

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ**

На правах рукописи

Хальчицкий Сергей Егорович

**ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА ФЕНИЛАЛАНИНА И
ЕГО ДЕРИВАТОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ
ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИЯХ**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.01.04 Биохимия

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Комов Вадим Петрович

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Введение.....	14
1.2. Метаболизм фенилаланина в норме.....	14
1.3. Компоненты фенилаланингидроксилазной системы.....	20
1.3.1. Фенилаланингидроксилаза.....	20
1.3.2. Кофактор фенилаланингидроксилазы – тетрагидробиоптерин.....	25
1.4. Метаболизм фенилаланина при патологических состояниях.....	30
1.4.1. Метаболизм фенилаланина при наследственных заболеваниях. Фенилкетонурия.....	30
1.4.2. Окислительный стресс у больных фенилкетонурией.....	33
1.4.3. Повреждения ДНК.....	35
1.4.4. Метаболизм нейромедиаторов.....	36
1.4.5. Синтез белка.....	37
1.4.6. Метаболизм липидов.....	39
1.4.7. Биоэнергетика.....	40
1.4.8. Гомеостаз кальция.....	41
1.4.9. Биохимические и фенотипические нарушения у гетерозиготных носителей ФКУ.....	42
1.4.10. Нарушения обмена фенилаланина и его дериватов при соматических заболеваниях.....	45
1.5. Заключение	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Обследуемые группы пациентов.....	52
2.1.1. Больные фенилкетонурией.....	52
2.1.2. Больные с синдромом Дауна.....	54

2.1.3. Больные вирусным гепатитом.....	54
2.1.4. Больные хроническим алкоголизмом.....	56
2.2. Методы исследования.....	57
2.2.1. Определение фенилаланина.....	57
2.2.2. Определение тирозина.....	58
2.2.3. Определение фенилпировиноградной кислоты.....	58
2.2.4. Определение пара-оксифенилпировиноградной кислоты.....	59
2.2.5. Определение гомогентизиновой кислоты.....	59
2.2.6. Определение катехоламинов (адреналин, норадреналин).....	60
2.2.7. Определение серотонина.....	61
2.2.8. Определение активности фенилаланингидроксилазы.....	62
2.2.9. Выделение геномной ДНК.....	63
2.2.10. ПЦР-диагностика.....	64
2.2.11. Детекция продуктов ПЦР.....	65
2.2.12. Рестрикционный анализ.....	65
2.2.13. Аллельспецифическая дот-гибридизация.....	65
2.2.14. Секвенирование ДНК.....	67
2.2.15. Конструирование кДНКовой клонотеки.....	68
2.2.16. Статистический анализ.....	77
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	78
3.1. Выявление биохимических нарушений у больных фенилкетонурией и членов их семей.....	78
3.2. Фенотипическое проявление мутантного гена у гетерозиготных носителей ФКУ.....	87
3.3. Выявление молекулярно-генетических нарушений у больных фенилкетонурией и членов их семей.....	88
3.4. Разработка новых методов ПЦР-диагностики мутаций.....	90
3.5. Выявление нарушений обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна.....	91

3.6. Выявление нарушений обмена фенилаланина и тирозина при вирусных гепатитах.....	98
3.7. Выявление биохимических и молекулярно-генетических нарушений фенилаланин-гидроксилазной системы у больных хроническим алкоголизмом.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Фенилаланин (ФА) и тирозин (ТИР) – ароматические аминокислоты, играющие важнейшую роль в биосинтезе белка, а также являющиеся предшественниками ряда необходимых организму гормонов, нейромедиаторов, пигментов, таких как дофамин, норадреналин, адреналин, меланин. Нарушение превращения фенилаланина в тирозин приводит к повышению уровня фенилаланина в крови, тканях и биологических жидкостях. Избыток фенилаланина действует токсически прежде всего на нервную систему и при длительном воздействии вызывает в ней необратимые дегенеративные изменения. Такие патологические изменения характерны, прежде всего, для больных с наследственными мутациями в генах фенилаланингидроксилазной системы (фенилкетонурия I и II типа), а также при экзогенной патологии, когда ферменты фенилаланингидроксилазной системы ингибируются различными поступающими извне токсическими агентами (бактериальные и вирусные токсины, алкоголь, другие гепатотоксины). Кроме избытка фенилаланина и возникающих вследствие нарушения превращения фенилаланина в тирозин патологических метаболитов фенилаланина (фенилпировиноградная, фенилмолочная, фенилуксусная кислоты), возникает дефицит тирозина и его последующих метаболитов, если тирозин в должном количестве не поступает с пищей. Таким образом, при гиперфенилаланинемиях возникает существенный метаболический дисбаланс, который приводит к тяжелым последствиям для организма.

Исследование этиологии и патогенеза фенилкетонурии (ФКУ) и гиперфенилаланинемий (ГФА), несмотря на большое количество соответствующих публикаций, до сих пор представляет собой весьма актуальную задачу. Сложность и многокомпонентность фенилаланингидроксилазной системы определяют

различные варианты ее нарушений и дальнейшего патогенеза. В связи с этим, до настоящего времени целый ряд вопросов, касающихся причин клинической гетерогенности ФКУ и ГФА, не решены окончательно. Только различные методологии исследования гиперфенилаланинемий – биохимические, нейрофизиологические, молекулярно-генетические - с разных сторон освещают проблему и, очевидно, только в комплексе способны дать полную картину заболевания и привести к наиболее оптимальным алгоритмам диагностики и лечения.

Кроме наследственных форм гиперфенилаланинемий, существует множество состояний, когда стойкое повышение уровня фенилаланина возникает по причинам экзогенного характера. Эти состояния требуют внимательного изучения, так как наряду с основными факторами этиологии, сопутствующая стойкая гиперфенилаланинемия также вносит свою ощутимую лепту в патогенез того или иного заболевания. Весьма распространенными заболеваниями экзогенного характера, при которых обнаруживается стойкая гиперфенилаланинемия, являются вирусные и токсические гепатиты, цирроз печени, хронический алкоголизм и др. Известно, что в острой стадии этих заболеваний возникают серьезные психические и неврологические расстройства, такие как сумеречные расстройства сознания, делирий, кататонические симптомы, галлюцинаторные проявления, нарушения вегетативной иннервации. Вследствие того, что гиперфенилаланинемия приводит к дисбалансу нейромедиаторов, исследовать, какой вклад она вносит в патогенез психоневрологических расстройств при экзогенных ГФА, весьма актуально, так как позволяет лучше понять природу клинических проявлений и проводить более эффективное лечение. В отношении экзогенных ГФА и роли избытка фенилаланина и его токсических продуктов в патогенезе психоневрологических расстройств при этих заболеваниях существуют только единичные публикации. Тем не менее, экзогенные гиперфенилаланинемии являются распространенным явлением патологии метаболизма и представляют собой серьезную медико-социальную проблему.

Комплексное исследование гиперфенилаланинемий различной этиологии вообще никогда не проводилось.

Таким образом, имеется насущная потребность исследования и обобщения данных о гиперфенилаланинемиях различной этиологии, чтобы понять, насколько нарушения обмена фенилаланина и его дериватов определяют клинический фенотип этих заболеваний.

Поэтому, назрела необходимость объединить результаты проведенных исследований с целью выявления наиболее характерных причинно-следственных связей возникновения патологических явлений при гиперфенилаланинемиях, выработать алгоритмы комплексного обследования и вариантов лечения при различных формах гиперфенилаланинемий.

Целью исследования

Выявить особенности биохимических и молекулярно-генетических нарушений при наследственных и экзогенных гиперфенилаланинемиях. Выяснить роль нарушений обмена фенилаланина в патогенезе наследственных и экзогенных гиперфенилаланинемий.

Задачи исследования

1. Разработать метод комплексного (биохимического и молекулярно-генетического) обследования больных наследственными формами гиперфенилаланинемий и гетерозиготных носителей мутаций в гене фенилаланингидроксилазы.
2. Изучить влияние мутантного генотипа на характер метаболических нарушений и клиническую картину заболевания.

3. Выяснить степень нарушения обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна и их роль в патогенезе заболевания.
4. Выявить нарушения обмена фенилаланина и тирозина у больных вирусными гепатитами и корреляцию этих нарушений с клинической картиной заболевания.
5. Выяснить роль нарушений фенилаланингидроксилазной системы в патогенезе алкогольной болезни, роль мутаций фенилаланингидроксилазы в наследственной предрасположенности к алкоголизму и возникновению алкогольного делирия.
6. Определить влияние тетрагидробиоптерина на активность ФАГ при различных вариантах наследственной и экзогенной ГФА.

Научная новизна

1. Для выявления нарушений метаболизма фенилаланина и тирозина в норме и при патологических состояниях разработан и применен комплексный метод биохимического исследования фенилаланина и его дериватов в тканях и биологических жидкостях.
2. Методом полимеразной цепной реакции впервые проведено исследование мутаций гена фенилаланингидроксилазы и получены данные о наиболее распространенных мутациях гена ФАГ.
3. Разработан новый вид ПЦР-диагностики на иммобилизованной ДНК-матрице.
4. Впервые проведены сравнительные исследования обмена фенилаланина и его дериватов при экзогенных гиперфенилаланинемиях.

5. Доказано увеличение частоты гетерозиготного носительства мутантного гена фенилаланингидроксилазы у больных хроническим алкоголизмом, впадающих в алкогольный делирий.

Теоретическая значимость

В результате проведенного исследования выявлены новые биохимические и молекулярно-генетические факторы этиологии и патогенеза наследственных гиперфенилаланинемий, а также гиперфенилаланинемий, вызванных экзогенными воздействиями. В частности, у больных анализировалась вся цепочка метаболитов ФА в сочетании с определением мутационных повреждений гена фенилаланингидроксилазы (ФАГ). Полученные сведения вносят вклад в понимание механизмов возникновения множественных нарушений метаболизма ФА при разной патологии и их взаимосвязь с клиническими проявлениями.

Практическая значимость

1. Использованный метод нагрузки фенилаланином имеет важное практическое значение, как доказательный метод диагностики нарушений метаболизма фенилаланина и тирозина при различных патологических состояниях.
2. Разработанным в данном исследовании методом ПЦР-диагностики в дальнейшем был определен ряд новых мутаций в гене фенилаланингидроксилазы.
3. Разработанный в данном исследовании метод ПЦР-диагностики на иммобилизованном носителе ДНК (пятна крови) ныне повсеместно используется для диагностики мутационных повреждений генома, при неонатальном скрининге, а также явился прообразом создания биочипов.

4. Мониторинг метаболизма фенилаланина и коррекция его уровня при соматической патологии, особенно при заболеваниях печени, позволяет избежать нарастания психоневрологической симптоматики при данных заболеваниях, улучшить состояние и ускорить процесс лечения.
5. Выявление мутаций в гене фенилаланингидроксилазы среди лиц, злоупотребляющих алкоголем, позволяет определить наследственную предрасположенность к хроническому алкоголизму и возникновению алкогольного делирия, т.е. выявить группы риска, а также прогнозировать тяжесть течения заболевания.

Методология и методы исследования

Методология изучения наследственных и экзогенных нарушений обмена фенилаланина и тирозина включает в себя совокупность биохимических и молекулярно-биологических исследований. Методы исследования, применяемые в данной работе, включали в себя биохимический кластер: определение содержания фенилаланина и его дериватов в сыворотке крови и моче (фенилаланин, тирозин, фенилпировиноградная кислота, гомогентизиновая кислота, норадреналин, адреналин), определение активности фенилаланингидроксилазы в ткани печени, а также молекулярно-биологический кластер: построение экспрессионной библиотеки генов печени, определение мутаций с помощью метода полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа, гибридизации ДНК, секвенирования ДНК.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены биохимические проявления генетической гетерогенности у больных фенилкетонурией, определяемые разной активностью фенилаланингидроксилазы печени.
2. Разработанные методы определения мутаций гена фенилаланингидроксилазы с помощью модификаций метода ПЦР в растворе и на твердых носителях (бумажные тест-полоски, нейлоновые фильтры) повысили точность и эффективность генодиагностики.
3. Проведенные исследования нарушений метаболизма фенилаланина и его дериватов при болезни Дауна, вирусном гепатите, хроническом алкоголизме выявили возможные механизмы возникновения психоневрологических расстройств при этих заболеваниях.
4. Проведенные исследования мутационных повреждений гена фенилаланингидроксилазы у больных хроническим алкоголизмом позволили выявить еще один предрасполагающий фактор развития этого заболевания и возникновения тяжелой психоневрологической симптоматики (абстинентный синдром, белая горячка).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность данного исследования определялась выверенными методами экспериментальной работы, многократной повторяемостью результатов и современными методами статистической обработки.

Результаты проведенных исследований опубликованы в отечественных и зарубежных научных журналах, явились предметом доклада на российских и международных научных форумах.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на Европейской конференции по генетике человека (Барселона, Испания, 2008), VIII Российском Конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2009), Европейской конференции по генетике человека (Гетенбург, Швеция, 2010), Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» им. проф. Е.И. Шварца (Санкт-Петербург, 2010), V Восточно-Европейской конференции по редким заболеваниям и лекарствам-сиротам (Санкт-Петербург, 2010), II Всероссийской конференции по редким заболеваниям и редко применяемым медицинским технологиям «Дорога жизни» с международным участием (Санкт-Петербург, 2011), Европейской конференции по генетике человека (Нюрнберг, Германия, 2012), Всеармейской юбилейной научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора В. К. Смирнова «Актуальные вопросы клинической, военной и экстремальной психиатрии» (Санкт-Петербург, 2013), II Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2014), IX международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука и технологии - перспективные разработки», 22-23 августа 2016 г. North Charleston, USA, Всероссийской конференции с международным участием «Окислительный стресс в психиатрии и неврологии», 20-21 октября 2016 г., Санкт-Петербург, Четвертом Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», 29 ноября – 2 декабря 2017 г., Санкт-Петербург.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 31 работа, в том числе 1 глава в монографии, 9 статей в рецензируемых отечественных журналах, рекомендованных ВАК, 6 статей в международных рецензируемых журналах, 15 статей и тезисов отечественных и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 рисунками и 14 таблицами; состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы (293 источника, в том числе 269 на иностранных языках).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Фенилаланин является ароматической аминокислотой и входит в состав всех живых организмов. Фенилаланин в организме человека - незаменимая аминокислота и поэтому его поступление в организм происходит исключительно с пищей. Фенилаланин входит в состав белков и играет значительную роль в функциональных центрах, обеспечивая фолдинг и стабилизацию белковых структур, а также регуляцию ферментативной активности. В свободной форме фенилаланин является предшественником целого ряда биологически активных веществ, таких как тирозин, ДОФА, дофамин, норадреналин, адреналин, меланин. При нарушении метаболизма фенилаланина возникает целый ряд патологических состояний, которые приводят к дисбалансу катехоламинов и повреждению центральной нервной системы. С нарушениями обмена фенилаланина связаны некоторые наследственные заболевания, прежде всего, фенилкетонурия. В то же время, устойчивые нарушения обмена фенилаланина и его дериватов возникают и при ряде соматических заболеваний и характеризуются сходной клинической картиной.

1.2. Метаболизм фенилаланина в норме

Фенилаланин в метаболической цепочке является началом пути, который приводит к последующему биосинтезу катехоламинов. Фенилаланин у животных и человека в норме имеет одну реакцию превращения – биосинтез тирозина посредством реакции гидроксирования. Эту реакцию осуществляет фенилаланингидроксилазная система, ключевым ферментом которой является фенилаланингидроксилаза. В норме порядка 75% поступающего с пищей фенилаланина превращается в тирозин. Превращение фенилаланина в тирозин в

организме в большей степени необходимо для удаления избытка фенилаланина, а не для восстановления запасов тирозина, так как тирозин обычно в достаточном количестве поступает с белками пищи, и его дефицита, как правило, не возникает. Дальнейшим катаболическим превращениям подвергается именно тирозин.

Хотя превращение фенилаланина в тирозин было продемонстрировано на перфузированной печени собаки еще в 1913 г. (Embden, Baldes, 1913), природа ферментов, участвующих в этом процессе, была неясна еще, по крайней мере, в течение 40 последующих лет. И только в 50-х гг. эта реакция привлекла более пристальное внимание энзимологов в связи с исследованиями Jervis (Jervis, 1947, 1953) о природе фенилкетонурии.

В 50-х – 60-х гг. Юденфренд и Купер (Udenfriend, Cooper, 1952), Митома и Кауфман (Mitoma et al., 1957; Kaufman, 1958, 1959, 1963) стали детально исследовать этот процесс. Этими и другими авторами было выявлено, что процесс ферментативного гидроксирования фенилаланина в тирозин осуществляется многокомпонентной фенилаланингидроксилазной системой (Kaufman, 1993). В нее входят ключевой фермент - фенилаланингидроксилаза и ферменты, осуществляющие биосинтез и регенерацию кофактора фенилаланингидроксилазы – тетрагидробиоптерина: гуанозинтрифосфатциклогидролаза, 6-пирувоил-тетрагидроптерин-синтаза, сепиаптерин-редуктаза, птерин-4а-карбиноламин-дегидратаза и дигидроптеридинредуктаза. Схематически этот процесс можно представить следующим образом (Рисунок 1).

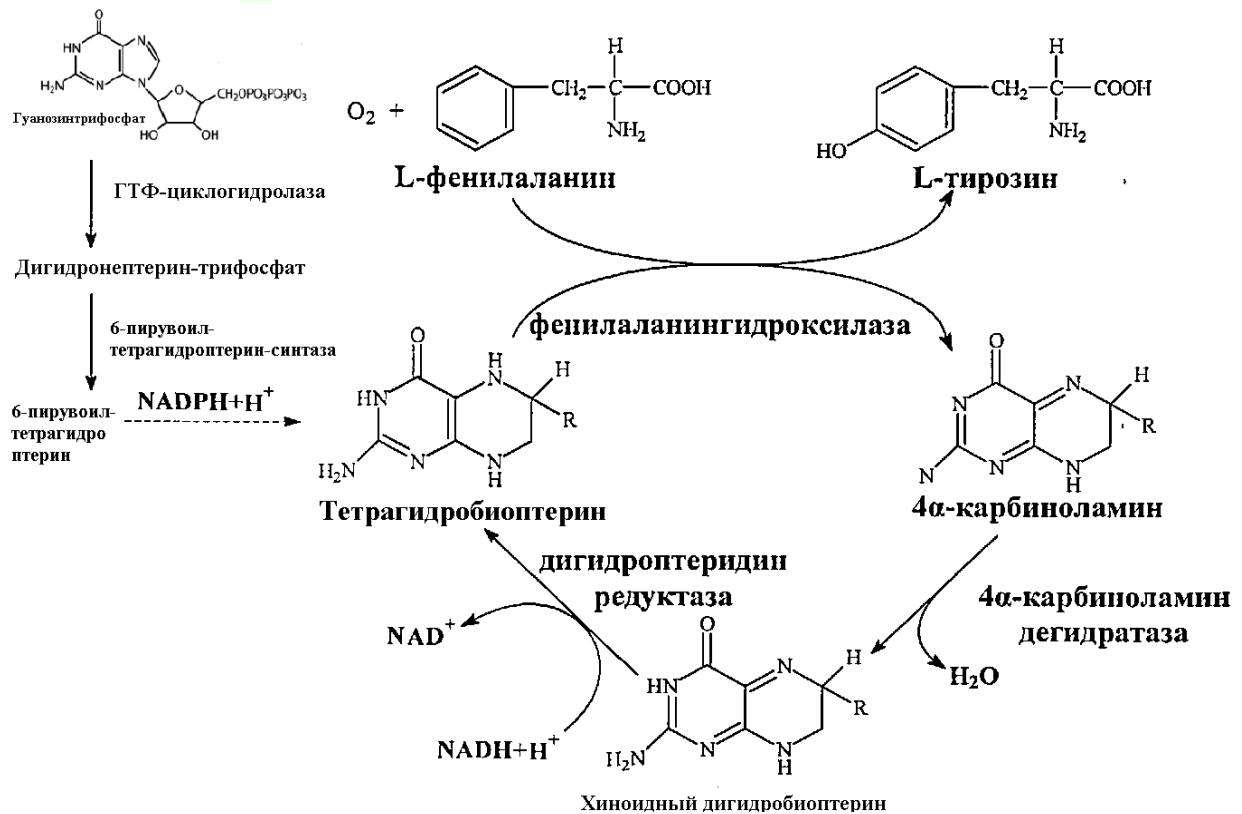


Рисунок 1. Гидроксилирование фенилаланина в тирозин и компоненты фенилаланингидроксилазной системы, участвующие в этом процессе.

Фенилаланингидроксилаза в основном присутствует в печени, где удаляет избыток фенилаланина и предупреждает нейротоксический эффект гиперфенилаланинемии. Вместе с тем, фенилаланин является также важной протеиногенной аминокислотой и поэтому не превращается в тирозин полностью. Чтобы сохранять это равновесие фенилаланингидроксилаза имеет различные регуляторные механизмы и специфическую структуру, через которую эти механизмы реализуются.

Кофактор фенилаланингидроксилазы – тетрагидробиоптерин (BH4), был открыт Кауфманом (Kaufman, 1958). Однако, наиболее подробно химические и биологические свойства этого соединения были исследованы в лаборатории Nenad Blau (Thony, Blau et al., 2000; Fiege, et al., 2004; Elzaouk, et al., 2004).

Другие ферменты, участвующие в биосинтезе и регенерации ВН4, в настоящее время хорошо исследованы, известны их строение и биологические функции (Amy et al., 2009; Du et al., 2009).

В последние годы имеется много важных достижений в выяснении каталитического механизма ФАГ и структурно-функциональных взаимоотношений (Fitzpatrick, 2000; Olsson et al., 2010; Flatmark, Stevens, 1999), но менее проработан вопрос о взаимоотношении структуры и регуляции (Fitzpatrick, 2012). Тем не менее, работы в этом направлении интенсивно продолжаются, появляются все новые данные, позволяющие более детально судить об этих процессах (Patel et al., 2016; Arturo et al., 2016).

В результате гидроксирования фенилаланина образующийся тирозин метаболизирует двумя путями. Первый путь - через трансаминирование является путем катаболизма до фумарата и ацетоацетата и далее – в цикл Кребса. Второй путь - через гидроксирование приводит к образованию целого ряда биологически активных соединений. Схема этих превращений представлена на Рисунках 2 и 3.

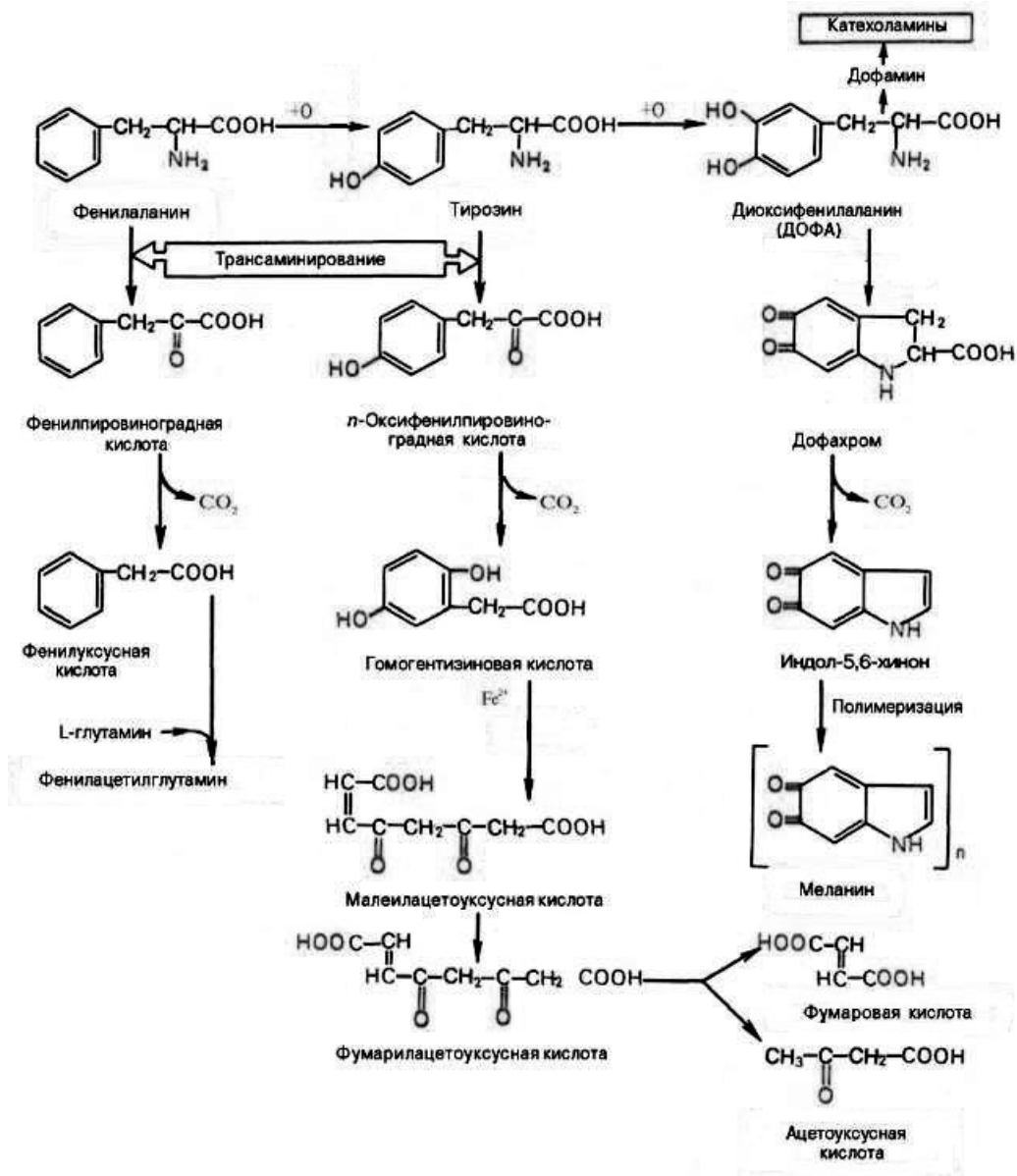


Рисунок 2. Катаболизм фенилаланина.



Рисунок 3. Тирозин и его метаболизм с образованием биологически активных соединений.

1.3. Компоненты фенилаланингидроксилазной системы

1.3.1. Фенилаланингидроксилаза

Фенилаланингидроксилаза (ФАГ) является ключевым ферментом фенилаланингидроксилазной системы. ФАГ катализирует превращение L-фенилаланина в L-тирозин с участием кофактора (6R)-L-эритро-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH₄) и молекулярного кислорода.

Активность ФАГ исследовалась еще с 1950-х г. многими авторами и на различных биологических объектах (Reem et al., 1957; Kenney et al., 1958; Coleman, 1960; Allen et al., 1964). Итог исследованиям тех лет подвел Кауфман (Kaufman, 1993). Далее, с появлением более совершенных технологических возможностей, стали проводиться исследования пространственной структуры этого фермента, его активных центров, исследовались кинетика, аллостерическая регуляция, фолдинг и т.д. (Roberts et al., 2013; Fitzpatrick, 2012; Loaiza et al., 2011; Underhaug et al., 2012).

ФАГ относится к семейству птерин-зависимых гидроксилаз ароматических аминокислот, к которым относятся также тирозингидроксилаза (ТГ) и триптофангидроксилаза (ТРГ). (Fitzpatrick, 1999). Каждый из этих ферментов катализирует гидроксилирование аминокислоты в области ароматического кольца, используя тетрагидробиоптерин и кислород для образования гидроксильной группы. Все ароматические гидроксилазы эукариот формируют гомотетрамеры, каждый мономер содержит N-концевой регуляторный домен, гомологичный каталитический домен и C-концевой тетрамеризующий домен. Кристаллическая структура каталитических доменов подтверждает, что они очень сходны по своей структуре и активным сайтам (Kobe et al., 1999; Goodwill et al., 1997; Wang et al., 2002), определяющим общий каталитический механизм (Fitzpatrick, 2003). Структуры регуляторных доменов ФАГ и ТГ содержат АСТ-домены (Kobe et al., 1999; Zhang et al., 2014; Grant, G. A. 2006), хотя регуляция деятельности каждого из

этих энзимов осуществляются по-разному (Xia et al., 1994; Fitzpatrick, 2012; Haуcock, 1990; Daubner et al., 2011).

Все три этих фермента имеют в своей структуре негемовое железо и вовлечены в метаболические пути, критически важные для нормального функционирования нервной системы. Все они имеют сходные каталитические механизмы, но различаются по особенностям регуляции (McKinney et al., 2005; Daubner et al., 2011).

ФАГ является высококонсервативным ферментом у млекопитающих, структура фермента крысы на 92% идентична человеческому ферменту, крысиная ФАГ на одну аминокислоту длиннее благодаря дополнительному остатку серина на С-концевом участке.

ФАГ человека (Рисунок 4) имеет массу 51,9 kDa и состоит из 452 аминокислотных остатков. Функционально активный фермент состоит из четырех идентичных субъединиц с примерно равным соотношением тетрамерной и димерной форм (Hufton et al, 1998). Динамическое смещение к тетрамерной форме происходит при понижении рН и при присоединении фенилаланина (Björge et al., 2001; Martínez et al., 1995).

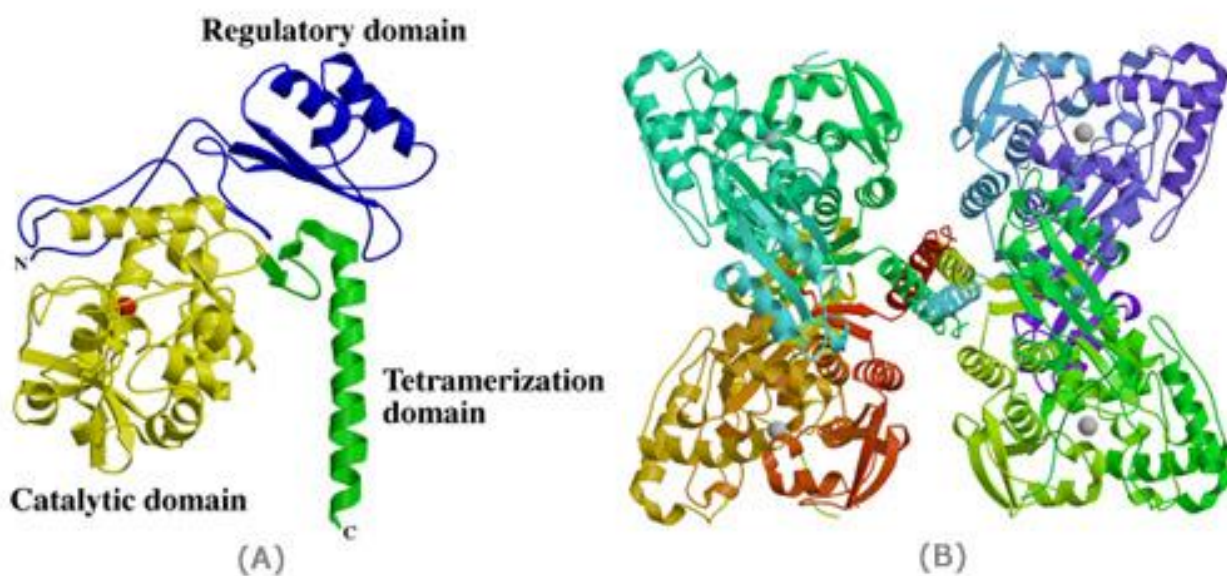


Рисунок 4. Структура фенилаланингидроксилазы. А – мономер, В – полноразмерный тетрамер.

Каждая субъединица ФАГ представляет собой α/β структуру и состоит из N-концевого регуляторного домена (аминокислотные остатки 1-117), центрального каталитического домена (аминокислотные остатки 118-410) и С-концевого олигомеризирующего домена (аминокислотные остатки 411-452) (Kobe et al., 1999; Fusetti et al., 1998). N-концевой регуляторный домен содержит АСТ-область – регуляторный модуль, присутствующий в различных белках, которые часто димеризуются и связывают аминокислоты (Aravind, Koonin, 1999; Liberles et al., 2005). Этот домен гибко присоединен к каталитическому домену через т.наз. «шарнирный регион» (Arg111–Thr117) и имеет контакты с каталитическим доменом смежной субъединицы внутри димера. В белках, содержащих АСТ области, лиганды имеют тенденцию образовывать связь между АСТ областями и областью консервативного Gly (Gly46 в hPAH) (Grant, 2006).

Регуляторный домен необходим для проявления регулирующих свойств, таких как активация фенилаланином, хотя до сих пор дискутируется вопрос, включает ли он аллостерический связывающий сайт для фенилаланина.

Регуляция активности ФАГ – сложный процесс. Фермент активируется фенилаланином и ингибируется тетрагидробиоптерином. Оба этих механизма были открыты еще несколько десятилетий назад (Nielsen, 1969; Bailey, Ayling, 1978). Инкубация ФАГ с фенилаланином повышает активность фермента до стократного уровня (Shiman et al., 1990). Активация фермента субстратом происходит в результате конформационных изменений молекулы при присоединении L-фенилаланина к аллостерическому сайту на N-концевом регуляторном домене, физически отличающемся от сайта связывания фенилаланина в активном центре фермента (Davis et al, 1997; Olafsdottir, Martinez, 1999; Li et al., 2010).

Активация фермента фосфорилированием также была открыта в 70-х г. (Abita et al., 1976). Механизмом такой активации фенилаланингидроксилазы является фосфорилирование серина в 16 положении, который является субстратом для цАМФ зависимой протеинкиназы. При этой реакции также изменяется вторичная структура N-концевого домена белка (Chehin et al., 1998). Фосфорилирование Ser16 снижает концентрацию фенилаланина, необходимую для активации ФАГ (Doskeland et al., 1996).

Современное понимание механизмов активации ФАГ базируется на анализе кристаллической структуры фермента, в котором N-терминальные аминокислотные остатки (19-29) регуляторного домена проходят через активный сайт каталитического домена. Связывание фенилаланина приводит к конформационным изменениям, которые перемещают N-конец регуляторного домена и открывают активный центр (Kobe et al., 1999).

Однако, полное представление о влиянии субстратов и фосфорилирования на активность фермента и структурных изменений, определяющих изменение активности, является пока недостаточным. Тем не менее, это не ставит под сомнение хорошо изученный каталитический механизм фермента, который характерен для всех ароматических гидроксилаз (Fitzpatrick, 2003; Olsson et al., 2010).

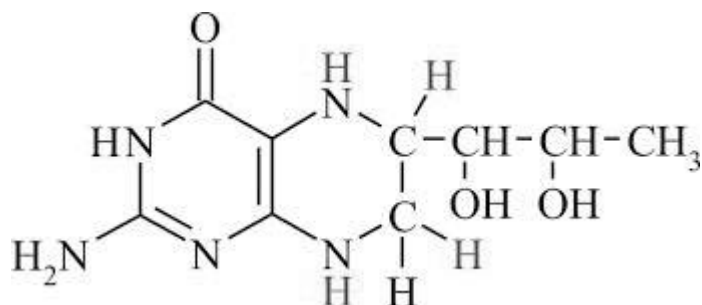
Активация субстратом представляет самый важный механизм регулирования ФАГ в печени, и имеет также важное физиологическое значение для контролирования гомеостаза ФА в крови (Kaufman,1993; Fitzpatrick, 2012). Фосфорилирование ФАГ в положении Ser16 цАМФ-зависимой протеинкиназой является дополнительным посттранскрипционным регулирующим механизмом, который действует синергистически с активацией субстратом (Fitzpatrick, 2012).

Таким образом, ФА усиливает уровень фосфорилирования протеинкиназой, что в свою очередь облегчает активацию фермента субстратом (Kaufman,1993; Fitzpatrick, 2012).

Кроме того, ФАГ также регулируется ВН4 двумя способами. В дополнение к его роли кофактора ВН4 также функционирует как негативный эффектор, который конкурирует с активацией ФА, уменьшает уровень фосфорилирования в положении Ser16 и формирует неактивный ФАГ-ВН4 комплекс при низких концентрациях ФА (Kaufman,1993; Mitnaul, 1995).

Хотя различные виды тетрагидроптеринов могут заменить ВН4 в реакции гидроксирования, естественный изомер с наличием С6-дигидроксипропильной группы, то есть, 1',2'-дигидроксипропил-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (6R-ВН4), является наиболее эффективным при формировании стабильного ФАГ-ВН4 комплекса, который запирает и стабилизирует ФАГ посредством конформационных изменений, затрагивающих N-концевую саморегулирующую последовательность (остатки 1-33) (Kobe et al.,1999; Peu et al., 2004). При этом ВН4 действует как естественный лиганд и химический низкомолекулярный шаперон ФАГ.

1.3.2. Кофактор фенилаланингидроксилазы – тетрагидробиоптерин



Тетрагидробиоптерин (6R-L-эритро-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин) является кофактором фенилаланингидроксилазы и, кроме того, кофактором всех гидроксилаз ароматических аминокислот, алкилглицерол-монооксигеназы и трех форм синтазы оксида азота (NO-синтазы). ВН4 был открыт первоначально, как кофактор фенилаланингидроксилазы (Kaufman, 1958), после чего началось его интенсивное изучение. ВН4 присутствует, вероятно, в каждой клетке или ткани высших организмов и играет ключевую роль во множестве биологических процессов и патологических состояний, связанных с образованием моноаминных нейротрансмиттеров, сердечно-сосудистой и эндотелиальной дисфункции, иммунного ответа и болевой чувствительности.

ВН4 синтезируется *de novo* из ГТФ в результате трех последовательных ферментативных реакций, выполняемых ГТФ-циклогидролазой I, 6-пирувоилтетрагидроптерин-синтазой и сепиаптерин-редуктазой.

Биосинтез ВН4 происходит *de novo* путем Mg^{2+} -, Zn^{2+} - и NADPH-зависимых реакций из ГТФ через два промежуточные продукта, 7,8-дигидронеоптерин трифосфат и 6-пирувоил-5,6,7,8-тетрагидроптерин (Рисунок 5).

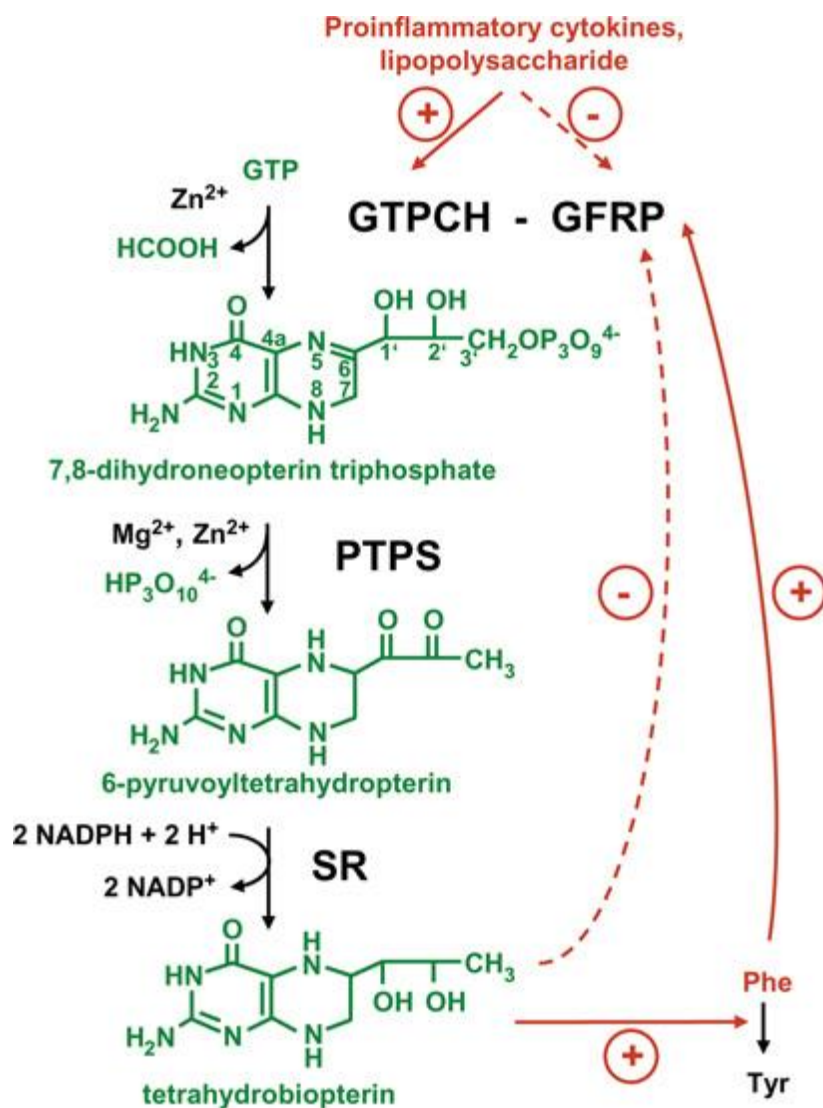


Рисунок 5. Биосинтез тетрагидробиоптерина (Werner et al., 2011). GTPCH (ГТФ-циклогидролаза I); GFRP (ГТФ-циклогидролаза-регуляторный белок); PTPS (6-пирувоилтетрагидроптеринсинтаза); SR (сепиаптеринредуктаза).

Три фермента: GTPCH, PTPS и SR, необходимы для выполнения стереоспецифической реакции синтеза ВН4. Используя кристаллографические структуры, в том числе характеристики активных центров всех трех ферментов, была получена основная информация для понимания механизмов реакции. Кроме того, при ЯМР-исследовании механизмов реакций всех трех ферментов, выявлены детали процесса водородного переноса и стереохимия реакций (Bracher et al., 1998).

Начальная стадия осуществляется GTPCH – гомодекамером, состоящим из двух пентамеров (Nar et al., 1995). GTPCH содержит десять эквивалентных

активных центров с каталитическими «карманами» размером 10 ангстрем. Интерфейс из трех субъединиц, двух из одного пентамера и одной из другого, образуют активный сайт. Атомная структура такого «кармана» высокоселективна для ГТФ. Каталитический механизм был предложен на основе структурного анализа (Nar et al., 1995a). Была также показана существенная роль цинка (Zn^{2+}) в активном сайте человеческой и бактериальной GTPCH (Auerbach et al. (2000).

Реакция превращения 7,8-дигидронеоптеринтрифосфата в 6-пирувоилтетрагидроптерин катализируется PTPS в Mg^{2+} - и Zn^{2+} -зависимой реакции (Рисунок 5). Кристаллографический анализ показал, что PTPS состоит из пары тримеров, расположенных головными частями друг к другу, формируя функциональный гексамер (Nar et al., 1994). Гомогексамер содержит шесть активных сайтов, которые расположены на границе трех мономеров, двух субъединиц одного тримера и одной субъединицы другого тримера. Каталитический центр и механизм реакции были изучены с помощью кристаллографического и кинетического анализа на крысиной PTPS, мутантной и дикого типа (Burgisser et al., 1995). Каждый каталитический центр имеет Zn^{2+} -связывающий сайт в 12-Å «кармане». «Карман» активного сайта содержит дополнительно еще два каталитических мотива: Zn^{2+} -связывающий сайт и межсубъединичную каталитическую триаду, образованную остатками цистеина, аспартата и гистидина (Ploom et al., 1999).

Последней стадией биосинтеза ВН4 является НАДФН-зависимая редукция двух кетогрупп боковой цепи 6-пирувоилтетрагидроптерина посредством SR (Рисунок 5). Общая структура SR представляет собой гомодимер, стабилизированный общим четырехспиральным пучком (Auerbach et al., 1997). Каждый мономер представляет собой структуру из двух альфа-спиралей с центральным доменом димеризации и образует отдельный комплекс, состоящий из семи параллельных бета-листов, окруженных альфа-спиралями. Этот этап биосинтеза ВН4 был подробно исследован на основе кинетических, кристаллографических и ЯМР анализов (Bracher et al., 1998).

Кроме того, имеется альтернативный путь синтеза ВН4 через дигидрофолатредуктазу, который может играть существенную роль помимо основного пути. Регенерация кофактора требует наличия птерин-4а-карбиноламин-дегидратазы и дигидроптеридин-редуктазы, за исключением NO-синтазы (NOS), для которой ВН4-кофактор претерпевает окислительно-восстановительный цикл без потребности в дополнительных ферментах регенерации. В отношении регуляции биосинтеза кофактора, главным регулирующим ферментом является ГТФ-циклогидролаза I.

Биосинтез ВН4 контролируется у млекопитающих гормонами и цитокинами (Kasai et al., 1995; Shi et al., 2004). Дефицит ВН4 вследствие аутосомно-рецессивных мутаций в генах всех вышеуказанных ферментов, за исключением сепиаптерин-редуктазы, был описан как причина гиперфенилаланинемии. Основной причиной сосудистой дисфункции, связанной с гипертонией, ишемически-реперфузионным повреждением, диабетом и другими патологическими состояниями, является превалирование нефункционального окисленного ВН4, что приводит к повышенному образованию кислородных радикалов вместо NO при дефиците NOS. Кроме того, различные неврологические заболевания могут быть следствием ограниченного наличия кофактора, и терапия пероральным введением кофактора стабилизирует фенилаланингидроксилазу при ВН4-зависимом типе гиперфенилаланинемии и имеет выраженный эффект снижения патологического уровня фенилаланина у больных ГФА.

ФАГ была первым ферментом, на котором была показана роль ВН4 в качестве кофактора. На основе детальных биохимических (Fitzpatrick, 1999) и структурных данных (Andersen et al., 2002), взаимодействие ФАГ и ВН4 отображено в упрощенном виде на Рисунке 6. Одним из важнейших участников в этом процессе является негемовое железо в активном центре, которое связано с двумя остатками гистидина His285 и His290 и Glu330. ВН4 и ФА взаимодействуют в непосредственной близости к этому негемовому железу. Молекулярный кислород

связывается с негемовым железом и активируется с помощью BH_4 , который образует связь с кислородом в 4a положении.

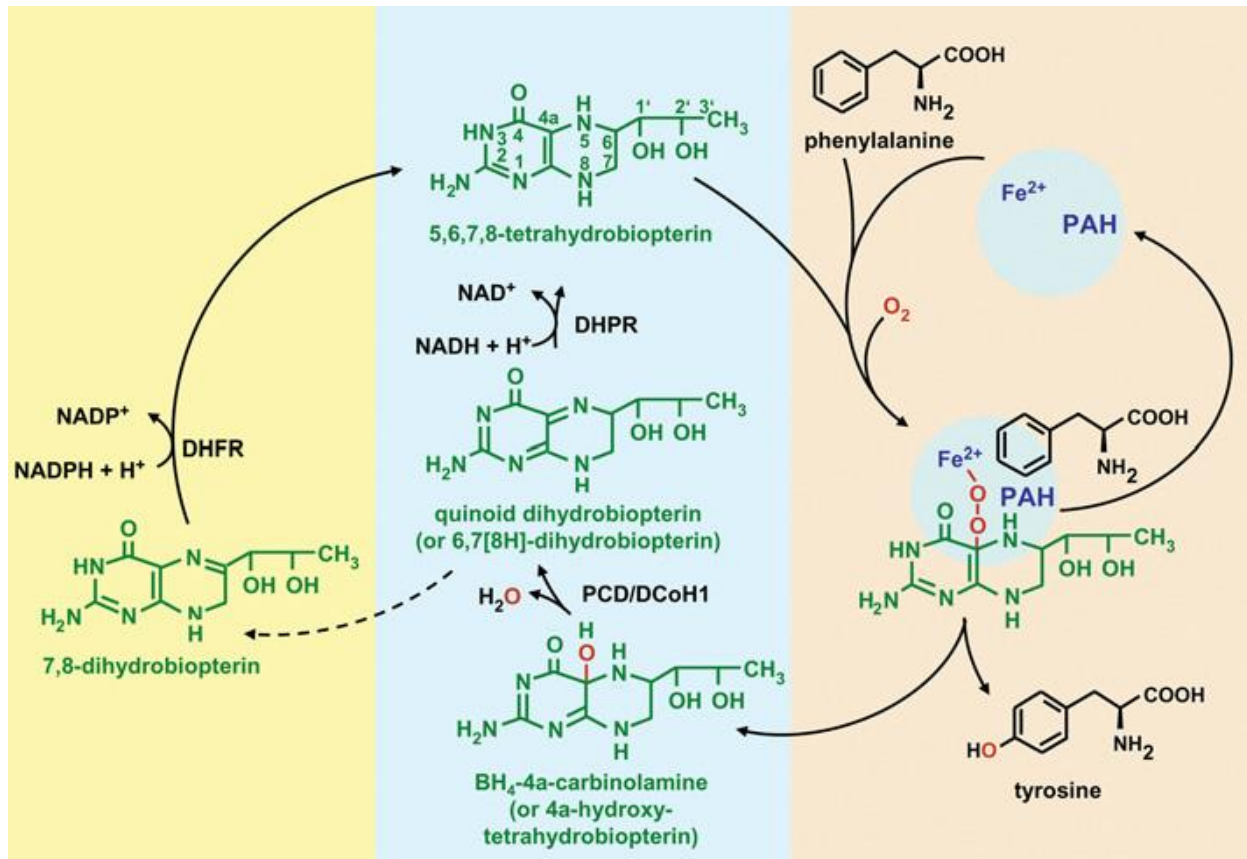


Рисунок 6. Механизм действия BH_4 и его регенерация (Werner et al., 2011). PCD (птерин-4а-карбиноламиндегидратаза); DHPR (дигидроптеридинредуктаза).

Связь O-O затем расщепляется, и высокоактивный Fe-оксокомплекс гидроксилирует фенилаланин. BH_4 выходит из реакции в виде его 4а-гидрокси-производного, а затем регенерирует под действием двух ферментов, PCD и DHPR. Ферментативная регенерация BH_4 важна для метаболизма фенилаланина, для непрерывной поставки кофактора и предотвращения накопления токсичного 4а-гидрокси интермедиата BH_4 (BH_4 -4а-карбиноламин).

Другой ролью BH_4 для ФАГ и ТГ является эффект химического низкомолекулярного шаперона для предотвращения мисфолдинга белка, его инактивации и защиты от протеолитического расщепления (Thony et al., 2004; Peu

et al., 2004; Thony et al., 2008). Таким образом, ВН4 играет центральную регулируемую роль в фенилаланингидроксилазной системе. Другие известные ВН4-зависимые ферменты печени, АГМО (алкилглицерол-монооксигеназа) и NOS (NO-синтаза), присутствуют в печени в относительно низких количествах, и только концентрации ФАГ-субъединиц и ВН4 в печени примерно равны (ФАГ, ~ 9 мкмоль/л, и ВН4, 5-10 мкмоль/л (Thony et al., 2004; Pey et al., 2004; Каррок, Сарадонна, 1996; Fukushima, Nixon, 1980. Тем не менее, принимая во внимание, что K_m для кофактора в ФАГ реакции оценивается в 25-30 мкмоль/л (Milstien, Kaufman 1975; Teigen, Martinez A., 2003), ВН4 является лимитирующим фактором гидроксилирования ФА в ткани печени (Thony et al., 2004; Kure et al., 2004).

1.4. Метаболизм фенилаланина при патологических состояниях

1.4.1. Метаболизм фенилаланина при наследственных заболеваниях.

Фенилкетонурия

Нарушения метаболизма фенилаланина в первую очередь связаны с нарушением функционирования основного фермента фенилаланингидроксилазной системы – фенилаланингидроксилазы. Это нарушение приводит к частичному или полному блоку превращения фенилаланина в тирозин, повышению уровня фенилаланина в тканях и биологических жидкостях, снижению уровня тирозина и его дериватов, появлению в организме патологических метаболитов фенилаланина (фенилпировиноградная кислота и др.), токсически действующих, прежде всего, на ЦНС.

Нарушения метаболизма фенилаланина были впервые описаны в связи с заболеванием, первоначально названным, как «фенилпировиноградная олигофрения». В 1934 году это сделал норвежский врач и биохимик Феллинг (Folling, 1934). Феллинг показал, что данное заболевание развивается как следствие нарушения метаболизма ароматической аминокислоты фенилаланина, в результате

чего в тканях организма накапливаются токсичные продукты альтернативного пути деградации фенилаланина. Феллингом был также предложен простой метод диагностики фенилкетонурии, основанный на реакции в моче больного патологического метаболита фенилпировиноградной кислоты с хлорным железом (Folling, 1934b). Через непродолжительное время случаи фенилпировиноградной олигофрении (фенилкетонурии) были описаны в Англии (Penrose, 1935) и в США (Jervis, 1937). Эти исследования послужили началом детального изучения метаболизма фенилаланина и его дериватов в норме и при патологических состояниях. В течение 30-50х гг. происходило выяснение биохимических основ фенилкетонурии, было показано, что метаболизм фенилаланина происходит в основном в печени, и у больных фенилкетонурией преобразования фенилаланина в тирозин практически не происходит. В частности, как определил Джервис (Jervis, 1953), у больных фенилкетонурией нагрузка фенилаланином не дает повышения уровня тирозина, как это происходит в здоровом организме. Активность фенилаланин-гидроксилазы при фенилкетонурии варьировалась от полного отсутствия до 50% от нормы, что позволило сделать предположение о различных механизмах нарушения активности фенилаланин-гидроксилазы и гетерогенности самого заболевания фенилкетонурии. Обнаружение кофактора фенилаланин-гидроксилазы тетрагидробиоптерина Кауфманом (Kaufman, 1958) еще более укрепило мнение о гетерогенности фенилкетонурии и, в более широком плане, всех гиперфенилаланинемий.

При классической фенилкетонурии основные биохимические нарушения, приводящие к тяжелой органической патологии, связаны с мутационными повреждениями в гене фенилаланин-гидроксилазы. В настоящее время выявлено более 950 мутаций в гене ФАГ, приводящих к полной или частичной инактивации фермента ФАГ, и, соответственно, полному или частичному блоку превращения фенилаланина в тирозин (Blau, 2016).

При инактивации ФАГ возникает системный дисбаланс метаболизма аминокислот и их дериватов.

1. Серьезно повышается уровень фенилаланина в крови (1200 мкм/л и более у нелеченых больных при норме до 120 мкм/л) (Blau et al., 2010).

2. При невозможности превращения фенилаланина в тирозин активируются альтернативные пути его метаболизма (Рисунок 7) через окислительное дезаминирование посредством фенилаланинаминотрансферазы, ген которой экспрессируется в основном в печени. Эта реакция активируется субстратом и становится актуальной при высоком уровне фенилаланина (Scriver, Rosenberg 1973). Фенилаланин также может подвергаться декарбоксилированию в фенилэтиламин под действием фенилаланиндекарбоксилазы, хотя скорость этой реакции невелика (Rampini et al., 1974).

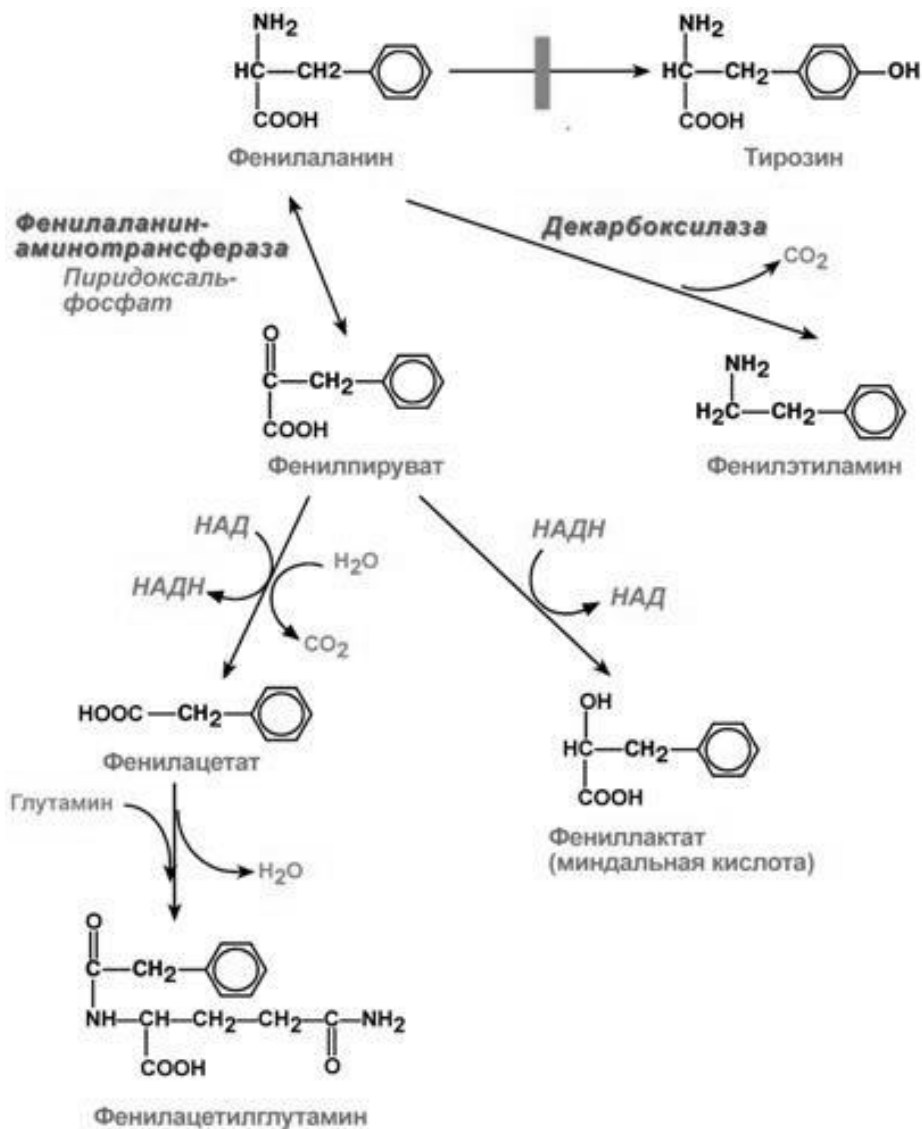


Рисунок 7. Альтернативные пути метаболизма фенилаланина.

В результате образуется ряд веществ (фенилпировиноградная кислота, фенилмолочная кислота, фенилуксусная кислота, фенилэтиламин, фенилацетилглутамин) в норме не присутствующих в организме и оказывающих токсическое воздействие, прежде всего, на ЦНС (Patel, Arinze, 1975; Sabelli et al, 1978; Kaufman, 1989).

3. У больных ФКУ и в модельных экспериментах на животных, повышенный уровень фенилаланина ингибирует биосинтез дофамина, норадреналина, адреналина, серотонина, их уровень снижается в различных отделах мозга, таких, как префронтальный кортекс, миндалевидное тело, гиппокамп, стриатум (Curtius et al., 1972).

Снижение уровня нейромедиаторов зависит от влияния высокой концентрации ФА на транспорт аминокислот через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (особенно таких как тирозин и триптофан) или на ферменты, участвующие в биосинтезе нейромедиаторов (Pardridge, 1998; Shulkin et al., 1995).

Следствием длительного повышения уровня фенилаланина являются серьезные органические повреждения отделов головного мозга - мозолистого тела, стриатума, коры больших полушарий, гипомиелинизация, что приводит к слабоумию и нейродегенерации (Dyer, 2000; Huttenlocher, 2000; Rocha, Martel, 2009; Duarte et al., 2013). Тем не менее, патофизиология повреждений мозга при фенилкетонурии и гиперфенилаланинемии еще недостаточно хорошо понятна и изучена. Основная гипотеза состоит в том, что избыток фенилаланина и его побочные метаболиты действуют как нейротоксины и при длительном воздействии вызывают необратимые изменения ткани мозга. Однако, существуют и другие патогенетические механизмы, являющиеся следствием гиперфенилаланинемии.

1.4.2. Окислительный стресс у больных фенилкетонурией

Окислительный стресс характеризуется как нарушение баланса между реактивными формами кислорода/азота и антиоксидантной системой. (Halliwell,

Gutteridge, 2007). Такой дисбаланс может индуцировать окислительное повреждение белков, липидов, ДНК. Окислительный стресс ассоциируется с патофизиологией различных нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, эпилепсия, демиелинизация (Halliwell, Gutteridge, 2007; Méndez-Alvarez et al., 2001; Behl, Moosmann, 2002; Stoy, Mackay et al., 2005; Berg, Youdim, 2006). Было показано, что ткань мозга особенно уязвима для окислительного стресса из-за высокого потребления кислорода, высоких концентраций железа, низкого уровня антиоксидантной защиты, что способствует избыточному синтезу перекиси водорода.

За последние годы окислительное повреждение макромолекул при ФКУ было исследовано на моделях животных с ГФА и биологических образцах больных ФКУ. Было продемонстрировано, что высокий уровень ФА ассоциируется с повреждениями ДНК, белков и липидов, а также низким уровнем антиоксидантной защиты. Было обнаружено повреждение ДНК в периферической крови больных ФКУ *in vivo* и *in vitro* при существенном повышении концентрации ФА (Schulpis et al., 2005; Sitta et al., 2005).

Кроме того, окислительное повреждение белков и липидов, измеренное тестами карбонилформации, окисления сульфогидрильных групп, тиобарбитуровой кислоты, содержанием малонового альдегида было выявлено в плазме и эритроцитах больных ФКУ (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2009; Sitta et al., 2009a; Sanayama et al., 2011). У этих больных также был обнаружен низкий уровень ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты. Низкий уровень общего антиоксидантного статуса и реактивности, L-карнитина, бета-каротина, коэнзима Q10 и изменение активности каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы у больных ФКУ указывают на ухудшение антиоксидантной защиты, что является результатом окислительного стресса. Однако, эта симптоматика может быть скорректирована с помощью L-карнитина и селена (Sitta et al., 2011).

Модели ГФА на животных также представляют соответствующие свидетельства для объяснения роли окислительного стресса в патофизиологии ФКУ. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали ухудшение работы антиоксидантных ферментов – каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы и снижение неферментативных антиоксидантных показателей, включая метаболизм глутатиона в ткани мозга крыс. Высокий уровень ФА также приводит к усилению окисления сульфогидрильных групп, повышению уровня тиобарбитурореактивных веществ, малонового диальдегида и 2',7'-дихлорофлюоресцина, что вызывает окислительное повреждение белков и липидов и повышение продукции реактивных форм кислорода (РФК) (Ercal et al., 2002; Kienzle Hagen et al., 2002; Martinez-Cruz et al., 2002; Fernandes et al., 2010; Moraes et al., 2010; Moraes et al., 2013). Большинство этих негативных явлений было предотвращено назначением липоевой кислоты, мелатонина, альфа-токоферола и аскорбиновой кислоты, которые являются хорошо известными антиоксидантами.

Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что побочные метаболиты ФА, такие, как ФПК, фенилуксусная (ФУК) и фенилмолочная (ФМК) кислоты, которые накапливаются при ФКУ, токсически воздействуют на антиоксидантные ферменты. В то время как ФМК и ФУК повышают активность СОД в мозге крысы, ФПК снижает активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в той же ткани (Moraes et al., 2013; Rosa et al., 2012), указывая на возможный косвенный механизм, посредством которого избыток ФА приводит к окислительному стрессу при ФКУ.

1.4.3. Повреждения ДНК

Реактивные формы кислорода, особенно гидроксильные радикалы, могут инициировать повреждения ДНК (Cooke et al. 2005, 2006; Culmsee, Mattson, 2005) и вызывать мутации ДНК. Например, гидроксильный радикал может добавить кольцевую структуру к гуанину в позиции 8 ДНК, образуя 8-гидрокси-2-дезоксигуанозиновый радикал (Halliwell, 2006). Гидроксильные радикалы могут

также атаковать другие основания и дезоксирибозные сахара в структуре ДНК, продуцируя массивные повреждения, которые могут быть детектированы с помощью метода ДНК-комет (Evans et al., 2004). Фактически, окисленные модификации ДНК могут индуцировать другие широкомасштабные эффекты, влияющие на функции клетки, затрагивая теломеры, микросателлитные последовательности, промоторы, и сайты метилирования (Evans, Cooke 2004; Evans et al., 2004), и эти механизмы могут играть важную роль в патогенезе многих заболеваний (Evans, Cooke, 2004). Однако, механизм генотоксического повреждения ДНК фенилаланином вследствие окислительного воздействия не может быть единственным. Могут быть и другие механизмы, например, нарушение системы репарации ДНК.

Тем не менее, результаты экспериментов *in vivo*, выявляют повреждения ДНК в мозге и крови крыс с экспериментальной ГФА и предполагают, что эти нарушения могут влиять на появление неврологических дисфункций у больных ФКУ (Simon et al., 2013).

1.4.4. Метаболизм нейромедиаторов

Нейрохимические и поведенческие исследования показали, что у животных, получавших диету с повышенным содержанием ФА, снижался уровень серотонина в ткани мозга и возникали когнитивные нарушения (Yuwiler et al., 1965). Недавно было установлено, что у больных ФКУ, у которых был снижен уровень дофамина, проявлялась неврологическая симптоматика, сходная с паркинсонизмом (Velema et al., 2015). Многие исследования показали, что высокий уровень ФА ассоциируется со снижением уровня серотонина, дофамина и норадреналина у человека и в модельных экспериментах на животных (Güttler, Lou, 1986; Yano et al., 2013; Pascucci et al., 2002; Landvogt et al., 2008; Sawin et al., 2014). Снижение уровня этих нейромедиаторов может быть связано с эффектом высокой концентрации ФА при транспортровке аминокислот через ГЭБ, особенно в отношении ТИР и ТРФ,

или воздействия на ферменты, вовлеченные в биосинтез нейромедиаторов (Güttler, Lou, 1986). Важно подчеркнуть, что транспортер больших нейтральных аминокислот имеет высокое сродство к ФА, который конкурирует с другими аминокислотами при переходе через ГЭБ (Knudsen et al., 1995; Pietz et al., 1999), особенно с ТИР и ТРФ, уменьшая их количество, доступное для синтеза нейромедиаторов (McKean, 1972; Sandler, 1982; de Groot et al., 2013; Sawin et al., 2014).

ФА также является конкурентным ингибитором тирозингидроксилазы и триптофангидроксилазы, важных ферментов, определяющих биосинтез в мозге нейромедиаторов дофамина и серотонина (Ikeda et al., 1967; Hommes, 1985; Choi, Pardridge, 1986; Diamond, Herzberg, 1996; Gramer et al., 2013; Harding et al., 2014). Кроме того, метаболиты ФА ингибируют 5-гидрокситриптофангидроксилазу и ДОФА-декарбоксилазу – ферменты, также вовлеченных в метаболизм нейромедиаторов (Fellman, 1956; Huang, Hsia, 1963; Justice, Hsia, 1965). Эти эффекты суммарно приводят к дефициту катехоламинов в мозге у больных ФКУ и в моделях на животных.

1.4.5. Синтез белка

При исследовании процессов биосинтеза белка в мозге крысы после введения фенилаланина (2 мг/г массы тела внутривентрикулярно) было выявлено ингибирование включения [³⁵S]метионина в белки мозга у 8- и 18-дневных крыс одновременно со снижением транспорта [³⁵S]метионина и [¹⁴C]лейцина в кислоторастворимую фракцию мозга 18-дневных крыс (Agrawal et al., 1970). Исследования *in vitro*, выполненные в бесклеточной системе, полученной из мозга хомячка, позволили предположить, что ингибирование синтеза белка вызвано нарушением инициации (Elslinger et al., 1989). Действительно, была выявлена отрицательная корреляция между синтезом белка в мозге и концентрацией ФА в плазме крови (200-500 μМ)

(Pardridge, 1998). Вдобавок, было выявлено, что обратная зависимость между концентрацией ФА в плазме и синтезом белка в мозге, возможно, происходит из-за нарушения транспорта БНА через ГЭБ (de Groot et al., 2013) и снижением включения ТИР в белок в ЦНС у больных ФКУ (de Groot et al., 2015). Насыщение транспортера L-аминокислот повышенным количеством ФА при переносе через ГЭБ, по-видимому, является важным, но не основным фактором снижения синтеза белка, наблюдаемого на моделях ФКУ у животных (Smith, Kang, 2000).

При исследовании мозга больных ФКУ с помощью позитронной эмиссионной томографии после внутривенного введения L-1-(11)C-ТИР была выявлена значимая отрицательная корреляция между содержанием ФА в плазме и уровнем синтеза белка в мозге (Hoeksma et al., 2009). Это подразумевает, что уровень ФА должен быть ниже 600-800 мМ/литр, чтобы предупредить нарушение синтеза белка.

Также показано, что концентрации плазменного иммуноглобулина А (IgA) и иммуноглобулина G (IgG) у детей, больных ФКУ, существенно ниже по сравнению со здоровыми детьми того же возраста (Groppe et al., 1995), что может быть следствием низкобелковой безфенилаланиновой диеты у этих больных. Кроме того, было показано, что при сравнительной оценке экспрессии церебральных белков у гомозиготных ФКУ-мышей и гетерозигот с помощью электрофоретических методов, был идентифицирован 21 вид дифференциально экспрессирующихся белков, четыре из которых демонстрировали повышенную экспрессию (включая *Glu2/3* и *NR1*), и 17 белков – сниженную экспрессию (*Ckb*, *Dpysl2*, *Eno1*, *Pgam1*, *Pkm*, *Syn2* и др.). Учитывая важную роль этих белков в физиологии мозга, было сделано заключение, что такой паттерн экспрессии может лежать в основе дисфункции мозга при ФКУ, снижая синаптическую пластичность, ослабляя нейротрансмиссию, нарушая биоэнергетику мозга (Imperlini et al., 2014). Повышенный уровень ФА и его побочных метаболитов также ассоциируется с нарушением биосинтеза ферментов антиоксидантной системы при ФКУ и нарушением редокс-гомеостаза (Rocha, Martins, 2012). Тем не менее, должно быть

четко доказано, является ли сниженный синтез белка следствием токсического эффекта избытка ФА и его дериватов или этому способствует низкобелковая диета у больных ФКУ.

1.4.6. Метаболизм липидов

Различные исследования показывают, что метаболизм липидов нарушен при ФКУ и сопровождается демиелинизацией. Было показано, что у больных ФКУ изменен уровень сывороточных липопротеинов, включая низкий уровень общего холестерина, липопротеинов высокой плотности, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов AI, AII и B (Nagasaka et al., 2014). Низкий уровень холестерина может быть объяснен нарушением синтеза холестерина из-за снижения экспрессии 3-гидрокси-3-метилглутарилкоэнзим-А-редуктазы – регулирующего фермента холестериногенеза, что наблюдается в нокаутной модели ФКУ у мышей (Shefer et al., 2000). Кроме того, было выявлено, что ФА, ФПК и ФУК ингибируют *in vitro* активность мевалонат-5-пирофосфатдекарбоксилазы и 3-гидрокси-3-метилглутарилкоэнзим-А-редуктазы в печени цыпленка при концентрациях, сходных с таковыми у больных ФКУ (Castillo et al., 1991). Уровень оксистеролов и витамина Д – важных метаболитов холестерина также снижен в сыворотке крови больных ФКУ (Nagasaka et al., 2013).

Также показано, что уровень докозагексаеновой кислоты (ДНА) (незаменимая полинасыщенная кислота класса Омега-3) ниже в фосфолипидах плазмы (Giovannini et al., 2011) и образцах крови больных ФКУ (Gramer et al., 2013), такой дефицит может приводить к повреждению нервных клеток при данном заболевании (Cockburn et al., 1996). Более того, у больных ФКУ выявлена более низкая концентрация эйкозапентаеновой кислоты, ДНА и арахидоновой кислоты по сравнению со здоровыми людьми (Lohner et al., 2013). В этом контексте было сделано предположение, что ФА и его патологические метаболиты влияют на

биосинтез полиненасыщенных жирных кислот, ингибируя реакцию дезоксигенации, и тем самым приводя к снижению синтеза ДНА и арахидоновой кислоты (Infante, Huszagh, 2001).

1.4.7. Биоэнергетика

Изменения в биоэнергетических механизмах метаболизма нервной ткани играют важную роль в патофизиологии многих врожденных дефектов метаболизма (Schuck et al., 2009; Amaral et al., 2010; Melo et al., 2011; Wajner, Goodman, 2011). В этом контексте было выявлено нарушение энергетического метаболизма у больных ФКУ и в моделях на животных. Значительное снижение активности сукцинатдегидрогеназы, а также активности митохондриальных комплексов I-III было обнаружено в церебральном кортексе крыс с экспериментальной ГФА (Rech et al., 2002), а также снижение концентрации убихинона-10 (коэнзим Q) у больных ФКУ (Artuch et al., 1999).

Активность креатинкиназы – ключевого фермента в гомеостазе АТФ (Wallimann et al., 2011), существенно ингибируется ФА *in vitro* в церебральном кортексе крыс с экспериментальной ГФА. Эти результаты предполагают наличие еще одного механизма, через который избыток ФА индуцирует нейрометаболические нарушения у больных ФКУ (Costabeber et al., 2003).

Обнаружено также, что билатеральное введение креатина или пирувата в гиппокамп в значительной мере предотвращало когнитивные нарушения, вызванные ГФА у крыс (Berti et al., 2012), указывая на то, что подобные нарушения, выявляемые у больных ФКУ, могут быть вторичными вследствие нарушения энергетических механизмов. Значительный благоприятный эффект креатина и пирувата подтверждается предотвращением нарушения митохондриальной и цитозольной активности креатинкиназы в церебральном кортексе и гиппокампе беременных и лактирующих крыс после введения высоких доз ФА, подтверждая

гипотезу нейротоксичности ФА вследствие нарушения энергетического метаболизма (Bortoluzzi et al., 2014).

ФА и его метаболиты также влияют на метаболизм кетоновых тел посредством ингибирования активности 3-гидроксибутиратдегидрогеназы и 3-оксокислой КоА-трансферазы в мозге кормящих крыс (Benavides et al., 1976). Кроме того, ФПК ингибирует окисление пирувата и малата в скелетной мускулатуре человека и крысы вследствие возможного ингибирования активности пируватдегидрогеназного комплекса, что приводит к повышению уровня лактата, явления, обнаруженного у больных ФКУ (Swierczyński et al., 1976). Вдобавок, ФА и ФПК ингибируют активность пируваткиназы и гексокиназы в мозге больных ФКУ (Weber, 1969), а также в мозге крыс с экспериментальной ГФА (Lütz et al., 2003; Bortoluzzi et al., 2014).

Полагая, что ионы металлов (т.е., цинк, железо, магний) являются ключевыми компонентами металлоферментов (Broderick, 2001), выполняя регулирующие функции в таких ферментах (Ragsdale, 2010; Brown, Cook 1981), и что они, как уже было упомянуто, находятся в дефиците у больных ФКУ, можно предположить, что энергетические дисфункции, наблюдаемые у больных ФКУ могут быть также вызваны ионным дисбалансом, который нарушает активность ключевых ферментов метаболизма. Взятые вместе все эти данные указывают на то, что нарушения в биоэнергетическом гомеостазе могут происходить в силу нейротоксичности избытка ФА, наблюдаемого у больных ФКУ.

1.4.8. Гомеостаз кальция

Гомеостаз кальция крайне важен для функционирования мозга и его дисрегуляция при ФКУ была описана в нескольких работах. В этом контексте паратиреоидный гормон, остеокальцин и дегидрохолекальциферол были повышены в сыворотке крови детей, больных ФКУ, однако кальцитонин был

снижен. Эти изменения не корректировались безфенилаланиновой диетой (Bushueva et al., 1993). В другом исследовании было выявлено, что ФА изменяет внутриклеточные концентрации свободного кальция, модулируя мембранную Ca^{2+} -АТФазу в кортикальных нейронах (Yu et al., 2007).

1.4.9. Биохимические и фенотипические нарушения у гетерозиготных носителей ФКУ

Мутации в гене ФАГ имеют аутосомно-рецессивное проявление, и частота гетерозиготного носительства ФКУ среди европеоидной популяции составляет примерно 1:50. Поскольку заболевание является аутосомно-рецессивным, представляется, что гетерозиготное носительство должно быть бессимптомным. Однако, различные исследования показали, что гетерозиготы отличаются от здоровых людей по своей способности гидроксилировать фенилаланин (Guttler, 1980; Scriver et al., 1995). Эти наблюдения дали основания использовать нагрузочные тесты для выявления метаболических аномалий у гетерозиготных носителей ФКУ (Guttler, 1980; Lehmann, 1989; Scriver et al., 1995).

Активность ФАГ у гетерозигот по ФКУ была оценена непосредственным измерением активности фермента в биоптатах печени (Kaufman et al., 1975) и косвенно посредством нагрузки ФА (Hsia et al., 1956; Jervis, 1960; Woolf et al., 1967; Rampini et al., 1969; Westwood, Raine, 1975; Jagenburg, Rodjer, 1977; Guttler, Hansen, 1977a; Guttler, 1980). Большинство этих исследований дали явное доказательство, что у гетерозигот снижена способность превращения ФА в ТИР по сравнению со здоровыми людьми. Однако, имеется довольно большой разброс в степени отклонения от нормального метаболизма у различных групп гетерозиготных носителей, что связывают с характером мутационного повреждения гена ФАГ (Guldborg et al., 1998).

Фенотипические отклонения от нормы у гетерозиготных носителей были выявлены в различных исследованиях, однако, таких работ сравнительно немного.

Еще в 1935 г. в семье больных ФКУ у шести родственников был выявлен особый вид психического заболевания депрессивного типа, которое проявлялось в пожилом возрасте. Было сделано предположение, что для гетерозигот характерен повышенный риск заболевания психическими расстройствами (Penrose., 1935).

Особенности, выявляемые у гетерозигот по ФКУ, подразделяются на 4 основных типа: отклонения по IQ и другим психологическим тестам; повышенный риск психических заболеваний; отклонения от нормы в электроэнцефалограмме (ЭЭГ), нарушение фертильности.

У гетерозигот была показана более высокая частота заболеваемости шизофренией, (Kuznetsova, 1974; Vogel, 1985) а также больше случаев психопатологии и расстройств личности (Thompson, 1957). При исследовании когнитивных способностей родителей больных ФКУ, особенно у отцов, было выявлено существенное снижение IQ по сравнению с родителями больных гистицинемией (другой дефект метаболизма аминокислот, вызывающий слабоумие у гомозиготных носителей) (Thalhammer et al., 1977). Кроме этих исследований родителей больных ФКУ, имеются сведения о том, что компаундные гетерозиготы с мягкой гиперфениланинемией страдают клинической депрессией (Koch et al., 2002), задержкой умственного развития, атаксией и агрессивным поведением (Bonafe et al., 2001).

Имеются данные об аномально высоком уровне фенилаланина крови у гетерозигот в стрессовых ситуациях, таких как грипп с высокой температурой (Blyumina M.G., 1981) или беременность. Специалистами в области экогенетики было выдвинуто предположение, что аспартам, подслащающее вещество с высоким содержанием фенилаланина, может наносить вред развивающимся эмбрионам у гетерозиготных женщин. Обследование нескольких сотен детей с небольшим умственным отставанием и отклонениями в поведении показало

наличие среди них индивидов с повышенным уровнем фенилаланина в крови (Hirsch W., 1967).

Высокий уровень фенилэтиламина (ФЭА), одного из патологических метаболитов ФА при недостаточности ФАГ, ассоциируется с психоневрологическими нарушениями. Дефицит ФАГ приводит к активизации побочного метаболического пути, где ФЭА является основным продуктом. Этот метаболит, химически сходный с амфетамином, является липофильным субстратом для МАО-В и легко проходит через ГЭБ (Oldendorf, 1971). Эта химическая структура долго привлекала исследователей шизофрении, т.к. злоупотребление амфетамином зачастую вызывает шизофреноподобный синдром (Snyder, 1973; Wyatt et al., 1981). Некоторые исследователи наблюдали значительное повышение уровня ФЭА у больных параноидной формой шизофрении по сравнению с контрольной группой или другими группами больных шизофренией (Jeste et al., 1981; Potkin et al., 1980; Yoshimoto et al., 1987), в то время как другие исследователи отмечали повышение уровня ФЭА в разных группах больных шизофренией (Fischer et al., 1972; O'Reilly et al., 1991). Высокий уровень ФЭА также отмечен и при шизоактивных состояниях, биполярных расстройствах, циклических биполярных расстройствах (Karoum et al., 1982; Linnoila et al., 1983; Sabelli et al., 1989). Эти результаты предполагают возможный механизм, который при дефиците ФАГ и избытке ФЭА может вызывать психические расстройства (O'Reilly, Davis, 1994).

Еще в одной работе исследовалось наличие мутаций гена ФАГ в гетерозиготном состоянии у больных с шизоаффективным расстройством. Были обнаружены различные миссенс-мутации, и больной, гетерозиготный по мутации А403V показал существенное снижение превращения ФА в ТИР. Четыре больных шизофренией с гетерозиготной мутацией К274Е также показали существенное ухудшение превращения ФА в ТИР и, по-видимому, компенсаторно повышенный уровень кофактора ВН4 по сравнению с больными шизофренией без мутаций в гене ФАГ (Richardson et al., 2003).

1.4.10. Нарушения обмена фенилаланина и его дериватов при соматических заболеваниях

Нарушения обмена фенилаланина и его дериватов характерны не только для наследственных гиперфенилаланинемий, обусловленных мутациями в генах фенилаланин-гидроксилазной системы. При ряде соматических заболеваний также нарушается деятельность фенилаланин-гидроксилазной системы, поскольку это явление может быть связано как с наличием мутаций генов фенилаланин-гидроксилазной системы в гетерозиготном состоянии у этих больных, так и прямым негативным воздействием на ферменты фенилаланин-гидроксилазной системы инфекционными и токсическими агентами, обуславливающими патогенез ряда соматических заболеваний.

В мировой научной литературе есть отдельные публикации, в которых затронута проблема гиперфенилаланинемии при различных соматических заболеваниях. Однако, кроме констатации самого факта наличия гиперфенилаланинемии, не проводился анализ ее клинического значения, какой вклад она вносит в симптоматику и патогенез заболевания.

Первые публикации, посвященные анализу нарушений метаболизма фенилаланина при ненаследственной патологии, появились в 70-80-е гг. Было установлено, что у больных циррозом печени, алкогольным гепатитом и другими заболеваниями печени удельная активность ФАГ в биоптатах печени в пересчете на г массы печени, была снижена. При циррозе печени активность ФАГ составляла 20% от нормы. После перорального введения L-ФА (100 мг/кг) концентрации ФА и ТИР возвращались к норме в течение 5 часов. У больных циррозом печени и острым гепатитом были существенно более высокие концентрации ФА и значительно сниженные концентрации ТИР по сравнению с нормой. У больных циррозом печени и острым гепатитом снижение концентрации ФА и нарастание уровня ТИР происходили медленнее, чем у здоровых людей (Heberer et al., 1980).

В другом исследовании сниженный уровень ТИР у больных алкогольным циррозом печени также объясняется недостаточной возможностью синтезировать ТИР из ФА у этих больных (Rudman et al., 1981).

Впервые, более развернутый анализ состояния метаболизма ФА при печеночной и септической энцефалопатии сделан в 1990 г. (Mizock et al., 1990). Было показано, что у больных с септической и печеночной энцефалопатией в крови и ликворе значительно повышен уровень ФА, а также появляются в значительном количестве патологические метаболиты ФА – ФПК, фенилэтиламин и другие. Впервые сделано предположение, что ФПК и другие дериваты ФА могут способствовать развитию энцефалопатии при данных заболеваниях. Однако, дальнейшего развития исследования патологии фенилаланингидроксилазной системы при заболеваниях печени не получили.

У людей, крыс, собак с хронической почечной недостаточностью концентрация ТИР в плазме, эритроцитах и скелетной мускулатуре часто снижена, содержание фенилаланина повышено и соотношение ФА/ТИР выше нормы (Young et al., 1973; Wang et al., 1975; Jones et al., 1978). Эти данные свидетельствуют о том, что происходит нарушение конверсии ФА в ТИР вследствие ингибирования ФАГ. Активность ФАГ, как известно, обнаружена в печени, почках и клетках поджелудочной железы (Tourian et al., 1969). Поскольку хроническая почечная недостаточность ассоциируется не только с ухудшением выделительной функции почек, но также с нарушением метаболической и эндокринной функций этого органа, вполне вероятно, что нарушение активности ФАГ в почках может являться причиной нарушения превращения ФА в ТИР при заболеваниях почек.

Различные исследования метаболизма ФА и ТИР были выполнены *in vivo* у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН). В одном из исследований была проведена нагрузка ФА из расчета 100 мг ФА на кг массы тела у 11 здоровых людей, 5-ти больных с хронической почечной недостаточностью, не получавших терапию гемодиализом и 8-ми больных, подвергшихся гемодиализной терапии (Jones et al., 1978). Во второй и третьей группах пациентов ФА в плазме

крови был выше по сравнению с нормой и после нагрузки возвращался к исходному уровню медленнее, чем у здоровых людей. ТИР был ниже нормы и возрастал при нагрузке в меньшей степени, чем у здоровых. Кроме того, в плазме крови и моче больных ХПН появлялись патологические метаболиты ФА – ФПК, ФУК. В других исследованиях также был выявлен более низкий уровень ТИР и повышенный уровень ФА после внутривенного введения смеси аминокислот или употребления белка перорально (Garibotto et al., 1987,1993). Кроме того, после внутривенного введения смеси аминокислот, содержащей ФА, уровень ФА поднимался выше, чем у здоровых и возвращался к исходному уровню медленней (Druml et al., 1986, 1989; Voigie et al., 2004). Исходя из современных данных, ФАГ почек играет существенную роль в превращении ФА в ТИР. Хотя в большинстве внутренних органов ФА используется в основном для биосинтеза белка, в почках почти весь свободный ФА превращается в ТИР. ТИР, синтезируемый в почках, поступает в кровяное русло и далее во внутренние органы. Эти данные объясняют сниженный уровень ТИР и повышенный – ФА при почечной недостаточности и уремии (Рисунок 8) (Garibotto et al., 2002).

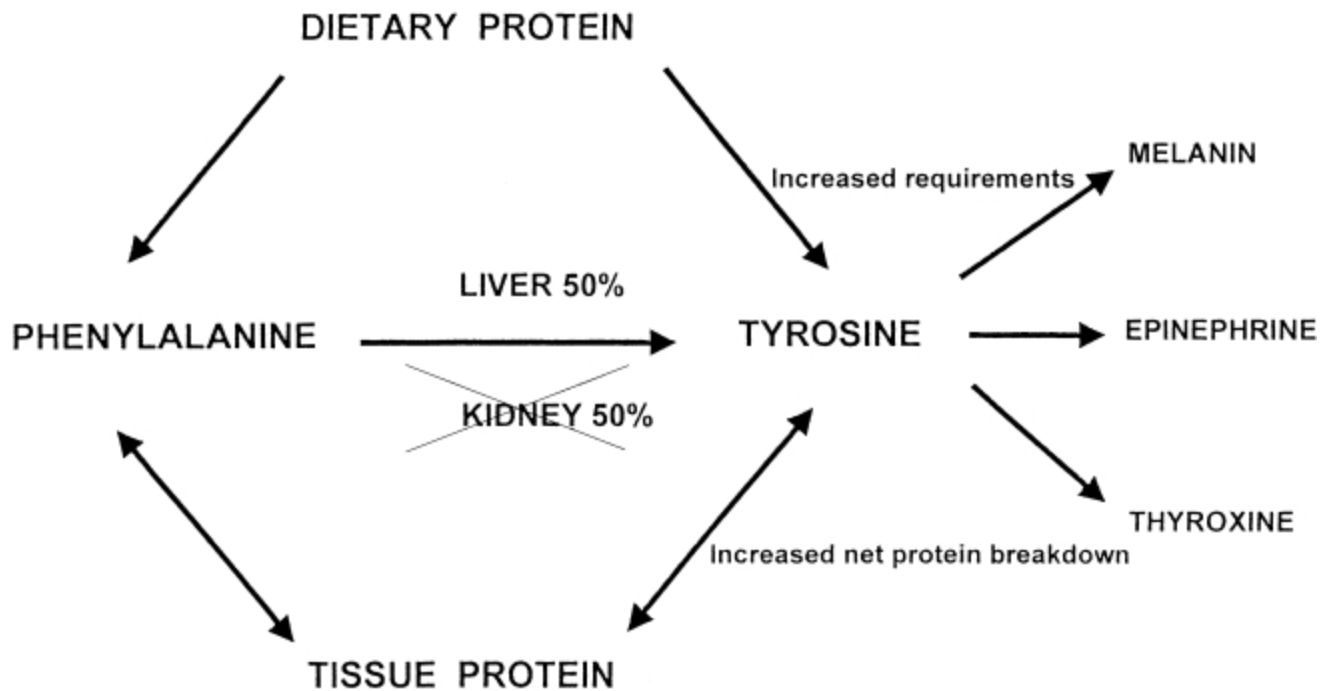


Рисунок 8. Возможный механизм нарушения метаболизма ФА при ХПН и уремии (Garibotto G, et al., 2002).

При шизофрении уровень ФА существенно повышен в сравнении с контролем (Poisner, 1960; Perry et al., 1973; Bjerkenstedt et al., 1985; Rao et al., 1990), хотя не все исследования это в полной мере подтверждают (Potkin et al., 1983; Smeraldi et al., 1987; Wei et al., 1995). В то же время, уровень ТИР ниже нормы (Rao et al., 1990; Wei et al., 1995). На синтез ДОФАмина и других катехоламинов в мозге может влиять не только доступность аминокислот-предшественников, но также функциональная целостность различных ферментов, вовлеченных в биосинтез катехоламинов. В синтезе катехоламинов одна из основных реакций – превращение ФА в ТИР посредством ФАГ. Эта реакция требует жесткой регуляции, чтобы обеспечить адекватный гомеостаз ФА (Fuchs et al., 2012). Примером дисфункции гомеостаза ФА с тяжелыми последствиями может служить ФКУ и ГФА (Bilder et al., 2013). Кроме того, такие ферменты, как ФАГ, ТГ и ТРГ требуют наличия кофактора – ВН4, недостаточность кофактора также приводит к ГФА (Blau et al.,

2001). У больных шизофренией наблюдается дефицит ВН4 по сравнению с контролем (Richardson et al., 2005).

В недавних исследованиях аномальная кинетика метаболизма ФА у больных шизофренией была выявлена путем измерения изотопа ^{13}C в выдыхаемом воздухе после перорального введения ^{13}C -ФА (Teraishi et al., 2012). Повышенное соотношение ФА/ТИР также ассоциируется с иммунной активацией и воспалительным процессом у пациентов, страдающих онкологическими и инфекционными заболеваниями, травматическими повреждениями (Neurauter et al., 2008; Zangerle et al., 2010; Ploder et al., 2008), гепатитом С (Zoller et al., 2012). Иммунная активация с повышением содержания провоспалительных цитокинов также выявлена и у больных шизофренией (Miller et al., 2011). Возможно, что иммунная активация у больных шизофренией способствует ингибированию ФАГ, что влияет на увеличение соотношения ФА/ТИР. Окислительный стресс, сопутствующий иммунной активации макрофагов через выброс реактивных форм кислорода и неоптерина является фоном, способствующим ингибированию ФАГ (Fuchs et al., 2012), что подтверждается исследованием, в котором повышенный уровень ФА коррелировал с характерным маркером окислительного стресса – изопростаном-8 (Neurauter et al., 2008).

ФАГ для своей оптимальной активности требует наличия кофактора, и провоспалительные цитокины, такие как интерферон- γ (уровень которого повышен при шизофрении (Miller et al., 2011) стимулирует ГТРСН, первый фермент в цепочке биосинтеза ВН4, однако вследствие дефицита следующего фермента – РТРС возникает дефицит ВН4 при иммунной активации (Murr et al., 2002). ВН4 также может подвергаться расщеплению под действием РФК, продуцируемых иммунными клетками (Milstien, Katusic, 1999; Laursen et al., 2001). Поэтому, повышенный уровень ФА и соотношения ФА/ТИР, наблюдаемый при шизофрении, может быть связанным с количественным и качественным дефицитом ВН4 (Okusaga et al., 2014).

Относительно метаболических аспектов фенилаланина при алкоголизме существуют единичные публикации, которые косвенным образом выявляют нарушения ФАГ-системы при этом заболевании (Heberer et al., 1980; Gleissenthall et al., 2014).

1.5. Заключение

В обзоре литературы проведен анализ современных представлений об обмене ФА и его дериватов в норме и при разных патологических состояниях, в том числе при наследственных заболеваниях.

Повышенный уровень ФА токсически влияет на различные органы и ткани человеческого организма. Если первоначально повышенный уровень фенилаланина связывали исключительно с фенилкетонурией и главным нарушением считалось повреждение ткани мозга, приводящее к слабоумию в результате токсического действия дериватов ФА, то к настоящему времени перечень патологических последствий длительного и устойчивого повышения уровня фенилаланина в организме значительно расширился. Сюда можно отнести и окислительный стресс, и повреждения биологических макромолекул, и многие другие факторы, т.е. последствия нарушения превращения ФА в ТИР носят системный всеобъемлющий характер.

Аналогичная картина наблюдается, как при наследственных, так и при экзогенных устойчивых гиперфенилаланинемиях. Однако при экзогенных патологиях последствия гиперфенилаланинемии могут маскироваться патологическими проявлениями основного заболевания. Тем не менее, при внимательном подходе эти проявления, как и в случае с ФКУ становятся очевидными.

В обзоре литературы приведены данные о структуре и функции фермента фенилаланингидроксилазы и других ферментов, которые образуют метаболическую цепь превращения фенилаланина в ряд важнейших для организма

веществ – тирозина, ДОФАмина, норадреналина, адреналина, меланина. Рассмотрен вопрос метаболизма кофактора фенилаланингидроксилазы и других гидроксилаз ароматических аминокислот – тетрагидробиоптерина и его влияние на интегральный обмен веществ фенилаланина, тирозина, триптофана. Показана ведущая роль нарушений метаболизма фенилаланина в патогенезе психоневрологических расстройств наследственной и экзогенной этиологии.

Тем не менее, хотя наследственные нарушения обмена фенилаланина, связанные с мутациями в гене фенилаланингидроксилазы и генах метаболизма и ресинтеза кофактора – тетрагидробиоптерина изучены в последнее время достаточно подробно, что отражено в отечественных и зарубежных работах, в том числе, и в наших исследованиях, проблеме экзогенных гиперфенилаланинемий уделяется достаточно скромное внимание и существуют лишь отдельные разрозненные исследования на эту тему, что также отражено в обзоре литературы.

Как показывают и эти немногочисленные исследования, проблема экзогенных гиперфенилаланинемий стоит весьма остро, т.к. нарушения метаболизма фенилаланина и его дериватов способствуют возникновению и развитию психоневрологических расстройств, связанных с метаболизмом нейромедиаторов, окислительным стрессом и другими патологическими состояниями, которые являются следствием нарушения метаболизма фенилаланина. В связи с крайне малой разработкой проблемы экзогенных гиперфенилаланинемий, весьма остро стоит задача исследовать не только наследственные нарушения метаболизма фенилаланина, но и те патологии, при которых нарушается функция печени под влиянием микробных и токсических агентов, в результате чего возникает дисбаланс аминокислотного обмена и, особенно, обмена ароматических аминокислот. Так происходит при различных видах вирусного гепатита, алкогольном поражении печени, хромосомном дисбалансе (болезнь Дауна) и других патологических состояниях. Изучение метаболизма фенилаланина и его дериватов при этих состояниях и влияние нарушений на возникновение и развитие психоневрологических расстройств требует дальнейших серьезных исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Обследуемые группы пациентов

2.1.1. Больные фенилкетонурией

Исследование биохимических показателей и мутаций в генах фенилаланингидроксилазной системы проводилось среди больных фенилкетонурией из регионов Санкт-Петербурга, Ленинградской области, Москвы, Московской области, Латвии.

Пациентам был поставлен диагноз фенилкетонурии на основе проведенных исследований, включая клинические осмотры, анализ аминокислот в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и моче, а также количественного определения содержания патологических метаболитов фенилаланина и тирозина в биологических жидкостях, анализа мутаций гена ФАГ с помощью методов ПЦР и секвенирования.

Исследование больных ФКУ происходило в несколько этапов.

В одном случае, используя методы экспресс-диагностики, было проведено выявление больных ФКУ по скринирующей программе среди умственно отсталых людей различного возраста, находящихся на лечении в психоневрологических интернатах Санкт-Петербурга и среди общей популяции. Среди выявленных 167 больных детально было обследовано 149 человек, из которых 124 человека составляли дети в возрасте от 3-6 мес. до 16 лет и 25 человек взрослые больные ФКУ от 17 до 50 лет. Следует подчеркнуть, что это самая большая в мировой практике группа выявленных взрослых больных ФКУ, никогда не получавших специфического для ФКУ лечения.

По степени умственной отсталости больные ФКУ представляли гетерогенную группу: среди детей имбецильность и идиотия составляет 96%,

дебильность – 2,4% и только 1,6% составляли дети с нормальным интеллектом. В группе взрослых идиотия обнаружена у 52% больных, имбецильность у 28% и 20% составляли больные с дебильностью. Изучение клинической картины показало наличие выраженной неоднородности симптомов и течения заболевания среди всех больных ФКУ.

Также биохимическое и генетическое обследование проходили больные ФКУ, состоящие на учете в медико-генетических консультациях и получающие диетотерапию. В частности, в медико-генетической консультации Ленинградской области нами постоянно наблюдались 39 больных ФКУ в возрасте от 1 года до 18 лет. Диагноз ФКУ большинству пациентов был поставлен в ходе неонатального скрининга.

Контрольную группу составили 467 человек в возрасте от 2 до 70 лет – практически здоровые люди, в семьях которых заболевания ФКУ и ГФА не наблюдались.

При биохимическом обследовании применялись следующие методы: определения уровня ФА и ТИР в крови, ФА, ТИР, ФПК и гомогентизиновой кислоты в моче до нагрузки и после нагрузки ФА из расчета 0,1 г/кг массы тела; определение активности ФАГ в биоптатах печени с добавлением и без добавления тетрагидробиоптерина; определение концентрации катехоламинов в моче и церулоплазмينا в крови.

При молекулярно-генетическом обследовании использовались методы выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови и пятен крови, иммобилизованных на бумажных и нейлоновых фильтрах.

Для проведения ПЦР-диагностики использовали термостабильную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* и *Thermus thermophilus* производства отечественных и зарубежных фирм. Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезировали твердофазным фосфорамитидным методом в Институте биоорганической химии РАН или приобретали в коммерческих фирмах. Выделение ДНК производили с помощью метода фенол-хлороформной

экстракции или использовали наборы реагентов производства фирм «Интерлабсервис» и «ДНК-технология». Амплификацию ДНК и определение мутаций в гене фенилаланингидроксилазы производили как с помощью собственных методов, так и диагностических наборов «PKU-408» и «PKU-11» производства ООО «Центр молекулярной генетики», Москва.

Секвенирование проводили ручным методом по Максаму-Гилберту, а также на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems модели 3130.

2.1.2. Больные с синдромом Дауна

Обследовано 4 мальчика с болезнью Дауна в возрасте от 12 до 16 лет, находившихся в психоневрологическом интернате № 4 (Санкт-Петербург). Диагноз подтвержден кариологическим анализом и клиническими данными. У всех больных выявлена трисомия по 21-й хромосоме. Степень умственной отсталости у всех обследованных — имбецильность. Во время обследования у больных отсутствовали заболевания желудочно-кишечного тракта и патология органов дыхания. Больные находились на обычном пищевом рационе и не получали никаких лекарственных препаратов.

Для выявления нарушений метаболизма ФА и ТИР 4 больным и 10 здоровым людям в возрасте 16—17 лет проводили натошак нагрузку *per os* L-фенилаланином из расчета 0,1 г на 1 кг массы тела и из локтевой вены получали кровь до нагрузки и через 1, 2, 4 и 6 ч после нее. В те же сроки собирали порции мочи. В сыворотке крови флюориметрически определяли концентрацию фенилаланина и тирозина, в моче содержание фенилпировиноградной и гомогентизиновой кислот.

2.1.3. Больные вирусным гепатитом

Для изучения нарушений обмена ароматических аминокислот и оценки состояния ФАГ-системы печени при ВГ было обследовано 80 взрослых больных

гепатитом В в возрасте от 16 до 70 лет и 30 больных детей в возрасте от 1 месяца до 15 лет с различной формой и степенью тяжести болезни. Тяжесть течения заболевания оценивали по степени интоксикации и другим клиническим показателям. К легкой форме заболевания относили случаи с отсутствием явлений интоксикации, небольшой желтухой, билирубин в крови не превышал 5 мг/дл. К средне - тяжелой форме были отнесены случаи течения болезни с явными признаками интоксикации, выраженной желтухой, билирубинемия в пределах 5-10 мг/дл. К тяжелой форме относили случаи с резко выраженными явлениями интоксикации, явной желтухой, проявлениями геморрагического синдрома, явлениями ОПН и симптомами ПЭ. Из 80 взрослых больных тяжелая форма течения ВГ была у 42 человек, средне - тяжелая – 28 больных и легкая – у 10 человек. Из 30 детей у 12 была средне - тяжелая форма в острой стадии, 10 - с хроническим течением болезни и 8 - в периоде реконвалесценции. Контрольную группу составили 15 здоровых детей в возрасте от 6 месяцев до 16 лет.

Определяли концентрацию ФА, ТИР, адреналина, норадреналина, серотонина, церулоплазмينا (ЦП) в сыворотке крови; экскрецию с мочой ФПК, п-ОФПК, ГГК, адреналина и норадреналина; проводили клинический анализ крови (определение содержания билирубина, активности трансаминаз и других показателей, белковоосадочных проб) и мочи в разгар заболевания, на спаде клинических проявлений и в период выздоровления.

Для оценки активности ФАГ-системы печени 16 взрослым (у 12 была тяжелая и у 4 – средне - тяжелая форма течения ВГ) и 4 детям (средне - тяжелая форма) проводили нагрузку ФА в дозе 0,1 г/кг массы тела *per os*, а нагрузку ТИР из расчета 0,05 г/кг проводили 19 взрослым больным с тяжелой формой ВГ. Контрольную группу составили 10 здоровых людей в возрасте от 17 до 35 лет. Нагрузку больным и здоровым людям проводили натошак и из локтевой вены брали кровь до нагрузки и через 1, 2, 4 и 6 часов после введения. В сыворотке крови определяли содержание ФА, ТИР, катехоламинов, экскрецию ФПК, п-ОФПК и ГГК, адреналина и норадреналина измеряли в суточной моче до, во время, и через

24 часа после нагрузки.

Для оценки активности ФАГ проводили определение активности фермента в биоптатах печени 5 больных ВГ. Пункционную биопсию проводили иглой Menghini (Menghini, 1958). Биоптаты весом от 21 до 159 мг быстро обрабатывали, в надосадочной жидкости определяли активность ФАГ, используя в качестве кофактора тетрагидробиоптерин (2-амино-4-окси-6,7-диметил-тетрагидроптеридин). Контрольную группу составили 11 человек (7 мужчин и 4 женщины) в возрасте 25-30 лет без патологии печени.

2.1.4. Больные хроническим алкоголизмом

Для выявления нарушений метаболизма ФА и ТИР при алкогольной болезни обследовано 34 больных хроническим алкоголизмом мужчин в возрасте 25-48 лет, находящихся в условиях стационара, из них 12 - в 1-е сутки поступления при выраженной картине алкогольного абстинентного синдрома, а остальные - не менее чем через 30 дней пребывания в стационаре, при полном воздержании от приема алкоголя. У подавляющего большинства больных была II стадия алкоголизма. Клиническое обследование больных проводилось в наркодиспансере Московского р-на Санкт-Петербурга и 1 Межрайонном наркологическом диспансере Санкт-Петербурга.

Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев в возрасте 21-35 лет.

Для оценки активности фенилаланингидроксилазной системы печени у 10 здоровых людей, 6 больных с выраженной картиной абстинентного синдрома и 4 больных, не получавших алкоголь в течение 30 суток, была проведена нагрузка L-фенилаланином. Фенилаланин вводили перорально из расчета 0,1 г на 1 кг массы тела натощак. Кровь для исследования брали из локтевой вены до нагрузки и через 1, 2, 4 и 6 ч после нагрузки. В эти сроки в сыворотке крови определяли концентрацию

фенилаланина и тирозина флюориметрически, а в моче, собранной за указанные периоды, определяли содержание фенилаланина, фенилпировиноградной и гомогентизиновой кислот.

Для выявления мутаций в гене фенилаланингидроксилазы было обследовано 156 больных хроническим алкоголизмом, состоявших на учете в Межрайонном наркологическом диспансере № 1 Санкт-Петербурга, среди них 120 мужчин и 36 женщин в возрасте 25-70 лет. В анамнезе – алкоголизм 2-3 стадии, отягощенный психоневрологическими расстройствами, и случаями *delirium tremens*. Контрольную группу составили 417 добровольцев тех же возрастных групп.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью диагностических наборов «ДНК-сорб» производства компании «ДНК-технология». В выделенной геномной ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявляли наличие мажорной мутации R408W, приводящей к резкому снижению активности фенилаланингидроксилазы. Использовался диагностический набор «РКУ-408» производства ООО «Центр молекулярной генетики».

Исследования групп больных были одобрены этическими комитетами соответствующих клинических учреждений и проводились при получении информированного согласия.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение фенилаланина

Содержание фенилаланина в сыворотке крови определяли флюориметрическим методом: 0,2 мл надосадочной жидкости, полученной после осаждения белков сыворотки трихлоруксусной кислотой, нейтрализовали 0,3 н. NaOH до pH 6,0, добавляли 0,2 мл 0,3 М сукцинатного буфера pH 5,8, затем 0,2 мл 3×10^{-2} М раствора нингидрина и 0,1 мл 5×10^{-3} М раствора дипептида (L-лейцил-L-

аланин). Смесь перемешивали и инкубировали при 60°C в водяной бане в течение 120 мин., после чего охлаждали и прибавляли 2 мл 0,006% тартрата меди в 0,16% растворе Na_2CO_3 . Через 10 мин измеряли флюоресценцию (светофильтр возбуждения 365 мкм, вторичный светофильтр 505-530 мкм). Фенилаланин в моче определяли сходным образом.

2.2.2. Определение тирозина

Тирозин определяли флуориметрическим методом. Доводили 1 мл плазмы водой до 4 мл. Добавляли 1 мл 30%-ной трихлоруксусной кислоты. Спустя 10 мин. смесь центрифугировали. К 2 мл депротеинизированной плазмы добавляли 1 мл 0,1% раствора нитрозо-нафтола в 95% этиловом спирте и 1 мл смеси 24,5 мл азотной кислоты (1:5) с 0,5 мл 25% раствора NaNO_2 . Пробирку закрывали, встряхивали и помещали на 30 мин в водяную баню при 55°C. После того, как смесь остынет, к ней добавляли 10 мл дихлорэтана и пробирку встряхивали для экстракции непрореагировавшего нитрозо-нафтола. После центрифугирования надосадочный водный слой переносили в кювету и измеряли его флуоресценцию. Флуоресценцию образовавшегося продукта измеряли при 570 мкм при возбуждении светом с длиной волны 460 мкм.

2.2.3. Определение фенилпировиноградной кислоты

К 1 мл мочи, предварительно разведенной в 10 раз водой, добавляли 5 мл буферного раствора, рН 2,2 (глицин 7,5 г, NaCl 5,85 г, 0,1 н. HCl 400 мл дистиллированной воды до 1 л) и 0,2 мл 10% раствора FeCl_3 . Оптическую плотность измеряли при длине волны 630 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см в течение 3 мин против холостого опыта, в котором вместо мочи использовали 1 мл H_2O .

Для построения калибровочного графика ставили реакцию с растворами, содержащими в 1 мл от 10 до 600 мкг фенилпировиноградной кислоты в 96% этаноле. Температура (от 10 до 34°C) не влияла на развитие зеленого окрашивания. Калибровочная кривая имела линейный характер до $E_{630\text{нм}}=1,1$. В указанных условиях обнаруживали 98,5% фенилпировиноградной кислоты, добавленной к моче здоровых людей.

2.2.4. Определение пара-оксифенилпировиноградной кислоты

Экскрецию п-оксифенилпировиноградной кислоты определяли в реакции Миллона по Felix и Teske (Гиттер, Хейльмейер, 1966).

2.2.5. Определение гомогентизиновой кислоты

К 2 мл мочи доливали 6 мл дистиллированной воды и 2 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали для осаждения белков. В мерную колбу емкостью 25 мл помещали 1 мл надосадочной жидкости или разведенной мочи (если нет белка), добавляли 15 мл воды, 2 мл 1 % однозамещенного фосфорнокислого калия и 2 мл 5% раствора молибдата аммония в 5 н. растворе серной кислоты. Смесь встряхивали и доливали водой до метки. Зеленое окрашивание различной интенсивности, от слабого желтовато-зеленого до густого зеленого, развивалось постепенно - тем медленнее, чем меньше интенсивность окраски, которая нарастала в первые 30-40 мин. и стойко сохранялась в течение 2 часов. Фотометрировали опытную пробу против контрольной при длине волны 670 нм в кювете 1 см. Измерение производили в первые 5 мин. (максимально 10 мин). Раствором для сравнения служила смесь реактивов в объеме 25 мл воды.

Построение калибровочной кривой. В качестве стандарта служил гидрохинон: 250 мг его растворяли в 1 л бидистиллированной воды, а затем

разводили еще в 5 раз. 1 мл такого раствора содержал 0,05 мг гидрохинона, что соответствует по окраске 0,0395 мг гомогентизиновой кислоты. Отбирали аликвотные количества исходного раствора - 0,2-0,1 мл и т. д. до 8 мл, ставили цветную реакцию в общем объеме 25 мл. При малых концентрациях гидрохинона окраска нарастала в течение примерно 30 мин, но высокие концентрации сразу создавали интенсивную зеленую окраску.

2.2.6. Определение катехоламинов (адреналин, норадреналин)

Катехоламины определяли флуориметрическим методом (Меньшиков, 1987). Для анализа брали подкисленную мочу, стоявшую по крайней мере одну ночь в холодильнике, за это время максимальное количество солей успевает выпасть в осадок. К 15 мл отфильтрованной мочи добавляли 200 мг ЭДТА и 1 н. раствором NaOH доводили pH до 8,2 при тщательном перемешивании и под контролем pH-метра. Колонки для хроматографии диаметром около 7 мм заполняли окисью алюминия, для чего 1,2 г Al_2O_3 взбалтывали в 3 мл воды и вносили в колонку, нижний конец которой рыхло закрыт ватой, прокипяченной в воде и высушенной. Остатки окиси алюминия переносили в колонку еще с 2-3 порциями воды. 15 мл мочи наносили на колонку и давали стечь под действием силы тяжести, затем промывали 10 мл воды, к которым была добавлена 1 капля 0,5 н. NH_4OH ; создавая вакуум водоструйным насосом, катехоламины элюировали 6 мл 0,25 н. уксусной кислоты. Время между промывкой колонки подщелоченной водой и окончанием элюции не должно превышать 30 мин. Перед исследованием остатки взвеси окиси алюминия удаляли центрифугированием. Для определения адреналина к 1 мл холодного элюата добавляли 1 мл холодного фосфатного буферного раствора pH 4,2, 1 каплю 0,5 н. NH_4OH (pH должен быть в пределах 4,1—4,3) и 0,5 мл 0,25 % раствора феррицианида калия. На этом этапе исследуемая проба и все реактивы должны находиться в бане со льдом. Точно через 2 мин окисление останавливали, добавляли 0,2 мл 0,3 % раствора аскорбиновой кислоты в 5 н. NaOH, а еще через 3

мин 1 мл воды, охлажденной на льду, перемешивали и флюорометрировали, измеряя флюоресценцию в области 500-550 нм при возбуждении светом с длиной волны 400 нм. Для определения норадреналина, которое также проводили при постоянном охлаждении всех реагентов в бане с ледяной водой, к 1 мл отцентрифугированного элюата добавляли 1 мл холодного фосфатного буфера рН 7,3 (при этом рН смеси устанавливали в пределах 6,2—6,5) и 0,4 мл 0,5 % раствора феррицианида калия. Перемешивали и точно через 2 мин добавляли 1,2 мл смеси, которая была приготовлена за несколько минут до этого путем смешивания 3 мл охлажденной тиогликолевой кислоты и 8 мл охлажденного раствора едкого натра с формалином, еще через 3 мин добавляли на кончике стеклянной палочки 2—3 мг порошка гидросульфата натрия, перемешивали и измеряли флюоресценцию в тех же условиях, что и при определении адреналина.

2.2.7. Определение серотонина

Серотонин определяли флуориметрическим методом (Меньшиков, 1987). Кровь брали в пробирку, содержащую 1,34 % раствор оксалата натрия в количестве, составляющем 1/10 от предполагаемого количества крови. К 1 мл крови приливали 1 мл воды и 1 мл 1 н. хлорной кислоты, перемешивали и через 30 мин центрифугировали. К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 0,2 мл 5 н. NaOH, 1 г порошка хлорида натрия и 4 мл бутанол-хлороформенной смеси, встряхивали 3 мин, а затем центрифугировали для разделения слоев. Водную фазу удаляли, а к органической добавляли 2 мл 0,1 н. NaOH, насыщенного хлоридом натрия, встряхивали и центрифугировали, 3,5 мл органической фазы переносили в другие пробирки, где экстрагировали 2,5 мл 0,1 н. HCl. После разделения фаз из кислотной (верхней) фазы отбирали порции по 1 мл, которые использовали для определения серотонина.

К 1 мл кислотной фазы добавляли 1 мл фосфатного буфера рН 8,0 (при этом в растворе должен установиться рН 7,0) и 0,2 мл 0,1 М раствора нингидрина. Смесь

инкубировали 30 мин при 75°C, затем еще 1 ч выдерживали при комнатной температуре, доводили объем до 5 мл и измеряли флюоресценцию в области 490 нм при возбуждении светом с длиной волны 365 нм. Для калибровки брали пробы, содержащие 0,05 мкг серотонина, доводили водой до объема 1,5 мл и приливали 0,5 мл 1 н. хлорной кислоты. В холостой опыт брали 1,5 мл воды и 0,5 мл 1 н. хлорной кислоты. Калибровочные и холостые пробы экстрагировали бутанол-хлороформенной смесью после добавления 0,2 мл 5 н. NaOH и обрабатывали так же, как и опытные пробы. Свечение холостой пробы вычитали из результатов, полученных для опытных и калибровочных проб. Расчет проводили по калибровочному графику, по данным которого рассчитывали содержание серотонина в пробе. Чтобы узнать содержание в 1 мл цельной крови, полученные результаты умножали на 3/2, так как в опыт взято 2 мл хлорного экстракта крови из общего объема 3 мл.

2.2.8. Определение активности фенилаланингидроксилазы

Пункционную биопсию печени производили по Менгини (Menghini, 1958). Биоптаты печени быстро отмывали от крови холодным физиологическим раствором и замораживали в жидком азоте. Биоптат гомогенизировали в течение 1 мин в охлажденном стеклянном микрогомогенизаторе объемом 0,6 мл, добавляя охлажденный до 4°C раствор 0,15 м KCl из расчета 0,03 мл на 1 мг ткани печени. Полученный гомогенат центрифугировали при 18000 об/мин в течение 30 мин при 4°C. Надосадочную жидкость использовали как источник фермента. Для инкубации 0,4 мл надосадочной жидкости помещали в среду, содержащую 0,2 мл 0,02 М никотинамида в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 7,5, 0,2 мл 0,02 М ¹⁴C-фенилаланина (удельная радиоактивность 5 мКи/ммоль), 0,2 мл 0,003 М НАД-Н₂ и 0,02 мл 0,006 М раствора кофактора 2-амино-4-окси-6,7-диметилтетрагидроптеридина. Все растворы готовили в день опыта. Инкубацию проб проводили на водяной бане в течение 30 мин при 37°C в аэробных условиях при

постоянном перемешивании. После инкубации в пробы добавляли 0,2 мл 20% ТХУ. Контрольные пробы инкубировали в тех же условиях, добавляя ТХУ перед внесением надосадочной жидкости. Через 10 мин пробы центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 15 мин. В безбелковых центрифугатах флюориметрически определяли содержание тирозина, а также концентрацию образованного в процессе инкубации ^{14}C -тирозина. Разделение аминокислот проводили хроматографическими методами. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике. Активность ФАГ выражали в микромолях тирозина на 1 г белка за 60 мин.

2.2.9. Выделение геномной ДНК

Забор крови проводили в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Пробирки центрифугировали при 2000g 10 мин. Супернатант плазмы удаляли, находящиеся в интерфазе лейкоциты использовали в качестве источника ДНК. К полученному осадку лейкоцитов добавляли 300 мкл лизирующего буфера для выделения ДНК (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0; 10 мМ ЭДТА, pH 8.0; 100 мМ NaCl), 35 мкл 10% SDS, 3 мкл протеиназы К (10 мг/мл). Инкубировали в течение ночи при 55⁰С. Экстракцию ДНК осуществляли смесью хлороформа и изоамилового спирта (24 части хлороформа: 1 часть изоамилового спирта). ДНК осаждали добавлением 2,5 объема охлажденного (-20⁰С) перегнанного этилового спирта. Осадок промывали 70% этанолом. Высушенный осадок ДНК растворяли в 50 мкл апиrogenной деионизированной воды. Количество ДНК определяли спектрофотометрически. Качество ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,2 % агарозе.

Также ДНК выделялась из крови, тканей и биологических жидкостей сорбционным методом с помощью коммерческих наборов «Проба-ГС» фирмы «ДНК-технология» и «ДНК-сорб-В» фирмы «Интерлабсервис».

2.2.10. ПЦР-диагностика

Разновидности ПЦР, использованные в процессе исследования

Амплификация очищенной ДНК. 50-100 нг ДНК вносили в пробирку с реакционной средой, состоящей из Трис-НСI буфера, $MgCl_2$, 4 дНТФ, олигонуклеотидных праймеров и *Taq*-полимеразы. Режим амплификации выбирался в зависимости от протяженности и структуры праймеров. Количество циклов – от 25 до 35. Продукт амплификации анализировали с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

Амплификация из цельной крови. 1 мкл цельной крови лизировали в 100 мкл H_2O , из этого разведения 5 мкл вносили в реакционную среду конечного объема 50 мкл, содержащую 50 мМ трис-НСI рН 8,5, 15 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 6 мМ $MgCl_2$, 0,17 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 4 дНТФ (1,5 мМ каждый), 20-членные олигонуклеотидные праймеры в концентрации 0,8 мкг/мл каждый. Пробирку помещали в водяную баню при $97^\circ C$ на 7 мин для денатурации ДНК, затем добавляли 1 ед. акт. ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus*, сверху наслаивали 25 мкл вазелинового масла для предотвращения испарения пробы и проводили амплификацию ДНК в термоциклере в режиме 94-55-70 $^\circ C$, 1-1-2 мин соответственно в течение 30 циклов. Продукт реакции анализировали гель-электрофорезом.

Амплификация из высушенного пятна крови. Каплю крови, взятой из пальца, наносили на фильтровальную бумагу и высушивали (такой материал можно хранить при комнатной температуре не менее 2 лет). Вырезали из пятна участок размером 1 мм² и помещали в реакционную среду вышеуказанного состава с конечным объемом 50 мкл. Амплификацию проводили в том же режиме.

Амплификация после нанесения на нейлоновый фильтр. К 2 мкл цельной крови добавляли раствор NaOH до его конечной концентрации 0,5 н. Лизат

крови наносили на нейлоновый мембранный фильтр пористостью 0,2—0,45 мкм (использовали мембранные фильтры производства предприятия «Хийу Калур» - Эстония, или «Hybond N» - «Amersham»). Нанесение на фильтр производилось с помощью аппарата «Manifold», изготовленного фирмой «Биос» (Новосибирск). После нанесения фильтр отмывали от щелочи в 0,1% растворе SDS, затем в нескольких сменах бидистиллированной воды до нейтральной реакции. Фильтр высушивали, вырезали участок с нанесенным лизатом крови, помещали его в пробирку и проводили амплификацию в вышеуказанных условиях.

2.2.11. Детекция продуктов ПЦР

Детекцию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле в зависимости от размера амплифицированных фрагментов. Гель окрашивали с помощью интеркалирующих красителей – бромистого этидия или SybrGreen. Визуализацию окрашенного геля проводили на трансиллюминаторе с последующим фотографированием.

2.2.12. Рестрикционный анализ

Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов ДНК проводился с помощью ферментов рестрикции производства ООО «СибЭнзим» в соответствии с инструкциями производителя.

2.2.13. Аллельспецифическая дот-гибридизация

Аллельспецифическую дот-гибридизацию проводили с олигонуклеотидными зондами, имеющими нормальную и мутантную структуру в соответствующем кодоне гена фенилаланингидроксилазы.

Гибридизацию производили на нейлоновых фильтрах, предварительно обработанных 0,4 М NaOH, 0,6 М NaCl. Амплифицированный материал, денатурированный в 0,4 М NaOH, 1 мМ ЭДТА, наносили на фильтр из расчета $1/10$ реакционной смеси в пятно, фильтр подвергали УФ-облучению (254 нм, 30 с) для иммобилизации ДНК, промывали TE (10 мМ трис-HCl pH 7,2, 1 мМ ЭДТА) и 6XSSC (3 М NaCl, 0,3 М Na-цитрат) и проводили предгибридизацию в среде 6XSSC, 5X раствора Денхардта (0,2 % БСА, 0,2% поливинилпирролидон, 0,2% фикоил), 0,1% SDS, 200 мкг/мл соницированной и денатурированной ДНК спермы лосося 2 ч при 59°C, а затем гибридизацию в той же среде с добавлением 5'-[32 P]-меченых зондов (1 нг/см² фильтра, 10⁶ имп/мин/нг) в течение 6 ч при той же температуре. Отмывку фильтров проводили в 6XSSC, 0,1 % SDS 2 раза по 20 мин при 20°C и 1 раз 2 мин при 64°C. Характерный результат такой гибридизации представлен на Рисунке 9.

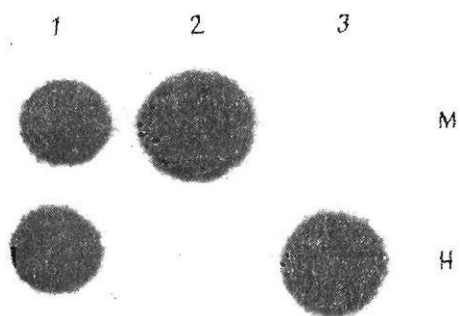


Рисунок 9. Аллельспецифическая гибридизация геномной ДНК человека с нормальным (Н) и мутантным (М) зондами на фенилкетонурию, R408W (С→Т-транзиция в 12-м экзоне). 1 - ДНК матери, 2 - ДНК пробанда, 3 - контроль.

2.2.14. Секвенирование ДНК

Наличие мутаций в гене фенилаланингидроксилазы в исследованных образцах подтверждалось секвенированием продукта амплификации, избирательно меченного ^{32}P по 5'-концу одной из цепей. Характерный результат такого секвенирования представлен на Рисунке 10.

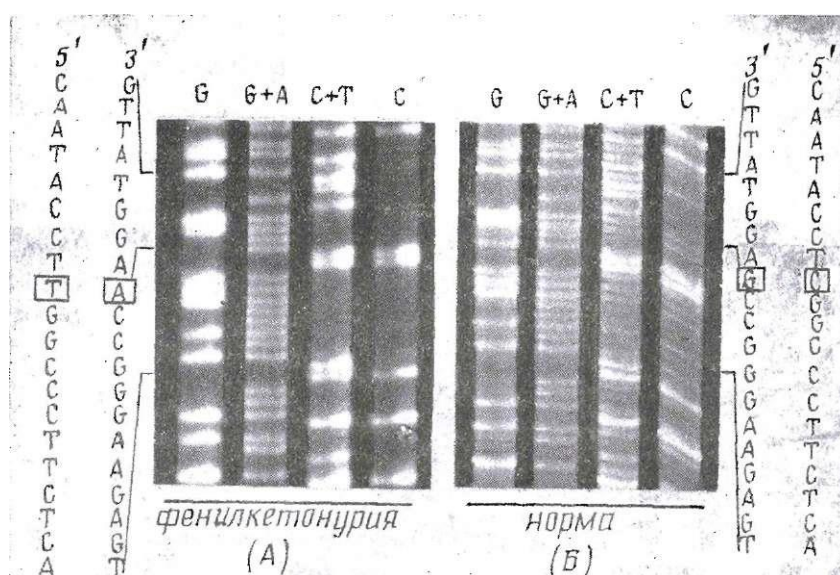


Рисунок 10. Анализ по Максому-Гилберту первичной структуры участка 12-го экзона фенилаланингидроксилазного гена у больного фенилкетонурией, содержащего патогенную мутацию R408W (C→T транзция) (А) и в контроле (Б).

Кроме того, отдельные результаты секвенирования были получены с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе *Abi Prism* (Рисунок 11).

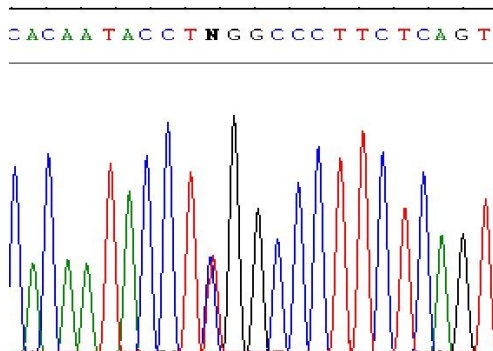


Рисунок 11. Электрофореграмма фрагмента 12 экзона гена ФАГ с мутацией R408W [с.1222 C>T].

2.2.15. Конструирование кДНКовой клонотеки

К анализу гена фенилаланингидроксилазы были применены два подхода – построение кДНКовой библиотеки печени человека и ПЦР-технологии. Ниже приводится последовательность действий по конструированию кДНКовой библиотеки генов печени человека.

Последовательность действий при конструировании кДНКовой клонотеки.

Выделение РНК из ткани печени

Навеску ткани, замороженную в жидком азоте, заливали 5 объемами гуанидинизотиоцианата (ГТЦ), приготовленного следующим образом: 100 г ГТЦ растворяли в 150 мл H₂O, добавляли 0,5 мл 2 М цитрата Na (pH 7,0), 10 мл 1 М трис-HCl (pH 7,6), 1 г саркозила и 2 мл β-меркаптоэтанола. Объем доводили водой до 200 мл, стерилизовали путем пропускания через нитроцеллюлозный фильтр 0,2 мкм. Раствор хранили при 4°C.

Ткань измельчали ножницами, затем тщательно гомогенизировали в гомогенизаторе Dounce. Гомогенат осветляли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин при 4°C, наслаивали в полиалломерную пробирку ротора

SW-25 Beckman, заполненную на 1/4 объема 5,7 М CsCl и центрифугировали при 25000 об/мин. в течение 24 час при 20°C. Супернатант отбрасывали, остатки гомогената со стенок пробирки удаляли фильтровальной бумагой, смоченной этанолом. Осадок РНК растворяли в стерильном буфере TE (10 mM трис-HCl, pH 7,6 и 1 mM ЭДТА), добавляли 0,1 объема 3M ацетата натрия, pH 5,2 и 2,2 объема этанола. Препарат РНК хранили в жидком азоте.

Выделение полиаденилированной РНК при помощи хроматографии на олиго(дТ)-целлюлозе

Колонку объемом 1 мл заполняли олиго(дТ)-целлюлозой и уравнивали стерильным буфером следующего состава: 20 mM трис-HCl, (pH 7,6), 0,5 M NaCl и 1 mM ЭДТА. РНК растворяли после осаждения этанолом в стерильной воде, прогревали при 65°C в течение 5 мин, добавляли равный объем 2x-кратного состава вышеуказанного буфера и наносили на колонку. Последнюю промывали несколькими объемами однократного буфера до тех пор, пока оптическая плотность при E₂₆₀ сходящего материала не принимала минимального значения. Элюцию poly(A)⁺-РНК проводили раствором следующего состава: 10 mM трис-HCl, pH 7,5, 1 mM ЭДТА. В препарат полиаденилированной РНК добавляли ацетат натрия, pH 5,2, до конечной концентрации 0,3 M и осаждали при -20°C 2,2 объемами этанола. Осадок растворяли в стерильной воде. Качество РНК оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле. В качестве денатурирующего агента использовали формальдегид.

Синтез первой цепи кДНК

Для проведения этого синтеза использовали следующие реактивы:

1. 5x буфер для обратной транскриптазы из вируса миелобластома птиц: 0,5M трис-HCl, pH 8,3 (измерение проводили при 43°C), 50 mM MgCl₂, 50 mM дитиотрейтол (ДТТ), 0,5 M KCl;
2. 20 mM раствор дНТФ, содержащий все четыре дНТФ, в буфере 10 mM трис-HCl, pH 8,0, ³H дЦТФ (уд. акт. 29 Ки/ммоль);
3. обратная транскриптаза - 8 ед/мкл;

4. олиго(дТ)₁₂₋₁₈ - 1 мкг/мкл.

К высушенному в стерильной эппендорфовой пробирке дЦТФ (100 мкКи) добавляли 5 мкл 20 мМ р-ра немеченых дНТФ, затем вносили 100 мкг р_о1у(А)+РНК в объеме 50 мкл, 40 мкл 5х буфера, 20 мкл олиго(дТ)₁₂₋₁₈, 60 мкл Н₂О и 25 мкл обратной транскриптазы. Смесь инкубировали при 43°С в течение 3 часов. Затем для денатурации гибридов РНК-кДНК пробирку помещали на 1,5 мин в кипящую воду и быстро охлаждали в ледяной бане. Для определения процента включения ³Н-дЦТФ из реакционной смеси отбирали аликвоту и определяли суммарную радиоактивность и радиоактивность ТХУ-преципитируемого материала. На основании процента включения в преципитат ³Н-дЦТФ определяли выход кДНК. После окончания ревертазной реакции проводили фенольную депротеинизацию, хроматографировали кДНК на сефадексе G-100 и осаждали 2 объемами этанола.

Синтез второй цепи кДНК

Синтезированную кДНК ресуспендировали в 10 мкл стерильной бидистиллированной воды и добавляли в пробирку с высушенным α-³²Р-дТТФ (100 мкКи, уд. акт. 1000 Ки/ммоль). Затем вносили 30 мкл 5х буфера (0,33М К₂НРО, рН 6,8, 50 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ), 30 мкл 0,5 мМ дНТФ, воду до объема 150 мкл и 180 ед. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Смесь инкубировали 18 час при 15°С. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М ЭДТА до концентрации 20 мМ. После фенольной депротеинизации ДНК отделяли от невключившихся трифосфатов хроматографией на сефадексе G-50. Эффективность синтеза второй цепи оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в денатурирующих и неденатурирующих условиях. ДНК осаждали этанолом.

Расщепление петли шпильки нуклеазой S₁

Оптимальное количество нуклеазы S₁, необходимое для расщепления петли шпильки оценивали опытным образом. В калибровочных экспериментах аликвоты двунитевой кДНК обрабатывали различным количеством нуклеазы S₁.

Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Количество нуклеазы S_1 , удаляющее из препарата кДНК 2% радиоактивности, использовали в дальнейшем для препаративного эксперимента.

Для обработки 30 мкг двунитевой кДНК в реакционную смесь объемом 90 мкл вносили 60 мкл кДНК, 22,5 мкл 4х буфера (1,2 М NaCl, 0,2 М Na-ацетат (pH 4,5), 4 mM ZnSO₄), 6 мкл H₂O и 3,5 ед. нуклеазы S_1 . После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 0,5М ЭДТА до концентрации 20 mM. Затем проводили фенольную депротеинизацию и хроматографию на сефадексе G-50 и осаждали ДНК этанолом.

Достройка кДНК до тупых концов

Для последующей пришивки линкеров EcoR₁ в качестве необходимого условия требуется достройка концевых одонитевых участков ДНК после обработки нуклеазой S_1 до тупых концов. Данную реакцию проводили с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы 1.

ДНК растворяли в 10 мкл H₂O, добавляли 10 мкл 10х буфера (его состав: 0,5 М трис-HCl (pH 7,6), 65 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ), затем 0,3 мкл 10 mM раствора четырех дНТФ, 5 пмоль α -³²P-дАТФ (уд. акт. 3000 Ки/ммоль), 0,2 ед. фрагмента Кленова и доводили водой до 100 мкл. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М ЭДТА до концентрации 20 mM. Проводили фенольную депротеинизацию и отделяли ДНК от невключившихся трифосфатов хроматографией на сефадексе G-50. ДНК осаждали этанолом.

Метилирование кДНК

При клонировании фрагментов ДНК путем присоединения линкеров (в данном случае линкеров EcoR₁) в качестве предварительного действия требуется защита всех сайтов EcoR₁ в клонированной ДНК. С этой целью применяли метилазу EcoR₁.

ДНК ресуспендировали в 20 мкл буфера для метилазы EcoR₁: 50 mM трис-HCl (pH 7,5), 1 mM ЭДТА, 5 mM ДТТ. В смесь добавляли 2 мкл 100 мкМ S-

аденозилметионина (препарат готовили непосредственно перед экспериментом из маточного 10 мМ раствора) и 0,2 мкл метилазы EcoR1 (1,8 мг/мл). Смесь инкубировали 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C в течение 10 мин. Депротеинизацию проводили хлороформом. ДНК осаждали этанолом.

Введение метки в 5'-концы линкеров EcoR1

5'-концы линкеров EcoR1 метили с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Инкубационная среда объемом 24 мкл содержала: 50 мкКи γ -³²P-АТФ (уд. акт. 1000 Ки/ммоль), 4,8 мкл 5x буфера: 0,3 М трис-HCl (pH 7,6), 50 мМ MgCl₂, 30 мМ ДТТ, 2 мкл линкеров EcoR1 (1 мкг/мкл), 2 мкл (5 ед.) полинуклеотидкиназы и H₂O. Смесь инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Затем в нее добавляли "холодный" АТФ до концентрации 1 мМ и 2,5 ед. полинуклеотидкиназы. Реакцию продолжали еще 30 мин при 37°C. После окончания реакции проверяли способность фосфорилированных линкеров к лигированию. Из реакционной смеси брали 2 мкл линкеров, добавляли 1 мкл 10x лигазного буфера (0,5 М трис-HCl (pH 7,5), 0,1 М MgCl₂, 0,1 М ДТТ и 10 мМ АТФ), 30 ед. ДНК-лигазы фага T4 и H₂O до 10 мкл. Инкубацию проводили в течение 6 час при 12°C. Лигазу инактивировали прогреванием реакционной смеси при 65°C в течение 15 мин. Затем проверяли способность лигированных линкеров к рестрикции. Из реакционной смеси отбирали 5 мкл, добавляли 2 мкл 10x буфера для рестрикции (0,5 М трис-HCl, pH 7,5, 1М NaCl, 0,1 М MgCl₂, 10 мМ ДТТ), 30 ед. рестриктазы EcoR1 и H₂O до 20 мкл. Смесь инкубировали 1 час при 37°C.

Анализ киназной, лигазной и рестриктазной реакций проводили с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле. На дорожки наносили линкеры, обработанные или киназой, или киназой и лигазой, или киназой, лигазой и рестриктазой. После окончания электрофореза гели автордиографировали.

Формирование липких концов EcoR1 на кДНК

Эта процедура включала два этапа: 1) лигирование синтетических линкеров с кДНК; 2) обработка такой кДНК рестриктазой EcoR1 с целью формирования на ней EcoR1-концов.

Лигирование проводили следующим образом. К 1 мкг кДНК добавляли 2 мкг меченых с помощью киназы линкеров, затем вносили 5 мкл 10х лигазного буфера (0,4 М трис-НСl (рН 7,5), 80 мМ MgCl₂, 80 мМ ДТТ, 10 мМ АТФ), 20 ед. лигазы и Н₂О до 50 мкл. Инкубацию проводили при 15°С в течение 10 час. Реакцию останавливали прогреванием смеси при 65°С в течение 10 мин. Проверку реакции лигирования проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Для формирования сайта EcoR1 после лигирования с синтетическими линкерами проводили рестрикцию кДНК рестриктазой EcoR1. После инактивации лигазы в реакционную смесь добавляли трис-НСl, рН 7,5 до концентрации 50 мМ; MgCl₂ до концентрации 10 мМ; NaCl до концентрации 100 мМ и 100 ед. рестриктазы EcoR1. Смесь инкубировали 1 час при 37°С. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до 20 мМ.

Фракционирование кДНК на биогеле А-50m

С целью удаления остатков линкеров и обогащения библиотеки клонированными фрагментами кДНК, имеющими размер свыше 500 нуклеотидов, проводили хроматографическое разделение кДНК на биогеле А-50m. Колонку объемом 1 мл заполняли носителем в буфере следующего состава: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1мМ ЭДТА. Хроматографию вели в этом же буфере. Собирали фракции по 50 мкл, измеряли их радиоактивность и проводили электрофорез в 1,2% агарозном геле в присутствии маркеров. Определяли местоположение кДНК и отбирали фракции размером свыше 500 пар оснований.

Приготовление ДНК вектора λ gt10

Бактериофаг λ gt10, использованный нами в качестве вектора, имеет уникальный сайт рестрикции EcoRI в области гена c1-репрессора индукции фага λ . При нормальном функционировании гена c1 фаг λ gt10 образует мутные бляшки на газоне индикаторных клеток. При наличии вставки в сайт EcoRI происходит инактивация гена-репрессора и фаг образует прозрачные бляшки. Для того, чтобы при клонировании не получить значительный процент ложных рекомбинантов, необходимо отобрать клон фага, дающий минимальное количество прозрачных бляшек, т.е. имеющий минимальный уровень спонтанного мутагенеза по данному гену.

Фаг выращивали на штамме С600 и для дальнейшей работы отбирали фаголизат, дающий количество прозрачных бляшек менее $0,5 \times 10^{-3}$. Далее проводили выделение фага. С этой целью на 150 мм чашку Петри, содержащую 40 мл агаризованной среды LB, наносили 5 мл мягкого (0,8%) агара в среде LB, содержащего около 2×10^8 клеток С600 и 2×10^6 частиц фага λ gt10. Чашки инкубировали в течение 5 - 6 час при 37°C. Частицы фага образовали плотный пятнистый газон. На чашку наносили 10 мл холодного буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM ЭДТА), несколько капель хлороформа и оставляли на ночь при 4°C. За это время бактериофаг диффундирует с поверхности агара в раствор. Фаговую суспензию осторожно сливали в пробирки и центрифугировали при 4000g в течение 10 мин при 4°C для осаждения бактериальных осколков. Далее частицы фага осаждали центрифугированием в роторе SW-27 Beckman со скоростью 23000 об/мин в течение 90 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 1 мл описанного выше буфера. Фаг очищали центрифугированием в градиенте CsCl и хранили при 4°C. ДНК фага выделяли формамидной экстракцией.

Анализ полноты рестрикции ДНК фага λ gt10 рестриктазой EcoRI

К 5 мкл ДНК λ gt10 (1 мкг/мкл) добавляли 5 мкл 10x буфера для EcoRI (0,5 M трис-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂), 15 ед. рестриктазы EcoRI и H₂O до объема 50 мкл. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли еще 15 ед. EcoRI

и снова инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М ЭДТА до концентрации 20 мМ и прогревали 10 мин при 70°C. Для контроля полноты рестрикции проводили пробную упаковку рестрицированной фаговой ДНК.

Лигирование молекул κДНК и рестрицированных ДНК фага λgt10

Вначале проверяли способность рестрицированной ДНК фага к лигированию собственных концов. Падение титра упакованной после этого фаговой ДНК, а также появление большего количества прозрачных бляшек могло указывать на наличие нуклеазных примесей в ферментах или растворах.

Сошедшие с колонки фракции κДНК размером более 500 пар нуклеотидов центрифугировали 5 мин в микроцентрифуге. К супернатанту добавляли такое количество фаговой ДНК, чтобы средняя молярная концентрация κДНК была равной молярной концентрации ДНК фага. Так, например, к 0,02 мкг κДНК со средним размером 900 пар нуклеотидов добавляли 1 мкг фаговой ДНК. Затем добавляли Na-ацетат до концентрации 0,2 М и 2 объема этанола. Для формирования осадка пробирки помещали на 30 мин на -70°C. Смесь центрифугировали при 15000g 30 мин при 4°C. Осадок промывали холодным 70% этанолом, центрифугировали еще раз в тех же условиях, тщательно удаляли супернатант и высушивали. ДНК ресуспендировали в 7 мкл 70 мМ трис-HCl и 14 мМ MgCl₂. Смесь прогревали 15 мин при 42°C для соединения липких концов фага. Добавляли 1 мкл 10 мМ АТФ, 1 мкл 0,1 М ДТТ и 1 мкл (1 ед./мкл) ДНК-лигазы фага T4. Смесь инкубировали 15 час при 12°C.

Упаковка фаговой ДНК

Готовили упаковочные экстракты и хранили при -70°C. Для упаковки одной пробы ДНК фага λgt10 брали аликвоты упаковочных экстрактов, размораживали во льду, смешивали и вносили 0,1 мкг (5 мкл) ДНК фага. Смесь инкубировали 1,5 час при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мл среды LB. Для высева на чашку из пробирки отбирали пробу в 5 мкл, добавляли к 100 мкл ночной культуры штамма С600, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и замешивали в 4

мл расплавленного мягкого агара LB. Пробу наносили на чашку с нижним агаром LB и инкубировали при 37°C. Бляшки появлялись через 5 - 8 час.

Определение *in situ* рекомбинантных клонов в библиотеке кДНК

Для определения процента истинных рекомбинантов в полученной библиотеке проводили клон-гибридизацию между ДНК из 100 произвольно отобранных фаговых клонов и меченой кДНК.

Клоны перекалывали на чашку с газоном чувствительных бактерий и инкубировали при 37°C 5-8 час до появления бляшек среднего размера. Капроновые фильтры, соответствующие размеру чашки, смачивали прикосновением к поверхности 1,5% питательного агара LB, а затем накладывали на чашку с фагом и выдерживали 60 с. Для получения каждой последующей реплики с той же чашки время контакта фильтра с чашкой увеличивали каждый раз на 60 с. Затем фильтр, колониями вверх, переносили на поверхность фильтровальной бумаги, пропитанной лизирующим раствором (0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl), и выдерживали 7 мин. Фильтры инкубировали 5 мин на поверхности фильтровальной бумаги, пропитанной нейтрализующим раствором (0,5 М трис-HCl, pH 7,2, 1,5 М NaCl) и ополаскивали в 2х SSC (0,3 М NaCl, 0,03 М Na-цитрат). Эту процедуру повторяли еще раз. Фильтры высушивали на фильтровальной бумаге и для фиксирования ДНК облучали ультрафиолетом на расстоянии 10 см в течение 20-25 мин. Затем фильтры инкубировали 2 часа при 42°C в промывающем растворе (50 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 М NaCl, 1 mM ЭДТА, 0,1% SDS) и переносили в буфер для предгибридизации: 50% формамид, 5х раствор Денхардта, 0,1% SDS, 5х SSC, 1 mM ЭДТА, 170 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося. Количество буфера определяли из расчета 1 мл/см² фильтра. Предгибридизацию проводили при 42°C в течение 12 час в чашках Петри. После этого буфер сливали, добавляли новую порцию (0,4 мл/см² фильтра) того же буфера и проводили гибридизацию с меченой ДНК. Метку в кДНК вводили следующим образом. К 50 нг кДНК в буфере (10 mM трис-HCl (pH 7,4), 80 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ДТТ, 10 mM ДНТФ, 100 мкКи α-³²P ДАТФ и α-³²P дГТФ) объемом 50 мкл добавляли 5 ед.

ДНК-полимеразы I и смесь инкубировали при 18⁰С 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М ЭДТА до 20 мМ. От невключившихся трифосфатов освобождались при помощи хроматографии на сефадексе G-50.

Скрининг библиотеки на последовательности Alu

На газон чувствительных бактерий высевали 8 - 10 тыс. фаговых частиц так, чтобы бляшки, образующиеся за 5 - 8 час инкубации при 37⁰С, не перекрывались. Затем негативные колонии переносили на капроновые фильтры, как описано выше. Фрагмент Alu плазмиды BLUR8, используемый в качестве гибридизационного зонда, получали рестрикцией плазмиды рестриктазой BamH1. Его выделяли из геля после электрофореза в легкоплавкой агарозе. Зонд метили с помощью фрагмента Кленова в условиях, идентичных реакции с ДНК-полимеразой I, описанных выше.

2.2.16. Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили, используя пакет прикладных программ «Statistica 6.0» и «GraphPadInStat». Значимость различий в частоте аллелей сравниваемых выборок определяли с использованием критерия хи-квадрат (для больших выборок) или точного теста Фишера (для малых выборок). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выявление биохимических нарушений у больных фенилкетонурией и членов их семей

В предложенной Нейфахом и Шапошниковым гипотезе о механизмах патогенеза при ФКУ (Нейфах, Шапошников, 1965) и в результате дальнейших исследований было определено, что нарушения метаболизма при этом заболевании делятся на первичные и вторичные. Первичным этиопатогенетическим фактором является отсутствие или нарушение активности любого компонента ФАГ-системы, в результате чего нарушается реакция гидроксилирования ФА в ТИР. Накопление в организме ФА и его патологических дериватов приводит к вторичным нарушениям интегрированного обмена веществ организма.

В современной классификации форм ФКУ имеются различные подходы, однако, в России в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями принято подразделять ФКУ на три формы: I типа (классическая), обусловленная дефицитом ФАГ; II типа, обусловленная дефицитом ДГПР; III типа, связанная с недостаточностью PTPS (Матулевич и др., 2013; Студеникин и др., 2011). На самом деле ситуация с классификацией ФКУ и ГФА существенно сложнее и попытка изложить ее более подробно предпринята в статье Blau (Blau et al., 2011).

Частота встречаемости мутантных аллелей гена ФАГ в гомо- и гетерозиготном состоянии в общей популяции, вероятно, значительно выше, чем указывают авторы работ по ФКУ, что обусловлено размерами выборки. Активность ФАГ зависит не только от степени мутационных повреждений, приводящим к физико-химическим изменениям молекулы фермента, но также от экспрессивности и плейотропного действия генов индивидуального гомо- или гетерозиготного носителя мутантного аллеля, что и определяет фенотипическую (биохимическую и клиническую) манифестацию выраженности патологического состояния.

В Таблице 1 представлена предлагаемая нами классификация наследственных молекулярных дефектов, ведущих к развитию ГФА. Понятно, что ГФА возникает не только при мутациях в генах компонентов ФАГ-системы, но и при таких заболеваниях, как гепатиты, алкоголизм, почечная недостаточность, малярия и других патологических состояниях (Heberer et al., 1980; Mizock et al. 1990; Lopansri et al., 2006; Jones MR, et al., 1978). ГФА, вызванные недостаточностью системы кофактора наследуются аутосомно-рецессивным путем и составляют 2% всех ГФА. Дефект активности ферментов системы кофактора ВН₄ ведет к нарушению биосинтеза катехоламинов, серотонина и оксида азота (NO), следствием чего является развитие различной степени выраженности психоневрологических расстройств.

Таблица 1

Классификация гиперфенилаланинемий (Шапошников, Хальчицкий, 2007а)

№ п/п	Первичный (биохимический) дефект	Тип наследования	Мутации гена
1	Недостаточность активности фенилаланингидроксилазы (при уровне ФА выше 200 мг/л)	аутосомно-рецессивный	ФАГ
2	Классическая фенилкетонурия, умеренная (при уровне ФА 100-200 мг/л)	аутосомно-рецессивный	ФАГ
3	ГФА, необусловленная ФКУ (при уровне ФА 21-80 мг/л)	-//-	ФАГ
4	Тетрагидробиоптерин (ВН ₄) зависимая ФКУ/ГФА	-//-	ФАГ
5	Материнская ФКУ/ГФА	-//-	ФАГ

6	Недостаточность ГТФ-гидролазы-1 (GTPCH)	-//-	GTPCH
7	Недостаточность 6-пирувоил-тетрагидроптеринсинтазы (PTPS)	-//-	PTPS
8	Полное отсутствие активности PTPS	-//-	PTPS
9	Недостаточность дигидроптеридинредуктазы (ДГПР)	-//-	ДГПР
10	Недостаточность птерин-4 α -карбиноламин-дегидратазы (ПКД)	-//- транзиторная ГФА	ПКД
11	Недостаточность ГТФ-циклогидролазы (GTPCH), вызывающая ДОФА-зависимую дистонию	аутосомно-доминантный, без выраженной ГФА	GTPCH
12	Недостаточность сепиаптеринредуктазы (SR)	аутосомно-рецессивный, без выраженной ГФА	Гены компонентов ФАГ- системы
13	Экзогенные ГФА, обусловленные действием вирусов, бактерий, простейших и других факторов (алкоголь, ксенобиотики), ведущие к нарушению компонентов ФАГ-системы, активность которых изменена, т.е. имеется генетически	?	Гены компонентов ФАГ- системы

	детерминированный дефект ФАГ- системы		
--	--	--	--

В ходе проводимого исследования под нашим наблюдением в разное время находились больные ФКУ и их ближайшие родственники, состоявшие на учете и лечении в медико-генетической консультации Ленинградской области, медико-генетическом центре Санкт-Петербурга, психоневрологических интернатах Санкт-Петербурга.

С целью выявления первичных и вторичных этиопатогенетических факторов у больных ФКУ нами проводилось исследование активности ФАГ печени, а также определение концентрации ФА, ТИР, ФПК и других метаболитов у различных групп больных ФКУ и их сопоставление с клиническими данными.

В Таблицах 2 и 3 представлены данные об активности ФАГ и их сопоставление с выраженностью клинических и биохимических нарушений у детей и взрослых больных ФКУ.

Таблица 2

Клинико-биохимическая характеристика и активность ФАГ детей с
фенилкетонурией

№ п/п	Пол	Возраст к моменту обследования	Коэффициент развития (DQ), ед.	Месяц жизни, на котором заболевание манифестировало	Течение болезни	Клиническая картина ФКУ в раннем возрасте	Концентрация ФА в крови, мг/л	Концентрация фенилпировиноградной кислоты в моче, мг/л	Активность фенилаланин-гидроксилазы печени, мкмоль тирозина/ г белка/час	
									Без кофактора	с кофактором
1	ж	1 год 7 мес.	20	1-й	тяжелое	Грубая задержка психомоторного развития, судороги (до 100 раз в сутки).	400	250	0	0,0140

						Аномалии развития				
2	м	2 года	30	3-4-й	средней тяжести	Резкая задержка в психомоторном развитии. Судороги с 8 мес. Аномалии развития	285	180	0,0049	0,0058
3	м	5 лет 1 мес.	8	1-й	тяжелое	Резкая задержка психомоторного развития	242	120	0,0047	0,0049
4	ж	4 года 4 мес.	30	11-12-й	средней тяжести	До 1 года признаков заболевания не отмечалось	292	940	0,0100	0,0160
5	м	2 года 6 мес.	60	7-8-й	средней тяжести	Отставание в развитии стало заметным в 7 мес.	300	190	0,0120	0,0240
6	ж	4 года 7 мес.	66	6-7-й	тяжелое	Задержка психомоторного развития, судороги с 6 мес.	380	230	0,0120	0,0130
7	м	3 года 5 мес.	20	12-й	легкое	Задержка психомоторного развития, вялость	395	180	0,0140	0,0200
8	м	3 года 3 мес.	70	7-й	средней тяжести	Задержка психомоторного развития, инертность	420	240	0,0150	0,0180
9	ж	3 года 4 мес.	34	10-й	легкое	Раннее развитие – удовлетворительное, с 10 мес. – потеря навыков	205	170	0,0160	0,0600
10	м	1 год 4 мес.	23	4-й	тяжелое	Задержка психомоторного развития	360	200	0,0180	0,0290

В Таблице 3 представлены результаты определения активности ФАГ в биоптатах печени у 10 больных с классической формой ФКУ.

Таблица 3

Активность ФАГ (в мкмоль тирозина на 1 г белка за 60 мин.) в печени и содержание (мг/л) ФА, ТИР в крови и ФПК (в мг/л) в моче больных ФКУ и в контрольной группе

Группа обследованных	Пол	Возраст	Степень умственной отсталости	До нагрузки				Через 4 часа после нагрузки				Активность ФАГ	
				ФА	ТИР	ФА/ТИР	ФПК	ФА	ТИР	ФА/ТИР	ФПК	Без добавления кофактора	С добавлением кофактора
Больные ФКУ	м	29 лет	Дебиленость	63	10	6,3	75	85	12	7,1	440	0,27	7,2
	ж	40 лет	-//-	258	7,2	35,8	875	465	6,6	70,5	7400	0	4,5
	м	30 лет	-//-	204	8,4	24,3	190	392	8,0	49	1500	0	5,4
	м	49 лет	-//-	250	8,0	31,2	720	321	6,8	36,8	3500	1,06	2,4
	м	35 лет	Имбециленость	192	9,4	20,4	480	207	10	20,7	1600	0	2,2
	м	21 год	-//-	137	8,2	16,7	650	292	8,2	35,6	3350	0	2,26
	м	25 лет	-//-	221	7,6	29	220	385	6,2	45,9	3300	0	0
	ж	28 лет	-//-	171	6,0	28,5	380	335	6,0	55,8	2600	0	0
	ж	26 лет	-//-	221	7,0	31,5	800	328	7,8	42	1400	0	2,2
	м	23 года	Идиотия	200	7,6	26,3	340	305	7,6	40,1	700	0	1,52
	м	25 лет	-//-	150	8,0	18,7	1200	207	7,6	27,2	2050	0	0
	ж	34 года	-//-	292	8,0	36	170	-	-	-	400	0	0,48
	ж	24 года	-//-	207	7,0	29,5	750	335	6,4	52,3	4700	0	0
	м	10 мес.	-//-	228	6,2	36,7	-	-	-	-	-	0	0
Контрольная группа (без ФКУ и ГФА)				18±1,7	10±2,1	18±1,5	0	22±1,7	14±2,9	16±1,1	241±25	-	-
Больные олигофренией без ФКУ и ГФА	м	21 год	Идиотия	17	8,2	1,4	0	-	-	-	-	2,4	55,0
	ж	1 мес.	-//-	11	9,1	1,0	0	-	-	-	-	-	33,0
	м	10 мес.	-//-	15	10,3	1,3	0	-	-	-	-	-	42,0
	м	26 лет		18	9,8	1,8	0	-	-	-	-	2,1	61,5
	ж	39 лет		19	10	1,9	0	-	-	-	-	0,8	58,0

В Таблице 2 представлены результаты определения активности ФАГ в биоптатах печени у 10 больных ФКУ. Из приведенных данных видно, что активность ФАГ у больных ФКУ в отсутствие кофактора ВН4 резко снижена по сравнению с контрольной группой. При добавлении кофактора активность ФАГ возрастает в разной степени, что говорит о возможной гетерогенности мутационного повреждения гена ФАГ. Тем не менее, даже с добавлением кофактора активность ФАГ у больных существенно ниже, чем в контрольной группе. Концентрация ФА в крови резко повышена.

Следует отметить, что добавление кофактора увеличивает в десятки раз активность ФАГ у лиц контрольной группы, но не влияет или влияет незначительно на активность у больных ФКУ I типа.

В Таблице 3 представлены данные первичных и вторичных биохимических нарушений у взрослых больных ФКУ по сравнению с контрольной группой. У людей без ФКУ добавление кофактора резко стимулирует активность ФАГ. Определение активности ФАГ в печени с добавлением кофактора у больных ФКУ показывает, что активность возрастает незначительно, причем у части больных активность ФАГ как с добавлением, так и без добавления кофактора отсутствует. У больных ФКУ с умственной отсталостью в степени дебильности активность ФАГ в присутствии кофактора составляет 7-13%, у остальных больных с имбецильностью и идиотией активность ФАГ составляет 0,7-3,7% и менее до полного отсутствия активности по сравнению с контрольной группой. Эти результаты свидетельствуют о том, что у больных ФКУ синтезируется структурно измененный (мутантный) фермент, активность которого снижена или отсутствует полностью. Как видно из таблицы, активность ФАГ у больных ФКУ стимулируется кофактором неоднозначно, что указывает на присутствие разных мутантных вариантов фермента. Различная степень нарушения активности ФАГ указывает на генетическую гетерогенность фенилкетонурии.

Вторичные биохимические нарушения у больных фенилкетонурией также неоднородны. Только у 3 больных концентрация фенилаланина в крови не

превышает 150 мг/л, у остальных больных этот показатель значительно выше. Содержание тирозина у всех больных снижено. Отношение фенилаланин/тирозин у больных варьировало от 6,3 до 36,7, а экскреция фенилпировиноградной кислоты составляла 75-1200 мг/л, что значительно превышает эти показатели у здоровых людей. Обращает внимание, что отношение фенилаланин/тирозин через 4 ч после нагрузки фенилаланином только у 3 больных ФКУ возрастает незначительно, а у остальных увеличивается в 1,5-2 раза. Следовательно, при нагрузке резко возрастает содержание фенилаланина, причем образуются лишь минимальные количества тирозина. При нагрузке аминокислотой здоровых людей отношение фенилаланин/тирозин через 4 ч составляет 1,6, в то время как до нагрузки этот показатель равен 1,8. Это указывает на интенсивное образование тирозина в печени здоровых людей. Фенилпировиноградная кислота с мочой больных выделяется в больших количествах как до, так и во время нагрузки. У людей из контрольной группы через 2—4 ч после нагрузки нами обнаружено небольшое выделение этой кислоты, которая в моче в норме отсутствует. Исследование активности ФАГ в печени и вторичных биохимических нарушений при фенилкетонурии показало, что активность ФАГ у больных снижена неоднозначно, вторичные биохимические нарушения не отражают степени выраженности первичного генетического дефекта у большинства больных. Наименее выраженное снижение активности ФАГ и вторичных биохимических нарушений отмечено у одного больного, заболевание которого можно расценивать как атипичную форму фенилкетонурии, но с наличием умственного дефекта. Таким образом, проведенное исследование показало, что генетический дефект при фенилкетонурии является гетерогенным.

В Таблице 4 представлены исследованные нами *in vitro* свойства ФАГ в биоптатах печени лиц контрольной группы и больных ФКУ.

Таблица 4

Свойства ФАГ печени лиц контрольной группы и больных ФКУ

Свойства	Контрольная группа	Больные ФКУ
Активация FeCl ₂ (1мкМ)	отсутствует	отсутствует
Активация лизофосфатидилсеринном (в %)	316 - 320	26 – 40
Активность в присутствии п-хлорфенилаланина	отсутствует	отсутствует
Влияние 3-йодтирозина	не влияет	не влияет

Приведенные данные показывают, что железо не влияет на активность фермента, ингибитор ФАГ п-хлорфенилаланин подавлял активность в норме и при ФКУ, а ингибитор тирозингидроксилазы – 3-йодтирозин не влиял на активность. Лизофосфатидилсерин резко увеличивал активность ФАГ здоровых, но незначительно активировал ФАГ больных ФКУ.

Следует отметить, что при электронно-микроскопическом и гистохимическом исследовании у больных ФКУ установлены глубокие нарушения в органеллах гепатоцитов, связанных с осуществлением окислительной и белоксинтезирующей функции. Так, митохондрии имели уплотненный матрикс и короткие единичные кристы, количество митохондрий увеличено, и они расположены вблизи наружной мембраны; отмечены набухание, фрагментация и уменьшение количества рибосом, фиксированных на мембранах гранулярной эндоплазматической сети, а также очаговый лизис ее мембран; гиперплазия

органойдов, связанных с индукцией микросомальных ферментов и другие изменения гепатоцитов (тканевая гипоксия, перегрузка липидами и гликогеном).

Наши исследования показали, что вторичные биохимические нарушения при ФКУ не ограничены патологией обмена ароматических аминокислот и катехоламинов. Имеются нарушения обмена углеводов, липидов, а также нарушена активность ферментов других метаболических путей (Шапошников, Хальчицкий, 2007а). Таким образом, гетерогенность первичного генетического дефекта приводит к неоднозначности вторичных нарушений обмена, что и проявляется в виде различной клинической картины болезни каждого индивидуума.

3.2. Фенотипическое проявление мутантного гена у гетерозиготных носителей ФКУ

При исследовании биохимических и клинических проявлений мутантного гена ФАГ у родственников больных ФКУ нами было установлено, что гетерозиготные носители ФКУ (ГЗ) также представляют собой гетерогенную группу. Исходный уровень ФА в крови у 36 родственников – гетерозиготных носителей ФКУ из 17 семей в среднем на 44,4% выше, а концентрация ТИР на 26,3% ниже по сравнению с контролем. Особенно отчетливо наличие мутантного аллеля выявляется при нагрузке ФА. Исследуя метаболизм ФА при введении здоровым людям и ГЗ установлено, что ФА метаболизирует согласно кинетике реакции первого порядка. По нашим данным константа скорости реакции гидроксилирования ФА в ТИР, рассчитанная по ФА для здоровых людей, составляет $0,5 \cdot 10^{-2} \text{мин}^{-1}$, а для ГЗ - $0,18 \cdot 10^{-2} \text{мин}^{-1}$.

В противоположность общепринятому мнению, что ГЗ по ФКУ фенотипически здоровы наше обследование показало, что у них имеются психоневрологические расстройства: умственная отсталость (один из родителей в 5-ти семьях), психопатические черты личности (4 семьи). У ГЗ обнаружена патологическая ЭЭГ, причем в некоторых случаях однотипные изменения

установлены, как у больного ФКУ, так и у его родителей и сибсов. Таким образом, экспрессивность мутантного гена проявляется не только у гомозиготных, но также и у ГЗ носителей, причем фенотипическое проявление мутантного гена различно, как у больных ФКУ, так и у родственников. Это свидетельствует о том, что действие мутантного аллеля на уровне целостного организма неоднозначно.

3.3. Выявление молекулярно-генетических нарушений у больных фенилкетонурией и членов их семей

Исследуемые группы больных фенилкетонурией состояли на учете в медико-генетических центрах Москвы, Санкт-Петербурга, Ленинградской области, Латвии. Представляло интерес выявить генетические повреждения в гене ФАГ, фенотипически проявляющиеся у больных ФКУ. Проводили тестирование на наличие наиболее распространенных точечных мутаций, характерных для Европейской части стран бывшего СССР. Для детекции мутаций использовались диагностические наборы ООО «Центр молекулярной генетики», Москва, а также праймеры собственной разработки.

В одной из групп больных (жители Санкт-Петербурга и Ленинградской области) было обследовано 27 пробандов (возраст от года до 23 лет, 12 пробандов мужского пола, 15 женского пола), в том числе в двух семьях две пары разнополых сибсов. Выявлено 9 человек, гомозиготных по мутации R408W, 15 человек – компаунды со вторым не идентифицированным аллелем, у трех пробандов аллель R408W отсутствовал. Таким образом, в обследованной группе больных ФКУ частота аллеля R408W равна 61,1% (Хальчицкий и др., 2010).

В другой группе больных ФКУ (31 чел., жители Московского региона) были проанализированы мутации в 408, 261 и 158 кодонах, а также в сайте сплайсинга на границе 12 экзона (Charikova, Khalchitskii et al., 1993).

Были проанализированы 62 хромосомы 31 пациента из 30 неродственных семей. У 10 детей определена мутация R408W в гомозиготном состоянии.

Аmplифицированные фрагменты геномной ДНК еще 10 больных фенилкетонурией обнаружили присутствие мутантного аллеля R408W, а также мутантного аллеля в сайте сплайсинга IVS-12. Таким образом, эта группа больных детей представляет собой гетерозиготных компаундов, обладающих двумя различными мутантными аллелями - (R408W/IVS-12ntl).

У пяти пациентов с ФКУ был обнаружен только один мутантный аллель R408W. Геномную ДНК этих больных ФКУ тестировали на наличие точечной мутации в 158 кодоне, локализованной в пятом экзоне. Среди этих больных у 2-х человек была обнаружен мутантный аллель, т.е. они представляли собой компаунд-гетерозиготы 408/158. Также были выявлены трое компаундных гетерозигот 408/X и трое 158/X у которых вторая мутация не была выявлена.

Среди спектра точечных мутаций в гене ФАГ ДНК больных ФКУ скринировалась и на наличие точечной мутации, локализованной в 261 кодоне седьмого экзона. Двое больных ФКУ показали наличие мутации в 261 кодоне в одном аллеле, т.е. также являлись компаундными гетерозиготами. Таким образом, распределение мутантных аллелей среди больных ФКУ в наших исследованиях было следующим: 56,4% имели мутацию в R408W, 16% - IVS-12ntl, 8,1% - R158Q и 3,2% - R261Q. Анализ наших данных по частоте мутантных аллелей R408W и IVS-12ntl мы сравнили с распределением этих точечных мутаций в десяти европейских странах. У мутации R408W есть следующие установленные частоты: Дания - 19.7%; Германия - 26.1%; Франция - 11.8%; Швейцария - 9.1%; Шотландия - 10.5%; Венгрия - 55.0%; Чехия и Словакия - 68.2%; Болгария 33%; Италия-4.7%, Польша 56.8%. Частоты мутации в сайте сплайсинга IVS-12ntl распределены следующим образом: Дания - 37.9%; Германия - 11.4%; Франция-13.7%; Швейцария-18.2%; Шотландия - 5.3%; Венгрия - 5.0%; Чехия и Словакия - 0%: Болгария 0%; Италия 3.1%, Польша - 2.3%.

Таким образом, в группах исследованных нами детей с ФКУ, частота точечной мутации R408W такая же, как в странах Восточной Европы - Польше, Венгрии, Чехии и Словакии. Частота мутации в сайте сплайсинга IVS-12ntl

составляет 16%, то есть, этот мутантный аллель встречается довольно часто, но только в гетерозиготном состоянии в составе компаундов. Такое же распределение этой мутации в составе компаундов встречается во Франции и других странах Западной Европы (Rey et al., 1988; Berthelon et al., 1991). Только в одной семье (DiLella et al., 1986), было два сибса, имеющих эту мутацию в гомозиготном состоянии.

3.4. Разработка новых методов ПЦР-исследований мутаций, использованных при диагностике ФКУ и ГФА

ПЦР-диагностика, как эффективный метод молекулярно-генетического анализа была изобретена в 1983 г., и в 1985 г. в журнале Science появилась первая публикация о данном методе. В СССР первые опыты по применению ПЦР-диагностики были проведены нами в Ленинградском институте ядерной физики (лаб. проф. Е.И. Шварца), была разработана оригинальная методика с применением термофильной ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus*. На основании разработанной нами методики появилась первая в СССР публикация о диагностике мутационных повреждений в гене фенилаланингидроксилазы (Скрябин, Хальчицкий и др., 1989). Далее, чтобы приспособить ПЦР-диагностику для массового скрининга мутаций и полиморфизмов нами был изобретен и впервые в мире стал применяться метод ПЦР-диагностики с ДНК, иммобилизованной на различных твердых носителях (Schwartz, Khalchitsky et al., 1990, Skryabin, Khalchitsky et al., 1990, Кузьмин, Хальчицкий и др., 1991). Первоначально для амплификации ДНК использовались пятна крови, нанесенные на бланки из специальной бумаги, предназначенные для выполнения теста Гатри на содержание фенилаланина. Затем, для иммобилизации биологического материала (кровь, клеточные суспензии, очищенная ДНК) использовались нейлоновые и нитроцеллюлозные мембранные фильтры, и другие материалы. Эта технология положила начало массовому скринингу мутаций при наследственных

заболеваниях. Метод иммобилизации ДНК или зонда на носителе был использован также при разработке технологии диагностических биочипов.

3.5. Выявление нарушений обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна

Раскрытие патогенетических механизмов развития болезни Дауна и проведение на этой основе эффективных терапевтических мероприятий возможны лишь при детальном изучении биохимических основ хромосомного дисбаланса. Поскольку ведущим симптомокомплексом при трисомии по 21-й хромосоме являются психоневрологические расстройства, то особо важное значение имеют исследования метаболических систем, участвующих в обмене ароматических аминокислот. Патология обмена фенилаланина, тирозина и триптофана приводит к нарушению синтеза и метаболизма нейромедиаторов центральной нервной системы — адреналина, норадреналина, дофамина, серотонина, что обуславливает развитие психических и неврологических расстройств при наследственных и экзогенных заболеваниях человека. Так, генетически детерминированное нарушение реакции гидроксилирования фенилаланина и как следствие этого патологический обмен тирозина и триптофана приводит к слабоумию и другим расстройствам центральной нервной системы при «классической» форме фенилкетонурии, наследственная недостаточность дигидроптеридинредуктазы печени и мозга сопровождается умственной отсталостью, судорожными припадками. Генетический блок реакции превращения п-оксифенилпировиноградной кислоты в гомогентизиновую при тирозинемии вызывает тяжелые поражения печени и нервной системы, извращение обмена ароматических аминокислот определяет психоневрологическую симптоматику при заболеваниях, сопровождающихся поражением печени, таких, как вирусный гепатит, хронический алкоголизм и др. (Scriver, 1967, Fulenwider, 1978, Endo, 1999). Эти данные показывают, что между расстройством обмена фенилаланина и

тирозина и психоневрологическими нарушениями существует тесная взаимосвязь.

При болезни Дауна концентрация фенилаланина в сыворотке крови увеличена как у новорожденных, так и у более старших детей (Давиденкова, 1966). Нарушение обмена тирозина и триптофана при этом заболевании выражается в повышении их уровня в крови и патологической экскрецией метаболитов этих аминокислот с мочой (Концевая, Рицнер, 1972). Кроме того, установлено, что при болезни Дауна нарушается структура и функция печени (Seeff et al., 1967, Ruchelli et al., 1991). Совокупность представленных данных позволяет предположить, что при этом заболевании страдает фенилаланингидроксилазная система печени (Шапошников, Хальчицкий, 1979).

Для изучения динамики превращения фенилаланина в тирозин нами была использована методика нагрузки фенилаланином. Результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5

Концентрация (в мг/л) фенилаланина и тирозина в сыворотке крови и выделение гомогентизиновой кислоты с мочой после нагрузки L-фенилаланином больных и здоровых (0,1 г/кг массы тела)

Время, ч	Фенилаланин	Тирозин	Гомогентизиновая кислота
Больные болезнью Дауна			
0	25,0±3,0	16,6±1,2	90,0±1,2
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,1
1	63,0±4,7	20,7±1,5	104,0±3,9
<i>P</i>	>0,1	>0,1	<0,02
2	73,0±7,2	22,3±1,6	119,0±4,2
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05
4	51,0±2,6	22,7±0,9	118,0±6,3
<i>P</i>	<0,001	<0,02	<0,01
6	33,0±4,0	20,6±0,9	100,0±4,8
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,1
Здоровые люди			
0	18,0±2,4	12,0±0,4	99,0±4,8
1	74,0±9,6	19,2±0,8	128,0±6,5
2	56,0±2,1	17,5±1,0	154,0±13,2
4	23,0±0,9	14,6±0,7	168,0±12,5
6	18,0±1,8	14,2±1,1	135,0±20,0

Примечание. *P* дано по сравнению с контролем (здоровые люди).

Из таблицы видно, что исходная концентрация фенилаланина в сыворотке крови у больных выше по сравнению с таковой в контрольной группе. У здоровых людей через 1 ч. после нагрузки наблюдается максимальное повышение уровня фенилаланина. В последующем происходит снижение концентрации

аминокислоты, и к 6 ч. уровень фенилаланина возвращается к исходному. При болезни Дауна уровень фенилаланина через 1 ч. после нагрузки несколько ниже, чем в контроле, и достигает максимума к 2 ч. Основные различия в скорости гидроксилирования фенилаланина получены в последующие 4 ч. после нагрузки. Уровень фенилаланина через 4 и 6 ч. после нагрузки значительно (в 1,5—2 раза) превышает таковой у здоровых людей и даже через 6 ч. не возвращается к исходному. Фенилпировиноградная кислота в моче здоровых и больных детей отсутствовала как до, так и во все периоды после нагрузки. При расчете скорости гидроксилирования фенилаланина оказалось, что имеются существенные различия в скорости гидроксилирования фенилаланина в организме здоровых и больных людей (Рисунок 12). Следует отметить, что подобная динамика гидроксилирования фенилаланина при нагрузке обнаружена у атипичных гомо- и гетерозиготных носителей гена фенилаланингидроксилазы и у больных вирусным гепатитом.

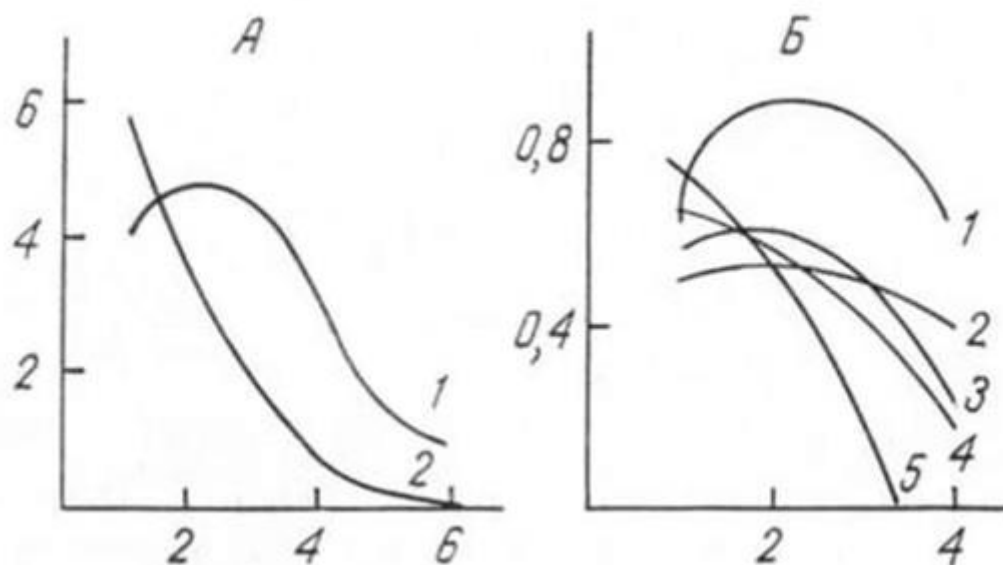


Рисунок 12. Изменение содержания ФА в сыворотке крови в процессе нагрузки L-ФА у больных синдромом Дауна и у здоровых людей.

По оси ординат: А – $(\Phi - \Phi_0)$ (в мг/100 мл); Б – $\lg (\Phi - \Phi_0)$, где Φ – концентрация ФА в сыворотке крови через 1, 2, 4 и 6 часов после нагрузки, Φ_0 – концентрация ФА в сыворотке крови до нагрузки. По оси абсцисс: время после нагрузки (в ч.) А: 1 – больные; 2 – здоровые люди. Б: 1 – 4 – больные; 5 – здоровый человек.

В результате нагрузки уровень тирозина в сыворотке крови и выделение гомогентизиновой кислоты с мочой у здоровых людей увеличиваются через 1, 2, 4, 6 ч на 60, 46, 22, 18 и 29, 56, 70, 14% соответственно, а при болезни Дауна — на 25, 34, 37, 24 и 16, 32, 31, 11% соответственно (за 100% приняты концентрации до нагрузки у здоровых и больных). У здоровых людей после нагрузки фенилаланином уровень тирозина повышается максимально через 1 ч, и через 6 ч происходит постепенное снижение его в сыворотке крови, причем максимальное выделение гомогентизиновой кислоты с мочой отмечено через 4 ч после нагрузки. До нагрузки у больных концентрация тирозина в сыворотке крови достоверно выше таковой у здоровых людей, что согласуется с данными литературы (Heggarty et al., 1996). Через 2-6 ч концентрация фенилаланина и тирозина достоверно выше у больных по сравнению с таковой в контрольной группе. Однако уровень тирозина в крови у больных в процессе нагрузки возрастает незначительно, причем экскреция гомогентизиновой кислоты с мочой снижается.

Приведенные данные показывают, что при болезни Дауна нарушен обмен фенилаланина: скорость реакции гидроксилирования этой аминокислоты ниже, чем у здоровых людей, что свидетельствует о нарушении фенилаланингидроксилазной системы печени. Нарушение обмена тирозина выражается не только в повышенном его содержании до нагрузки, но также и в снижении экскреции с мочой гомогентизиновой кислоты после нагрузки фенилаланином.

Результаты проведенного исследования показывают, что при болезни Дауна концентрация фенилаланина в крови увеличена. Однако, как до, так и в процессе

нагрузки фенилаланином фенилпировиноградная кислота в моче не обнаруживается. Морфологические изменения ткани печени при болезни Дауна (Seeff et al., 1967) очень сходны с нарушением структуры печени у больных вирусным гепатитом и алкоголизмом (Блюгер, Новицкий, 1988; Никифоров и др., 2014). Однако, содержание фенилаланина в сыворотке крови у больных вирусным гепатитом среднетяжелой формы составляет от $21,0 \pm 3,6$ до $29,0 \pm 5,3$ мг/л, а экскреция фенилпировиноградной кислоты с мочой - 40-65 мг/сут, а у больных алкоголизмом при концентрации фенилаланина в крови $24,3 \pm 1,6$ мг/л выделение фенилпировиноградной кислоты составляет $5,7 \pm 0,6$ мг/сут, причем после нагрузки L-фенилаланином экскреция фенилпировиноградной кислоты резко возрастает. Отсутствие выделения фенилпировиноградной кислоты с мочой в процессе нагрузки фенилаланином при болезни Дауна, вероятно, обусловлено нарушением переаминирования фенилаланина, так как показано извращение метаболизма и экскреции фенилпировиноградной кислоты при снижении или отсутствии активности цитоплазматической тирозинаминотрансферазы печени (КФ 2.6.1.5.) (Kennaway N.G., Buist, 1971). Изменение скорости гидроксилирования фенилаланина (Рисунок 12) может быть обусловлено снижением активности фенилаланингидроксилазы и (или) дегидроптеридинредуктазы, но не дегидрофолатредуктазы, так как показано, что активность этого фермента при болезни Дауна увеличена (Holzmann et al., 1967). Содержание тетрагидробиоптерина - необходимого кофактора фенилаланингидроксилазной системы печени при болезни Дауна, вероятно, не изменено, так как активность тетрагидрофолатдегидрогеназы больных не отличается от активности у здоровых людей (Holzmann et al., 1967). Гипертирозинемия при болезни Дауна не связана с ускоренным образованием тирозина, о чем свидетельствуют наши данные (Таблица 5). Снижение активности или содержания компонентов фенилаланингидроксилазной системы должно приводить к снижению уровня тирозина в крови. В процессе нагрузки фенилаланином концентрация тирозина в крови больных увеличивается незначительно. Следовательно, стойкая

гипертирозинемия при болезни Дауна обусловлена другими причинами. Одной из них может быть снижение активности цитоплазматической и (или) митохондриальной тирозинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1.). Изменение активности этих ферментов может быть вызвано недостатком пиридоксаль-5-фосфата, так как установлено, что содержание витамина В₆ в тканях при болезни Дауна снижено (McCoу et al., 1969) Нарушение трансаминирования тирозина подтверждается сниженной экскрецией гомогентизиновой кислоты. Вероятно, снижение экскреции этого продукта обмена тирозина обусловлено медленным образованием п-оксифенилпировиноградной кислоты в печени и почках в результате снижения активности тирозинаминотрансфераз или оксидазы п-оксифенилпировиноградной кислоты (КФ 1.14.2.2.) в этих органах, так как в других тканях организма этот фермент отсутствует (Fellman et al., 1972). Кроме того, снижение активности оксидазы п-оксифенилпировиноградной кислоты может быть обусловлено действием фенилаланина и его дериватов. Гиперфенилаланинемия при болезни Дауна выявляется с периода новорожденности. Вполне вероятно, что дисбаланс тирозина и триптофана, а также других аминокислот при этом заболевании является вторичным в результате аллостерического влияния фенилаланина и его метаболитов на ферменты, осуществляющие превращения тирозина и триптофана. Это положение подтверждается тем, что гиперфенилаланинемия вызывает нарушение синтеза гормонов - медиаторов центральной нервной системы - при наследственной и экзогенной патологии. Таким образом, нарушение обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна может явиться одним из факторов нарушения синтеза нейромедиаторов и быть одной из причин развития слабоумия при этом заболевании.

3.6. Выявление нарушений обмена фенилаланина и тирозина при вирусных гепатитах

Исследование нарушений метаболизма при вирусном гепатите важно для понимания патогенетических механизмов развития психоневрологических расстройств и коматозных состояний при данном заболевании. Мы исследовали ряд метаболических факторов (фенилаланин, тирозин и их дериваты), метаболизм которых существенно нарушен при вирусном гепатите, вызывает дисбаланс нейромедиаторов и является одной из главных причин развития психоневрологических расстройств (Шапошников, Хальчицкий, 2007).

В Таблице 6 представлены данные о содержании ФА и ТИР в сыворотке крови и ФПК, адреналина и норадреналина в моче больных ВГ.

Таблица 6

Концентрация фенилаланина и тирозина в сыворотке крови, фенилпировиноградной кислоты, норадреналина и адреналина в суточной моче больных вирусным гепатитом

Группа обследованных	Стадия болезни	Фенилаланин	Тирозин	Фенилпировиноградная кислота	Адреналин	Норадреналин
		в мг/л		мг/сут.	мкг/сут.	
Больные вирусным гепатитом: среднетяжелая форма	Разгар	29,0±5,3	18,0±1,8	108,0±13,5	7,8±0,70	37,0±9,6
	<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,4
	Спад	21,0±3,6	17,0±2,0	40,0±8,2	6,5±0,34	44,7±2,8
	<i>P</i>	<0,04	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01

	Разгар	45,0±5,5	25,0±1,7	160±15,6	8,8±0,85	48,2±12,8
тяжелая	<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,2
форма	Спад	23,0±1,6	17,0±1,6	65,0±9,35	6,9±0,49	45,0±3,7
	<i>P</i>	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01
Контрольная		18,0±1,7	11,4±0,3	0	5,2±0,71	28,8±4,48
группа						

Из Таблицы 6 видно, что у всех больных вирусным гепатитом концентрация ФА и ТИР в различные периоды болезни повышена, причем содержание ФА особенно резко увеличивается при тяжелой форме в разгар болезни. При среднетяжелом течении в разгар болезни уровень ФА и ТИР повышен в 1,6 раза, а на спаде заболевания – в 1,1 и 1,5 раза соответственно, причем экскреция ФПК даже на спаде болезни остается высокой. Кроме того, повышена экскреция адреналина и норадреналина. При тяжелом течении в разгар болезни уровень ФА возрастает в 2,5 раза, ТИР – в 2,2, а на спаде – в 1,2 и 1,5 раза соответственно. Однако экскреция ФПК, адреналина и норадреналина остается повышенной. Таким образом, очевидно, что в разгар болезни при тяжелой и среднетяжелой форме нарушается обмен ФА и ТИР. Особенно страдает обмен ФА: в моче появляются его метаболиты, которые в норме отсутствуют. Более того, на спаде заболевания концентрация ФА и ТИР остается повышенной.

В Таблице 7 приведены результаты нагрузки ФА взрослых больных ВГ в тяжелой форме в разгар заболевания.

Таблица 7

Концентрация (в мг/л) фенилаланина и тирозина в сыворотке крови больных вирусным гепатитом в тяжелой форме после нагрузки фенилаланином

Время после нагрузки в часах	Здоровые		Больные	
	фенилаланин	тирозин	фенилаланин	тирозин
0	18,0±1,7	11,4±0,03	38,6±6,5	19,7±1,9
<i>P</i>			<0,01	<0,01
1	107,0±8,8	15,3±1,2	103,5±10,5	20,8±1,9
<i>P</i>			<0,8	<0,02
2	66,0±16,6	16,1±1,2	95,2±8,0	21,4±2,2
<i>P</i>			<0,2	<0,05
4	22,0±1,7	16,5±2,9	84,0±8,6	21,7±1,8
<i>P</i>			<0,01	<0,02
6	17,0±1,5	15,1±1,3	71,0±6,7	22,3±1,5
<i>P</i>			<0,01	<0,01

У лиц контрольной группы концентрация ФА резко возрастает через час после нагрузки и возвращается к исходному уровню через 4-6 часов; концентрация ТИР возрастает максимально (в 1,4 раза) через 4 часа и остается выше исходной даже через 6 часов после нагрузки. У больных максимальный подъем уровня ФА отмечался через час и оставался высоким через 2, 4 и 6 часов после его введения, причем через 6 часов концентрация ФА почти вдвое превышала исходный уровень. Концентрация ТИР у больных незначительно увеличивалась по сравнению с таковой до нагрузки. Экскреция ФПК у больных ВГ во время нагрузки возрастала в 1,9 раза, а адреналина и норадреналина практически не изменялась. Через 24 часа

после нагрузки уровень ФПК возвращался к исходному (в среднем 152 мг в сутки). Следовательно, при нагрузке больных уровень ФА в крови возрастает и не нормализуется даже через 6 часов после нагрузки, что указывает на существенное нарушение обмена ФА в разгар болезни.

Для выяснения вопроса об обмене ФА после клинического выздоровления мы провели нагрузку ФА больных ВГ в тяжелой и среднетяжелой форме в разгар заболевания и через 3 месяца, в период выздоровления (Рисунок 13).

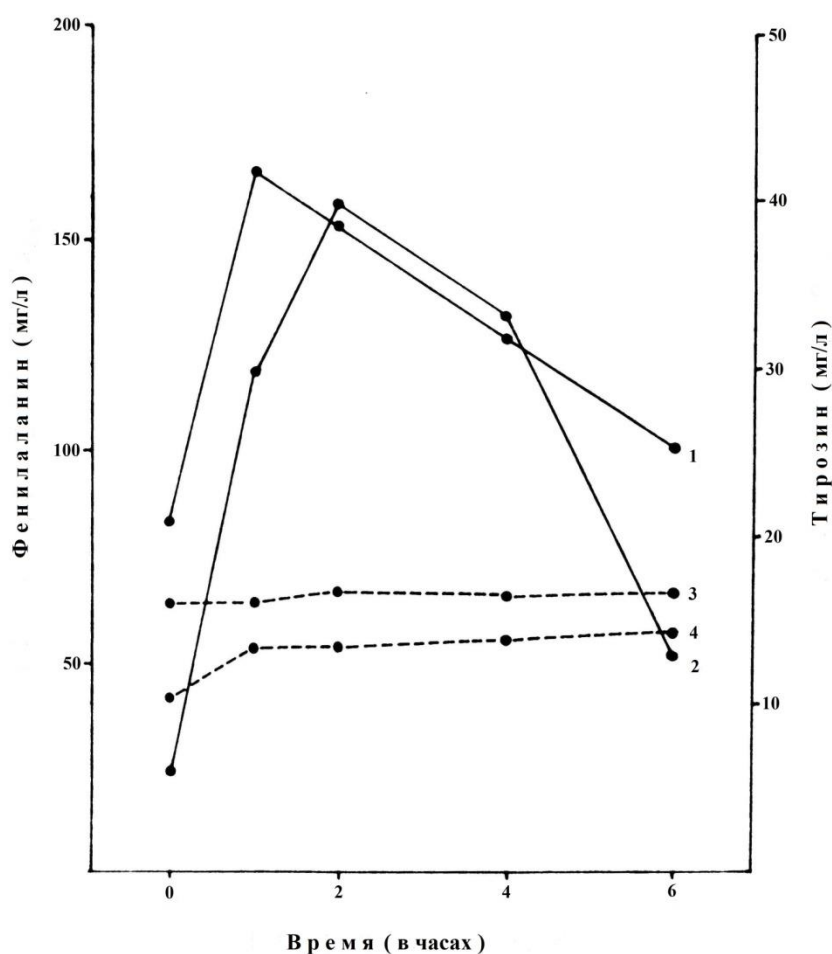


Рисунок 13. Концентрация фенилаланина и тирозина в сыворотке крови при нагрузке фенилаланином больного вирусным гепатитом в тяжелой форме в разгаре заболевания и через 3 месяца – в периоде выздоровления.

1 – уровень фенилаланина в разгаре заболевания; 2 – в период выздоровления; 3 – уровень тирозина в разгаре заболевания; 4 – в период

выздоровления.

На Рисунке 13 представлены результаты нагрузки больного, перенесшего ВГ в тяжелой форме. В разгар заболевания исходный уровень ФА очень высок (кривая 1). Через 6 часов после нагрузки его концентрация не достигла исходного уровня, а концентрация ТИР практически не увеличивалась (кривая 3). В период выздоровления исходный уровень ФА значительно снизился (кривая 2), однако нормализации содержания ФА не наблюдалось и через 6 часов после нагрузки. Уровень ТИР изменился весьма незначительно (кривая 4).

Результаты нагрузки ФА больной с менее тяжелой формой ВГ представлены на Рисунке 14.

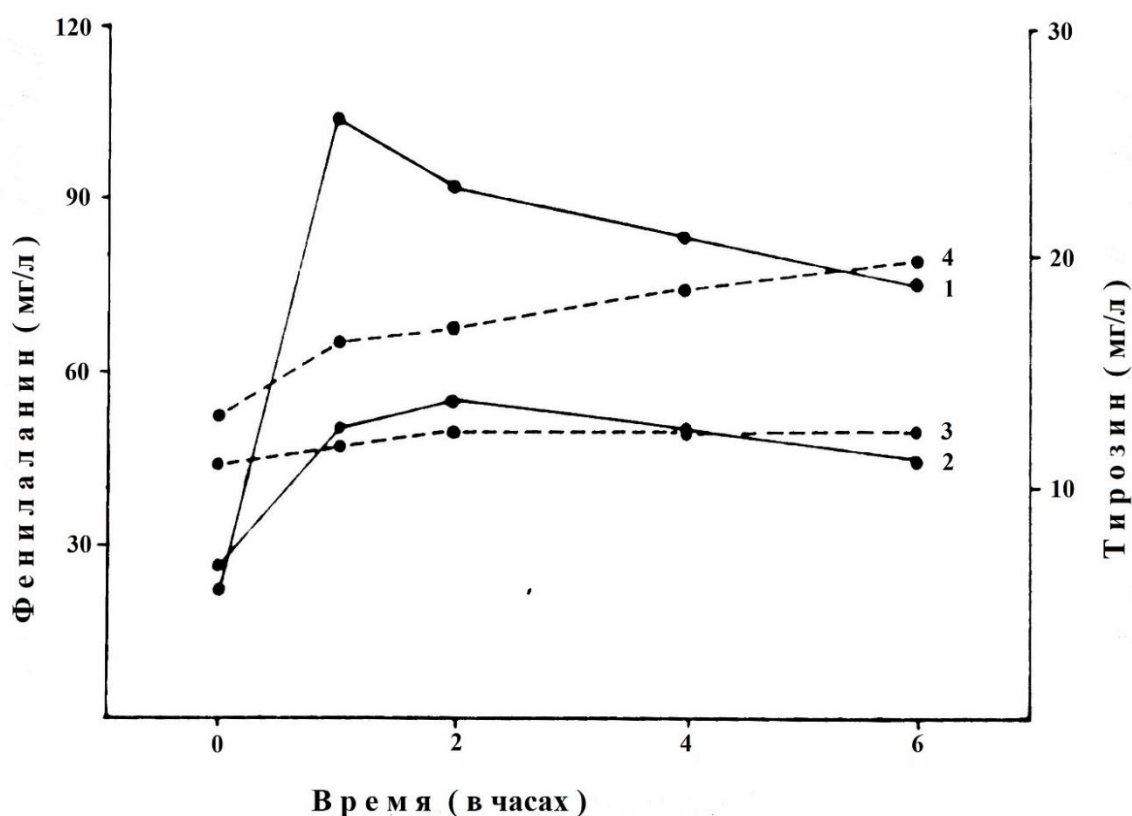


Рисунок 14. Концентрация фенилаланина и тирозина в сыворотке крови при нагрузке фенилаланином больной вирусным гепатитом в среднетяжелой форме и в разгаре заболевания и через 3 месяца – в периоде выздоровления. Обозначения те же, что и на Рисунке 13.

На Рисунке 14 приведены результаты нагрузки больной ВГ в среднетяжелой форме. Обращает внимание, что содержание ФА до нагрузки значительно ниже и в разгар заболевания, и в период выздоровления (кривые 1 и 2) по сравнению с больным с тяжелой формой. Тем не менее, через 6 часов концентрация ФА не возвращалась к исходному уровню (кривые 1 и 2). В разгар заболевания уровень ТИР при нагрузке изменялся незначительно (кривая 3), а в период выздоровления он интенсивно повышался в течение 6 часов после введения ФА (кривая 4). Это указывает на нормализацию биохимических нарушений в период выздоровления.

Кроме этого была проведена нагрузка ФА больного, 30 лет, спустя год после того, как он перенес тяжелую форму ВГ, осложненного печеночной комой. Клинически, спустя год после выписки из стационара, у больного определялись остаточные явления в виде ноющих болей в правом подреберье, увеличение печени, снижение сулемового титра (Рисунок 15).

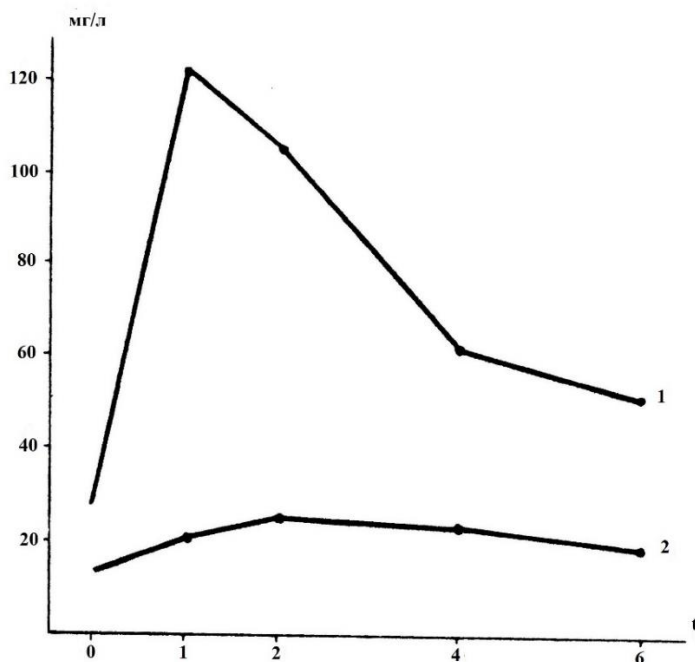


Рисунок 15. Концентрация ФА (1) и ТИР (2) в крови больного ВГ, перенесшим заболевание, осложненное печеночной комой, через 1 год после выписки из стационара. По оси ординат – содержание ФА и ТИР в мг/мл. По оси абсцисс – время нагрузки в часах.

Из Рисунка 15 видно, что у этого больного через год после выписки не наступило нормализации ФАГ-системы, о чем свидетельствует повышенный уровень ФА в крови, и превышение этого показателя в 1,8 раза спустя 6 часов после нагрузки.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у всех больных ВГ содержание ФА в крови увеличено по сравнению с показателем в контрольной группе. Наибольшее увеличение концентрации ФА отмечалось в острой стадии течения болезни – содержание ФА в этот период составляло от 23 до 46 мг/л (в среднем $28,8 \pm 2,2$ мг/л), у больных с хронической формой течения болезни от 18,5 до 26,1 мг/л (в среднем $22,1 \pm 0,8$ мг/л) и в период реконвалесценции от 17,5 до 28,5 мг/л (в среднем $21,0 \pm 0,3$ мг/л). В контрольной группе содержание ФА составляло от 9,8 до 18,6 мг/л (в среднем $16,3 \pm 0,5$ мг/л). Концентрация ТИР у всех групп больных была увеличена в среднем в 1,5; 1,31; 1,62 раза по сравнению с контрольной группой. В моче больных ВГ отмечено появление ФПК, концентрация которой составляла от 28 до 86 мг/л. В контрольной группе ФПК в моче отсутствовала. Концентрация ГГК в моче больных была от 104 до 165 мг/л (в среднем $131 \pm 1,0$ мг/л), в контрольной группе в среднем $96 \pm 0,8$ мг/л. Содержание ЦП в крови у всех больных ВГ было повышено в 2,8 раза по сравнению с аналогичным показателем у здоровых. На спаде клинических симптомов болезни, концентрация ФА, Тир, ЦП в крови и экскреция ГГК и ФПК в моче больных снизилась.

Нагрузка ФА дает возможность выявить нарушение ФАГ-системы печени, что проявляется в замедленном окислении ФА, увеличением экскреции ФПК в моче. Проведенная нагрузка больных после клинического выздоровления показывает, что у больных остаются разной степени выраженности нарушения фенилаланингидроксилазной реакции. Это косвенным образом свидетельствует о том, что у больных снижена активность ФАГ печени.

Для прямого доказательства нарушения активности ФАГ печени нами было проведено определение активности фермента в биоптатах печени 5 больных ВГ

(Таблица 8).

Таблица 8

Активность ФАГ печени (мкМ ТИР/г белка/час), содержание ФА и ТИР в крови (мг/л) и экскреция ФПК с мочой (мг/л) у больных ВГ в зависимости от степени тяжести и стадии болезни

Больные	Возраст в годах	Степень тяжести	Стадия болезни	ФА	ТИР	ФПК	Активность ФАГ печени	
							+ кофактор	- кофактор
1. С-ва В.В.	42	Легкая	Разгар	20,0	8,9	2,0	55,2	-
2. Ч-ва Г.А.	47	Среднетяжелая	Разгар	31,0	15,2	53,0	23,6	2,6
3. С-ва Е.А.	67	“-	“-	35,0	24,0	28,0	18,8	2,0
4. Ш-ов А.И.	26	Легкая	Спад	28,0	11,6	13,0	50,0	-
5. П-ов В.В.	44	Среднетяжелая	Разгар	30,0	12,3	5,0	30,6	-

Оказалось, что активность ФАГ печени больных снижена в различной степени. Активность ФАГ печени больных, заболевание которых протекало в легкой форме в разгар и спад заболевания (больные 1 и 4, Таблица 8) составляет от 55,2 и 50,0 мкМ ТИР/г белка/час, а у больных со среднетяжелой формой болезни в разгар заболевания активность составляла 18,8, 23,6 и 30,6 (в среднем $24,3 \pm 3,4$ мкМ ТИР/г белка/час) (больные 2, 3 и 5, табл. 8). Содержание ФА в сыворотке крови больных также было увеличено. Важно отметить, что у больных с высоким содержанием ФА в крови активность фермента была снижена в большей степени. Кроме того, чем тяжелее протекало заболевание, тем ниже оказалась активность ФАГ. Таким образом, прямое определение активности фермента в печени больных с различной клинической картиной показывает, что чем тяжелее протекает

заболевание, тем более выражены расстройства обмена ФА и ТИР.

Исследуя активность ФАГ, установлено, что у больных фенилкетонурией активность фермента составляет 0,7-13% и ниже до полного отсутствия, у гетерозиготных носителей – 43%, у больных ВГ – 44% по сравнению со средними данными активности людей без патологии печени.

Сопоставляя данные нагрузки ФА и определение активности ФАГ в печени больных ВГ можно заключить, что нарушение реакции гидроксилирования ФА при ВГ обусловлено снижением активности ФАГ печени. Поскольку в период выздоровления у больных ВГ активность ФАГ нормализуется неоднозначно при различной степени тяжести заболевания, то это может служить одним из показателей наличия и выраженности патологического процесса и эффективности лечения.

При ВГ страдает и обмен ТИР: его концентрация в крови увеличивается, с мочой выделяются избыточные количества *n*-ОФПК, ГГК, адреналина и норадреналина. Возможно, что при ВГ нарушение обмена ТИР является вторичным, как следствие дефицита нескольких ферментов, возникающего в результате токсического нарушения обменных процессов в печени.

Особенно разительные изменения метаболизма возникают при острой печеночной недостаточности (ОПН) с развитием печеночной комы, как следствие активной вирусной репликации, как правило, в результате массивной инфицирующей дозы моновозбудителя (HBV), чаще двух возбудителей (HBV+HDV) или еще чаще суперинфекцией новым вирусом - поздняя ОПН (Ивашкин, 2002; Рахманова, 2006). При этом нарушается активность всех компонентов ФАГ-системы печени, и, как следствие, развивается стойкая гиперфенилаланинемия, причем патологические дериваты ФА извращают обмен ТИР и ТРФ, что вызывает дисбаланс обмена нейромедиаторов ЦНС и является причиной психоневрологических расстройств (Шерлок, Дули, 2002; Плотникова с соавт., 2003). При этом нарушения обмена ароматических аминокислот, как и другие биохимические показатели, несмотря на общую направленность, могут

иметь гетерогенные индивидуальные особенности, что необходимо учитывать для прогноза и терапии болезни.

В числе важнейших факторов, ответственных за возникновение печеночной энцефалопатии (ПЭ) считают недостаточность функции печени в обмене ароматических аминокислот (Dejong et al., 2007), что вызывает дисбаланс биогенных аминов, которые, проникая через гематоэнцефалический барьер, нарушают работу нейронов, приводя к возникновению психических и неврологических расстройств (Fogel et al., 1990, Butterworth, 2001).

К числу биогенных аминов (медиаторов, или нейрогормонов) относят катехоламины, ацетилхолин, серотонин, γ -аминомасляную кислоту, гистамин. Медиаторы обладают широким диапазоном действия и оказывают регулирующее влияние на метаболические процессы в организме. Продукты декарбоксилирования аминокислот – такие медиаторы, как катехоламины и серотонин подвергаются общим процессам трансметилирования и окислительного дезаминирования.

Учитывая роль, которую играет печень в обмене катехоламинов, можно предположить, что при ее заболеваниях должны возникнуть значительные изменения обмена этих веществ. Определение коэффициента суммы катехоламинов (ДОФАмина, норадреналина и адреналина) к их химическому предшественнику ДОФА показало его изменение против нормы, что дало основание говорить об усилении процессов превращения ДОФА в катехоламины, в результате чего синтез ДОФА не успевает достаточно восполнить его уровень. При этом основным механизмом нарушения обмена катехоламинов считают увеличение активности ДОФА-декарбоксилазы и снижение активности митохондриальной моноаминоксидазы с уменьшением экскреции ванилилминдальной кислоты, а также снижение активности катехол-О-метилтрансферазы.

В результате исследований метаболизма катехоламинов при заболевании печени было показано значение “фальшмедиаторов” в развитии печеночной

недостаточности (Fisher et al., 1971). Полагают, что нарушения сознания больных с печеночной недостаточностью связаны со снижением образования нейротрансмиттеров, таких как норадреналин, ДОФАмин. При изучении моноаминов в мозге умерших от печеночной комы было выявлено снижение содержания ДОФАмина во всех областях мозга с повышением в них концентрации серотонина (Ивашкин, 2002).

При ВГ вследствие повышения активности бактериальных аминокислотных декарбоксилаз образуются вещества типа тирамина, октопамина и др. со структурой, сходной с норадреналином, вследствие чего они могут накапливаться в нервной системе, заменяя его. Эти “фальшмедиаторы” нарушают нейрохимическую передачу в мозге и вызывают синдром ПЭ. Введение ДОФА – предшественника норадреналина, легко проникающего в мозг, вызывает усиленное образования норадреналина в мозге и вытесняет “фальшмедиаторы”.

Повышение содержания адреналина в крови, по нашим данным, у больных со среднетяжелой формой наблюдалось в разгар болезни у 67,5%, в период реконвалесценции – у 59,1%. Содержание норадреналина было соответственно повышено у 53,5 и 45,4% больных. При тяжелой форме заболевания содержание адреналина было повышено у 71,1% и в период реконвалесценции – у 54,8% больных. Содержание норадреналина было повышено, соответственно, в 52,4% и в 47,5% случаев. Максимальное увеличение содержания адреналина выявлялось в разгар болезни, в период реконвалесценции оно снижалось (Таблица 9).

Таблица 9

Содержание адреналина и норадреналина в крови больных вирусным гепатитом с острой печеночной недостаточностью

Форма гепатита	Фаза процесса	Содержание	
		адреналина (нмоль/л)	норадреналина (нмоль/л)
Среднетяжелая	Разгар	10,5±1,80	11,33±1,95

Тяжелая	Спад	9,02±2,00	26,96±2,18
	Реконвалесценция	2,9±0,53	2,9±0,53
	Разгар	12,20±0,55	22,41±4,13
	Спад	11,44±1,65	26,55±1,13
ОПН	Реконвалесценция	9,90±1,10	18,64±1,18
	Прекома I	11,5±0,24	26,10±1,06
	Прекома II	13,50±0,20	28,90±0,70
	Кома	8,60±0,44	16,34±4,42
	Норма	4,40±0,65	8,07±1,77

Следует отметить, что у больных в состоянии печеночной комы в периоде выраженного психомоторного возбуждения содержание катехоламинов, в особенности адреналина, было низким. При наличии резко выраженного геморрагического синдрома в виде профузного желудочно-кишечного кровотечения уровень катехоламинов незначительно повышался. У больных с поздней печеночной недостаточностью в прекоматозной стадии и даже в период комы определялись высокие показатели адреналина и норадреналина (Рахманова, 2006). При тяжелых заболеваниях печени расстройства сознания обусловлены уменьшением образования серотонина в мозге из-за неспособности переходить в 5-гидрокситриптофан.

Концентрация серотонина крови у больных ВГ с ОПН и комой была повышена: в прекоматозном периоде I - $1,47 \pm 0,06$ мкмоль/л (норма $0,67 \pm 0,034$), в прекоматозный период II - $1,87 \pm 0,21$ мкмоль/л, в периоде печеночной комы - $2,18 \pm 0,18$ мкмоль/л. При этом максимальная степень его изменений отмечена у больных с поздней и подострой комой.

Проведенные исследования дают основание прийти к заключению, что при ВГ с ОПН происходит увеличение содержания катехоламинов и серотонина в

крови. Степень этих изменений находится в зависимости от варианта ОПН: максимальные их величины выявляются при позднем варианте, в то время как при раннем они близки к нормальным. Изменения уровня медиаторов обусловлены нарушениями обмена их предшественников – ароматических аминокислот.

Большое значение в патогенезе ОПН придается накоплению веществ, относящихся к фенольным соединениям. Выявлено токсическое действие свободного фенола, а также ароматических аминокислот и их метаболитов – фенольных соединений, увеличение содержания которых отмечено при тяжелых формах ВГ и печеночной коме в крови, СМЖ и моче больных (Рахманова, 2006).

Исследование обмена ТИР у больных ВГ выявило увеличение содержания этой аминокислоты в крови и моче. Наряду с этим повышалась экскреция метаболитов тирозина: п-ОФПК и ГГК. Накопление ТИР и его метаболитов, фенольных кетокислот, является одной из причин интоксикации при ВГ. Наиболее высокие значения ФА и ТИР определялись нами у больных, находящихся в прекоматозном и коматозном состоянии. Они были несколько выше у больных с поздней ОПН.

Накопление ФА и ТИР в крови способствовало увеличению концентрации продуктов метаболизма, часть из которых токсична для организма (ФПК, п-ОФПК и др.). Степень увеличения содержания ТИР коррелировала с выраженностью симптомов интоксикации и, возможно, была одной из причин накопления катехоламинов.

Изменение метаболитов ФА и ТИР находилось в соответствии с тяжестью и фазой заболевания. В разгар желтушного периода содержание ФПК, п-ОФПК и ГГК повышалось тем больше, чем тяжелее протекало заболевание (Таблица 10).

Таблица 10

Экскреция метаболитов фенилаланина и тирозина при вирусном гепатите с ОПН

Фаза процесса	Экскреция кислот, мг/сут.		
	фенилпирувиноградной	Параоксифенилпирувиноградной	гомогентизиновой
Разгар	107±4,5	197±6,7	199±6,1
Преимущественно с неврологическими явлениями	129±7,0	230±10,0	216±8,0
С диспепсическими явлениями	94±11,0	191±10,3	199±11,0
Спад	53±3,0	142±4,0	156±4,8
Реконвалесценция	0	100±5,3	83±4,0
Норма	0	64±2,0	59±2,0

Для изучения механизмов нарушения обмена этих веществ и их взаимосвязи с динамикой катехоламинов проводились исследования у больных ВГ с нагрузкой ФА и ТИР и с определением содержания этих аминокислот в крови, а их метаболитов в моче. Наряду с этим у данных больных определяли показатели экскреции адреналина и норадреналина, а также их содержание в крови. Следует отметить, что одноразовый прием аминокислот существенно не отражался на состоянии больного.

В Таблице 11 представлены данные о содержании ФА и ТИР в сыворотке крови больных ВГ при нагрузке ТИР.

Таблица 11

Концентрация фенилаланина (ФА) и тирозина (ТИР) в сыворотке крови больных вирусным гепатитом после нагрузки тирозином (мг/л)

Время после нагрузки, ч	Больные						Здоровые лица	
	В разгар болезни				В период реконвалесценции			
	среднетяжелая форма		тяжелая форма					
	ФА	ТИР	ФА	ТИР	ФА	ТИР	ФА	ТИР
До нагрузки	24,0	13,3	36,0	16,9	25,0	17,4	20,0	9,6
1	27,0	26,8	36,0	27,0	31,0	39,1	21,0	18,1
2	32,0	28,0	92,0	34,2	31,0	42,0	26,0	19,2
4	32,0	27,1	49,0	34,7	27,7	30,8	26,0	19,2
6	27,0	21,1	42,0	29,8	32,0	32,6	23,0	15,5
24	25,0	18,8	20,0	29,6	32,0	28,5	27,0	12,4

При нагрузке ТИР содержание его в крови увеличивалось более заметно у больных с тяжелой формой ВГ. Спустя 6 ч. после приема ТИР его уровень у больных ВГ был почти в 2 раза выше исходного. В период реконвалесценции результаты нагрузки ТИР были также значительно изменены, что свидетельствует о нарушениях ферментных систем печени, ответственных за метаболизм ТИР. Накопление ТИР в крови в течение длительного отрезка времени после его приема, по-видимому, является следствием снижения активности печеночных ферментов: тирозингидроксилазы, тирозинаминотрансферазы, ДОФА-декарбоксилазы, оксидазы п-оксифенилпировиноградной кислоты.

У больных ВГ происходят изменения других ферментных систем, участвующих в метаболизме ТИР: при нагрузке ТИР экскреция п-ОФПК

повышается, а экскреция ГГК кислоты не меняется или даже снижается, что позволяет предполагать снижение активности фермента параоксифенилпируватоксидазы. Возможно, в изменении метаболизма ТИР имеет значение дефицит ряда кофакторов, таких как аскорбиновая кислота, пиридоксальфосфат, а также нарушения функции коры надпочечников. Содержание ФПК при нагрузке ТИР заметно не менялось.

В отличие от здоровых людей экскреция п-ОФПК к исходной не возвращалась, экскреция ГГК существенно не менялась. Это подтверждает высказанное нами ранее предположение о торможении активности тирозинаминотрансферазы печени и окислительного распада ТИР также и на следующем этапе его превращения – до ГГК.

Одной из причин нарушения обмена изучаемых ароматических аминокислот могут быть изменения содержания кофакторов, входящих в состав специфических ферментных систем, в частности, тетрагидробиоптерина – основного кофактора гидроксилаз всех ароматических аминокислот. Недостаток витамина С в организме больных ВГ является дополнительным фактором, способствующим накоплению в организме продуктов неполного распада ФА и ТИР.

При изучении влияния нагрузок ФА и ТИР на содержание адреналина и норадреналина в крови и моче выявлены разнонаправленные изменения. При нагрузке ФА (Рисунок 16) экскреция адреналина с мочой несколько уменьшалась, а норадреналина – не менялась. Содержание адреналина в крови снижалось более заметно, составляя до нагрузки 9,57 нмоль/л, спустя 2 ч – 3,35 нмоль/л, через 24 ч – 10,12 нмоль/л. Содержание норадреналина было, соответственно, равно 10,45 нмоль/л; 14,87 нмоль/л; 15,75 нмоль/л. Таким образом, при нагрузке ФА происходило уменьшение содержания адреналина и повышение норадреналина. Уменьшение адреналина можно объяснить ингибирующим влиянием ФПК, который образуется при приеме ФА, на активность фермента ДОФА-декарбоксилазы, обеспечивающего образование ДОФАмина, предшественника

норадреналина.

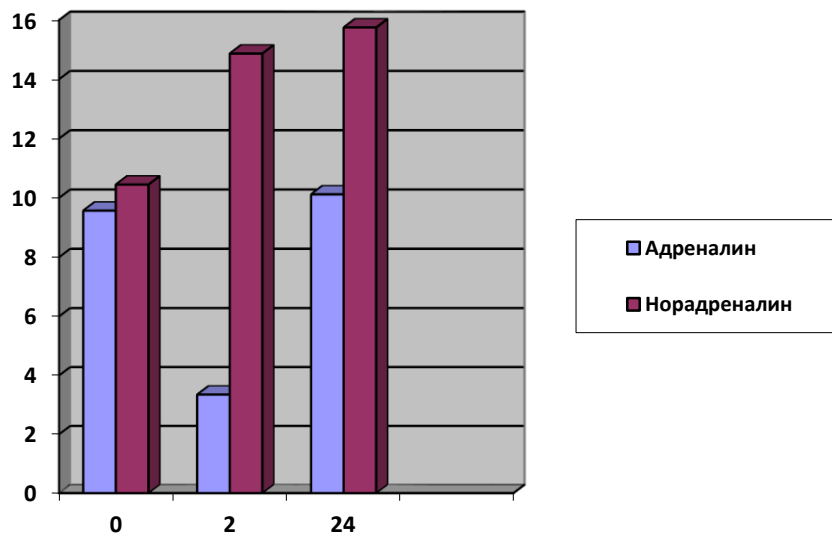


Рисунок 16. Концентрация адреналина и норадреналина (нмоль/л) в крови больного вирусным гепатитом после нагрузки фенилаланином (в часах).

При нагрузке ТИР у больных ВГ наблюдалось повышение экскреции адреналина и норадреналина с мочой в первые сутки после нагрузки (Таблица 12).

Таблица 12

Содержание адреналина (А) и норадреналина (НА) в крови больных вирусным гепатитом при нагрузке тирозином (нмоль/л)

Время после нагрузки ч	Больные				Здоровые лица	
	в разгар болезни		в период реконвалесценция			
	А	НА	А	НА	А	НА
До нагрузки	5,11±1,10	10,32±1,77	5,50±0,55	14,45±2,36	4,40±2,20	8,07±4,72
1	7,97±1,10	19,21±4,72	15,01±1,10	10,97±1,77	3,96±0,55	10,05±4,13
	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,01	<i>P</i> < 0,05			
2	7,21±2,75	15,57±5,31	12,10±1,65	10,03±2,36	3,96±1,10	14,39±2,36

			$P < 0,05$	$P < 0,05$		
24	11,99±3,85	15,28±5,31	6,93±2,75	6,90±4,13	7,90±3,85	10,90±2,36
	$P < 0,01$			$P < 0,05$		

Содержание адреналина и норадреналина в крови у большинства больных увеличивалось. Нагрузка в период реконвалесценции выявила ту же закономерность. У здоровых лиц наблюдалась противоположное явление: экскреция адреналина и норадреналина уменьшалась и содержание их в крови спустя 1 и 2 ч. снижалось. Повышенное образование катехоламинов у больных ВГ при нагрузке их ТИР, по-видимому, обусловлено извращением обмена аминокислот и катехоламинов, увеличением их синтеза и нарушением распада.

Отмечено достоверное снижение содержания серотонина в крови у больных ВГ в первые 2 ч. после приема ТИР (до нагрузки 1,12 мкмоль/л, спустя 2 ч. – 0,72 мкмоль/л, $P < 0,01$). Аналогичное явление наблюдалось и у здоровых лиц (Рисунок 17).

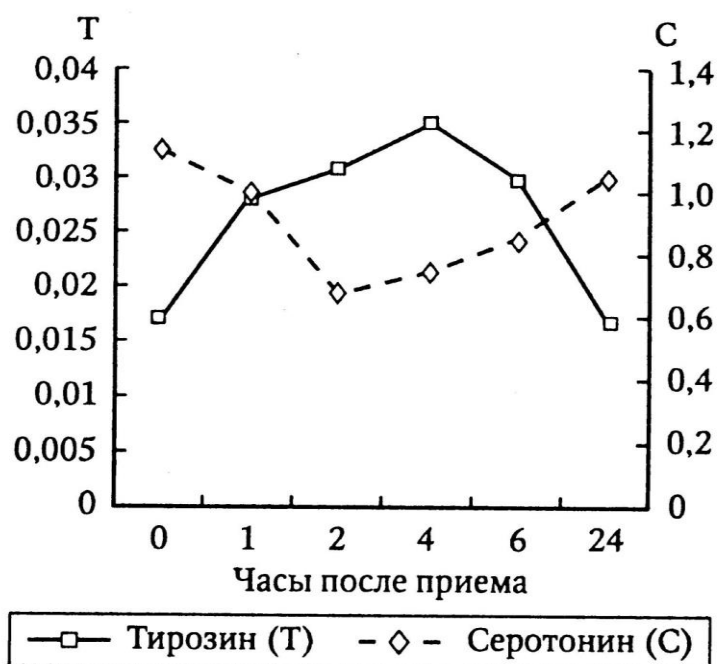


Рисунок 17. Концентрация тирозина и серотонина (мкмоль/л) в крови больных вирусным гепатитом после нагрузки тирозином.

Эти данные можно объяснить ингибирующим влиянием ТИР и ФА на активность ферментов, участвующих в метаболизме ТРФ.

Таким образом, нагрузки больных ВГ ФА и ТИР выявляют метаболические дефекты ФАГ-системы печени. Обнаруженные биохимические нарушения в обмене ФА при ВГ характерны и для больных фенилкетонурией; наши данные близки результатам, полученным при нагрузке ФА гетерозиготных носителей гена фенилкетонурии, у которых дефект ФАГ-системы обусловлен генетически. Определение активности ФАГ в биоптатах печени больных ВГ показало снижение активности фермента.

В настоящее время выявлено более 950 различных мутаций в гене ФАГ (Scriver, 2007; Blau, 2016), а частота носительства мутантного аллеля составляет 1:50 (Scriver et al., 2001) в общей популяции. Частота осложнений ОПН печеночной комой составляет 1:40-100 больных. Вполне вероятно, что ОПН и кома при ВГ развивается у гетерозиготных носителей гена ФАГ, а гомозиготные носители не мутантного гена ФАГ переносят ВГ в легкой форме или являются вирусоносителями. В пользу этого предположения свидетельствуют многочисленные данные о наследственной предрасположенности к инфекционным заболеваниям, в частности к ВГ человека в зависимости от генотипа (Blumberg et al., 1969; Cooke, Hill, 2001; Clementi, Di Gianantonio, 2006; Chapman, Hill, 2012).

При ВГ страдает обмен ТИР: его концентрация в крови увеличивается, с мочой выделяются в избыточном количестве п-ОФПК, адреналин и норадреналин (Бала и др., 1970, Krauns et al., 1985). Возможно, и при ВГ нарушение обмена ТИР является вторичным следствием дефекта ФАГ-системы. Накопление в организме ФА и его производных может обуславливать аллостерическое ингибирование ферментов, участвующих в превращениях ТИР. Данные о том, что при ВГ выделяются большие количества п-ОФПК, подтверждают это предположение. Изменение уровня серотонина свидетельствует о нарушении обмена ТРФ. Обнаружено, что активация серотонинергической или дофаминергической системы вызывает соответственно иммуносупрессию или иммуностимуляцию

(Королева с соавт., 2006), однако взаимодействие этих двух систем, В-факторов и огромного пула регуляторных пептидов изучены недостаточно, особенно при ПЭ. Следует отметить, что изменения в ЭЭГ при ОПН (Рахманова, 2006) практически полностью совпадают с данными ЭЭГ некоторых гетерозиготных носителей гена ФАГ (Матусова и др., 1971). Изменения, выявляемые на ЭЭГ при ВГ, свидетельствуют об угнетении деятельности корковых нейронов, а также о вовлечении в патологический процесс подкорковых и стволовых структур головного мозга.

Церулоплазмин (ЦП) кроме медьтранспортной функции осуществляет окисление в крови норадреналина, дофамина, адреналина и серотонина (Walaas et al., 1966). Нами было установлено, что активность ЦП (в мг/л) у 40 здоровых людей составляет $355,0 \pm 61,6$, а у 44 больных ВГ и у 15 человек с циррозом печени активность ЦП составляет $625,7 \pm 38,0$ и $683,0 \pm 57,0$ соответственно. Вероятно, увеличение содержания биогенных аминов в крови приводит к активированию ЦП гистамином (который является положительным аллостерическим эффектором ЦП) (Тинтерис, Шапошников, 1978), что в свою очередь сопровождается снижением уровня катехоламинов за счет их окисления активированным ЦП. Следует отметить, что при ВГ и циррозе печени содержание свободного гистамина в крови увеличивается в 5-10 раз (Геллер, Козлова, 1970). Ведущая роль в “срочной” регуляции уровня катехоламинов в крови принадлежит гистамину, который при взаимодействии с ЦП увеличивает оксидазную активность фермента. Увеличение в 2 раза активности ЦП при ВГ показывает, что нарушено динамическое равновесие уровня биогенных аминов в крови. Гиперцерулоплазминемия возникает не за счет ускоренного синтеза ЦП в печени и его выхода в кровяное русло, а в результате увеличения оксидазной активности гистамином, как аллостерическим, положительным эффектором (Шапошников и др., 2008).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что при ВГ нарушен обмен ароматических аминокислот, активность ФАГ печени снижена на 44% у больных со среднетяжелой степенью заболевания, т.е. нарушена реакция

гидроксилирования ФА в ТИР. Нарушение ФАГ-системы является пусковым звеном в развитии нарушений обмена ТИР и ТРФ, что при развитии ОПН сопровождается ПЭ. Как компенсаторная реакция происходит увеличение активности ЦП, которая коррелирует со степенью нарушения обмена биогенных аминов. Поскольку в период выздоровления больных ВГ метаболизм ФА нормализуется неоднозначно при разной степени тяжести заболевания, можно судить о наличии и выраженности патологического процесса и об эффективности лечения. Целесообразно, включать в схему лечения тетрагидробиоптерин, что приведет к нормализации обмена ароматических аминокислот.

3.7. Выявление биохимических и молекулярно-генетических нарушений фенилаланингидроксилазной системы у больных хроническим алкоголизмом

Алкогольная болезнь сопровождается множественными психоневрологическими и соматическими расстройствами. В патогенезе этих расстройств – нарушение метаболизма нейромедиаторов и токсическое поражение печени. Наше исследование проводилось с целью выяснения влияния нарушения метаболизма фенилаланина и его дериватов на патогенетические механизмы упомянутых расстройств.

Исследование фенилаланина и тирозина в крови и их метаболитов в моче у больных алкоголизмом и лиц контрольной группы представлено в Таблице 13.

Таблица 13

Концентрация фенилаланина и тирозина в сыворотке крови, отношение фенилаланин: тирозин и экскреция фенилаланина, фенилпировиноградной и гомогентизиновой кислот с мочой у больных хроническим алкоголизмом, мг/л ($M \pm m$)

Исследуемая жидкость	Показатель	Больные хроническим алкоголизмом		Контрольная группа
		при абстинентном синдроме	в состоянии ремиссии	
Сыворотка крови	Фенилаланин	24,3±1,6*	19,6±0,5	18,0±1,7
	Тирозин	9,6±0,9*	8,3±0,18*	11,4±0,3
	Фенилаланин/тирозин	2,53	2,36	1,58
Моча	Фенилпировиноградная кислота	57,0±6,0*	0	0
	Гомогентизиновая кислота	82,0±6,0*	86,0±14,7	104,0±0,3
	Фенилаланин	28,3±1,6*	21,0±1,1	19,0±2,3

Приведенные данные показывают, что у больных алкоголизмом содержание фенилаланина в сыворотке крови повышено, а уровень тирозина снижен по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Особенно наглядно различия в уровне аминокислот обнаруживаются при расчете отношения фенилаланин/тирозин. Наиболее выраженные нарушения в содержании аминокислот в крови выявлены у больных в состоянии абстиненции. У больных в период ремиссии, несмотря на воздержание от приема алкоголя в течение месяца и более, когда практически все клинические показатели нормализовались, уровень фенилаланина оставался повышенным, а тирозина - сниженным по сравнению с таковыми в контрольной группе. Исследование мочи подтвердило, что метаболизм фенилаланина и тирозина у больных алкоголизмом изменен. Так, нарушение обмена фенилаланина при алкогольном абстинентном синдроме приводит к патологическому увеличению экскреции фенилпировиноградной

кислоты, которая отсутствует в моче здоровых людей и у больных алкоголизмом в период ремиссии. Избыточная экскреция фенилаланина с мочой выявлена как при абстиненции, так и в период ремиссии. Снижение экскреции гомогентизиновой кислоты, являющейся метаболитом обмена тирозина, указывает на нарушение обмена последнего.

Особенно отчетливо нарушения обмена фенилаланина и тирозина выявляются при нагрузке больных фенилаланином, Нагрузочный тест позволяет оценить активность фенилаланин-гидроксилазной системы печени и количественно определить скорость гидроксилирования фенилаланина в организме (Таблица 14).

Таблица 14

Концентрация фенилаланина, тирозина, отношение фенилаланин: тирозин в сыворотке крови и содержание фенилпировиноградной и гомогентизиновой кислот в моче больных хроническим алкоголизмом при нагрузке L-фенилаланином, мг/л

Обследуемая группа	Время в часах после нагрузки	Сыворотка крови			Моча		
		фенилаланин	тирозин	Фенилаланин/тирозин	фенилпировиноградная кислота	гомогентиновая кислота	фенилаланин
Больные в период ремиссии	0	17,2±1,1	8,1±0,6*	2,12	0,0	85,8±6,8	18,9±2,0
	1	92,5±5,5	10,4±0,9*	8,88	21,0±0,4*	117,0±8,9	88,5±12,0
	2	-	-	-	35,0±1,2*	119,0±7,5	118,0±9,6
	4	41,5±6,0*	13,7±1,3	3,03	31,0±0,9*	128,0±8,7	89,7±2,4
	6	22,5±2,8	11,7±0,3*	1,83	17,0±0,5*	117,0±11,0	-
Больные с абстинентным	0	29,3±3,2*	11,2±1,9	2,59	66,7±8,1*	85,7±6,0	25,3±2,2
	1	71,5±13,6	14,9±3,7	4,80	85,7±7,6*	91,7±3,4*	60,0±12,0
	2	105,2±9,6*	17,2±2,5	6,10	96,7±11,2*	109,0±12,5*	101,0±9,6

синдромом	4	65,0±12,2*	16,2±1,1	4,07	80,7±9,8*	103,0±5,5*	95,0±12,0
	6	38,0±3,6*	13,3±0,6	2,05	72,0±9,3*	86,3±4,9*	76,7±6,4
Контрольная группа	0	17,9±2,4	12,0±0,4	1,49	0,0	9,85±0,48	17,6±0,8
	1	74,2±9,6	19,2±0,8	3,86	0,0	12,81±0,65	63,8±1,2
	2	36,0±2,1	17,5±1,0	2,69	0,0	15,42±1,32	82,0±2,2
	4	23,0±0,9	14,6±0,7	1,57	0,0	16,84±1,25	53,4±1,7
	6	17,1±1,8	14,3±1,1	1,20	0,0	13,54±2,00	28,2±0,9

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Из Таблицы 14 видно, что как в состоянии абстиненции, так и в период ремиссии даже через 6 ч после нагрузки уровень фенилаланина в сыворотке крови не возвращается к исходному, в то время как в контрольной группе содержание этой аминокислоты нормализуется. У здоровых людей фенилпировиноградная кислота в моче при нагрузке не определяется, но у больных она выделяется в значительных количествах, причем максимальное выделение этого метаболита обнаружено у больных с абстинентным синдромом.

На Рисунке 18 представлены результаты нагрузки фенилаланином больного хроническим алкоголизмом с *delirium tremens*.

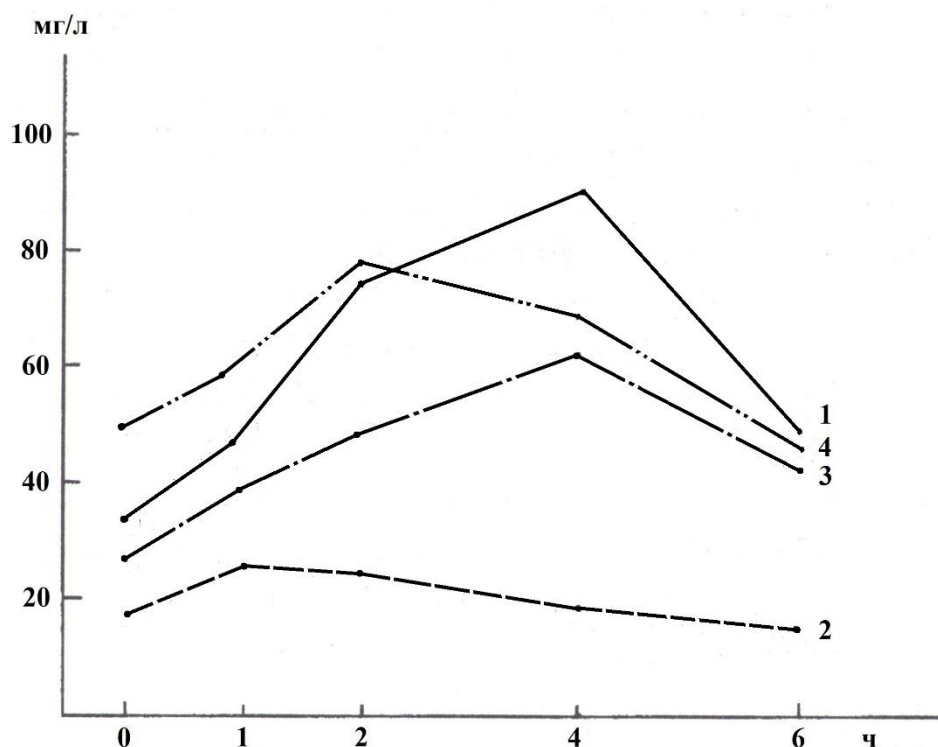


Рисунок 18. Результаты нагрузки L-фенилаланином больного хроническим алкоголизмом, осложненным *delirium tremens*.

1 и 2 — фенилаланин и тирозин в сыворотке крови соответственно, 3 и 4 — фенилаланин и фенилпировиноградная кислота в моче соответственно. По оси ординат - концентрация, в мг/л; по оси абсцисс - время после нагрузки, в ч.

Данные нагрузки показывают, что у этого больного резко нарушено превращение фенилаланина в тирозин, о чем свидетельствуют высокий исходный уровень фенилаланина в крови и моче, резкое увеличение содержания фенилаланина через 4 ч после нагрузки в крови и в моче. Даже через 6 ч после нагрузки концентрация фенилаланина в крови превышала исходный уровень в 1,6 раза и в моче в 1,9 раза, в то время как содержание тирозина в крови в процессе нагрузки увеличивалось незначительно.

Результаты исследования показывают, что при хроническом алкоголизме концентрация фенилаланина в крови возрастает, а уровень тирозина снижается. Это сопровождается выделением с мочой избыточных количеств фенилаланина и

фенилпировиноградной кислоты у больных в состоянии абстиненции. При проведении нагрузки фенилаланином выявлено, что у больных хроническим алкоголизмом страдает фенилаланингидроксилазная система печени. Нарушение гидроксилирования фенилаланина может быть обусловлено торможением синтеза или активности фенилаланингидроксилазы в результате действия алкоголя и его метаболитов. Указанные нарушения фенилаланингидроксилазной системы печени приводят к тому, что фенилаланин в тканях вступает в реакцию переаминирования с α -кетоглутаровой кислотой и превращается в фенилпировиноградную кислоту.

Обнаруженные при алкоголизме нарушения в обмене фенилаланина сходны с нарушениями у больных вирусным гепатитом, а также с результатами, полученными при нагрузке фенилаланином гетерозиготных носителей гена фенилкетонурии, у которых дефект фенилаланингидроксилазной системы генетически детерминирован, а активность фенилаланингидроксилазы, составляет менее 50% по сравнению с таковой у здоровых людей.

Наиболее выраженные нарушения обмена фенилаланина и тирозина обнаружены у больных с абстинентным синдромом. У больных этой группы концентрация фенилаланина была значительно выше, а уровень тирозина ниже по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Выделение фенилпировиноградной кислоты было увеличено, а экскреция гомогентизиновой кислоты снижена, что указывает на нарушение обмена тирозина при хроническом алкоголизме. Особенно наглядным является нарушение обмена фенилаланина и тирозина при нагрузке больных хроническим алкоголизмом с «белой горячкой».

Представленные данные позволяют предположить взаимосвязь выраженности психических нарушений на фоне алкогольной интоксикации со степенью нарушения фенилаланингидроксилазной системы и извращением обмена фенилаланина и тирозина. Снижение активности фенилаланингидроксилазной системы печени может вести к накоплению фенилаланина и его патологических дериватов в ткани мозга, что вызывает нарушение обмена биогенных аминов в центральной нервной системе.

Мы также предположили, что у больных хроническим алкоголизмом, особенно имеющими в анамнезе случаи *delirium tremens* могут иметься мутации в гене ФАГ, т.е., эти больные являются гетерозиготными носителями ФКУ. С этой целью группа больных алкоголизмом 2–3 стадии была протестирована на наличие мажорной мутации R408W, характерной для ФКУ.

Как известно по литературным данным средняя частота гетерозиготного носительства ФКУ в различных популяциях составляет 1:40-200. При обследовании контрольной группы на мутацию R408W, которая встречается у 65-70% больных ФКУ, наши экспериментальные данные совпали с данными других исследователей, т.е. выявленная нами частота гетерозиготного носительства ФКУ по мутации R408W составила 2,39%.

При обследовании пациентов с хроническим алкоголизмом по мутации R408W эта цифра оказалась значительно выше. Так, среди 156 больных хроническим алкоголизмом было выявлено 11 человек, являющихся гетерозиготными носителями данной мутации, что составляет 7,05% (Khalchitsky et al., 2012; Комов, Khalchitsky et al., 2015).

Вследствие того, что среди больных хроническим алкоголизмом количество гетерозиготных носителей ФКУ явно выше, мы предполагаем, что дефект фенилаланингидроксилазной системы является предрасполагающим фактором к развитию алкогольной болезни и возникновению *delirium tremens*. Одним из возможных механизмов такого явления является врожденное нарушение обмена нейромедиаторов ЦНС у гетерозиготных носителей ФКУ, которое проявляется в психологическом дискомфорте, эмоциональной неустойчивости, склонности к девиантному поведению. Употребление алкоголя, с одной стороны, временно смягчает подобную симптоматику, а с другой – ускоряет алкоголизацию и явления психической и физической зависимости, а в дальнейшем приводит к более тяжелым соматическим и психоневрологическим расстройствам в данной группе больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование биохимических и молекулярно-генетических аспектов наследственных и экзогенных гиперфенилаланинемий является комплексным решением актуальных задач по выяснению этиологии и патогенеза этой группы заболеваний.

Первая часть работы относится к области изучения метаболизма фенилаланина и тирозина и их дериватов, выявления клинической и биохимической гетерогенности фенилкетонурии.

Для более глубокого выявления нарушений метаболизма фенилаланина и тирозина применялся метод пероральной нагрузки фенилаланином с последующей оценкой превращения фенилаланина в тирозин в течение 6 часов. Этот метод позволил косвенным образом оценить активность фенилаланин-гидроксилазной системы у больных гиперфенилаланинемией, выявить скрытые нарушения метаболизма фенилаланина и тирозина у гетерозиготных носителей ФКУ. Проводилось также прямое исследование активности фенилаланин-гидроксилазы с использованием кофактора тетрагидробиоптерина. Были выявлены случаи атипичной ФКУ, не реагировавшей на добавление кофактора.

Одновременно проводилась работа по оценке нарушений метаболизма фенилаланина и тирозина при патологических состояниях, не связанных с наследственными нарушениями фенилаланин-гидроксилазы. Впервые было проведено исследование нарушений метаболизма фенилаланина и тирозина при болезни Дауна и выявлены особенности метаболизма этих аминокислот, отличающиеся от нормы, но не характерные для других видов гиперфенилаланинемий.

Кроме биохимических исследований впервые в нашей стране автором стали применяться молекулярно-биологические методы исследования оценки молекулярного дефекта в гене фенилаланин-гидроксилазы.

В частности, впервые была сконструирована к-ДНКовая клонотека печени человека на основе бактериофаге λ gt10 для молекулярного анализа гена фенилаланингидроксилазы.

Освоенный впервые в нашей стране метод полимеразной цепной реакции в собственной модификации, был также впервые применен для выявления мутаций в гене фенилаланингидроксилазы в российской популяции и опубликованы статьи в ведущих российских и зарубежных научных журналах.

Впервые методом ПЦР в нашей стране были выявлены мутации в кодонах 408, 261, 158, сайте сплайсинга IVS12 гена фенилаланингидроксилазы с подтверждением с помощью секвенирования.

Автором также была усовершенствована методология ПЦР с проведением впервые ПЦР-реакции на источнике ДНК, иммобилизованном на мембранных фильтрах и Гатри-картах.

Это позволило начать массовый скрининг больных ФКУ на наличие мутаций в Санкт-Петербурге и других регионах России.

Нарушения обмена фенилаланина и тирозина имеют не только наследственную природу. Поскольку фенилаланингидроксилаза в основном экспрессируется в печени можно предположить, что при заболеваниях, связанных с повреждением печени будет страдать и фенилаланингидроксилазная система. Также, как и при фенилкетонурии это может приводить к дисбалансу нейромедиаторов, появлению патологических метаболитов фенилаланина, и как следствие – к психоневрологическим расстройствам. Однако, эта проблема в научной литературе ранее практически не исследовалась.

Наши исследования больных вирусным гепатитом подтвердили снижение активности фенилаланингидроксилазы и нарушение метаболизма фенилаланина и тирозина при этом заболевании. Получены доказательства, что чем серьезнее нарушения фенилаланингидроксилазной системы (т.е. снижение активности фенилаланингидроксилазы, повышение уровня фенилаланина, увеличение

соотношения фенилаланин/тирозин, появление в моче фенилпировиноградной кислоты), тем острее клинические проявления психоневрологических расстройств.

Аналогичная картина имеет место при хроническом алкоголизме. При тяжелых стадиях хронического алкоголизма, осложненных алкогольным делирием, нарушения фенилаланин-гидроксилазной системы особенно серьезны. В моче появляется фенилпировиноградная кислота; это свидетельствует о том, что фенилаланин-гидроксилаза не справляется с превращением фенилаланина в тирозин и образуется токсический продукт, содержание которого особенно велико при алкогольном делирии. Это указывает на серьезное поражение ЦНС. Уровень фенилаланина высок и не приходит к норме даже в ремиссии.

Таким образом, было доказано, что нарушения фенилаланин-гидроксилазной системы при гиперфенилаланинемиях экзогенного происхождения влияют на развитие психоневрологических расстройств, вызывают сходную клиническую симптоматику с проявлениями фенилкетонурии, а их нормализация приводит к значительному улучшению состояния больного.

Еще одним важным обстоятельством, влияющим на проявления психоневрологических расстройств при алкоголизме, оказался установленный нами факт, что среди больных хроническим алкоголизмом гетерозиготные носители фенилкетонурии встречаются почти в три раза чаще, чем в обычной популяции.

Дальнейшей перспективой нашей работы является расширение спектра исследований фенилаланин-гидроксилазной системы в плане изучения компонентов, связанных с метаболизмом кофактора ФАГ тетрагидробиоптерина и его влияние не только на метаболизм фенилаланина, но и других ароматических аминокислот при психоневрологической и сердечно-сосудистой патологии.

ВЫВОДЫ

1. При комплексном биохимико-генетическом обследовании с использованием методов нагрузки фенилаланином, определением уровня фенилаланина и его дериватов в сыворотке крови и моче, определения мутационных повреждений в гене фенилаланингидроксилазы, выявлена взаимосвязь характера мутационного повреждения гена фенилаланингидроксилазы и особенностей нарушения метаболизма фенилаланина и его дериватов у больных наследственными формами гиперфенилаланинемий и гетерозиготных носителей мутаций гена фенилаланингидроксилазы.
2. Нарушения метаболизма фенилаланина и тирозина при болезни Дауна обнаруживаются при нагрузке L-фенилаланином. Эти нарушения могут быть одной из причин развития слабоумия при данном заболевании.
3. У больных с вирусным гепатитом выявлены нарушения обмена фенилаланина и тирозина. Выраженность этих нарушений коррелирует со степенью тяжести патологии и наличием психоневрологических расстройств.
4. Нарушения метаболизма фенилаланина и тирозина у больных хроническим алкоголизмом зависят от стадии заболевания и его обострений в виде абстинентного синдрома и алкогольного делирия. Наиболее выраженные изменения характерны для абстинентного синдрома и алкогольного делирия.
5. У больных хроническим алкоголизмом выявлено трехкратное повышение частоты гетерозиготного носительства мутации R408W в гене фенилаланингидроксилазы по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – адреналин
БНА – большие нейтральные аминокислоты
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВГ – вирусный гепатит
ГГК – гомогентизиновая кислота
ГТФ - гуанозинтрифосфат
ГФА – гиперфенилаланинемия
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА – диоксифенилаланин
ДГПР – дигидроптеридинредуктаза
ДТТ - дитиотрейтол
ДФР – дигидрофолатредуктаза
МАО - моноаминоксидаза
НА – норадреналин
ОПН – острая печеночная недостаточность
п-ОФПК — параоксифенилпировиноградная кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭ – печеночная энцефалопатия
РФК – реактивные формы кислорода
СОД - супероксиддисмутаза
ТГ - тирозингидроксилаза
ТИР – тирозин
ТРГ - триптофангидроксилаза
ТРФ – триптофан
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ФА – фенилаланин

ФАГ – фенилаланингидроксилаза

ФАГ – ген фенилаланингидроксилазы

ФКУ – фенилкетонурия

ФМК – фенилмолочная кислота

ФУК – фенилуксусная кислота

ФЭА - фенилэтиламин

ФПК – фенилпировиноградная кислота

ХПН – хроническая почечная недостаточность

ЦНС – центральная нервная система

ЦП - церулоплазмин

ВН4 – тетрагидробиоптерин

ДНА – докозогоксаеновая кислота

ГТРСН – ГТФ-циклогидролаза I

NOS – NO-синтаза

РTPS - 6-пирувоилтетрагидроптеринсинтаза

SDS – додецилсульфат натрия

SR - сепиаптеринредуктаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бала Ю.М., Немых В.Н. Содержание свободных аминокислот и аминокислотный состав гамма-глобулина у больных с заболеваниями печени. // Советская медицина. - 1970, № 3. - С. 15–18.
2. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Вирусные гепатиты. Рига: Звайгзне, 1988. 412 с.
3. Геллер Л.И., Козлова З.П. Некоторые показатели обмена гистамина при болезнях печени. // Вопросы мед. химии. - 1970, № 4. - С. 366–367.
4. Гиттер А., Хейльмейер Л. (ред.). Справочник по клиническим функциональным исследованиям. М., «Медицина», 1966. – С. 552-554.
5. Давиденкова Е.Ф. (ред.). Болезнь Дауна, Л., «Медицина», 1966. 453 с.
6. Ивашкин В.Т. (ред.). Болезни печени и желчевыводящих путей, М., «М-Вести», 2002. 416 с.
7. Концевая Н.Г., Рицнер М.С. Метаболизм тирозина и триптофана у детей с болезнью Дауна // Педиатрия. – 1972. - №3. - С. 52-56
8. Королева С.В., Николаева А.А., Ашмарин И.П. Взаимодействие дофамина, серотонина и других факторов внутреннего подкрепления // Известия РАН, серия биологическая. - 2006, № 4. - С. 457–469.
9. Кузьмин А.И, Хальчицкий С.Е., Скрыбин Б.В., Кабоев О.К., Шварц Е.И. Простые методы энзиматической амплификации ДНК для клинической практики // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1991. - №8. - С. 6-8
10. Матулевич С.А., Голихина Т.А., Денисенкова Е.В., Бакулина Е.Г., Назаренко Л.П., Лязина Л.В., Бушуева Т.В., Николаева Е.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии. М., 2013. 43 с.
11. Матусова С.И., Мелючева Л.А., Шапошников А.М. Экспрессивность гена фенилкетонурии у гомо- и гетерозиготных носителей. // В кн.: Проблемы психопатологии детского возраста. Л., 1971. – С. 49–54.

- 12.Меньшиков В.В. (ред.) Лабораторные методы исследования в клинике. М. «Медицина», 1987. – С. 256-259.
- 13.Нейфах С.А., Шапошников А.М. Биохимико-генетические представления о фенилпировиноградной олигофрении // Журнал невропатологии и психиатрии имени С.С. Корсакова, - 1965. - Т. 65, № 7. - С. 1104-1113.
- 14.Никифоров И.А., Чернобровкина Т.В., Жовнерчук Е.В., Исаев Р.Н., Казанцев А.В., Жуйков В.Ю., Ганцева И.П., Матушкин А.А., Матушкина Т.С., Никифоров И.И. Поражение печени при алкоголизме // Профилактическая медицина. - 2014. - Т. 17, №3. - С. 55-61.
15. Плотникова Ю.К., Леоненко В.В., Котова И.В. и др. К вопросу о печеночной энцефалопатии // Журнал инфекционной патологии. – 2003. - Т. 10, №4. - С. 82-83.
- 16.Рахманова А.Г. (ред.) Хронические вирусные гепатиты и цирроз печени. СПб: СпецЛит, 2006. 412 с.
- 17.Скрябин Б.В., Ковальчук Л.А., Хальчицкий С.Е., Гольцов А.А., Кабоев О.К., Плуталов О.В., Берлин Ю.А., Шварц Е.И. Определение природы мутационного повреждения в 12-м экзоне фенилаланингидроксилазного гена у больных фенилкетонурией // Биоорганическая химия. – 1989. - Т. 15, № 12. – С. 1690-1692.
- 18.Студеникин В.М., Боровик Т.Э., Бушуева Т.В. Фенилкетонурия у детей и ее лечение // Лечащий врач. - 2011. - № 9. - С.55-58.
- 19.Тинтерис Л.В., Шапошников А.М. Аллостерическая регуляция активности церуплазмина // Биохимия. – 1978. - Т. 43, вып. 6. - С. 979–987.
- 20.Хальчицкий С.Е., Мхеидзе М.О., Никифорова И.Ф., Иванов И.А., Стадник Н.П., Шабанова Е.С. Выявление мутации R408W среди больных ФКУ в Ленинградской области // Клинико-лабораторный консилиум. – 2010. - № 2-3 (33-34). - С. 121.
21. Шапошников А.М., Хальчицкий С.Е. Патохимия обмена фенилаланина, тирозина, триптофана и активность фенилаланингидроксилазы печени при

- вирусных гепатитах // Естественные и технические науки. – 2007. - № 2. – С. 137-154.
22. Шапошников А.М., Хальчицкий С.Е. Гетерогенность молекулярных дефектов фенилаланингидроксилазы печени при наследственных и экзогенных гиперфенилаланинемиях // Естественные и технические науки. – 2007а. - № 5. - С. 147-157.
23. Шапошников А.М., Хальчицкий С.Е., Булычева И.А. О механизме гиперцерулоплазминемии при патологических состояниях // Естественные и технические науки. – 2008. - № 5. – С. 45-52.
24. Шапошников А.М., Хальчицкий С.Е. Шварц Е.И. Нарушение обмена фенилаланина и тирозина при болезни Дауна // Вопросы медицинской химии. – 1979. - №1. – С. 15-19.
25. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. Пер. с английского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. 859 с.
26. Abita J.P., Milstien S., Chang N., Kaufman S. In vitro activation of rat liver phenylalanine hydroxylase by phosphorylation // J. Biol. Chem. - 1976. - Vol. 251(17). – P. 5310-4.
27. Agrawal H.C., Bone A.H., Davison A.N. Effect of phenylalanine on protein synthesis in the developing rat brain // Biochem. J. – 1970. – Vol. 117. – P. 325-31.
28. Amaral A.U., Leipnitz G., Fernandes C.G., Seminotti B., Schuck P.F., Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain // Brain Res. – 2010. - Vol. 1324. – P. 75-84.
29. Tatham A.L., Crabtree M.J., Warrick N., Cai S., Alp N.J., Channon K.M. GTP cyclohydrolase I expression, protein, and activity determine intracellular tetrahydrobiopterin levels, independent of GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein expression // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284(20). – P. 13660–13668.

30. Andersen O. A., Flatmark T., Hough E. 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. – Vol. 320. – P. 1095–1108.
31. Aravind, L., Koonin, E. V. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 287. – P. 1023–1040.
32. Artuch R., Vilaseca M.A., Moreno J., Lambruschini N., Cambra F.J., Campistol J. Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 70. – P. 892-5.
33. Arturo E.C., Gupta K., Héroux A., Stith L., Cross P.J., Parker E.J., Loll P.J., Jaffe E.K. First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. Vol. 113(9). – P. 2394-9.
34. Auerbach G., Herrmann A., Gutlich M., Fischer M., Jacob U., Bacher A., Huber R. The 1.25Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 7219–7230.
35. Auerbach G., Herrmann A., Bracher A., Bader G., Gutlich M., Fischer M., Neukamm M., Garrido-Franco M., Richardson J., Nar H., et al. Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – Vol. 97. – P. 13567–13572.
36. Bailey S.W., Ayling J.E. Separation and properties of the 6-diastereoisomers of 1-erythro-tetrahydrobiopterin and their reactivities with phenylalanine hydroxylase // *J. Biol. Chem.* – 1978. – Vol. 253(5). – P. 1598-605.
37. Behl C., Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds // *Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 383. – P. 521-36.

38. Benavides J., Gimenez C., Valdivieso F., Mayor F. Effect of phenylalanine metabolites on the activities of enzymes of ketone-body utilization in brain of suckling rats // *Biochem. J.* – 1976. – Vol. 160. - P. 217-22.
39. Berg D., Youdim M.B. Role of iron in neurodegenerative disorders // *Top. Magn. Reson. Imaging.* – 2006. - Vol. 17. – P. 5-17.
40. Berthelon M., Caillaud C., Rey F., Labrune P., Melle D., Feingold J., Frézal J., Briard M.L., Farriaux J.P., Guibaud P., et al. Spectrum of phenylketonuria mutations in western Europe and north Africa, and their relation to polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus // *Hum. Genet.* – 1991. – Vol. 86(4). – P. - 355-8.
41. Berti S.L., Nasi G.M., Garcia C., Castro F.L., Nunes M.L., Rojas D.B., et al. Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats // *Metab. Brain Dis.* – 2012. – Vol. 27. – P. 79-89.
42. Bilder D.A., Burton B.K., Coon H., Leviton L., Ashworth J., et al. Psychiatric symptoms in adults with phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Vol. 108. – P. 155–160.
43. Bjerkenstedt L., Edman G., Hagenfeldt L., Sedvall G., Wiesel F.A. Plasma amino acids in relation to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in schizophrenic patients and healthy controls // *Br. J. Psychiatry.* – 1985. – Vol. 147. – P. 276–282.
44. Bjørge E., de Carvalho R. M., Flatmark T. A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr427→Pro mutant human phenylalanine hydroxylase // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 997–1005.
45. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now // *Hum. Mutat.* - 2016. - Vol. 37, № 6. - P. 508-15.
46. Blau N., Thony B., Cotton R.G. H., Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W. S., Valle D.,

- Vogelstein B., editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. – New York: McGraw-Hill. – 2001. - P. 1725–1776.
47. Blau N., Van Spronsen F.J., Levy H.L. 2010. Phenylketonuria // *Lancet*. – 2010. – Vol. 376. – P. 1417–1427.
48. Blau N., Hennermann J. B., Langenbeck U., Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. Vol. 104. – Suppl.: S2-9.
49. Blyumina M.G. Blood serum phenylalanine level in heterozygotes for the phenylketonuria gene under conditions of intensified protein catabolism // *Genetika*. – 1981. – Vol. 17. – P. 910-914.
50. Boirie Y., Albright R., Bigelow M., Nair K.S. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 66. – P. 591–6.
51. Bonafe L., Blau N., Burlina A.P., Romstad A., Guttler F., Burlina A.B. Treatable neurotransmitter deficiency in mild phenylketonuria // *Neurology*. – 2001. – Vol. 57. – P. 908–911.
52. Bortoluzzi V.T., de Franceschi I.D., Rieger E., Wannmacher C.M. Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring // *Neurochem. Res.* – 2014. – Vol. 39. – P. 1594-602.
53. Bracher A., Eisenreich W., Schramek N., Ritz H., Gotze E., Herrmann A., Gutlich M., Bacher, A. Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 28132–28141.
54. Broderick J.B. Coenzymes and cofactors // *ELS citable reviews*. John Wiley & Sons. - 2001. – P. 1-11.
55. Brown D.A., Cook R.A. Role of metal cofactors in enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of the *Escherichia coli* nicotinamide adenine

- dinucleotide phosphate specific malic enzyme, depending on whether magnesium ion or manganese ion serves as divalent cation // *Biochemistry*. – 1981. - Vol. 20. – P. 2503-12.
56. Burgisser D., Thony B., Redweik U., Hess D., Heizmann C. W., Huber R., Nar H. 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase: an enzyme with a novel type of active site involving both zinc binding and an intersubunit catalytic motif; site-directed mutagenesis of the proposed active center, characterization of the metal binding site and modelling of substrate binding // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 253. – P. 358–369.
57. Bushueva T.V., Ladodo K.S., Spirichev V.B., Denisova S.N., Rybakova E.P. Calcium homeostasis and calcium-regulating hormones in young children with phenylketonuria // *Vopr. Pitan.* – 1993. - №3 – P. 16-21.
58. Butterworth R.F. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings // *Metab. Brain Dis.* – 2001. – Vol. 16(1-2). – P. 55-65.
59. Castillo M., Martinez-Cayuela M., Zafra M.F., Garcia-Peregrin E. Effect of phenylalanine derivatives on the main regulatory enzymes of hepatic cholesterologenesis // *Mol. Cell. Biochem.* – 1991. – Vol. 105. – P. 21-5.
60. Charikova E.V., Khalchitskii S.E., Antoshechkin A.G., Schwartz E.I. Distribution of some point mutations in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria patients from the Moscow region // *Human Heredity*, 1993, v.43, №4. - P. 244-249.
61. Choi T.B., Pardridge W.M. Phenylalanine transport at the human blood-brain barrier. Studies with isolated human brain capillaries // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 6536-41.
62. Cockburn F., Clark B.J., Caine E.A., Harvie A., Farquharson J., Jamieson E.C. Fatty acids in the stability of the neuronal membrane: relevance to PKU // *Int. Pediatr.* – 1996. – Vol. 11. – P. 56-60.

63. Coleman D.L. Phenylalanine hydroxylase activity in dilute and nondilute strains of mice // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1960. - Vol.91. - P. 300-6.
64. Cooke M.S., Evans M.D., Dove R., Rozalski R., Gackowski D., Siomek A., Lunec J., Olinski R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 574(1–2). – P. 58–66.
65. Cooke M.S., Olinski R., Evans M.D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 365(1–2). – P. 30–49.
66. Costabeber E., Kessler A., Severo Dutra-Filho C., de Souza Wyse A.T., Wajner M., Wannmacher C.M. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 21. – P.111-6.
67. Culmsee C., Mattson M.P. p53 in neuronal apoptosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 331(3). – P. 761–777.
68. Curtius H.C., Baerlocher K., Völlmin J.A. Pathogenesis of phenylketonuria: inhibition of DOPA and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria // *Clin. Chim. Acta.* – 1972. – Vol. 42(1). – P. 235-9.
69. Curtius H.C., Niederwieser A., Viscontini M., Leimbacher W., Wegmann H., Blehova B., Rey F., Schaub J., Schmidt H. Serotonin and dopamine synthesis in phenylketonuria // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1981. – Vol. 133. – P. 277-91.
70. Daubner S. C., Le T., Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2011. – Vol. 508. – P. 1-12.
71. Davis M. D., Pamiak M. A., Kaufman S., Kempner E. The role of phenylalanine in structure-function relationships of phenylalanine hydroxylase revealed by radiation target analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1997. - Vol.94. - P.491-495.
72. de Groot M.J., Hoeksma M., Reijngoud D.J., de Valk H.W., Paans A.M., Sauer P.J., et al. Phenylketonuria: reduced tyrosine brain influx relates to reduced cerebral protein synthesis // *Orphanet. J. Rare Dis.* - 2013. – Vol. 8(1). – P.133.

73. de Groot M.J., Sijens P.E., Reijngoud D.J., Paans A.M., van Spronsen F.J. Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2015. – Vol. 35. – P. 200-5.
74. Dejong C.H., van de Poll M.C., Soeters P.B., Jalan R., Olde Damink S.W. Aromatic amino acid metabolism during liver failure // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137(6 Suppl 1). – P. 1579S-1585S
75. Diamond A., Herzberg C. Impaired sensitivity to visual contrast in children treated early and continuously for phenylketonuria // *Brain.* - 1996. – Vol. 119. – P. 523-38.
76. DiLella A.G., Marvit J., Lidsky A.S., Güttler F., Woo S.L.C. Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria // *Nature.* – 1986. – Vol. 322(6082). – P. 799-803.
77. Doskeland A. P., Martinez A., Knappskog P. M., Flatmark, T. Phosphorylation of recombinant human phenylalanine hydroxylase: effect on catalytic activity, substrate activation and protection against non-specific cleavage of the fusion protein by restriction protease // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 313. – P. 409-414.
78. Druml W., Kleinberger G., Burger U., Balcke P., Laggner A., Lenz K., Schmidt P., Zazgornik J. Elimination of amino acids in chronic renal failure // *Infusionsther. Klin. Ernahr.* – 1986. – Vol.13. – P. 262–7.
79. Druml W., Roth E., Lenz K., Lochs H., Kopsa H. Phenylalanine and tyrosine metabolism in renal failure: dipeptides as tyrosine source // *Kidney Int. Suppl.* – 1989. – Vol. 27. - P. S282–6.
80. Duarte J.M., Schuck P.F., Wenk G.L., Ferreira G.C. Metabolic disturbances in diseases with neurological involvement // *Aging Dis.* – 2013. – Vol. 5. – P. 238-55.
81. Dyer C.A. Comments on the neuropathology of phenylketonuria // *Eur. J. Pediatr.* 2000. – Vol. 159, Suppl 2. - P. S107-8.
82. Elsliger M.A., Thériault G.R., Gauthier D. In vitro localization of the protein synthesis defect associated with experimental phenylketonuria // *Neurochem. Res.* – 1989. – Vol. 14. – P. 81-4.

83. Elzaouk L., Laufs S., Heerklotz D., Leimbacher W., Blau N., Résibois A., Thöny B. Nuclear localization of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1670(1). – P. 56-68.
84. Embden G., Baldes K. Über den Abbau des Phenylalanins im tierischen Organismus // *Biochem. Z.* – 1913. – Vol. 55. – P. 301-322.
85. Endo F., Inborn errors of tyrosine metabolism: abnormalities in catabolic pathway of phenylalanine and tyrosine // *Seikagaku.* – 1999. – Vol. 71(11). – P. 1327-31.
86. Ercal N., Aykin-Burns N., Gurer-Orhan H., McDonald J.D. Oxidative stress in a phenylketonuria animal model // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 32. – P. 906-11.
87. Evans M.D., Cooke M.S. 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids // *Bioessays.* – 2004. – Vol. 26(5). – P. 533–542.
88. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 567(1). – P. 1–61.
89. Fellman J.H. Inhibition of DOPA decarboxylase by aromatic acids associated with phenylpyruvic oligophrenia // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* -1956. – Vol. 93(3). – P. 413-4.
90. Fellman J.H., Buist N.R., Kennaway N.G., Swanson R.E. The source of aromatic ketoacids in tyrosinaemia and phenylketonuria // *Clin. Chim. Acta.* – 1972. – Vol. 39(1). – P. 243-6.
91. Fernandes C.G., Leipnitz G., Seminotti B., Amaral A.U., Zanatta A., Vargas C.R., et al. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2010. - Vol. 30. – P. 317-26.
92. Fiege B., Ballhausen D., Kierat L., Leimbacher W., Goriounov D., Schircks B., Thöny B., Blau N. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration // *Mol. Genet. Metab.* – 2004. – Vol. 81(1). – P. 45-51.

93. Fischer E., Spatz H., Saavedra J.M., Reggiani H., Miro A.H., Heller B. Urinary elimination of phenethylamine // *Biol. Psychiatry.* – 1972. – Vol. 5. – P. 139–147.
94. Fischer J.E., Baldessarini R.J. False neurotransmitters and hepatic failure // *Lancet.* – 1971. – Vol. 2(7715). – P. 75-80.
95. Fitzpatrick, P. F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases // *Ann. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 355-381.
96. Fitzpatrick, P. F. The aromatic amino acid hydroxylases // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 235–294.
97. Fitzpatrick, P. F. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 14083-14091.
98. Fitzpatrick, P. F. Allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 519. – P. 194–201.
99. Flatmark T., Stevens R. C. Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms // *Chem. Rev.* – 1999. – Vol. 99. – P. 2137–2160.
100. Fogel W.A., Andrzejewski W., Maśliński C. Neurotransmitters in hepatic encephalopathy // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.).* – 1990. – Vol. 50(4-5). – P. 281-93.
101. Fuchs J.E., Huber R.G., von Grafenstein S., Wallnoefer H.G., Spitzer G.M., et al. Dynamic regulation of phenylalanine hydroxylase by simulated redox manipulation // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(12). – P. e53005.
102. Fukushima T., Nixon, J. C. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 102. – P. 176–188.
103. Fulenwider J.T., Nordlinger B.M., Faraj B.A., Ivey G.L., Rudman D. Deranged tyrosine metabolism in cirrhosis // *Yale. J. Biol. Med.* – 1978. – Vol. 51(6). – p. 625-33.

104. Fusetti F., Erlandsen H., Flatmark T., Stevens R. C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 16962–16967.
105. Garibotto G., Deferrari G., Robaudo C., Saffioti S., Salvidio G., Paoletti E., Tizianello A. Effect of amino acid ingestion on blood amino acid profile in patients with chronic renal failure // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1987. – Vol. 46. – P. 949–54.
106. Garibotto G., Deferrari G., Robaudo C., Saffioti S., Paoletti E., Pontremoli R., Tizianello A. Effects of a protein meal on blood amino acid profile in patients with chronic renal failure // *Nephron.* – 1993. – Vol. 64. – P. 216–25.
107. Garibotto G, Tessari P, Verzola D, Dertenois L. The metabolic conversion of phenylalanine into tyrosine in the human kidney: does it have nutritional implications in renal patients? // *J. Ren. Nutr.* – 2002. – Vol. 12. – P. 8–16.
108. Giovannini M., Verduci E., Radaelli G., Lammardo A., Minghetti D., Cagnoli G., et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids profile in plasma phospholipids of hyperphenylalaninemic children on unrestricted diet // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* – 2011. – Vol. 84. – P. 39-42.
109. Gleisenthall G.V., Geisler S., Malik P., Kemmler G., Benicke H., Fuchs D., Mechtcheriakov S. Tryptophan metabolism in post-withdrawal alcohol-dependent patients // *Alcohol Alcohol.* – 2014. – Vol. 49(3). – P. 251-5.
110. Goodwill K. E., Sabatier C., Marks C., Raag R., Fitzpatrick P. F., Stevens, R. C. Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases // *Nat. Struct. Biol.* – 1997. – Vol. 4. – P. 578-585.
111. Gramer G., Förl B., Springer C., Weimer P., Haege G., Mackensen F., et al. Visual functions in phenylketonuria-evaluating the dopamine and long-chain polyunsaturated fatty acids depletion hypotheses // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Vol. 108. – P. 1-7.

112. Grant, G. A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. P. 33825-33829.
113. Gropper S.S., Chaung H.C., Bernstein L.E., Trahms C., Rarback S., Weese S.J. Immune status of children with phenylketonuria // *J. Am. Coll. Nutr.* – 1995. – Vol. 14. – P. 264-70.
114. Guldberg P., Henriksen K.F., Lou H.C., Güttler F. Aberrant phenylalanine metabolism in phenylketonuria heterozygotes // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1998. – Vol. 21(4). – P. 365-72.
115. Güttler F., Hansen G. Heterozygote detection in phenylketonuria // *Clin. Genet.* – 1977. – Vol. 11. – P. 137-146.
116. Güttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency // *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* – 1980. – Vol. 280. – P. 1-80.
117. Güttler F., Lou H. Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1986. - Vol. 9, Suppl. 2. – P. 169-77.
118. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 97(6). – P. 1634–1658.
119. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., editors. Free radicals in biology and medicine. – 4th ed. - Oxford: Oxford University Press Inc, 2007, 851 p., ill.
120. Harding C.O., Winn S.R., Gibson M.K., Arning E., Bottiglieri T., Grompe M. Pharmacologic inhibition of L-tyrosine degradation ameliorates cerebral dopamine deficiency in murine phenylketonuria (PKU) // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2014. – Vol. 37. – P. 735-43.
121. Haycock, J. W. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase *in situ* at serine 8, 19, 31, and 40 // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 11682-11691.

122. Heberer M., Talke H., Maier K.P., Gerok W. Metabolism of phenylalanine in liver diseases. *Klinische Wochenschrift.* – 1980. – Vol. 58(21). - P. 1189–1196.
123. Heggarty H.J., Ball R., Smith M., Henderson M.J. Amino acid profile in Down's syndrome // *Arch. Dis. Child.* – 1996. – Vol. 74(4). – P. 347-9.
124. Hirsch W., Mex A., Vogel F. Metabolic traits in mentally retarded children as compared with normal populations: Phenylalanine and tyrosine in serum and urine // *J. Ment. Defic. Res.* – 1967. – Vol. 11. - P. 212-227.
125. Hoeksma M., Reijngoud D.J., Pruijm J., de Valk H.W., Paans A.M., van Spronsen F.J. Phenylketonuria: high plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – Vol. 96. – P. 177-82.
126. Holzmann H., Morsches B., Sachsse W. On the activity of folate-dependent enzymes in leukocytes in mongolism // *Klin. Wochenschr.* – 1967. – Vol. 45(7). – P. 363-6.
127. Hommes F.A. Aminoacidemias and Brain Dysfunction // In: *Pathological Neurochemistry.* – Plenum Press, NY, 1985. – P. 15-41.
128. Hsia D.Y.Y., Driscoll K.W., Troll W., Knox W.E. Detection by phenylalanine tolerance tests of heterozygous carriers of phenylketonuria // *Nature.* – 1956. – Vol. 178. - P. 1239.
129. Huang I., Yi-Yung Hsia D. Studies on inhibition of 5-hydroxy-tryptophan decarboxylase by phenylalanine metabolites // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1963. – Vol. 112. – P. 81-4.
130. Hufton S. E., Jennings I. G., Cotton R. G. H. Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 1998. - Vol.1382. - P. 295-304.
131. Huttenlocher P.R. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies // *Eur. J. Pediatr.* – 2000. – Vol. 159, Suppl. 2. – P. S102-6.

132. Ikeda M., Levitt M., Udenfriend S. Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1967. – Vol. 120(2). – P. 420-7.
133. Imperlini E., Orrù S., Corbo C., Daniele A., Salvatore F. Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model // *J. Neurochem.* – 2014. – Vol. 129. – P. 1002-12.
134. Infante J.P., Huszagh V.A. Impaired arachidonic (20:4n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acid synthesis by phenylalanine metabolites as etiological factors in the neuropathology of phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.* – 2001. – Vol. 72. – P. 185-98.
135. Jagenburg R., Rodjer S. Detection of heterozygotes for phenylketonuria by constant intravenous infusion of L-phenylalanine // *Clin. Chem.* – 1977. – Vol. 23. – P. 1661-1665.
136. Jervis G. A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error // *J. Biol. Chem.* – 1947. – Vol. 169. – P. 651-656.
137. Jervis G.A. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine oxidizing system // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1953. - Vol. 82. - P. 514-515.
138. Jervis G.A. Detection of heterozygotes for phenylketonuria // *Clin. Chim. Acta.* – 1960. – Vol. 5. – P. 471-476.
139. Jeste D.V., Doongaji D.R., Panjwani D., Datta M., Potkin S.G., Karoum F., et al. Cross-cultural study of a biochemical abnormality in paranoid schizophrenia // *Psychiatry Res.* – 1981. – Vol. 5. - P. 341–352.
140. Du J., Xu H., Wei N., Wakim B., Halligan B., Pritchard K.A., Shi Y. Identification of Proteins Interacting with GTP Cyclohydrolase I // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 385(2). – P. 143–147.
141. Jones M.R., Kopple J.D., Swendseid M.E. Phenylalanine metabolism in uremic and normal man // *Kidney Int.* – 1978. – Vol. 14. – P. 169–79.

142. Justice P., Hsia D.Y. Studies on inhibition of brain 5-hydroxytryptophan decarboxylase by phenylalanine metabolites // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1965. – Vol. 118. – P. 326-8.
143. Kappock T. J., Caradonna J. P. Pterin-dependent amino acid hydroxylases // *Chem. Rev.* – 1996. – Vol. 96. – P. 2659–2756.
144. Karoum F., Linnoila M., Potter W.Z., Chuang L-W., Goodwin F.K., Wyatt R.J. Fluctuating high urinary phenylethylamine excretion rate in some bipolar affective disorder patients // *Psychiatry Res.* – 1982. – Vol. 6. – P. 215–222.
145. Kasai K., Hattori Y., Nakanishi N., Manaka K., Banba N., Motohashi S., Shimoda S. Regulation of inducible nitric oxide production by cytokines in human thyrocytes in culture // *Endocrinology.* - 1995. – Vol. 136(10). – P. 4261-70.
146. Kaufman S. A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine // *J. Biol. Chem.* 1958. – Vol. 230. - P. 931-939.
147. Kaufman S. Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine // *J. Biol. Chem.* - 1959. - Vol. 234. - P. 2677-2682.
148. Kaufman S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1963. - Vol. 50. - P. 1085-1093.
149. Kaufman S., Max E.E., Kang E.S. Phenylalanine hydroxylase activity in liver biopsies from hyperphenylalaninemia heterozygotes: deviation from proportionality with gene dosage // *Pediatr. Res.* – 1975. – Vol. 9. – P. 632-634.
150. Kaufman S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine // *J. Pediatr.* – 1989. – Vol. 114(5). – P. 895-900.
151. Kaufman S. The phenylalanine hydroxylating system // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* – 1993. - Vol. 67. - P. 77–264.
152. Kennaway N.G., Buist N. R. M. Metabolic studies in a patient with hepatic cytosol tyrosine aminotransferase deficiency // *Pediatr. Res.* – 1971. – Vol. 5. - P. 287-297.

153. Kenney F.T., Reem G.H., Kretchmer N. Development of phenylalanine hydroxylase in mammalian liver // *Science*. – 1958. - Vol. 127(3289). - P. 86.
154. Khalchitsky S.E., Nikiforova I.F., Shaposhnikov A.M., Bulycheva I.A. The mutant phenylalanine hydroxylase gene is more often found out in alcoholics // *European Conference of Human Genetics*. - 2012, June 23-26, Nürnberg, Germany. P13.39.
155. Komov V.P., Khalchitsky S.E., Dubina M.V. Disturbances in Metabolism of Phenylalanine and Tyrosine as an Important Factor in the Etiology and Pathogenesis of Psychoneurological Disorders Associated with Liver Diseases // *International Journal of Biomedicine*. – 2015. – Vol. 5(2). – P. 65-70.
156. Kienzle Hagen M.E., Pederzoli C.D., Sgaravatti A.M., Bridi R., Wajner M., Wannmacher C.M., et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2002. – Vol. 1586(3). – P. 344-52.
157. Knudsen G.M., Hasselbalch S., Toft P.B., Christensen E., Paulson O.B., Lou H. Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria // *J. Inher. Metab. Dis*. - 1995. – Vol. 18(6). – P. 653–664.
158. Kobe B., Jennings I. G., House C. M., Michell B. J., Goodwill K. E., Santarsiero B.D., Stevens R. C., Cotton R. G. H., Kemp, B. E. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase // *Nat. Struct. Biol*. – 1999. – Vol. 6. – P. 442-448.
159. Koch R., Guttler F., Blau N. Mental illness in mild PKU responds to biopterin // *Mol. Genet. Metab*. – 2002. – Vol. 75. - P. 284–286.
160. Krauns P., Ruge W. Plasma catecholamine levels in liver disease // *Z. Gastroenterol*. - 1985 Vol. 23(2). – P. 64-73.
161. Kuznetsova L.I. Frequency and phenotypic manifestations of schizophrenia in the parents of patients with phenylketonuria // *Sov. Genet*. – 1974. – Vol. 8. – P. 554–555.
162. Kure S., Sato K., Fujii K., Aoki Y., Suzuki Y., Kato S., Matsubara Y. Wild-type phenylalanine hydroxylase activity is enhanced by tetrahydrobiopterin

- supplementation in vivo: an implication for therapeutic basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency // *Mol. Genet. Metab.* – 2004. – Vol. 83. – P. 150–156.
163. Landvogt C., Mengel E., Bartenstein P., Buchholz H.G., Schreckenberger M., Siessmeier T., et al. Reduced cerebral fluoro-L-dopamine uptake in adult patients suffering from phenylketonuria // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* – 2008. – Vol. 28. – P. 824-31.
164. Laursen J.B., Somers M., Kurz S., McCann L., Warnholtz A., et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin // *Circulation.* – 2001. – Vol. 103. – P. 1282–1288.
165. Lehmann W.D. Progress in the identification of the heterozygote in phenylketonuria // *J. Pediatr.* – 1989. – Vol. 114. – P. 915-924.
166. Li J., Dangott L. J., Fitzpatrick P. F. Regulation of Phenylalanine Hydroxylase: Conformational Changes Upon Phenylalanine Binding Detected by Hydrogen/Deuterium Exchange and Mass Spectrometry // *Biochemistry.* – 2010. - Vol. 49. - P. 3327–3335.
167. Liberles J. S., Thorolfsson M., Martinez A. Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism // *Amino Acids.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1–12.
168. Linnoila M., Karoum F., Cutler N.P., Potter W.Z. Temporal association between depression-dependent dyskinesias and high urinary phenylethylamine output // *Biol. Psychiatry.* - 1983. – Vol. 18. – P. 513–517.
169. Loaiza A., Ronau J.A., Ribbe A., Stanciu L., Burgner J.W., Paul L.N., Abu-Omar M.M. Folding dynamics of phenylalanine hydroxylase depends on the enzyme's metallation state: the native metal, iron, protects against aggregate intermediates // *Eur. Biophys. J.* – 2011. – Vol. 40(8). – P. 959-68.

170. Lohner S., Fekete K., Decsi T. Lower n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid values in patients with phenylketonuria: a systematic review and meta-analysis // *Nutr. Res.* – 2013. – Vol. 33. – P. 513-20.
171. Lopansri B.K., Anstey N.M., Stoddard G.J. et al. Elevated plasma phenylalanine in severe malaria and implication for pathophysiology of neurological complications // *Infection and Immunity.* – 2006. – Vol. 74(6). - P. 3355-3359.
172. Lütz Mda G., Feksa L.R., Wyse A.T., Dutra-Filho C.S., Wajner M., Wannmacher C.M. Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats // *Metab. Brain. Dis.* – 2003. – Vol. 18(1). – P. 87-94.
173. Martínez A., Knappskog P. M., Olafsdottir S., Døskeland A. P., Eiken H. G., Svebak R. M., Flatmark, T. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 306. – P. 589–597.
174. Martinez-Cruz F., Pozo D., Osuna C., Espinar A., Marchante C., Guerrero J.M. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C // *J. Neurosci. Res.* -2002. – Vol. 69. – P. 550-8.
175. McKean C.M. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain // *Brain Res.* – 1972. - Vol. 47. – P. 469-76.
176. McKinney J., Knappskog P.M., Haavik J. Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase // *J. Neurochem.* – 2005. Vol. 92(2). - P. 311-20.
177. McCoy E.E., Colombini C., Ebadi M. The metabolism of vitamin B6 in Down's syndrome // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1969. – Vol. 166(1). - P. 116-25.

178. Melo D.R., Kowaltowski A.J., Wajner M., Castilho R.F. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic academia // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – Vol. 43. – P. 39-46.
179. Méndez-Alvarez E., Soto-Otero R., Hermida-Ameijeiras A., López-Martín M.E., Labandeira-García J.L. Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31. – P. 986-98.
180. Menghini G. One-second needle biopsy of the liver // *Gastroenterology.* – 1958. – Vol. 35(2). – P. 190-9.
181. Miller B.J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects // *Biol. Psychiatry.* – 2011. – Vol. 70. – P. 663–671.
182. Milstien S., Kaufman S. Studies on the phenylalanine hydroxylase system in liver slices // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250. – P. 4777–4781.
183. Milstien S., Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 263. - P. 681–684.
184. Mitnaul L. J., Shiman R. Coordinate regulation of tetrahydrobiopterin turnover and phenylalanine hydroxylase activity in rat liver cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1995. – Vol. 92. - P. 885–889.
185. Mitoma C., Auld R.M., Udenfriend S. On the nature of enzymatic defect in phenylpyruvic oligophrenia // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1957. - V. - 94. - P. 634-635.
186. Moraes T.B., Jacques C.E., Rosa A.P., Dalazen G.R., Terra M., Coelho J.G. et al. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 33. – P. 253-60.
187. Moraes T.B., Zanin F., da Rosa A., de Oliveira A., Coelho J., Petrillo F., et al. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute

- hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain // *J. Neurol. Sci.* – 2010. - Vol. 292. – P. 89-95.
188. Mizock B.A., Sabelli H.C., Dubin A., Javaid J.I., Poulos A., Rackow E.C. Septic encephalopathy. Evidence for altered phenylalanine metabolism and comparison with hepatic encephalopathy // *Arch. Intern. Med.* – 1990. – Vol. 150(2). – P. 443-9.
189. Murr C., Widner B., Wirleitner B., Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation // *Curr. Drug Metab.* – 2002. – Vol. 3. – P. 175–187.
190. Nagasaka H., Okano Y., Kimura A., Mizuochi T., Sanayama Y., Takatani T., et al. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening // *Clin. Chim. Acta.* – 2013. – Vol. 416. – P. 54-9.
191. Nagasaka H., Tsukahara H., Okano Y., Hirano K., Sakurai T., Hui S.P. et al. Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – Vol. 433. – P. 1-4.
192. Nar H., Huber R., Heizmann C.W., Thony B., Burgisser D. Three-dimensional structure of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis // *EMBO J.* – 1994. – Vol. 13, - P. 1255–1262.
193. Nar H., Huber R., Meining W., Schmid C., Winkauf S., Bacher A. Atomic structure of the GTP cyclohydrolase I // *Structure.* – 1995. – Vol. 3. – P. 459–466.
194. Nar H., Huber R., Auerbach G., Fischer M., Hosl C., Ritz H., Bracher A., Meining W., Eberhardt S. Bacher A. Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1995. – Vol. 92. – P. 12120–12125.
195. Neurauter G., Grahmann A.V., Klieber M., Zeimet A., Ledochowski M., et al. Serum phenylalanine concentrations in patients with ovarian carcinoma correlate with concentrations of immune activation markers and of isoprostane-8 // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 272. – P. 141–147.

196. Nielsen K.H. Rat liver phenylalanine hydroxylase. A method for the measurement of activity, with particular reference to the distinctive features of the enzyme and the pteridine cofactor // *Eur. J. Biochem.* – 1969. – Vol. 7(3). – P. 360-9.
197. Okusaga O., Muravitskaja O., Fuchs D., Ashraf A., Hinman S., Giegling I., Hartmann A.M., Konte B., Friedl M., Schiffman J., Hong E., Reeves G., Groer M., Dantzer R., Rujescu D., Postolache T.T. Elevated levels of plasma phenylalanine in schizophrenia: a guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 metabolic pathway abnormality? *PLoS One.* 2014. – Vol. 9(1). – P. e85945.
198. Olafsdottir S., Martinez A. The accessibility of iron at the active site of recombinant human phenylalanine hydroxylase to water as studied by IH NMR paramagnetic relaxation. Effect of 1-phe and comparison with the rat enzyme. // *The Journal of biological chemistry.* - 1999. - Vol.274. - P. 6280-6284.
199. Oldendorf W.H. Brain uptake of radio labelled amino acids, amines and hexoses after arterial infusion // *Am. J. Physiol.* – 1971. – Vol. 221. – P. 1629–1639.
200. Olsson E., Teigen K., Martinez A., Jensen V. R. The aromatic amino acid hydroxylase mechanism: a perspective from computational chemistry // *Adv. Inorg. Chem.* – 2010. – Vol. 62. – P. 437–500.
201. O'Reilly R., Davis B.A., Durden D.A., Thorpe L., Machnee H., Boulton A.A. Plasma phenylethylamine in schizophrenic patients // *Biol. Psychiatry.* – 1991. – Vol. 30. – P. 145–150.
202. O'Reilly R.L., Davis B.A. Phenylethylamine and schizophrenia // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 1994. – Vol. 18. – P. 63–75.
203. Pardridge W.M. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids // *Neurochem. Res.* - 1998. – Vol. 23(5). – P. 635–644.
204. Pascucci T., Ventura R., Puglisi-Allegra S., Cabib S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria // *Neuroreport.* – 2002. – Vol. 13. - P. 2561-4.

205. Patel M.S., Arinze I.J. Phenylketonuria: metabolic alterations induced by phenylalanine and phenylpyruvate // *Am. J. Clin. Nutr.* -1975. – Vol. 28. - P. 183-188.
206. Patel D., Kopec J., Fitzpatrick F., McCorvie T.J., Yue W.W. Structural basis for ligand-dependent dimerization of phenylalanine hydroxylase regulatory domain // *Sci. Rep.* – 2016. - Vol. 6. article number: 23748
207. Penrose L.S. Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria) // *Lancet.* – 1935. – Vol. 2. – P. 192–194.
208. Perry T.L., Hansen S., Tischler B., Richards F.M., Sokol M. Unrecognized adult phenylketonuria. Implications for obstetrics and psychiatry // *N. Engl. J. Med.* – 1973. – Vol. 289. - P. 395–398.
209. Pey A. L., Perez B., Desviat L. R., Martinez M. A., Aguado C., Erlandsen H., Gamez A., Stevens R. C., Thorolfsson M., Ugarte M. Martinez A. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 24. - P. 388–399.
210. Pey A. L., Thórólfsson M., Teigen K., Ugarte M., Martínez A. Thermodynamic characterization of the binding of tetrahydropterins to phenylalanine hydroxylase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126. - P. 13670–13678.
211. Pietz J., Kreis R., Rupp A., Mayatepek E., Rating D., Boesch C. et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103. - P. 1169-78.
212. Ploder M., Neurauter G., Spittler A., Schroecksnadel K., Roth E. et al. Serum phenylalanine in patients post trauma and with sepsis correlate to neopterin concentrations // *Amino Acids.* – 2008. – Vol. 35. - P. 303–307.
213. Ploom T., Thony B., Lee S., Nar H., Leimbacher W., Huber R. Auerbach G. Crystallographic and kinetic investigations on the mechanism of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 286. – P. 851–860.

214. Poisner A.M. Serum phenylalanine in schizophrenia: biochemical genetic aspects // *J. Nerv. Ment. Dis.* – 1960. – Vol. 131. - P. 74–76.
215. Potkin S.G., Wyatt R.J., Karoum F. Phenylethylamine (PEA) and phenylacetic acid (PAA) in the urine of chronic schizophrenic patients and controls // *Psychopharmacol. Bull.* – 1980. – Vol. 16. – P. 52–54.
216. Potkin S.G., Cannon-Spoor H.E., DeLisi L.E., Neckers L.M., Wyatt R.J. Plasma phenylalanine, tyrosine, and tryptophan in schizophrenia // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 1983. – Vol. 40. – P. 749–752.
217. Ragsdale S. Metal-carbon bonds in enzymes and cofactors // *Coord. Chem. Rev.* – 2010. – Vol. 254. – P. 1948-9.
218. Rampini S., Anders P.W., Curtius H.C., Marthaler T. Detection of heterozygotes for phenylketonuria by column chromatography and discriminatory analysis // *Pediatr. Res.* – 1969. – Vol. 3. – P. 287-297.
219. Rampini S., Völlmin J.A., Bosshard H.R., Müller M., Curtius H.C. Aromatic acids in urine of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia, and phenylketonuria, before and after phenylalanine load // *Pediatr. Res.* – 1974. – Vol. 8. – P. 704-9.
220. Rao M.L., Gross G., Strebel B., Braunig P., Huber G., Klosterkötter J. Serum amino acids, central monoamines, and hormones in drug-naive, drug-free, and neuroleptic-treated schizophrenic patients and healthy subjects // *Psychiatry Res.* – 1990. – Vol. 34. – P. 243–257.
221. Rech V.C., Feksa L.R., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T., Wajner M., Wannmacher C.M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex // *Neurochem. Res.* – 2002. – Vol. 27. – P. 353-7.
222. Reem G.H., Kretchmer N. Development of phenylalanine hydroxylase in liver of the rat // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1957. - Vol. 96(2). - P. 458-60.
223. Rey F., Berthelon M., Caillaud C., Lyonnet S., Abadie V., Blandin-Savoja F., Feingold J., Saudubray J.M., Frézal J., Munnich A. et al. Clinical and molecular

- heterogeneity of phenylalanine hydroxylase deficiencies in France // *Am. J. Hum. Genet.* – 1988. – Vol. 43(6). – P. 914-21.
224. Richardson M.A., Read L.L., Clelland J.D., Chao H.M., Reilly M.A., Romstad A., Suckow R.F. Phenylalanine hydroxylase gene in psychiatric patients: screening and functional assay of mutations // *Biol. Psychiatry.* – 2003. – Vol. 53(6). - P. 543-53.
225. Richardson M.A., Read L.L., Taylor Clelland C.L., Reilly M.A., Chao H.M. et al. Evidence for a tetrahydrobiopterin deficit in schizophrenia // *Neuropsychobiology.* – 2005. – Vol. 52. – P. 190–201.
226. Roberts K.M., Pavon J.A., Fitzpatrick P.F. Kinetic mechanism of phenylalanine hydroxylase: intrinsic binding and rate constants from single-turnover experiments // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52(6). – P. 1062-73.
227. Rocha J.C., Martel F. Large neutral amino acids supplementation in phenylketonuric patients // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2009. - Vol. 32. – P. 472-80.
228. Rocha J.C., Martins M.J. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions // *J. Inherit. Metab. Dis.* - Vol. 35. – P. 381-98.
229. Rosa A.P., Jacques C.E., Moraes T.B., Wannmacher C.M., Dutra Ade M., Dutra-Filho C.S. Phenylpyruvic acid decreases glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 1113-8.
230. Ruchelli E.D., Uri A., Dimmick J.E., Bove K.E., Huff D.S., Duncan L.M., Jennings J.B., Witzleben C.L. Severe perinatal liver disease and Down syndrome: an apparent relationship // *Hum. Pathol.* – 1991. – Vol. 22(12). – P. 1274-80.
231. Rudman D., Kutner M., Ansley J., Jansen R., Chipponi J., Bain R.P. Hypotyrosinemia, hypocystinemia, and failure to retain nitrogen during total parental nutrition of cirrhotic patients // *Gastroenterology.* – 1981. – Vol. 81(6). – P. 1025-35.

232. Sabelli H.C., Durai U.N., Fawcett J., Javaid J.I. High phenylacetic acid differentiates schizoaffective from schizophrenic patients // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* – 1989. Vol. 1. – P. 37–39.
233. Sanayama Y., Nagasaka H., Takayanagi M., Ohura T., Sakamoto O., Ito T., et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 103. – P. 220-5.
234. Sandler M. Inborn errors and disturbances of central neurotransmission (with special reference to phenylketonuria) // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1982. – Vol. 5. – P. 65-70.
235. Sawin E.A., Murali S.G., Ney D.M. Differential effects of low-phenylalanine protein sources on brain neurotransmitters and behavior in C57BI/6-Pah(enu2) mice // *Mol. Genet. Metab.* – 2014. – Vol. 111. – P. 452-61.
236. Scriver C.R. The phenotypic manifestations of hereditary tyrosinemia and tyrosyluria: a hypothesis // *Can. Med. Assoc J.* – 1967. Vol. 97(18). – P. 1073-5.
237. Scriver C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift // *Hum. Mutat.* – 2007. – Vol. 28(9). – P. 831-45.
238. Scriver C.R., Kaufman S., Eisensmith R.C. et al. The hyperphenylalaninemia // In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill. – 1995. - P. 1015-1075.
239. Scriver C.R., Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency // In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill. – 2001. – P. 1667-1724.
240. Scriver C.R., Rosenberg L.E. Amino acid metabolism and its disorders // *Major. Probl. Clin. Pediatr.* – 1973. – Vol. 10. - P. 1-478.

241. Schuck P.F., Ferreira G.C., Moura A.P., Busanello E.N., Tonin A.M., Dutra-Filho C.S. et al. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain // *Neurochem. Int.* – 2009. – Vol. 548. – P. 519-25.
242. Schulpis K.H., Tsakiris S., Traeger-Synodinos J., Papassotiriou I. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria // *Clin. Biochem.* - 2005. Vol. 38. – P. 239-42.
243. Schwartz E.I., Khalchitsky S.E., Eisensmith R.C., Woo S.L.C. Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on Guthrie cards // *The Lancet.* – 1990. - Vol. 336, Issue 8715. - P. 639-640.
244. Seeff L.B., Levitsky J., Tillman P.W., Perou M.L., Zimmerman H.J. Histopathology of the liver in Down`s syndrome // *Am. J. Dig. Dis.* – 1967. – Vol. 12(11). – P. 1102-13.
245. Shefer S., Tint G.S., Jean-Guillaume D., Daikhin E., Kendler A., Nguyen L.B. et al. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? // *J. Neurosci. Res.* – 2000. – Vol. 61. – P. 549-63.
246. Shi W., Meininger C.J., Haynes T.E., Hatakeyama K., Wu G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2004. – Vol. 41(3). – P. 415-34.
247. Shiman R., Jones S. H., Gray D. W. Mechanism of Phenylalanine Regulation of Phenylalanine Hydroxylase // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 11633-11642.
248. Shulkin B.L., Betz A.L., Koeppe R.A., Agranoff B.W. Inhibition of neutral amino acid transport across the human blood-brain barrier by phenylalanine // *J. Neurochem.* - 1995. – Vol. 64(3). – P. 1252–1257.
249. Simon K.R., Dos Santos R.M., Scaini G., Leffa D.D., Damiani A.P., Furlanetto C.B., Machado J.L., Cararo J.H., Macan T.P., Streck E.L., Ferreira G.C., Andrade V.M., Schuck P.F. DNA damage induced by phenylalanine and its

- analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia // *Biochem. Cell. Biol.* - 2013. – Vol. 91(5). - P. 319-24.
250. Sirtori L.R., Dutra-Filho C.S., Fitarelli D., Sitta A., Haeser A., Barschak A.G. et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1740. – P. 68-73.
251. Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Barden A.T., Biancini G.B., Vargas P.R. et al. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 27. - P. 243-7.
252. Sitta A., Barschak A.G., Deon M., de Mari J.F., Barden A.T., Vanzin C.S. et al. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2009a. – Vol. 29. – P. 211-8.
253. Sitta A., Manfredini V., Biasi L., Treméa R., Schwartz I.V., Wajner M. et al. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 679. – P. 13-6.
254. Sitta A., Vanzin C.S., Biancini G.B., Manfredini V., de Oliveira A.B., Wayhs C.A. et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 31. – P. 429-36.
255. Skryabin B.V., Khalchitsky S.E., Kuzjmin A.I., Kaboev O.K., Kalinin V.N. and Schwartz E.I. A crude lysate of cells immobilized on solid support can serve as a matrix for enzymatic DNA amplification // *Nucleic Acids Research.* – 1990. - Vol. 18, № 14. - P. 4289.
256. Smeraldi E., Lucca A., Macciardi F., Bellodi L. Increased concentrations of various amino acids in schizophrenic patients. Evidence for heterozygosity effects? // *Hum. Genet.* – 1987. – Vol. 76. – P. 138–140.
257. Smith C.B., Kang J. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2000. – Vol. 97. – P. 11014-9.

258. Snyder S.H. Amphetamine psychosis: A “model” schizophrenia mediated by catecholamines // *Am. J. Psychiatry.* – 1973. – Vol. 130. – P. 61–67.
259. Stoy N., Mackay G.M., Forrest C.M., Christofides J., Egerton M., Stone T.W. et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington’s disease // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 93. - P. 611-23.
260. Swierczyński J., Aleksandrowicz Z., Zydowo M. Inhibition of pyruvate oxidation by skeletal muscle mitochondria by phenylpyruvate // *Acta Biochim. Pol.* – 1976. – Vol. 23. – P. 85-92.
261. Teigen K. Martinez A. Probing cofactor specificity in phenylalanine hydroxylase by molecular dynamics simulations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2003. – Vol. 20. – P. 733–740.
262. Teraishi T., Ozeki Y., Hori H., Sasayama D., Chiba S. et al. ¹³C-phenylalanine breath test detects altered phenylalanine kinetics in schizophrenia patients // *Transl. Psychiatry.* – 2012. – Vol. 2(5). e119. – P. 1-9.
263. Thalhammer O., Havelec L., Knoll E., Wehle E. Intellectual level (IQ) in heterozygotes for phenylketonuria (PKU). Is the PKU gene also acting by means other than phenylalanine blood level elevation? // *Hum. Genet.* – 1977. – Vol. 38. – P. 285–288.
264. Thompson J.H. Relatives of phenylketonuric patients // *J. Ment. Defic. Res.* – 1957. – Vol. 1. – P. 67–78.
265. Thony B., Auerbach G., Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 347 (1). - P. 1-16.
266. Thony B., Ding Z. Martinez A. Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 577. – P. 507–511.
267. Thony B., Calvo A.C., Scherer T., Svebak R.M., Haavik J., Blau N. Martinez, A. Tetrahydrobiopterin shows chaperone activity for tyrosine hydroxylase // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 106. – P. 672–681.

268. Tourian A., Goddard J., Puck T.T. Phenylalanine hydroxylase activity in mammalian cells // *J. Cell. Physiol.* – 1969. – Vol. 73. – P. 159–70.
269. Udenfriend S., Cooper J.R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine // *J. Biol. Chem.* – 1952. - Vol. 194. - P. 503-511.
270. Underhaug J., Aubi O., Martinez A. Phenylalanine Hydroxylase Misfolding and Pharmacological Chaperones // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 12(22). – P. 2534–2545.
271. van Spronsen F.J., Hoeksma M., Reijngoud D.J. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? // *J. Inherit. Metab. Dis.* - 2009. – Vol. 32(1). – P. 46–51.
272. Velema M., Boot E., Engelen M., Hollak C. Parkinsonism in phenylketonuria: a consequence of dopamine depletion? // *JIMD Rep.* - 2015. – Vol. 20. - P. 35-8.
273. Vogel F. Phenotypic deviations in heterozygotes of phenylketonuria (PKU) // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1985. – Vol. 177. - P. 337–349.
274. Wajner M., Goodman S.I. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – Vol. 43. – P. 31-8.
275. Walaas E., Waalas O., Lovstad R. The interaction of ceruloplasmin with catecholamines // В кн.: «Biochemistry of copper». Acad. Press, N.Y. 1966. - P. 537–544.
276. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine // *Amino Acids.* – 2011. - Vol. 40. – P. 1271-96.
277. Wang L., Erlandsen H., Haavik J., Knappskog P. M., Stevens, R. C. Threedimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. – P. 12569-12574.

278. Wang M., Vyhmeister I., Swendseid M.E., Kopple J.D. Phenylalanine hydroxylase and tyrosine aminotransferase activities in chronically uremic rats // *J. Nutr.* – 1975. – Vol. 105. - P. 122–7.
279. Weber G. Inhibition of human brain pyruvate kinase and hexokinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible relevance to phenylketonuric brain damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1969. – Vol. 63. - P. 1365-9.
280. Wei J., Xu H., Ramchand C.N., Hemmings G.P. Low concentrations of serum tyrosine in neuroleptic-free schizophrenics with an early onset // *Schizophr. Res.* – 1995. - Vol. 14. – P. 257–260.
281. Werner E.R., Blau N., Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 438(3). – P. 397-414.
282. Westwood A., Raine D.N. Heterozygote detection in phenylketonuria. Measurement of discriminatory ability and interpretation of the phenylalanine loading test by determination of the heterozygote likelihood ratio // *J. Med. Genet.* – 1975. – Vol. 12. - P. 327-333.
283. Woolf L.I., Cranston W.I., Goodwin B.L. Genetics of phenylketonuria. Heterozygosity for phenylketonuria // *Nature.* – 1967. – Vol. 213. – P. 882-883.
284. Wyatt R.J., Karoum F., Stoff D.M., Kleinman J.E., Gillin J.C., Jeste D.V. et al. Monoamine oxidase, phenylethylamine, norepinephrine and schizophrenia // *Clin. Gene.* – 1981. - Vol. 19. - P. 437–442.
285. Xia T., Gray D. W., Shiman R. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. III. Control of catalysis by (6R)-tetrahydrobiopterin and phenylalanine // *J.Biol. Chem.* – 1994. - Vol. 269. – P. 24657-24665.
286. Yano S., Moseley K., Azen C. Large neutral amino acid supplementation increases melatonin synthesis in phenylketonuria: a new biomarker // *J. Pediatr.* – 2013. – Vol. 162. - P. 999-1003.
287. Yoshimoto S., Kaku H., Shimogawa S., Watanabe A., Nakagawara M., Takahashi R. Urinary trace amine excretion and platelet monoamine oxidase activity in schizophrenia // *Psychiatry Res.* – 1987. – Vol. 21. - P. 229–236.

288. Young G.A., Parsons F.M. Impairment of phenylalanine hydroxylation in chronic renal insufficiency // *Clin. Sci.* – 1973. – Vol. 45. – P. 89–97.
289. Yu Y.G., Tang F.G., Pan J., Gu X.F. Effects of phenylalanine and its metabolites on cytoplasmic free calcium in cortical neurons // *Neurochem. Res.* – 2007. - Vol. 32. – P. - 1292-301.
290. Yuwiler A., Geller E., Slater G.G. On the mechanism of the brain serotonin depletion in experimental phenylketonuria // *J. Biol. Chem.* – 1965. – Vol. 240. - P. 1170-4.
291. Zangerle R., Kurz K., Neurauter G., Kitchen M., Sarcletti M. et al. Increased blood phenylalanine to tyrosine ratio in HIV-1 infection and correction following effective antiretroviral therapy // *Brain Behav. Immun.* – 2010. - Vol. 24. - P. 403–408.
292. Zhang S., Huang T., Ilango U., Hinck A. P., Fitzpatrick, P. F. The solution structure of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase // *J. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 426. - P. 1483-1497.
293. Zoller H., Schloegel A., Schroecksadel S., Vogel W., Fuchs D. Interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus infection increases plasma phenylalanine and the phenylalanine to tyrosine ratio // *J. Interferon Cytokine Res.* - 2012. - Vol. 32. – P. 216–220.