bolesnika koji nisu u srodstvu. Među njima osam su bili homozigoti za

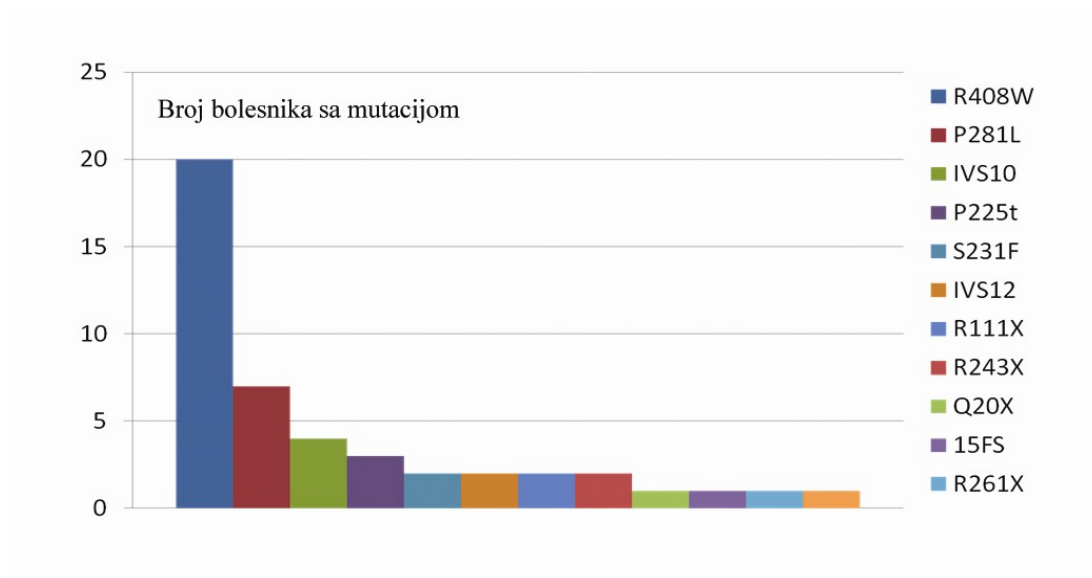
p.L48S mutaciju, odnosno njihov genotip je: [p.L48S];[p.L48S]. Homozigotnost je utvrđena i kod p.I306V mutacije kod dva bolesnika, ali je kod ovih bolesnika registrovano prisustvo i treće mutacije tako da je njihov genotip: p.[R261Q; I306V]; [I306V] i p.[R408W; I306V]; [I306V].

Od ukupnog broja mutacija za 15 se smatra da dovode do nulte enzimske aktivnosti, dok kod ostalih 11, se može očekivati izvesna, manja ili veća, enzimska aktivnost (tabela IV 3.)

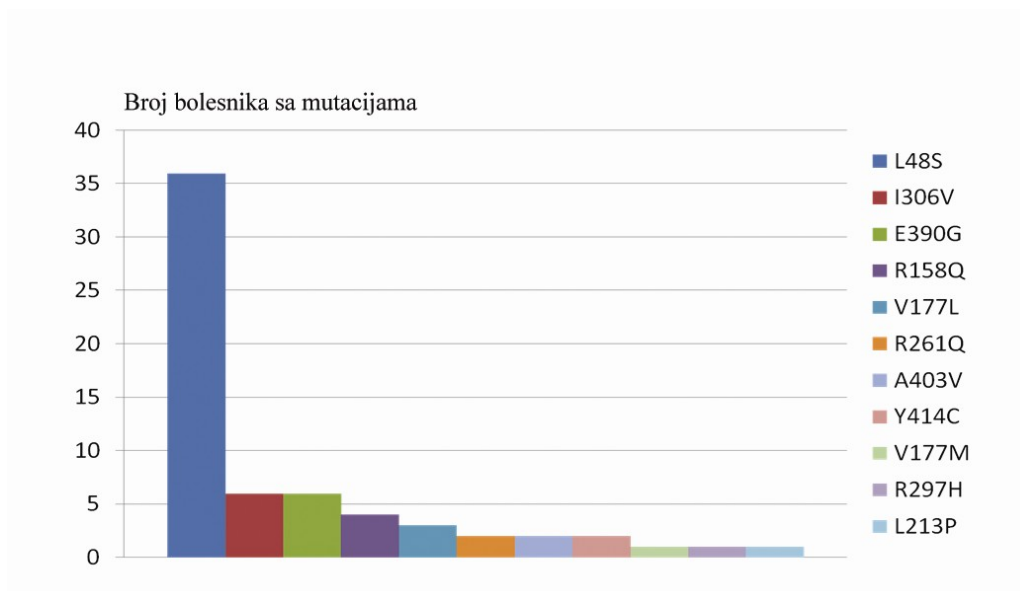
Tabela IV 3. Prikaz mutacija sa nultom enzimskom aktivnošću (null) i mutacija sa izvesnom enzimskom aktivnošću (ne null) kod bolesnika na teritoriji Srbije

Mutacije u genu za PAH za koje je poznato da dovode do nulte enzimske aktivnosti, PAH –takozvane null mutacije	Mutacije u genu za PAH kod kojih može postojati enzimska aktivnost PAH – takozvane ne null mutacije
P281L	L48S
R408W	R261Q
P225T	I306V
S231F	R158Q
Q20X	V177L
IVS12+1G>A	V177M
R111X	A403V
S16fs	E390G
R243X	Y414C
R261X	R297H
R413P	L213P
IVS10+3A>G	
IVS10-11G>A	
R252Q	
P416Q	

Učestalost null mutacija u Srpskoj populaciji prikazana je na slici IV 6. Dok je učestalost ne null mutacija prikazano na slici IV 7.



Slika IV 6. Distribucija null mutacija u populaciji Srbije



Slika IV 7. Distribucija ne null mutacija u populaciji Srbije

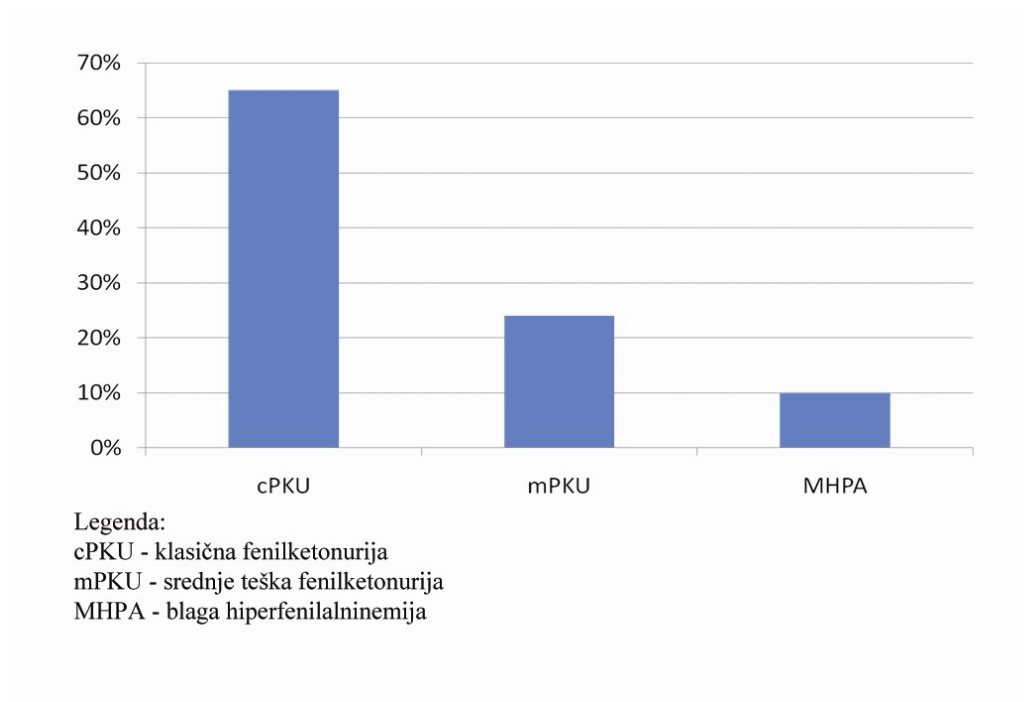
Kako je pokazano genetičkim analizama utvrđeno je ukupno 39 različitih genotipova, od kojih se 33 nije ponavljalo, već je svaki od ovih genotipova registrovan samo u jednoj porodici.

U odnosu na tip mutacije, najviše je pacijenata sa kombinacijom null/ne null mutacije (46,8%).

IV 5. Fenotipske karakteristike

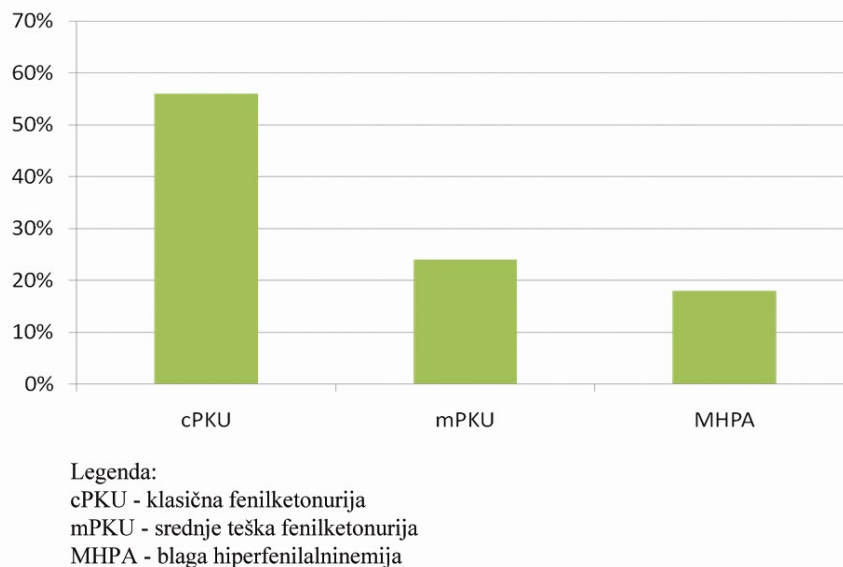
Bolesnici su podeljeni u tri fenotipske kategorije: klasičnu fenilketonuriju (cPKU); srednje tešku fenilketonuriju (mPKU) i blagu hiperfenilalaninemiju (MHPA) u odnosu na maksimalnu koncentraciju fenilalnina, a zatim u odnosu na toleranciju fenilalnina.

U odnosu na maksimalnu koncentraciju fenilalnina u analiziranoj populaciji bilo je 38 bolesnika sa cPKU (65%), 14 sa mPKU (24%) i 6 sa MHPA (10%) (slika IV 8.).



Slika IV 8. Procenat zastupljenosti fenotipskih kategorija hiperfenilalaninemije na teritoriji Srbije prema maksimalnoj koncentraciji fenilalnina.

U odnosu na toleranciju fenilalnina u analiziranoj populaciji bilo je 33 bolesnika sa cPKU (56%); 14 sa mPKU (24%) i 11 sa MHPA (18%) (slika IV 9.).



Slika IV 9. Procenat zastupljenosti fenotipskih kategorija hiperfenilalaninemije na teritoriji Srbije prema maksimalnoj koncentraciji fenilalanina.

Kod 16% bolesnika postoje razlike u odnosu na vrstu određivanih parametara (maksimalna koncentracija ili tolerancija fenilalanina) koji se koristi u klasifikaciji, a kako će se videti kasnije najizraženije razlike su kod bolesnika sa L48S mutacijom. Kada postoje razlike, kao što se može videti iz tabele IV 1. koncentracija fenilalanina u krvi, gotovo uvek određuje teži oblik hiperfenilalaninemije u odnosu na toleranciju. Ako se posmatraju bolesnici sa najčešćom L48S mutacijom, čak kod 20% postoji razlika u klasifikaciji HPA između koncentracije fenilalanina u krvi i tolerancije fenilalanina.

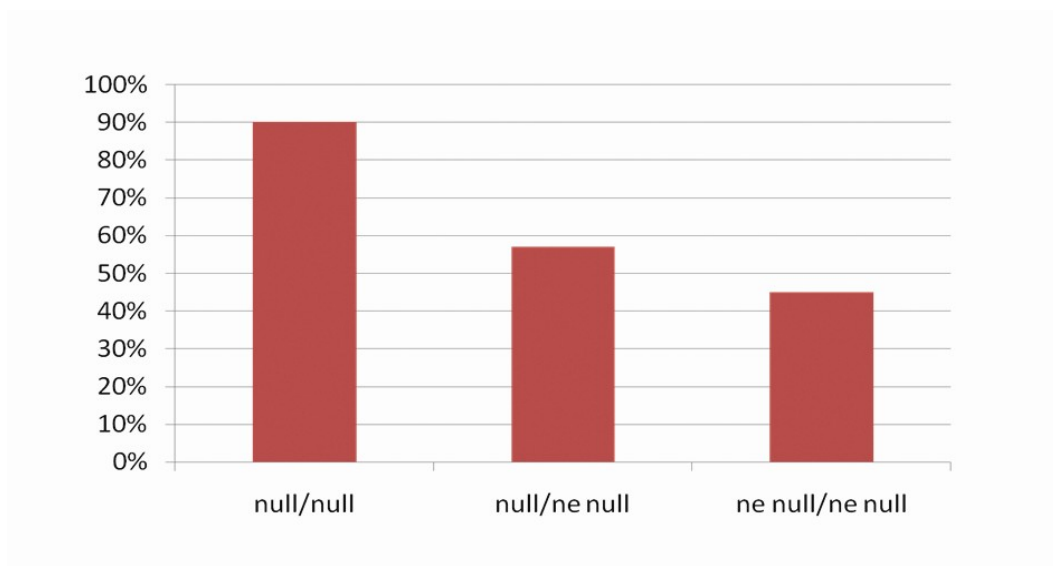
IV 6. Genotipsko fenotipska korelacija

Studija genotipsko fenotipske korelacije je obuhvatila 61 bolesnika sa teritorije Srbije kod kojih je utvrđena hiperfenilalaninemija.

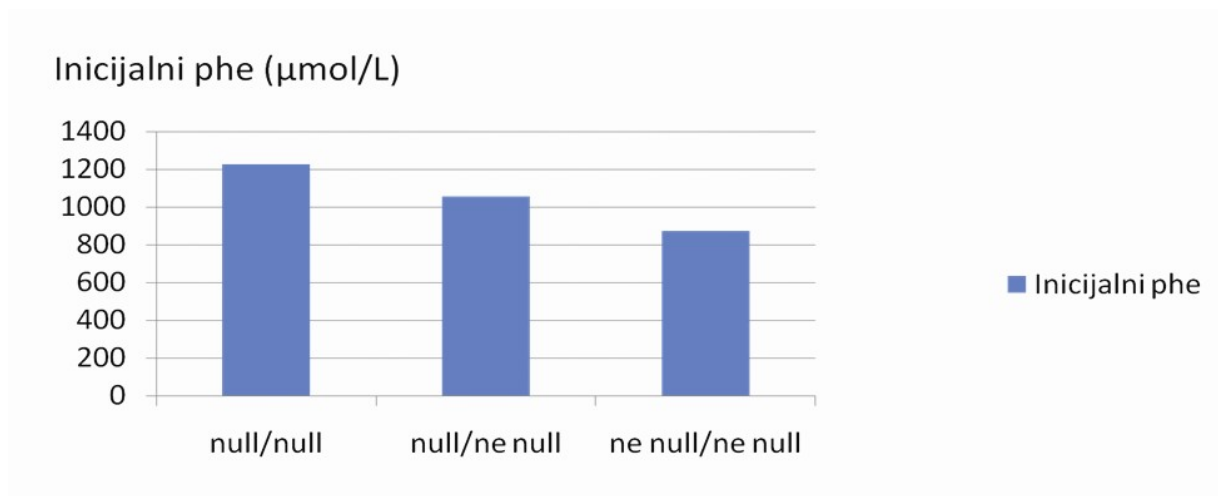
Najveći broj bolesnika sa hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije ima klasičnu fenilketonuriju, tako da se može zaključiti da je većina mutacija u srpskoj populaciji vezana sa klasičnom fenilketonurijom.

Na slici IV 10. prikazana je procentualna zastupljenost cPKU kod različitih genotipova: [null];[null], [null];[ne null] i [ne null];[ne null]. Očekivano je da je procentualno daleko najveći broj bolesnika sa cPKU u kombinaciji dve nulte mutacije, ali je neočekivano

da i relativno veliki procenat bolesnika koji ima dve mutacije sa određenom enzimskom rezidualnom aktivnosti ima klasični oblik fenilketonurije.



Slika IV 10. Procentualna zastupljenost klasične fenilketonurije kod različitih genotipova



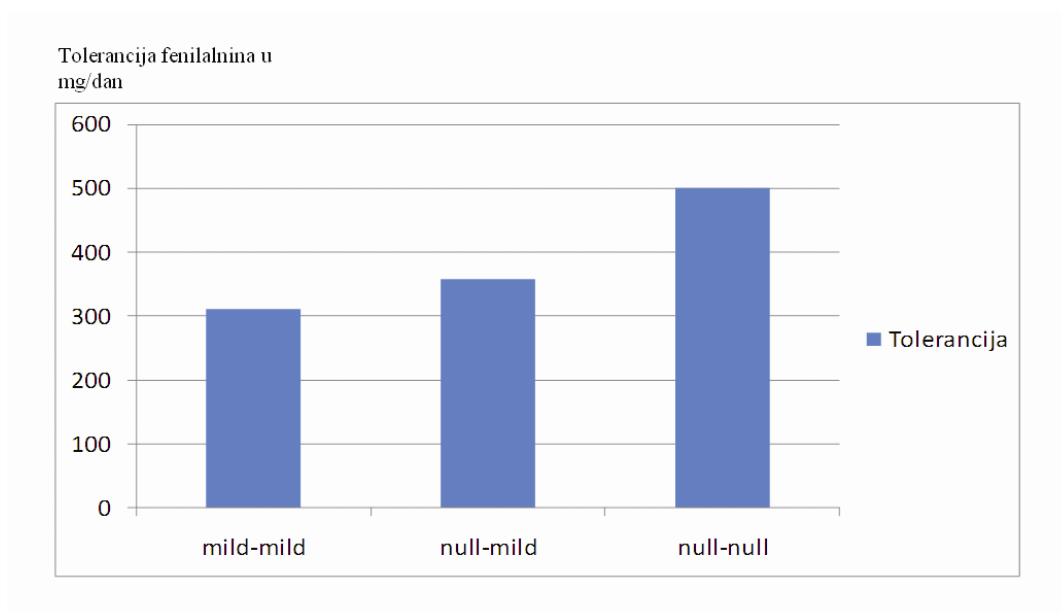
Anova F = 4,473 p 0,016

Legenda: phe - fenilalanin

Slika IV 11. Korelacija između maksimalne koncentracije fenilalanina i tipa mutacije

Prema ANOVA testu postoji značajna statistička razlika između pacijenata u vrednosti maksimalne koncentracije fenilalanina u odnosu na tip mutacije (p 0.016, F 4,473) iz čega se može zaključiti da je prisustvo null mutacije udruženo sa statistički značajno većom verovatnoćom za pojavu klasične fenilketonurije (slika IV 11.).

Analiziran je i odnos između različitih genotipova i tolerancije fenilalanina. Utvrđena je statistički značajna razlika, prema ANOVA testu, u odnosu na tip mutacije i toleranciju fenilalanina. Najmanju toleranciju fenilalanina su imali bolesnici koji su bili homozigoti ili složeni heterozigoti za dve null mutacije (slika IV 12.).



Slika IV 12. Razlika u toleranciji fenilalanina u odnosu na genotip

IV 6.1. Analiza genotipsko fenotipske korelacije bez L48S mutacije

IV 6.1.1 Homozigoti

Bez L48S mutacije svega četiri bolesnika (tabela IV 1.) su homozigoti za različite mutacije i to R408W, P281L, R111X i R243X. Sve četiri mutacije po svojim karakteristikama imaju nultu enzimsku aktivnost, tako da je potpuno očekivano da ovi bolesnici imaju sve karakteristike klasične fenilketonurije (cPKU). Prve dve mutacije pripadaju najčešćim mutacijama na našem području.

IV 6.1.2 Heteroalelna homozigotnost (složeni heterozigoti)

Heteroalelnih homozigota za dve null mutaciju ima 7 (tabela IV 1.). Svih sedam bolesnika takođe pripada grupi cPKU.

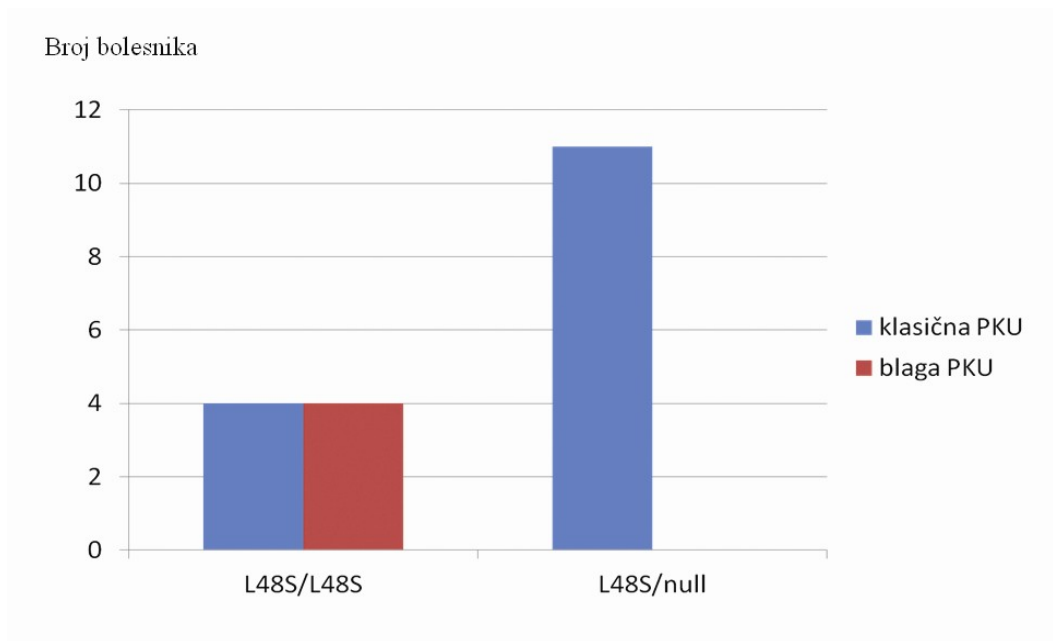
Heteroalelnih homozigota za dve ne null mutacije (bez L48S mutacije koja će biti posebno analizirana) ima svega dva (tabela IV 1.). Bolesnici imaju fenotip blage hiperfenilalaninemije (MHPA).

Bolesnika sa genotipom [null];[ne null] (bez L48S) ima 16 (tabela IV 1.). U ovoj grupi 6 bolesnika ima sliku cPKU, 8 mPKU, a tri bolesnika MHPA. Očito je da je fenotip ovih bolesnika određen mutacijom koja nema nultu enzimsku aktivnost (88). Analizom pojedinačnih mutacija utvrđeno je da su p.P225T, p.R261Q i p.R413P mutacije udružene sa fenotipom cPKU, V177L i R297H sa mPKU, dok je I306V i A403V prisutna kod osoba sa MHP. Mutacija p.E390G ima promenljivi efekat jer se može naći u sve tri fenotipske kategorije (2 bolesnika sa cPKU – rođene sestre, tri bolesnika sa mPKU i jedan bolesnik sa MHP).

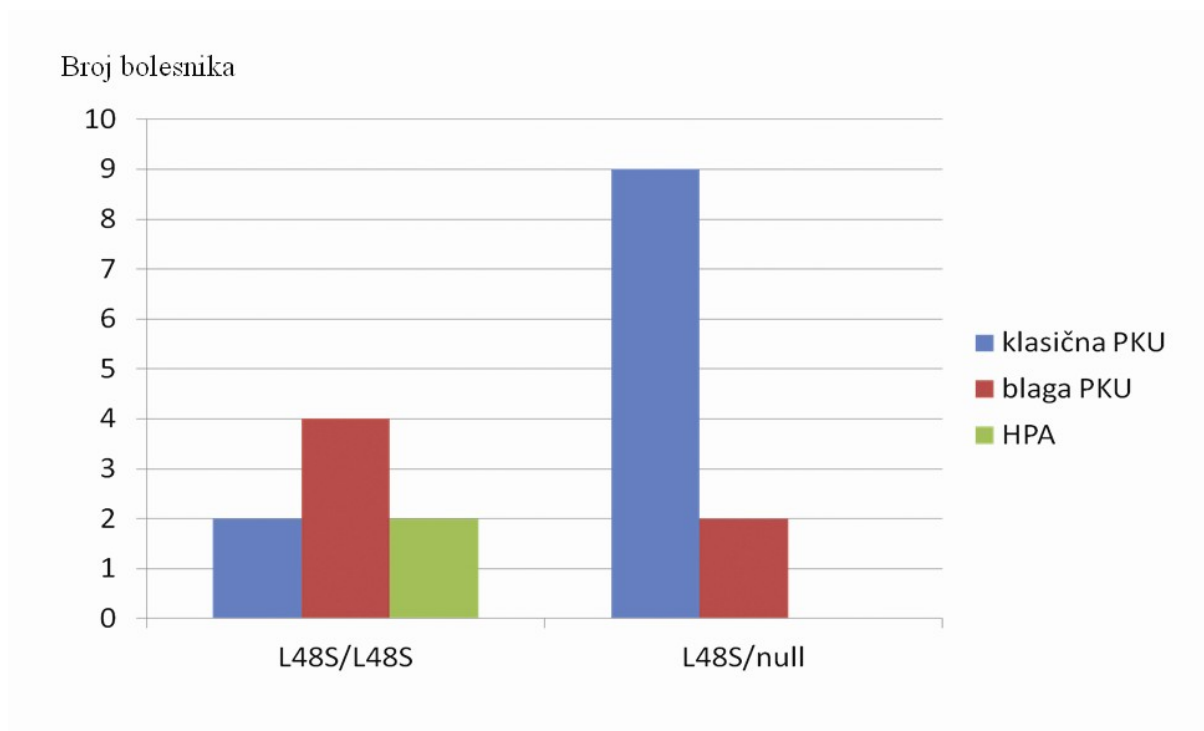
IV 6.2. Analiza genotipsko fenotipske korelacije za L48S mutaciju

Kod 11 bolesnika utvrđena je homozigotnost za L48S mutaciju. Ovoj grupi pripadaju dva para rođaka (rođena braća i sestre) i jedan par majka i dete (tabela IV 1.). Zbog nekompletne medicinske dokumentacije za genotipsko fenotipsku korelaciju nisu razmatrani bolesnici pod rednim brojevima 29., 38. i 58. Na osnovu koncentracije fenilalanina kod analiziranih bolesnika bi se mogla postaviti dijagnoza fenilketonurije, i to sa podjednakom učestalošću cPKU i mPKU. Međutim, kada se težina kliničke slike određuje na osnovu tolerancije fenilalanina, dva bolesnika pripadaju MHPA (bolesnici koji su prema maksimalnoj koncentraciji pripadali cPKU), dok dva ostaju u grupi cPKU, a četiri u grupi mPKU.

Da bismo izbegli efekat interalelne interakcije odvojeno smo analizirali genotipsko fenotipsku korelaciju osam p.[L48S];[L48S] i jedanaest p.[L48S];[null] genotipova. Fisherovim egzaktnim testom smo se poslužili da vidimo da li postoje statistički značajne razlike u fenotipovima kod bolesnika koji su homozigoti za L48S mutaciju i funkcionalnih hemizigota za L48S mutaciju i null mutaciju u odnosu na maksimalne koncentracije fenilalanina (slika IV 13a.) i toleranciju fenilalanina (slika IV 13b.). Statistička značajnost je dokazana u obe grupe ($p=0.018$ i $p=0.039$).

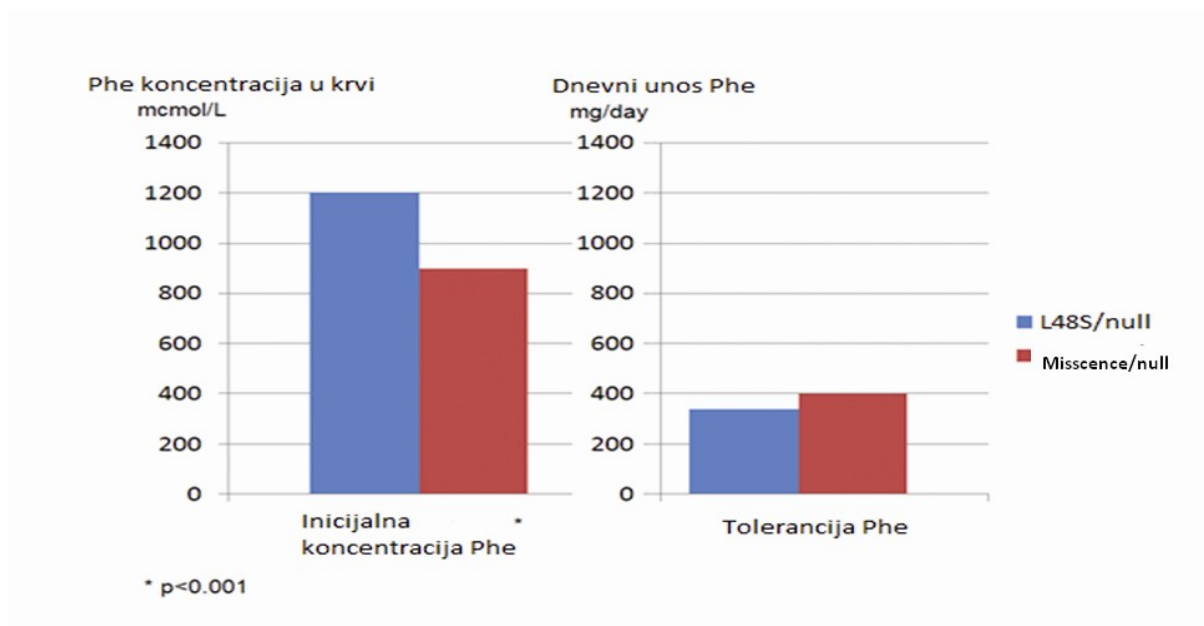


Slika IV 13a. Razlika fenotipa hemozigota za L48S mutaciju i funkcionalnih hemizigota za L48S mutaciju u odnosu na koncentraciju fenilalnina



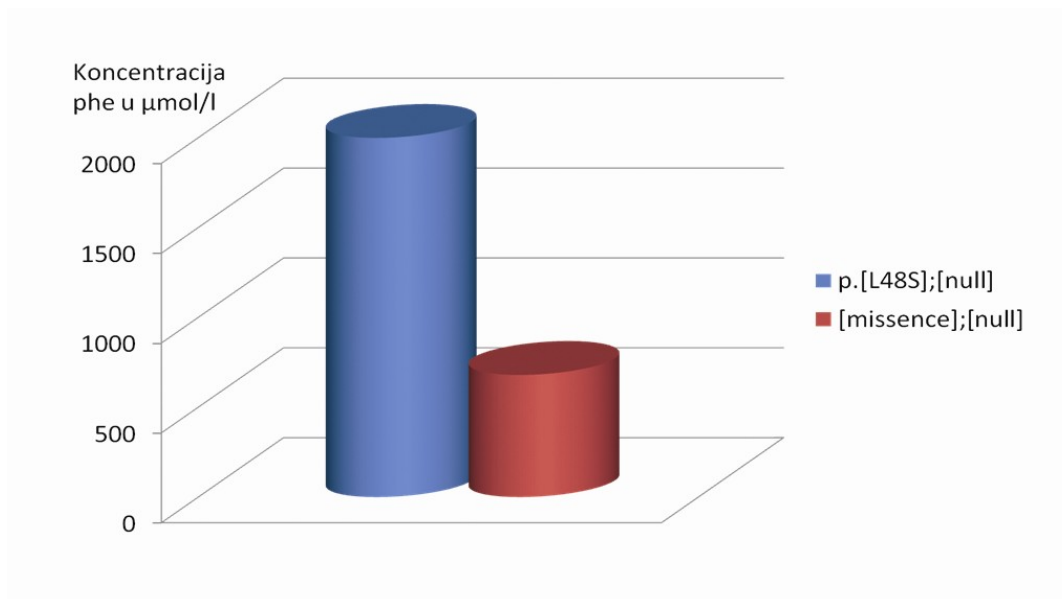
Slika IV 13b. Razlika fenotipa hemozigota za L48S mutaciju i funkcionalnih hemizigota za L48S mutaciju u odnosu na toleranciju fenilalnina

Vršili smo i poređenje maksimalne koncentracije fenilalnina u krvi i tolerancije fenilalnina za p.[L48S];[null] i p.[missense];[null] genotipa. U missense mutacije smo uključili one za koje je poznato da u in vitro uslovima imaju sličnu rezidualnu aktivnost kao i p.L48S mutacija (V177L, R261Q, R297H, I306V and E390G). Koristeći komparativni Mann-Whitney test pokazali smo da statistički značajna razlika ($p=0.001$) između ova dva genotipa postoji samo u kategoriji maksimalne koncentracije fenilalnina, a ne i u kategoriji tolerancije fenilalnina (slika IV 14.).



Slika IV 14. Razlika u koncentraciji fenilalnina i toleranciji fenilalnina između L48S/null i missence/null genotipa. Statistička značajna razlika postoji samo kod koncentracije fenilalnina.

Takođe se uočavaju veće vrednosti maksimalnih koncentracija fenilalnina kod bolesnika sa p.[L48S];[null] genotipom u odnosu na p.[missense];[null] genotip.



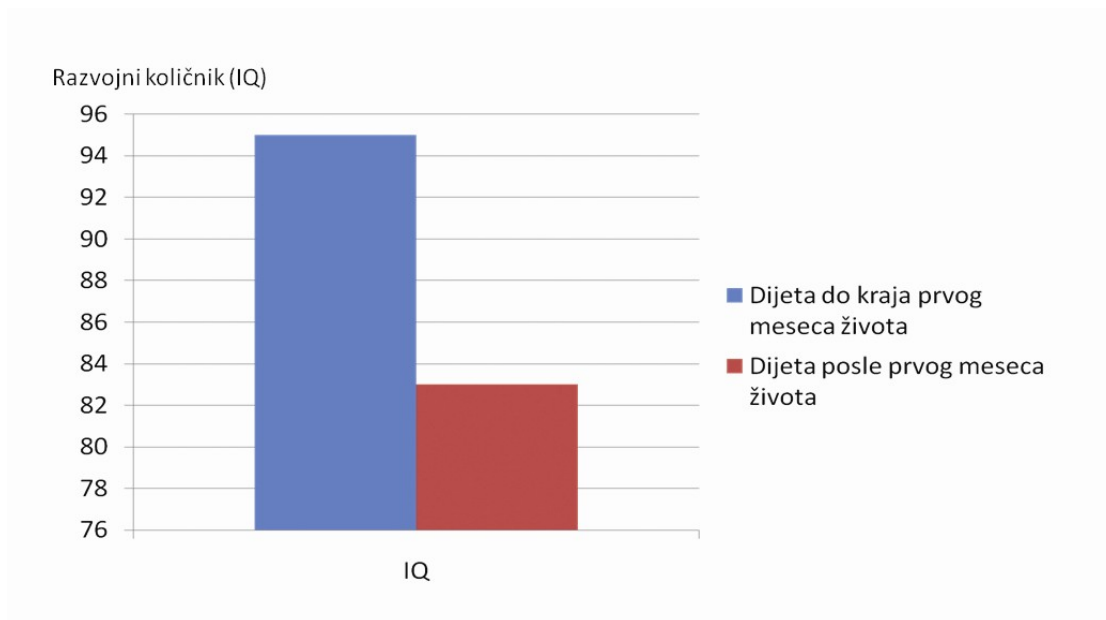
Slika IV 15. Maksimalne koncentracije fenilalanina u krvi kod funkcionalnih hemizogota

IV 7. Metabolička kontrola

U praćenju metaboličke kontrole bolesti pokušali smo da utvrdimo da li postoje merljivi parametri koji determinišu konačan ishod bolesnika sa hiperfenilalaninemijom, odnosno njihov IQ. Analizirali smo uticaj uzrasta početka dijete, maksimalne koncentracije fenilalanina u krvi, genotip bolesnika i pol u odnosu na konačan IQ. Kvalitet dijete smo određivali prosečnom koncentracijom fenilalanina, brojem pikova i standardnom devijacijom koncentracije fenilalanina, i analizirali njihov odnos u odnosu na konačan IQ.

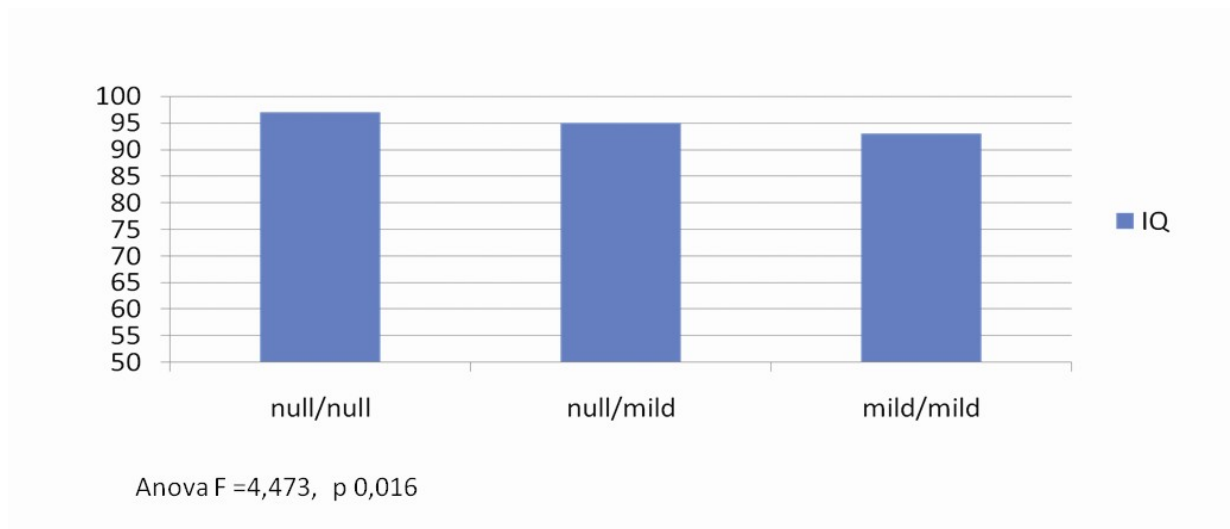
Za praćenje metaboličke kontrole korišćeni su podaci iz medicinske dokumentacije 49 bolesnika sa hiperfenilalaninemijom.

Od ukupnog broja ispitivanih bolesnika (61) 35 je imalo normalan IQ (57%) preko 90, dok je 27 bolesnika imalo IQ ispod 90 (43%). Prosečan IQ kod pacijenata koji su u prvom mesecu započeli dijetu, je 95, a kod pacijenata kod kojih je dijeta započeta posle navršenih mesec dana je 83 (0,012, t-test), što je statistički značajna razlika.



Slika IV 16. Uticaj uzrasta započinjanja dijetе na razvojni količnik.

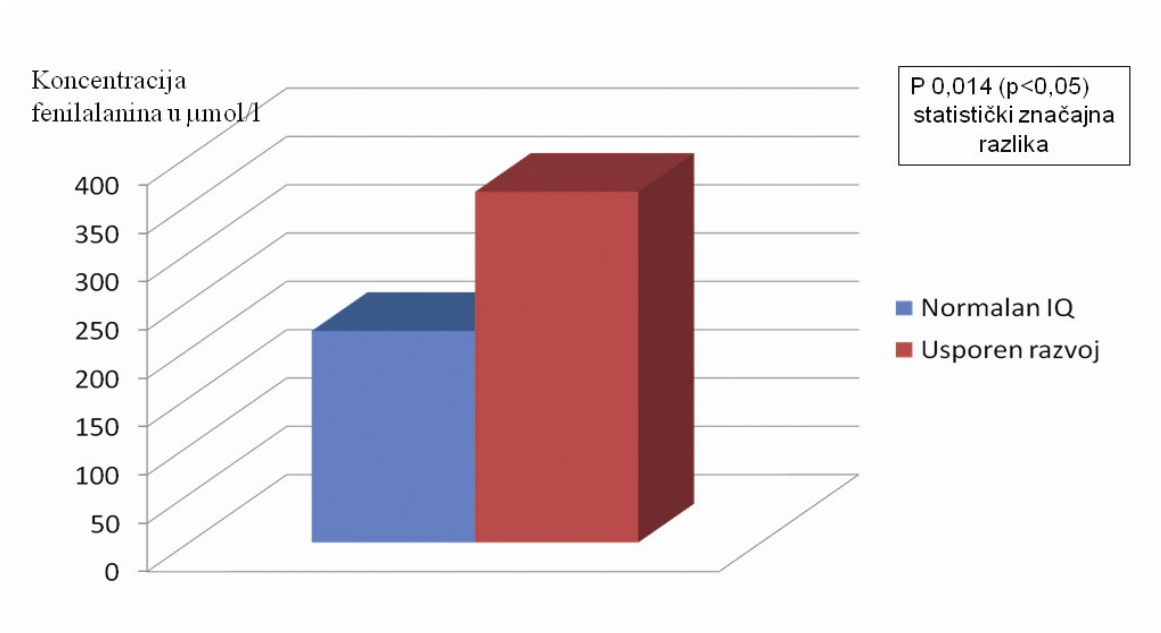
Kod bolesnika koji su sa dijetom započeli u prvom mesecu života pravljenа je korelacija da bi se videlo da li težina, odnosno tip mutacije (null/null; null/ne null; ne null/ne null) ima uticaj na razvojni količnik. Hi kvadrat testom je utvrđeno da ne postoji značajna razlika između ove tri grupe genotipa. Na osnovu ovoga moglo bi se zaključiti da genotip nije od značaja za konačni fenotip kod bolesnika koji na dijeti, već uticaj na konačni ishod, odnosno IQ više zavisi od faktora spoljne sredine.



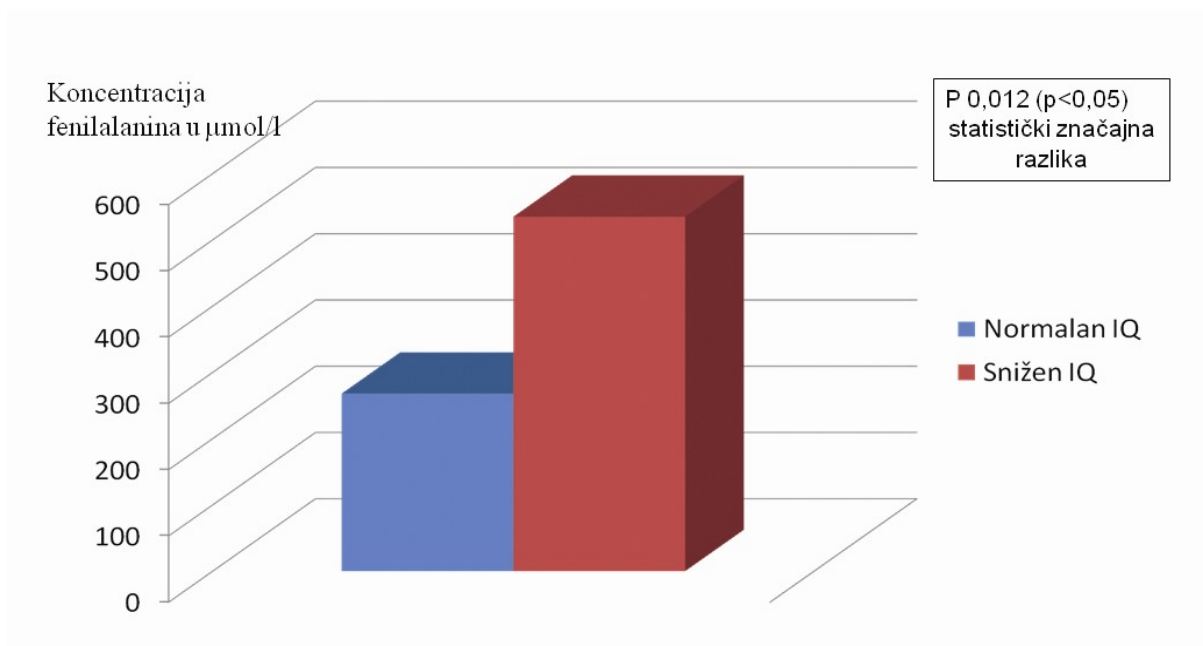
Slika IV 17. Tip mutacije nije od značaja za ishod bolesti ako su osobe na dijete od 1. meseca života.

Kod bolesnika kod kojih je dijete započeta u prvom mesecu života analizirani su faktori koji su uticali na ishod inteligencije.

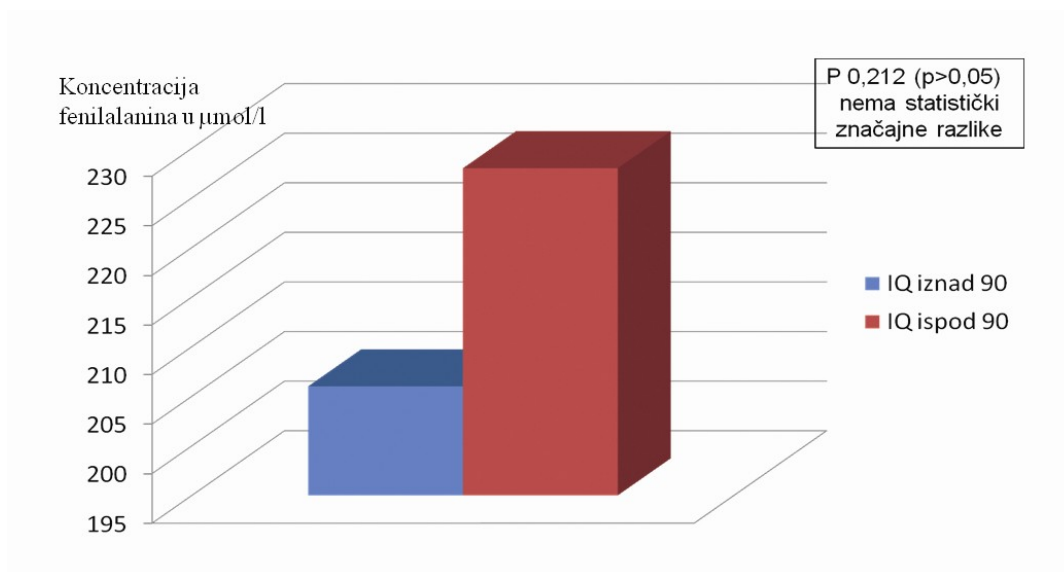
Pokazalo se da su prosečna vrednost phe u 2. i između 3. i 7. godine života, kao i standardna devijacija koncentracije fenilalanina (odnosno varijabilnost koncentracije phe u krvi) od 3. do 7. godine života značajno različite kod pacijenata koji su kasnije imali IQ preko 90 u odnosu na one sa IQ ispod 90. Više koncentracije phe i veća oscilacija koncentracije phe su u pozitivnoj korelaciji sa nižom inteligencijom u statistički značajnom odnosu. Kod bolesnika u prvoj godini života statističkim analizama nije utvrđena statistička značajna razlika između prosečnih koncentracija fenilalanina u krvi i inteligencije izražene sa IQ. Bolesnici u prvoj godini života su imali znatno manja odstupanja od prosečnih vrednosti fenilalanina i manji broj pikova, što je najverovatnije posledica maksimalne angažovanosti roditelja u ovom uzrastu oko sprovođenja dijete.



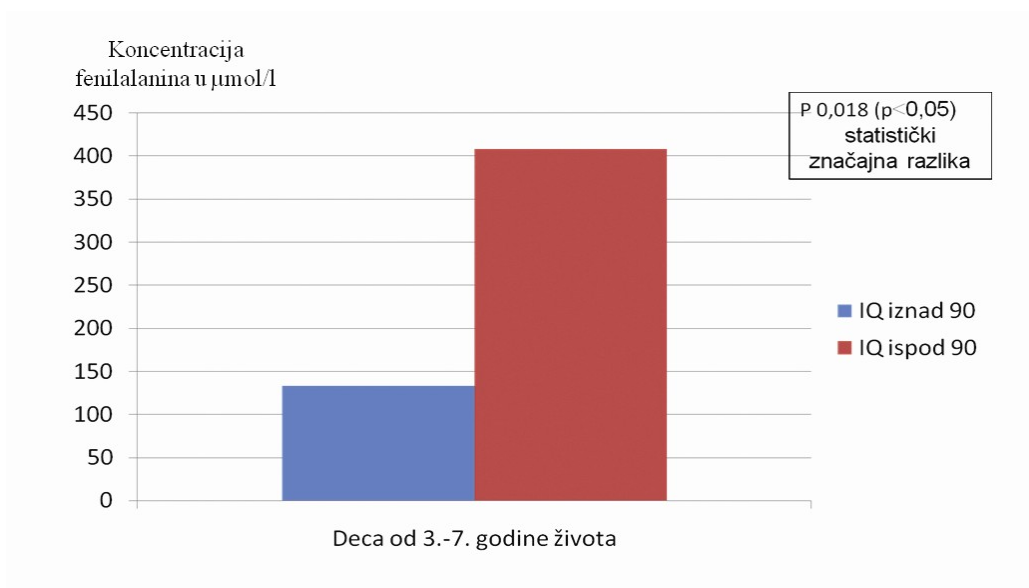
IV 18. Uticaj prosečnih vrednosti fenilalanina u drugoj godini života na IQ bolesnika



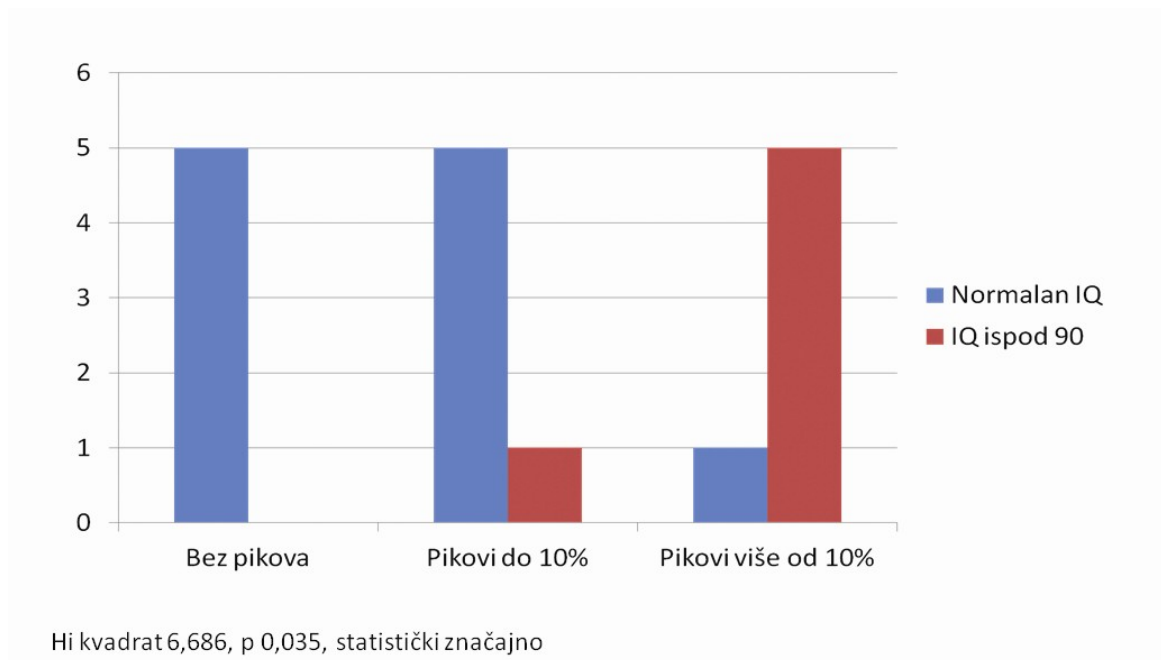
IV 19. Uticaj prosečnih vrednosti fenilalanina od treće do sedme godine života na IQ bolesnika



IV 20. Uticaj prosečnih vrednosti fenilalanina u prvoj godini života na razvojni količnik (IQ) bolesnika

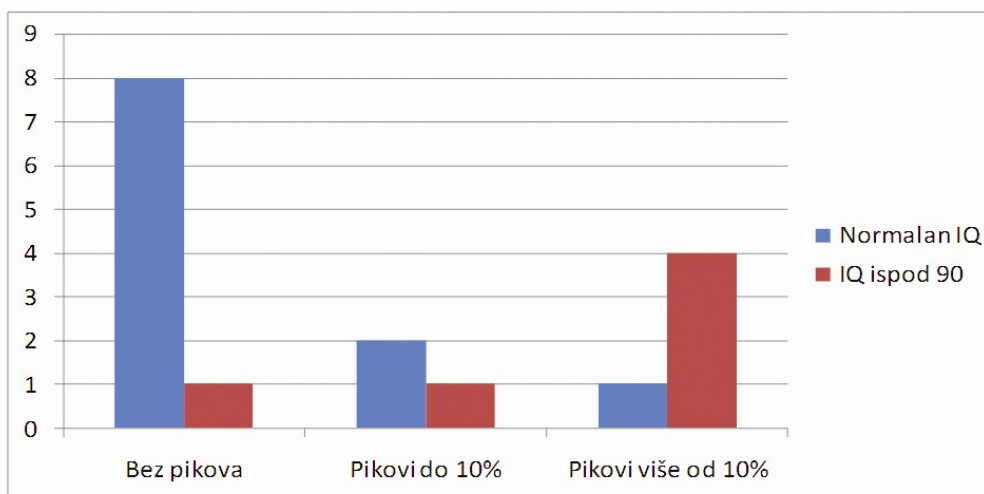


IV 21. Uticaj standardne devijacije fenilalanina između 3. i 7. godine života na razvojni količnik (IQ) bolesnika



Slika IV 22. Uticaj broja pikova fenilalanina u krvi u drugoj godini života na razvojni količnik (IQ) bolesnika

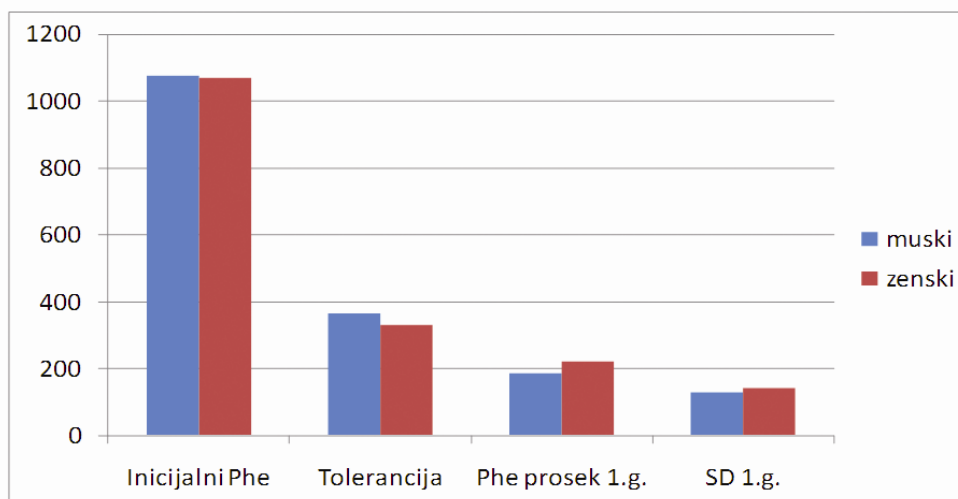
Kada je broj pikova fenilalanina kod pacijenata koji su na dijete, više od 10% u odnosu na ukupan broj određivanih koncentracija fenilalanina u drugoj (slika IV 22.) i od treće do sedme godine života (slika IV 23.) verovatnoća za nižu inteligenciju bolesnika je statistički značajna. Pod pikovima se podrazumevaju koncentracije fenilalanina koje su iznad dozvoljenih za uzrast.



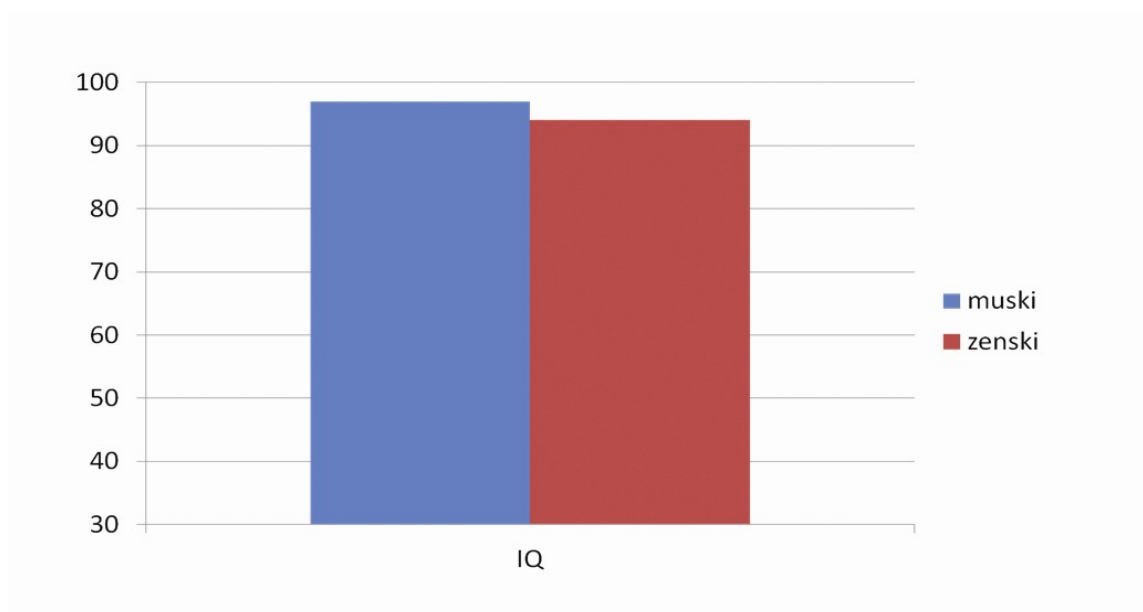
Hi kvadrat 9,7, p 0,008, visoko statistički značajno

IV 23. Broj pikova fenilalanina između 3. i 7. godine života u odnosu na konačnu inteligenciju

Dokazali smo da pol bolesnika nema uticaja na parametre praćenja bolesti i na konačan ishod inteligencije kod bolesnika kod kojih je dijeta započeta u prvom mesecu života. Pod parametrima smo podrazumevali maksimalnu koncentraciju fenilalanina, toleranciju fenilalanina, prosečnu vrednost fenilalanina u prvoj godini života i standardnu devijaciju fenilalanina u prvoj godini života (slike IV 24. i IV 25.).



Slika IV 24. Pol ne utiče sa statističkom značajnošću na parametre praćenja metaboličke kontrole



Slika IV 25. Pol nema značajnog uticaja na IQ bolesnika na dijete

Varijable	F	p
Prosečna vrednost Phe u 1. godini	0,057	0,945
Prosečna vrednost Phe u 2. godini	0,166	0,849
Prosečna vrednost Phe od 3-7. godine	0,699	0,513
SD Phe u 1. godini	0,150	0,862
SD Phe u 2. godini	3,03	0,079
SD Phe u 3-7. godini	2,49	0,117
Konačni IQ	0,132	0,877

Slika IV 26. Odsustvo statističke značajnosti između IQ, prosečnih vrednosti fenilalnina i njegovih varijacija sa različitim tipovima mutacija kod bolesnika koji su na dijeti od prvog meseca života

Dokazali smo da nema statističke značajnosti između IQ, prosečnih vrednosti fenilalnina, kao i njegovih varijacija kod bolesnika sa različitim tipom mutacija ako su na dijeti od prvog meseca života. Dakle, definitivno se može zaključiti da tip mutacije ne određuje konačan ishod bolesnika sa hiperfenilalninemijama ukoliko su od 1. meseca na dijeti.

IV 8. Očekivani odgovor na BH4 terapiju kod naših bolesnika

Objavljene studije (148-152) iz različitih centara u Evropi su pokazale da bolesnici sa p.L48S, p.R158Q, p.R261Q, p.I306V, p.E390G, p.A403V, p.R413P i p.Y414C mutacijama imaju dobar terapijski odgovor na primenu BH4. Imajući u vidu ove podatke može se zaključiti da kod 52,6% bolesnika iz Srbije može se očekivati odgovor na ovu terapiju. Kod 39 bolesnika (27,6%) odgovor bi bio nesumnjiv, kod 50% verovatan, a 22,4% bolesnika najverovatnije neće odgovoriti na ovu terapiju. (tabela IV 4.). Napravljena je razlika između genotipa sa jednim ili dva alela koji odgovaraju na terapiju sa BH4.

Tabela IV 4. Očekivani odgovor na BH4 terapiju prema genotipu kod bolesnika na teritoriji Srbije

Pozitivan terapijski odgovor na BH4		Verovatan pozitivan terapijski odgovor na BH4		Negativan terapijski odgovor na BH4
R + IR	R + N	IR + IR	IR + N	N + N
27.6%		50%		22.4%
4 (6.9%)	12 (20.7%)	12 (20.7%)	17 (29.3%)	13 (22.4%)
I306V/L48S (2)	I306V/R261X (1)	L48S/L48S (8)	L48S/Q20X (1)	R408W/V177L (1)
I306V/R261Q (1)	I306V/R408W (1)	L48S/R158Q (3)	L48S/V177L (1)	R408W/P225T (1)
E390G/R158Q (1)	I306V/P416Q (1)	L48S/R261Q (1)	L48S/V177M (1)	R408W/R252Q (1)
	E390G/R261X (1)		L48S/P225T (1)	R408W/IVS10+3 A>G (1)
	E390G/P281L (1)		L48S/S231F (1)	R408W/ R408W (1)
	E390G/R408W (3)		L48S/P281L (2)	P281L/P225T (1)
	A403V/R408W (1)		L48S/R408W (7)	P281L/P281L (1)
	A403V/? (1)		R261Q/15FS (1)	P281L/IVS12 (1)
	Y414C/IVS10-11 G>A (1)		R261Q/IVS12 (1)	R111X/R111X (1)
	Y414C/L213P (1)		R413P/R408W (1)	R111X/IVS10 (1)
				V177L/Q20X (1)
				R243X/R243X (1)
				IVS12/R297H (1)

Mutacije u *PAH* genu su podeljene po grupama u odnosu na očekivani odgovor na BH4 terapiju: **R** – apsolutni odgovor, **IR** – promenljivi odgovor i **N** – bez odgovora ili odgovor nije poznat; svi podaci su dobijeni na osnovu dosadašnjih ispitivanja iz različitih svetskih centara (148-152).

V DISKUSIJA

V 1. Incidencija

Incidencija klasične fenilketonurije na teritoriji Srbije je između 1: 18 732 i 1: 39 338, što nas svrstava u zemlje sa srednjim incidencijom cPKU u svetu, ali niže od prosečne incidencije u Evropi, koja iznosi između 1: 10 000 i 1: 20 000 (videti poglavlje I.2-Incidencija).

Mnogi autori u svojim radovima kada govore o incidenciji fenilketonurije, kao bolesti, računaju bolesnike kod kojih se sprovodi dijeta i za koje se ne može precizno razdvojiti da li pripadaju grupi cPKU ili mPKU, što nam daje za pravo da iznesemo dobijene rezultate (153,154).

V 2. Uzrast bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze hiperfenilalaninemije

Procenat (70,5%) otkrivenih bolesnika u našoj studiji putem neonatalnog skrininga (slika IV 2.) je znatno manji od standarda zemalja u kojima se sprovodi skrining, kao i rezultata koje imamo u poslednjih 20 godina. Razlog je što je studijom obuhvaćen period od 35 godina, dakle i period pre početka zvaničnog skrininga u našoj zemlji.

V 3. Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu

Zschocke je 2003, na osnovu do tada dostupnih podataka na PubMedu, sproveo sveobuhvatnu studiju o PAH mutacijama u Evropi (155). Zaključio je da se 29 različitih mutacija može smatrati čestim u evropskim populacijam (imale su relativnu učestalost preko 3% u makar dve zemlje). Međutim, postoje značajne razlike u spektru mutacija između zemalja.

Što se tiče regiona jugoistočne Evrope, podaci su relativno ograničeni. Prvi podaci o frekvenciji mutacija u ovom regionu potiču iz studije o multicentričnom poreklu mutacija. U okviru ove studije za Mađarsku je detektovano pet mutacija, pri čemu mutacija R408W ima značajnu učestalost (49%) (156). Ovo su ujedno i jedini podaci o mađarskoj populaciji.

Studija o pacijentima obolelim od fenilketonurije u Bugarskoj pokazuju da je najčešća mutacija u ovoj populaciji takođe R408W (35%), a učestalost IVS10-11G>A mutacije je izrazito visoka (25%) (157). Za Grčku i do današnjih dana postoje samo preliminarni podaci sa niskom stopom detekcije. Naime, od devet mutacija koje su analizirane, u grčkoj populaciji pronađeno je svega pet. Mutacije IVS10-11G>A (13%) i P281 (10%) nađene su sa značajnom učestalošću, međutim, ne može se reći da su navedene mutacije najčešće u grčkoj populaciji (158). Za Rumuniju je urađena kompletna studija, koja je pokazala da su najčešće mutacije R408W (48%), c.1089delG (14%) i P225T (7%) (159). Od zemalja sa prostora bivše Jugoslavije postoje podaci samo za Hrvatsku u kojoj je R408W takođe najčešća mutacija (160).

Za razliku od drugih zemalja jugoistočne Evrope u našoj zemlji je najčešća L48S mutacija (kod 31% bolesnika), zatim po učestalosti sledi R408W (kod 16,4% bolesnika), p.281.L (kod 6% bolesnika), p.E309G (kod 5,2% bolesnika) i p.I306V (kod 5,2% bolesnika) (154,161). Ovih pet mutacija su prisutne u 2/3 mutiranih alela u srpskoj populaciji, dok se ostale mutacije javljaju sporadično. Weiss je prvi ukazao na generalnu pojavu da na većini genskih lokusa postoji veliki broj različitih alela, ali da mali broj mutacija čini oko 2/3 svih alela, dok je većina mutacija retka, tzv. „privatna” (162).

Što je homozigotna vrednost veća, to je populacija homogenija u odnosu na mutacije u genu za *PAH* (163). Najhomogenija do sada opisana populacija je Jemskih Jevreja kod kojih postoji samo jedan molekularni defekt (delecija u trećem egzonu gena za *PAH*) koji je odgovoran za sve slučajeve fenilketonurije u ovoj populaciji. Prema tome, homozigotna vrednost iznosi 1 u ovoj populaciji (164). Severne i istočne slovenske populacije (Litvanija, Letonija, Južna Poljska) su takođe prilično homogene (160). Međutim, u slučaju srpske populacije, homozigotna vrednost je prilično niska i sličnija etnički raznolikim populacijama, kao što su nemačka ili američka, nego malim izolovanim populacijama, što ukazuje na njenu heterogenost. Genotipska homozigotnost, odnosno učestalost homozigota u našoj populaciji je niska i iznosi 8,82%. Homozigotna vrednost (j), koja je izračunata na osnovu alelskih frekvencija je niska i iznosi 0,10 (165). Što se tiče regiona bivše Jugoslavije, podaci za Bosnu i Hercegovinu, Makedoniju i Sloveniju ne postoje. Izuzetak je Hrvatska, gde je homozigotna vrednost 0,17 i ukazuje na umereno homogenu populaciju (160).

Kao što se pokazalo u našoj studiji **p.L48S** mutacija je najčešća u Srbiji. Učestalost ove mutacije (31%) je ujedno i najveća koja je ikad objavljena u nekoj populaciji. Ova mutacija prvi put je objavljena kod bolesnika u Turskoj (166). Nakon toga objavljena je u

brojnim evropskim populacijama sa frekvencijom od 2 - 5% (157). Veća učestalost ove mutacije je u Hrvatskoj (10%), Italiji (9.7%) i Turskoj (7%), odnosno u populacijama koje su geografski i istorijski povezane sa srpskom populacijom (155,167,168). Kako je objavljeno 2007. godine ova mutacija u srpskoj populaciji potiče od populacija sa različitim genetičkim osnovama (169).

Mutacija **p.R408W**, druga je po učestalosti u Srbiji. Inače, u većini zemalja ovo je najčešća mutacija koju karakteriše dva različita haplotipa sa linijskom distribucijom među Slovenima od Baltika do Mediteranskih zemalja. (157,161). Učestalost ove mutacije u Estoniji je 84% u Slovačkoj 46%, u Hrvatskoj 36%, a u Srbiji 16,4%.

Mutacije **p.P281L** i **p.E390G** relativno česte na Balkanu, ali su retke u ostalim državama Evrope. U Grčkoj p.P281L mutacija se nalazi kod 10% alela, kod 8.4% u Turskoj, kod 8% u Hrvatskoj, a u našoj zemlji kod 6% osoba sa hiperfenilalaninemijom, dok je p.E390G obuhvata 7% alela u Hrvatskoj, 5.2% u Srbiji i 4.1% u Turskoj (150,152,155,160,161,168).

S obzirom da smo našli kod dva bolesnika koji nisu u srodstvu tri mutacije u *PAH* genu, može se zaključiti da je u određenim situacijama bitan skrining celog gena da bi se utvrdio genotip, a sim tim da bi se došlo do korelacija između genotipa i fenotipa.

V 4. Fenotipske karakteristike

Naša istraživanja su pokazala da je kod osoba sa hiperfenilalaninemijom procenat klasične fenilketonurije (cPKU) 62%; umereno teške fenilketonurije (mPKU) 26%, a blage hiperfenilalaninemije (MHPA) 11%. Ova fenotipskih kategorizacija u našoj sredini odgovara već utvrđenim (1) u svetskoj populaciji. Bolesnici sa cPKU čine preko 50% ukupnog broja sa HPA, a bolesnici sa mPKU obuhvataju 25 - 30% ukupnog broja sa mutacijama, dok procenat ne PKU (MHPA) zavisi od broja i procenta obolelih.

V 5. Genotipsko fenotipska korelacija

Među češćim mutacijama nađene su dve null mutacije (p.R408W i p.P281L) i dve missense mutacije za koje se zna da nemaju predvidljiv efekat na fenotip (p.L48S i p.E390G), tako da se u našoj populaciji mogu ispitivati i porediti homozigoti i funkcionalni hemizigoti. Imajući u vidu mali broj bolesnika sa p.E390G mutacijom, relevantniji zaključci se mogu doneti kod bolesnika sa p.L48S mutacijom. Ostale mutacije po tipu missence, dobro su opisane u literaturi i uglavnom, kod većine bolesnika, njihov efekat na fenotip je jedinstven.

U pristupu analiziranja efekata mutacije na fenotip uočeni su problemi u fenotipskoj klasifikaciji. Za klasifikaciju koriste se dva parametra koja bi trebala biti u korelaciji. Prvi je maksimalna koncentracija fenilalanina bez dijete, koji je poznat za svakog bolesnika. Iako je koncentracija fenilalanina i danas najbitniji parametar u donošenju odluke oko terapije, izgleda da kod brojnih, posebno heteroalelnih mutacija od kojih je jedna od mutacija p.L48S, mnogo realniju sliku fenotipa daje tolerancija fenilalanina (152).

Ne postoji univerzalni vodič koji bi nas uputio koji parametar treba koristiti u klasifikaciji HPA. Kod bolesnika sa p.L48S mutacijom koristili smo oba parametra prilikom klasifikacije. Mann-Whitney test je bio od značaja da bi uporedili maksimalnu koncentraciju fenilalanina bez dijete i toleranciju fenilalanina za p.[L48S];[null] i p.[missense];[null] genotip. Kod bolesnika sa L48S mutacijom bolji pokazatelj težine bolesti se dobija određivanjem tolerancije fenilalanina u odnosu na maksimalnu koncentraciju fenilalanina (tabela IV 1.).

Već je potvrđeno u studijama koje su vršene među pacijentima sa PKU na teritoriji Srbije (161,169) da kada se vrši klasifikacija HPA samo na osnovu maksimalne koncentracije phe bez dijete, bolesnici sa p.L48S mutacijom i null mutacijom uvek pripadaju grupi cPKU. S druge strane bolesnici koji su homozigoti za p.L48S mutaciju na osnovu koncentracije fenilalanina bez dijete su bili klasifikovani i u cPKU i u mPKU. Međutim, ako se bolesnici sa ovim genotipovima klasifikuju prema toleranciji phe dobijaju se sledeći rezultati: genotip p.[L48S];[null] genotype je bio udružen sa cPKU (82%) i mPKU (18%), dok su p.L48S homozigoti bili prisutni u sva tri fenotipa (cPKU, mPKU i MHPA), što je davalo realniju sliku a može se potkrepiti sa nekoliko prikaza slučaja.

V 5.1 Prikaz bolesnika sa istim genotipom a različitim fenotipom

V 5.1.1 Genotip - p.[L48S];[null]

Tri pacijenta sa hiperfenilalaninemijom ispitivana u našoj studiji, koji nisu u srodstvu, imaju isti p.[L48S];[R408W] genotip (R408W mutacija spada u grupu null mutacija).

Prva bolesnica (tabela IV 1.; redni broj 37.) sa ovim genotipom se pojavila po drugi put u našoj službi u dobi od 35 godina, u vremenu planiranja trudnoće. Dijagnoza fenilketonurije postavljena je kod nje krajem prve godine života. Razlog za inicijalno ispitivanje u tercijarnoj zdravstvenoj ustanovi je bilo nenparedovanje i povraćanje. Dijeta siromašna fenilalaninom je započeta početkom druge godine života i sprovedena je prema tadašnjim preporukama, do kraja pete godine života. Bolesnica je završila visoku školu, IQ preko 90. Maksimalna koncentracija fenilalanina u krvi je bila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$, a tolerancija fenilalanina iznosi preko 500 mg dnevno. Ovo je primer bolesnika čija se bolest na osnovu koncentracija fenilalanina može uvrstiti u kategoriju cPKU, ali s obzirom na anamnestičke podatke (kasno započeta dijeta, normalan intelektualni razvoj) i toleranciju fenilalanina više odgovara grupi mPKU. Ovo je prva bolesnica sa PKU kod koje je u trudnoći sprovedena dijeta siromašna fenilalaninom. Ishod njene dve trudnoće je povoljan. Ima dva zdrava dečaka. Pacijentkinja se posle trudnoće vratila na normalnu ishranu (152).

Druga dva bolesnika sa istim genotipom p.[L48S];[R408W] (tabela IV 1.; redni brojevi 41. i 56.) su otkrivena neonatalnim skriningom. Oba bolesnika imaju maksimalnu koncentraciju fenilalanina u krvi preko 1200 $\mu\text{mol/l}$. Tolerancija fenilalanina kod oba bolesnika je 300 - 350 mg dnevno. Na osnovu svih parametara oba bolesnika prpadaju fenotipskoj kategoriji klasične fenilektonurije (cPKU).

Dva bolesnika u srodstvu (brat i sestra) sa genotipom p.[L48S];[S231F] (tabela IV 1.; redni brojevi 34. i 35.), koji su rođeni na teritoriji bez neonatalnog skrininga (Kosovo), su dijagnostikovani u uzrastu od 18 meseci i 4 ipo godine prilikom ispitivanja etiologije teške mentalne ratradcije. Koncentracija fenilalanina u krvi je bila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$. Ovi bolesnici dokazuju da kombinacija L48S mutacije i null mutacije kod jednog broja bolesnika nesumnjivo uzrokuje fenotip cPKU (152).

V 5.1.2. Genotip - p.[L48S];[L48S]

Kod 2 sestre bliznakinje (tabela IV 1.; redni brojevi 46. i 47.) koje su homozigoti za p.L48S mutaciju dijagnoza hiperfenilalaninemije (MHPA) postavljena je u novorođenačkom uzrastu na osnovu rezultata dobijenih neonatalnim skriningom. Maksimalna koncentracija fenilalanina je bila 360 $\mu\text{mol/l}$. Nastavljena je ishrana bez ograničenja unosa fenilalanina. U jedanaestom mesecu života maksimalna koncentraciju fenilalanina kod obe sestre iznosila 1200 $\mu\text{mol/l}$, kada smo se na osnovu konsultacija sa inostranim centrima odlučili za početak dijete siromašne fenilalaninom. Intelektualni razvoj obe sestre je normalan (IQ preko 100), tolerancija fenilalanina 400 mg. Na osnovu koncentracije fenilalanina u 11. mesecu života, tolerancije i anamnestičkih podataka obe sestre pripadaju grupi mPKU (152).

Kod muškog deteta (tabela IV 1.; redni broj 43.) je dijagnoza HPA postavljena neposredno nakon rođenja neonatalnim skrining programom. Koncentracija fenilalanina u krvi je bila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$, a tolerancija 330mg. Prema svim kriterijumima bolest deteta pripada grupi cPKU. Roditelji se ne pridržavaju dobro dijete, dosta je pikova fenilalanina, tako da je intelektualni razvoj niži (IQ 80). Majka (tabela IV 1; redni broj 60) je otkrivena sa HPA u isto vreme kada i dete. Majka nikad nije bila na dijete, koncentracija fenilalanina je bila preko 1200 $\mu\text{mol/l}$, a test opterećenja fenilalaninom je pokazao toleranciju preko 600 mg fenilalanina dnevno. Majka je završila samo osnovnu školu, živi u seoskoj sredini, IQ je precenjen na 84. Kategorija hiperfenilalaninemije kod majke, sa istim genotipom, na osnovu koncentracije fenilalanina bi pripadala grupi cPKU. Međutim, tolerancija fenilalanina, anamnestički podatak o dosadašnjem životu odgovara MHPA i predstavlja realniju sliku bolesti (152).

Svi navedeni primeri nam ukazuju na raznolikost kliničkog fenotipa L48S mutacije. Tolerancija fenilalanina mnogo bolje odražava težinu kliničke slike bolesti, kod bolesnika sa L48S mutacijom, u odnosu na maksimalnu koncentraciju fenilalanina, što smo pokazali statističkim analizama (152).

V 5.1.3 Analiza odnosa genotipa i fenotipa

Imajući u vidu da je rezidualna aktivnost PAH kod L48S mutacije 39%, naši rezultati ukazuju da je rezidualna enzimska aktivnost kod naših bolesnika smanjena najverovatnije mehanizmom negativne interalelne komplementacije (170,171). Možemo reći da je nestalan

efekat L48S mutacije posledica maskiranosti njene aktivnosti sa null mutacijom kod nekih funkcionalnih hemizigota. Kada je L48S mutacija u homozigotnom stanju, mogući je uticaj različitih genetičkih modifikatora.

Interalna komplementacija nije jedino moguće objašnjenje za različitu ekspresiju mutacije. Koncentracija fenilalanina u perifernoj cirkulaciji je pod kontrolom različitih genetičkih lokusa i modifikatornih faktora na najmanje dva nivoa (88,172,173). Na ćelijskom nivou kada postoje nestabilni oblici PAH može se javiti povećan stepen proteolitičke degradacije, smanjene funkcije šeperona ili smanjenja procesa transaminacije i dekarboksilacije fenilalanina. U svim ovim slučajevima i pored iste mutacije mogu se očekivati različite koncentracije fenilalanina u krvi. Na koncentraciju fenilalanina u krvi, kada se posmatra čitav organizam, utiče i stepen resorpcije u gastrointestinalnom traktu, ali i transporta kroz hematoencefalnu barijeru. Identifikacija i karakteristika gena modifikatora treba još da se ispita.

Stojiljkovic i saradnici su 2010 godine pokazali da genetičke varijante introna u *PAH* genu imaju sposobnost da regulišu gensku ekspresiju.

V 6. Odgovor na BH4 terapiju

Ova studija predpostavlja da se odgovor na BH4 terapiju kod bolesnika sa smanjenom funkcijom fenilalanin hidroksilaze može predvideti na osnovu *PAH* genotipa (158). Danas je ovo uobičajeni pristup kod bolesnika da bi se predvideo mogući terapijski odgovor (149,150).

Poznato je da neke mutacije koje se povezuju sa različitim PKU fenotipom, pokazuju i različiti odgovor na BH4 terapiju

Prema Trefzu i saradnicima (149), p.L48S, kao i p.R158Q, p.R261Q, p.E390G, p.A403V, p.Y414C mutacije kod najvećeg broja bolesnika imaju pozitivan odgovor na BH4 terapiju. Mutacije p.E390G, p.Y414C i ređe p.I306V i p.A403V, su poznate da imaju apsolutno pozitivni efekat na BH4 terapiju (149,150,174). Karacic i saradnici su pokazali da je p.L48S mutacija obično bez terapijskog odgovora kod funkcionalnih hemizigota, a sa terapijskim odgovorom kod homozigota za ovu mutaciju (152).

Kao što se vidi na tabeli IV 4 podelili smo genotipove u odnosu na očekivani odgovor na BH4 terapiju (148-152) u tri grupe: 1.) Genotip sa pozitivnim odgovorom na BH4; 2.) genotip sa mogućim pozitivnim odgovorom na BH4 i 3.) Genotipovi kod kojih se ne očekuje odgovor na BH4. Napravili smo i razliku između genotipova sa dva i jednim alelom koji bi

imao pozitivan odgovor na BH4. Zurfluh i saradnici smatraju da se u populacijama u Evropi može očekivati da je 17 – 79% bolesnika sa pozitivnim odgovorom na BH4 terapiju, pri čemu se učestalost povećava od severa ka jugu kontinenta. Prema našem ispitivanju od čak 77,6% bolesnika bi se mogao očekivati pozitivan odgovor na BH4 terapiju. Da bi se ovo potvrdilo potrebno je u budućnosti uraditi test opterećenja sa BH4, jer se jedino na taj način može doneti siguran zaključak.

IV 7. Metabolička kontrola

Veliku studiju poređenja koncentracije fenilalanina i kliničkog ishoda bolesnika sa fenilketonurijom napravili su Waisbern i saradnici (84). Studija je obuhvatila ispitivanja iz 40 svetskih centara. Zaključeno je da je svaki porast koncentracije fenilalanina za 100 $\mu\text{mol/l}$ preko gornje dozvoljene granice dovodi do smanjenja IQ za 1,3 do 1,9. Za bolesnike sa višim maksimalnim koncentracijama fenilalanina (429 - 1664 $\mu\text{mol/l}$) pokazali su da svaki porast koncentracije fenilalanina za 100 $\mu\text{mol/l}$ preko gornje dozvoljene granice dovodi do smanjenja IQ za 0,5 do 1,4. U studiju je, kao i kod naših bolesnika uključena heterogene populacija PKU pacijenata, uključujući bolesnike sa cPKU, mPKU i MHPA.

Studija koju su radili Vilaseca i saradnici je pokazala je da ishod (IQ) i kvalitet sprovođenja dijeta nisu u korelaciji sa težinom metaboličkog fenotipa. Fluktuacija koncentracije fenilalanina u krvi, odnosno broj pikova fenilalanina je u obrnutoj korelaciji sa vrednostima IQ. Broj pikova fenilalanina ima veći uticaj na IQ u odnosu na srednje vrednosti fenilalanina u krvi (175).

I u našoj studiji smo dokazali da tip mutacije, koji kod velikog broja bolesnika određuje i kategoriju hiperfenilalaninemije (cPKU, mPKU ili MHPA), nije od značaja za razvoj intelektualnih sposobnosti bolesnika pod uslovom da je dijeta blagovremeno uvedena. Tolerancija fenilalanina je individualna za svakog bolesnika i zavisi od genotipa i rezidualne enzimske aktivnosti. Individualni pristup, odnosno pridržavanje dozvoljenog unosa fenilalanina održavaće nivo fenilalanina u krvi konstantnim (117).

Anastasioae i saradnici (176) su ispitivali četrdeset šestoro dece sa različitim kategorijama hiperfenilalaninemije i utvrdili su da na kongnitivnu funkciju najveći uticaj imaju varijacije koncentracije fenilalanina. Do istog zaključka su došli i Demirkol i saradnici (177) što smo mi potvrdili u našoj studiji.

Utvrđili smo da su varijacije u koncentraciji fenilalanina najmanje u prvoj godini života. Najverovatniji razlog je što su roditelji u tom uzrastu deteta najmotivisaniji za precizno sprovođenje dijete, a i kvalitet sprovođenja dijete tada zavisi isključivo od roditelja. Najveće varijacije se očekuju u školskom uzrastu što smo takođe dokazali i našim ispitivanjima (119).

Iako smo pokazali da tip mutacije u našoj grupi pacijenata nije imao uticaja na ishod (IQ), smatramo da ovaj zaključak ipak zahteva nešto kompleksniji pristup i razmatranje. Dokazali smo, naime, da tip mutacije kod većine bolesnika određuje kategoriju hiperfenilalaninemije, a samim time i težinu kliničke slike. Bolesnici sa cPKU imaju najmanju toleranciju fenilalanina, te je kod njih najteže održati koncentracije fenilalanina u normalnim granicama (74, 177). Može se pretpostaviti da u porodicama bolesnika sa klasičnom PKU (a time najčešće i težom mutacijom) postoji povećana pažnja pri pripremi dijete i ređi su greške u ishrani, pa to delimično može objasniti da ishod u grupi cPKU nije bio značajno različit u odnosu na blaže hiperfenilalaninemije.

Za analizu prirodnog toka bolesti kod bolesnika koji nisu bili na dijeti ili je dijeta započeta kasno naš uzorak nije obezbedio dovoljan broj pacijenata. Stoga, je uticaj genotipa na prirodni tok bolesti u prethodnom tekstu diskutovan na pojedinačnim primerima.

VI Zaključak

Na osnovu naših istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Incidencija hiperfenilalaninemije na teritoriji Srbije se može proceniti na 1: 15 130 dok je incidencija klasične fenilketonurije 1:39 338.
2. Najčešća mutacija u Srbiji je p.L48S (31%), a po učestalosti slede: p.R408W (16.4%), p.P281L (6%), p.E390G (5.2%) i p.I306V (5.2%), i čine 2/3 svih mutacija. Mi smo za sada jedina zemlja koja je publikovala da je L48S najčešća mutacija u populaciji.
3. Genotip ima značajan uticaj na metabolički i klinički fenotip kod svih bolesnika sa hiperfenilalaninemijom.
4. Kod bolesnika sa klasičnom fenilketonurijom, a posebno homozigota za null/null mutaciju maksimalna koncentracija fenilalanina je dobar i dovoljan kriterijum za procenu kategorije bolesti, odnosno težinu kliničke slike. Za naše bolesnike sa L48S mutacijom (bilo da je kod homozigota, heterozigota ili funkcionalnih hemizigota) koncentracija fenilalanina je slabiji pokazatelj za utvrđivanje kategoriju bolesti u odnosu na toleranciju fenilalanina.
5. Bez obzira na tip mutacije i dalje se odluka oko započinjanja dijete siromašne fenilalaninom donosi na osnovu maksimalne koncentracije fenilalanina.
6. Tip mutacije i rezidualna enzimaska aktivnost nisu prediktivni faktori za konačni ishod bolesti ukoliko je dijeta započeta od 1. meseca života. Nesumnjivo je da konačan ishod bolesti najviše zavisi od uzrasta kada je dijeta započeta i broja pikova fenilalanina u prvim godinama života.

7. Kod preko 50% bolesnika na našim prostorima se na osnovu genotipa može očekivati pozitivan odgovor na BH4 terapiju.

VII Literatura

1. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8. New York: McGraw-Hill; 2001.p.1667–724.
2. Garrod AE Inborn errors of metabolism. The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians in London in June 1908. London. Henry Frowde; Hodder and Stoughton. Oxford University Press. Reprinted in Harris H. 1963. *Garrod's Inborn Errors of Metabolism*. Reprinted with a supplement. Oxford Monographs on Medical Genetics. London: Oxford University Press; 1909. p. 207.
3. Pasad C, Galbraith PA. Sir Archibald Garrod and alkaptonuria -"story of metabolic genetics". *Clin Genet* 2005; 68:199-203.
4. Wiedemann H.R. Sir Archibald Garrod 1857-1936. *Eur Jour Ped* 1993; 152:625.
5. Childs B. Sir Archibald Garrod's conception of chemical individuality: a modern appreciation. *N Eng J Med* 1970; 282:71-7.
6. Rosenberg LE. Garrod's Memorial Lecture: Legacies Garrod's brilliance one hundred years counting. In: Zchocke J, Hoffmann GF, Brown G, Gibson KM, Peters V, editors. *ICEM 2006*. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICEM); 2006 Sep 12-16; Chiba, Japan; p.1.
7. Childs B, Valle D, Jimenez-Sanchez G. The inborn error and biochemical individuality. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Metabolic Disease*. New York: Mc Graw-Hill; 2001.p.155-66.
8. Folling A. Uber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1934; 277:169–76.
9. Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J* 1937;31: 266–74.
10. Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error. *J Biol Chem* 1947;169: 651–6.
11. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;82: 514–5.

12. Bickel H, Gerrard J, Hickmans E. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 2:812.
13. Guthrie R, Susi A. A simple Phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32:338–43.
14. Dhondt JL. Neonatal screening from the 'Guthrie age' to 'genetic age'. *J Inher Metab Dis* 2007; 30:418-22.
15. Tarini BA. The current revolution in newborn screening: new technology, old controversies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161:767-72.
16. Vulović D, Vilhar N, Banićević M, Šićević S, Hajduković R i Subotić Z. Rano otkrivanje naslednih mana u novorođenčeta. *Srpski arhiv* 1979; 3:269-81.
17. Wilson JMG, Junger G. Principels and practice of screening for disease. In *Public Health Papers No 34*. World Health Organisation; 1968 Geneva, Switzerland. Available in the United States through Columbia University Press, 136 S. Broadway, Irvington-on-Hudson, N. Y. 10533.
18. Kaufman S. The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963; 50:1085–93.
19. Woo SLC, Lidisky AS, Guttler F, Robson TCKJH. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983; 306:151–5.
20. Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68:103-25.
21. DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J, Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1986;. 25:743–9.
22. Ozalp I, Coskun T, Ceyhan M, Tokol S, Oran O, Erdem G, Tekinalp G, Durmus Z, Tarikahya Y. Incidence of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in a sample of the newborn population. *J Inher Metab Dis*. 1986; 9:237.
23. Khemir s, Asmi M, Sanahaji H, Feki M, Jernna R, Tebib N et al. Phenylketonuria is still a major cause of mental retardation in Tunisia despite the possibility of treatment. *Clin Neurol Neurosurg* 2011; 113:727-30.

24. Groselj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, Hovnik T, Trebusak Podkrajsek K, Battelino T. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 2012; 106:142-8.
25. Young VR, Pellett PL. Protein intake and requirements with reference to diet and health. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1323-43.
26. Stojanov Lj. Hiperfenilalaninemije. U: Stojanov Lj, Marjanović B, urednici. *Nasledne neurometaboličke bolesti kod dece*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2002.s.61-82.
27. Kaufman S. Studies on the mechanism of phenylalanine hydroxylase: Detection of an intermediate. In: Pfleiderer W, editor. *Chemistry and Biology of Pteridines*. New York: Walter de Gruyter 1975. p.291.
28. Van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause?. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:46-51.
29. Anderson PJ, Wood SJ, Francis DE, Coleman L, Anderson V, Boneh A. Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels?. *Dev Neuropsychol* 2007; 3:645-68.
30. Moyle JJ, Fox AM, Arthur M, Bynevelt M, Burnett JR. Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol Rev* 2007; 7: 91-101.
31. DeRoche K, Welsh M, Twenty-five years of research on neurocognitive outcomes in early-treated phenylketonuria: intelligence and executive function. *Dev Neuropsychol* 2008; 33:474-504.
32. Van Spronsen FJ, Smit PG, Koch R. Phenylketonuria: tyrosine beyond the phenylalanine-restricted diet. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:1-4.
33. Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 2000; 130:1016-22.
34. Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 1998; 23:635-44.
35. Knudsen GM, Hasselbalch S, Toft PB, Christensen E, Paulson OB, Lou H. Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1995; 18:653-64.

36. De Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Sronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: Review of hypotheses. *Mol Genet Metab* 2010; 99:86-9.
37. Thompson AJ, Smith I, Brenton D, Youl BD, Rylance G, Davidson DC, Kendall B, Lees AJ. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1990; 336:602–5.
38. Pietz J. Neurological aspects of adult phenylketonuria. *Curr Opin Neurol* 1998; 11:679–88.
39. Smith I, Knowles J. Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review *Eur J Pediatr* 2000; 159:89–93.
40. Binek PA, Johnson TC, Kelly CJ. Effect of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine on brain polyribosomes and protein synthesis. *J Neurochem* 1981; 36:1476–84.
41. Binek-Singer P, Johnson TC. The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. *Biochem J* 1982; 206:407–14.
42. Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, Yudkoff M, Dyer CA. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 2000; 61:549–63.
43. Glushakov AV, Dennis DM, Sumners C, Seubert CN, Martynyuk AE. L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res.* 2003 Apr 1; 72:116-24.
44. Mortell KH, Anderson DJ, Lynch JJ, et al. Structure-activity relationships of alpha-amino acid ligands for the alpha2delta subunit of voltage-gated calcium channels. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16:1138–41.
45. Martinez A et al . Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochem J* 1995; 306:589-97.
46. Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD et al. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Struct Biol* 1999;6:442–8.
47. Anderson OA and Flatmark T. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine in the catalitically active Fe (II) atom form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J Mol Biol* 2001; 314:279-91.

48. Anderson OA et al. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* 2002; 320: 1095-108.
49. Erlandsen H et al. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 2000; 39:2208-17.
50. Gamez A et al. Expression analysis of phenylketonuria mutations. *J Biol Chem* 2000; 275(38):29737-42.
51. Pey AL et al. Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 2003; 21:370-8.
52. Pey AL et al. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet* 2007; 81:1006-24.
53. Waters PJ. Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: a mechanism underlying phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22:208–12.
54. Waters PJ et al. Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab* 2000; 69:101-10.
55. Waters PJ. How PAH Gene Mutations Cause Hyper-phenylalaninemia and Why Mechanism Matters: Insights From In Vitro Expression *Hum Mutat* 2003; 21:357-69.
56. Jennings IG et al. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:683-96.
57. Waters PJ. Degradation of mutant proteins, underlying "loss of function" phenotypes, plays a major role in genetic disease. *Curr Issues Mol Biol* 2001; 3:57–65.
58. Erlandsen H, Angel L, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Lourdes R, Desviat LR, Aguado C et al. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:16903-8.
59. Knappskog PM. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase: Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem* 1996; 242:813–21.

60. Jennings IG et al. Essential role of the N-terminal autoregulatory sequence in the regulation of phenylalanine hydroxylase. *FEBS Letters* 2001; 488:196-200.
61. Solstad T et al. Studies on the regulatory properties of the pterin cofactor and dopamine bound at the active site of human phenylalanine hydroxylase. *Eur J Biochem* 2003; 270:981-90.
62. Pey AL, Perez B, Desvitat LR, Martinez MA, Aguado C, Erlandensen H et al (2004) Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 2004; 24:388-9.
63. Kaufman S, Holtzman NA, Milstein S, Butler LJ, Krumholz A. Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *N Engl J Med* 1975; 293:785–790.
64. Donlon J et al. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Valle D, Beaudet A, Vogelstein B, Kinzler K, Antonarakis S, Ballabio A, eds.; Scriver CR, Childs B, Sly WS, emeritus eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2009. Chapter 77. Online. <http://genetics.accessmedicine.com>.
65. Aguado C et al. Analysis of the effect of tetrahydrobiopterin on PAH gene expression in hepatoma cells. *FEBS Letters* 2006; 580:1697-701.
66. Pérez B et al. Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH₄-responsive patients. *Mol Genet Metabol* 2005; 86:S11-6.
67. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860–921.
68. Lidsky AS et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6221-5.
69. Venter JC et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304–51.
Dostupno na sajtu <http://www.pahdb.mcgill.ca>.
70. Scriver CR. The PAH Gene, Phenylketonuria and a Paradigm Shift. *Hum Mutat* 2007; 28:831-45.
71. Kozak L et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab* 2006; 89:300–9.
72. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63:71-9.

73. Dianzani I et al. Novel Missense Mutation in the Phenylalanine Hydroxylase Gene Leading to Complete Loss of Enzymatic Activity. *Hum Mutat* 1999; 6:247-249.
74. Weglage J, Oberwittler C, Marquardt T, Schellscheidt J, von Teeffelen-Heithoff A, Koch G, et al. Neurological deterioration in adult phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23:83–4.
75. Pietz J, Dunckelmann R, Rupp A, Rating D, Meinck HM, Schmidt H, Bremer HJ. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1998; 157:824–30.
76. Williams K. Benefits of normalizing plasma phenylalanine: impact on behaviour and health. A case report. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21:785–90.
77. Pérez-Dueñas B, Valls-Solé J, Fernández-Alvarez E, Conill J, Vilaseca MA, Artuch R, Campistol J. Characterization of tremor in phenylketonuric patients. *J Neurol* 2005; 252:1328–34.
78. Zeman J, Bayer M, Stepán J. Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1999; 88:1348–51.
79. Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R, Efrati O. Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:202–8.
80. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr* 2000; 136:545–7.
81. Guttler F, Guldberg P. The influence of mutations of enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155:6-10.
82. Schweitzer-Kranz S, Bugard P. Survey of national guidelines for treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159:70-3.
83. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997; 61:1309–17.
84. Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2007; 92:63-70.
85. Zschocke J. Molecular basis of phenylketonuria: from genotype to clinical management. *Ann Nestle* 2010; 68:48-52.

86. Zschocke J. Dominant versus recessive molecular mechanisms in metabolic disease. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31:599-618.
87. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple. *Trends Genet* 1999;15: 267-72.
88. Dipple KM, McCabe ER. Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers and system dynamics. *Am J Hum Genet* 2000; 66:729-35.
89. Weglage, J et al. In vivo NMR spectroscopy in patient with phenylketonuria: clinical significance of interindividual differences in brain phenylalanine concentrations. *J Inherit Metab Dis* 1998; 22:81-2.
90. Hanley, WB et al. Maternal phenylketonuria collaborative study (MPKUCS) – the “outliers”. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:711-23.
91. Guttler F, Guldborg P. Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159:150-3
92. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L et al. Nutrigenetics and Nutrigenomics: View points on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2000; 4:69–89.
93. Bugard P. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159:74-9
94. Kure S et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135:375–8
95. Danks DM et al. Malignant hyperphenylalaninemia - current status (June 1977). *J Inherit Metab Dis* 1978;1:49–53.
96. Fiege B and Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 2007; 150:627–30.
97. Matalon R et al. Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med* 2004; 6:27–32.
98. Zurflüh MR et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29:167-175.
99. Ferhoff PM. Newborn screening for genetic disorders. *Pediatr Clin North Am* 2009; 56:503-13.
100. Loeber JG. Neonatal screening in Europe situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:430-8.

101. Đorđević M, Kecman B, Grković S, Sarajlija A, Milenković T. Novine u neonatalnom skrining programu. U: Zdravković D, urednik. Problemi u pedijatriji 2009. Beograd: Zavod za udžbenike: 2010. str 1-11.
102. Schulze A, Mayatepek E, Hoffmann GF, Evaluation of 6-year application of the enzymatic colorimetric phenylalanine assay in the setting of neonatal screening for phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 2002; 317(1-2):27-37.
103. Tandem mass spectrometry in newborn screening. American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Test and Technology Transfer Committee Working Group. *ACMG/ASHG statement* 2000, vol 2, No 4.
104. Banta-Wright SA, Steiner RD. Tandem mass spectrometry in newborn screening . *J Perinat Neonat Nurs* 2004; 18:41-58.
105. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 2003; 111:1399-406.
106. Kimura T, Noguchi Y, Shikata N, Takahashi M: Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks. *Curr Pin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12:49–53..
107. Longo N. Disorders of bipterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:333–42.
108. Mac Donald A, Depondt E, Evans S, Daly A, Hendriksz C, Chakrapani A et al. Breast feeding in IMD. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:299-303.
109. NIH Phenylketonuria (PKU): screening and management. NIH Consensus Statement. 2000;17:1–33.
110. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1993;68:426–7.
111. Acosta PB, Matalon KM. Nutrition management of patients with inherited disorders of aromatic amino acid metabolism. In: Acosta PB, editor. *Nutrition Management of Patients with Inherited Metabolic Disorders*. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2010. 119-74.
112. Guttler F, Azen C, Guldberg P, et al. Relationship among genotype, biochemical phenotype, and cognitive performance in females with phenylalanine hydroxylase deficiency: report from the Maternal Phenylketonuria Collaborative Study. *Pediatrics* 1999; 104:258–262.

113. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, et al. Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: the French guidelines (in French) *Arch Pediatr*. 2005; 12:594–601.
114. Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P, et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999; 158:46–54.
115. Koch R, Azen C, Friedman EG, Fishler K, Baumann-Frischling C, Lin T. Care of the adult with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; 155 Suppl 1S:S90–2.
116. Lngenbeck U, Burgard P, Wendel U et al. Metabolic phenotype of phenylketonuria. Kinetic and molecular evaluation of the Blaskovics protein loading test. *J Inherit Metab Dis* 2009; 33:506-13.
117. MacLeod EL, Ney DM. Nutritional management of phenylketonuria. *Ann Nestle* 2010; 68:58-69.
118. Ogier de Baulny H, Abadie V, Feillet F, de Parscau L. Management of Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia. *J Nutr* 2007; 137:15615-35.
119. Azen CG, Koch R, Friedman EG, et al. Intellectual development in 12-year-old children treated for phenylketonuria. *Am J Dis Child*. 1991; 145:35–39.
120. Metges CC, El-Khoury AE, Selvaraj AB, et al. Kinetics of L-[1-(13)C]leucine when ingested with free amino acids, unlabeled or intrinsically labeled casein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:1000–9.
121. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:340–8.
122. Waisbren SE, Hanley W, Levy HL, et al. Outcome at age 4 years in offspring of women with maternal phenylketonuria: the Maternal PKU Collaborative Study. *JAMA* 2000; 283:756–762.
123. Rohr F, Munier A, Sullivan D, et al. The Resource Mothers Study of Maternal Phenylketonuria: preliminary findings. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:145–55.
124. Trefz FK, Burton BK, Longo N, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr* 2009; 154:700–7.
125. Burlina A, Blau N. Effect of BH(4) supplementation on phenylalanine tolerance. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:40–5.

126. Hennermann JB, Buhrer C, Blau N, et al. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2005;86(suppl 1):S86–S90.
127. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH₄) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2009; 96:158–63.
128. MacLeod EL, Gleason ST, van Calcar SC, Ney DM. Reassessment of phenylalanine tolerance in adults with phenylketonuria is needed as body mass changes. *Mol Genet Metab* 2009; 98:331–7.
129. Pietz J, Kreis R, Rupp A, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 1999; 103:1169–70.
130. Schindeler S, Ghosh-Jerath S, Thompson S, et al. The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. *Mol Genet Metab* 2007;91:48–54.
131. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:153–8.
132. Ney DM, Hull AK, van Calcar SC, et al. Dietary glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria. *J Nutr* 2008; 138:316–22.
133. Ney DM, Gleason ST, van Calcar SC, et al. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:32–9.
134. Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, et al: Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther* 1999;10:965–76.
135. Verma IM, Weitzman MD: Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:711–38.
136. Fang B, Eisensmith RC, Li XH, et al: Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Gene Ther* 1994; 1:247–54.
137. Chen L, Woo SL: Complete and persistent phenotypic correction of phenylketonuria in mice by sitespecific genome integration of murine phenylalanine hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:15581–6.

138. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, et al: A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2339–44.
139. Eavri R, Lorberboum-Galski H. Novel approaches to the therapy of phenylketonuria. *Ann Nestle* 2010; 68:70-7.
140. Guldberg P and Guttler F. “Broad-range” DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: the human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 1994; 22 (5):880-1.
141. Ivaschenko T and Baranov VS. Rapid and efficient PCR/StyI test for identification of common mutation R408W in phenylketonuria patients. *J Med Genet* 1993; 30:153-4.
142. Eiken HG et al. Restriction enzyme-based assays for complete genotyping of phenylketonuria patients. *Dev Brain Dysfunct* 1993; 6:53-9.
143. Rivera I et al. Population genetics of hyperphenylalaninemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet* 1998;35: 301-4.
144. Eiken HG et al. Amplification of natural and amplification created sites for diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res* 1991;19 (7):1427-30.
145. Sanger F et al. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-7.
146. Trefz FK et al. Differential diagnosis and significance of various hyperphenylalaninemias. In: Bickel H, Wachtel U, eds. *Inherited Diseases of Amino Acid Metabolism*. Stuttgart: Thieme, 1985. p86-100.
147. Scriver CR. Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, *Pediatrics* 1963; 32:318-43. *Pediatrics* 1998 (S): 236-7.
148. Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29:167–75.
149. Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2009; 32(1):22-6.
150. Karacic I, Meili D, Sarnavka V et al. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. *Mol Genet Metab* 2009; 97(3):165-71.

151. Sterl E, Paul K, Paschke E, et al. Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. *J Inherit Metab Dis* 2012[Epub ahead of print].
152. Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, Ugrin M, Spasovski V, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular Genetics and Genotype-Based Estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU Patients: Spotlight on Phenotypic Implications of p.L48S. *J Inherit Metab Dis* 2013;9:49-58. doi: 10.1007/8904_2012_178. Epub 2012 Oct 13.
153. Karamifar H, Ordoei M, Karamizadeh Z, Amirhakimi GH. Incidence of neonatal hyperphenylalaninemia in fars province, South Iran. *Iran J Pediatr* 2010; 20:216-20.
154. Lambert DM. The Genetic Epidemiology of Hyperphenylalaninemia in Quebeck (disertation). Montréal, Canada: Mc Gill University; 1994.
155. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003;21: 345-356.
156. Eisensmith RC et al. Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 1992;51: 1355-65.
157. Kalaydjieva L et al. Population genetics of phenylketonuria in Bulgaria. *Dev Brain Dysfunct* 1993; 6:39–54.
158. Traeger-Synodinos J et al. Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Hum Genet* 1994 ;94:573–5.
159. Popescu T et al. Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian phenylketonuric alleles. *Hum Mutat* 1998;12(5): 314-9.
160. Zschocke J et al. The molecular basis of phenylalanine hydroxylase deficiency in Croatia *Hum Mutat* 2003: Mutation in Brief#586 Online.
161. Stojiljkovic M , Jovanovic J, Djordjevic M et al Molecular and phenotypic characteristics of phenylketonuria patients in Serbia and Montenegro. *Clin Genet* 2006; 70:151-155.
162. Weiss KM. Is There a Paradigm Shift in Genetics? Lessons from the Study of Human Diseases. *Mol Phylogenet Evol* 1996; 5(1): 259-65.
163. Guldberg P. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the maternal PKU collaborative study. *Am J Hum Genet* 1996; 59:84-94.
164. Avigad S et al. A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 1990 344: 168-70.

165. Stojiljković M. Polimorfizmi u genu za fenilalanin hidroksilazu kao regulatori genske ekspresije, modulatori fenotipa i populaciono-genetički markeri (disertacija). Beograd, Srbija: Biološki fakultet; 2009.
166. Konecki DS, Schlotter M, Trefz FK, Lichter-Konecki U. The identification of two missense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. *Hum Genet* 1991;87(4): 389-93.
167. Giannattasio S, Dianzani I, Lattanzio P et al. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. *Hum Hered* 2001;52(3): 154-159.
168. Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. *Mol Genet Metab* 2011; 102(2):116-21.
169. Stojiljkovic M, Stevanovic A, Djordjevic M, et al. Mutations in the PAH gene: a tool for population genetic study. *Arch Biol Sci* 2007; 59(3):161-7.
170. Leandro J, Nascimento C, de Almeida IT, Leandro P. Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(5):544-50
171. Leandro J, Leandro P, Flatmark T. Heterotetrameric forms of human phenylalanine hydroxylase: co-expression of wild-type and mutant forms in a bicistronic system. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(5): 602-612
172. Kaufman S. The Phenylalanine Hydroxylating System. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1993; 67:77-264.
173. Scriver CR and Waters PJ. Monogenic traits are not simple. *Trends Genet* 1999; 15:267-72.
174. Muntau AC, Röschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002;347(26):2122-32.
175. Vilaseca MA, Lambruschini N, Gómez-López L, Gutiérrez A, Fusté E, Gassió R et al. Quality of dietary control in phenylketonuric patients and its relationship with general intelligence. *Nutr Hosp* 2010; 25:60-6.
176. Anastasio V, Kurzius L, Forbes P, Waisbern S. Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2008; 95:17-20.
177. Demirkol M, Gizewska M, Giovannini M, Walter J. Follow up of phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2011; 104:31-9.

Biografija

Maja Đorđević je rođena u Beogradu 1966. godine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je završila 1992. godine sa srednjom ocenom 9,50. Od 1994. godine zaposlena je u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić”. Od 1996. godine je u redakciji udžbenika „Problemi u pedijatriji”, a od 2012. godine jedan od urednika ove edicije. Specijalizaciju iz pedijatrije je završila 1998. godine sa odličnim uspehom. Magistarski rad pod nazivom „Specifičnost i pouzdanost povišenih vrednosti alfa-feto proteina u serumu trudnica kao markera za defekt neuralne cevi fetusa” je odbranila 2003. godine. Poslediplomsku nastavu iz urođenih bolesti metabolizma i ishrane pohađala i u inostranstvu (Nemačka, Francuska, Italija). Obavlja dužnost načelnika službe za ispitivanje i lečenje bolesti metabolizma sa kliničkom genetikom od 2004. godine. Asistent je na Katedri pedijatrije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 2008. godine. Dr Đorđević ima preko 200 bibliografskih jedinica u stranim i domaćim publikacijama.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Маја Ђорђевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Корелација између генотипа и фенотипа болесника са хиперфенилалнинемијом
на територији Србије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 30.09.2013.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маја Ђорђевић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Корелација између генотипа и фенотипа болесника са хиперфенилалнинемијом на територији Србије

Ментор проф. Др Ивана Новаковић

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 30.09.2013.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Корелација између генотипа и фенотипа болесника са хиперфенилалнинемијом
на територији Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.09.2013.