

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ГРЕЧАНІНА ЮЛІЯ БОРИСІВНА

УДК 575.116:616-076.4-053-13

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІМОРФІЗМІВ МТДНК ТА ПОЛІМОРФНИХ
ВАРІАНТІВ ГЕНІВ С677Т МТНFR, А66G МTRR НА КЛІНІЧНІ
ПРОЯВИ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ДИСФУНКЦІЙ

03.00.15 – генетика

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня

доктора медичних наук

Науковий консультант:

Арбузова Світлана Борисівна

чл.-кор. НАМНУ,

д. мед. н., професор

Одеса-2012

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Сучасні погляди на мітохондріальні дисфункції (МТХД)	25
1.1.1. Сучасні дослідження мітохондріального геному (МТХГ).....	25
1.1.2. Енергетичний метаболізм мітохондрій (МТХ).....	27
1.1.3. Еволюційні особливості мітохондріального геному.....	30
1.1.4. Патогенетичні основи МТХД.....	32
1.1.5. Особливості клінічних форм МТХД.....	44
1.1.6. Діагностика МТХД.....	49
1.2. Порушення обміну метіоніну як глобальна проблема медицини	53
1.2.1. Роль метіоніну у забезпеченні модифікації генної експресії.....	53
1.3. Епігенетична регуляція функції геному.	59
1.3.1. Метилування як головна реакція епігенезу	61
1.3.2. Епігенетика і хвороби людини	67
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	71
2.1. Характеристика обстежених груп.....	71
2.2. Анамнез	74
2.3. Сомато-генетичне дослідження із синдромологічним аналізом.	74
2.4. Сучасні візуальні технології	76
2.4.1. Ультразвукове дослідження	76
2.4.2. Магнітно-резонансні дослідження	76
2.5. Молекулярно-генетичні дослідження.....	77
2.6. Аналіз вільних амінокислот методом високоефективної рідинної хроматографії.....	81
2.7. Визначення органічних кислот сечі за допомогою газової хроматографії/ мас-спектрометрії.	83

2.8. Інтерпретація отриманих результатів.....	88
2.9. Визначення рівня лактату крові ензиматичним методом.....	88
2.10. Визначення рівня біохімічних показників крові.....	89
2.11 Математико-статистичні методи.	89
2.12 Дослідження активності цитрат – синтази та I, II, III, IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій.....	114
РОЗДІЛ III МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ мтДНК ТА ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ	
C677T MTHFR ТА A66G MTRR	116
3.1. Генетична епідеміологія поліморфізмів мтДНК.....	116
3.2. Генетична епідеміологія поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу C677T A1298C, G1793A MTHFR, A66G MTRR, G80A RFC-1	123
РОЗДІЛ IV. КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА	
ХВОРИХ ІЗ МТХД	138
4.1. Загальна характеристика обстежених пацієнтів.	138
4.1.1. Клінічні ознаки виявлених МТХД.	145
4.2. Клініко-генетична характеристика хворих із мітохондріальною дисфункцією, асоційованою із «точковими» мутаціями мтДНК.....	171
4.3. Клінічні особливості хворих із МТХД, асоційованих із поліморфізмами мтДНК.	203
РОЗДІЛ V. КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХВОРИХ	
НОСІЇВ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ C677T MTHFR ТА A66G MTRR	229
5.1. Характер клінічних ознак пробандів - носіїв поліморфних варіантів генів C677T MTHFR та A66G MTRR.	229
5.2. Феномен синтропії при мітохондріальній дисфункції.	250
РОЗДІЛ VI. КЛІНІКО- БІОХІМІЧНА ОЦІНКА ХВОРИХ	
ІЗ МТХД	264
6.1. Визначення рівня лактату пірувату, біохімічних показників амінокислот крові	266

6.2. Оцінка частот і характеру змін органічних кислот у пацієнтів із МТХД.....	273
6.3. Проведення дослідження активності цитрат-синтази та I, II/III, IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій.....	284
РОЗДІЛ VII. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ	
РЕЗУЛЬТАТІВ	294
ВИСНОВКИ	310
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	313

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

А	– абсанс
АК	– амінокислоти
АКТГ	– адренкортикотропний гормон
А-Т	– атаксія-телеангіектазія
АТ-пари	– Аденозін-Тімін пари
АХ	– аномалії хромосом
БП	– біполярні порушення
VLCAD	– ацил-КоА дегідрогеназа жирних кислот із наддовгим вуглеводним ланцюгом
ВЕРХ	– вискоєфективна рідинна хроматографія
ГЕ	– генералізована епілепсія
ГЕП	– генералізований епіприступ
ГЛРАІ	– ген, відповідальний за α -1 субодиницю гліцинового рецептора
ГФА	– гіперфенілаланінемія
ГХ	– гетерохроматин
ГЦ-пари	– Гуанін-Цитозин пари
НМGS	– гідроксі-метіл-глутаріл-КоА-синтаза
ДЛ	– дихальний ланцюг
ДЛАД	– довголанцюгова ацилдегідрогеназа
ДНЕ	– доброякісна неонатальна епілепсія
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ДСНС	– доброякісні сімейні неонатальні судоми
Е	– епілепсія
Е2	– дегідроліпоамід ацетилтрансферази
ЕЕГ	– електроенцефалографія
Е3	– дегідроліпоамід дегідрогенази
ЕКГ	– електрокардіограма
ЕЛДГМ	– епілепсії лобної долі головного мозку

E1	– піруватдекарбоксилази
EM	– епігенетична мінливість
EP	– епілептичний приступ
ЖК	– жирні кислоти
ЗПМР	– затримка психомоторного розвитку
ЕТФ	– електронтранспортні флавопротеїни
КЛАД	– коротколанцюгова ацилдегідрогеназа
КТ	– комп'ютерна томографія
КТПІ	– карнитинпальмітоїлтрансфераза
КТОЕ	– комп'ютерна томографія з однофотонною емісією
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа
МАР	– малі аномалії розвитку
МАХ	– малі аномалії хромосом
МДТ	– малатдегідрогеназа
МЗ	– монозиготні близнюки
ММК	– міжмітохондріальні контакти
МПВР	– множинні природжені вади розвитку
МСАД	– ацил СоА-дегідрогеназа жирних кислот із середнім вуглеводним ланцюгом
МТР	– трьохфункціональний білок
МТНFR	– метилентетрагідрофолат редуктаза
МТRR	– метіонін синтаза-редуктаза
МTR	– метіонін синтаза
МТХД	– мітохондріальна дисфункція
МТХ	– мітохондрії
МТХГ	– мітохондріальний геном
МФА	– мультифакторіальні аномалії
MERRF	– міоклонус-епілепсія, «рвані» червоні волокна
MELAS	– мітохондріальна енцефалопатія, лактат-ацидоз, інсультподібні епізоди

мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
НАДН	– нікотинаміддінуклеотид
мтДНК	– мітохондріальна ДНК
НФ1	– нейрофіброматоз I тип
НЦЛ	– нейрональний цероїдний ліпофусциноз
ОА	– органічна ацидурія
ОФ	– окисне фосфорилування
ПВГ	– поліморфні варіанти генів
ПДГ	– піруватдегідрогеназа
ПДЗ	– пароксизмальне деполяризаційне зрушення
ПЕ	– парціальна епілепсія
ПЕП	– парціальний епілептичний приступ
ПЕТ	– позитронно-емісійна томографія
ПК	– піруваткарбоксилаза
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПМЕ	– прогресуюча міоклонус-епілепсія
РЕГ	– реоенцефалографія
РМ	– реметилування метіоніну
рРНК	– рибосомна рибонуклеїнова кислота
СА	– синдром Ангельмана
САХ	– структурні аберації хромосом
СВ	– синдром Веста
СГД	– соматогенетичне дослідження
СДГ	– сукцинаддегідрогенази
СГЕ	– симптоматичні генералізовані епілепсії
SCHAD	– 3-гідроксиацилдегідрогеназа жирних кислот із коротким вуглеводним ланцюгом
СЛАД	– середньоланцюгова ацилдегідрогеназа
СТД	– сполучнотканинна дисплазія
СХО	– спадкова хвороба обміну

SCOT	– сукциніл-КоА-оксоацил-КоА-трансферази
СШТ	– синдром Шерешевського-Тернера
ТКС	– тоніко-клонічні судоми
тРНК	– транспортна рибонуклеїнова кислота
ТС	– туберозний склероз
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
ХВ	– хромосомні варіанти
ХН	– хромосомна нестабільність
ХНПУ	– Харківський національний політехнічний університет
ХП	– хвороба Паркінсона
ХС	– хромосомні синдроми
ХСМГЦ	– Харківський спеціалізований медико-генетичний центр
ФАДН	– фосфатаденіндинуклеотид
ФКУ	– фенілкетонурія
ФПР	– фотопароксизмальна реакція
ФС	– фебрильні судоми
ЦКЛ № 5	– Центральна клінічна лікарня №5
ЦТК	– цикл трикарбованих кислот
ЦНС	– центральна нервова система
ЮАЕ	– ювенільна абсансна епілепсія
ЮМЕ	– ювенільна міоклонус-епілепсія
ЯМРТ	– ядерно-магніто-резонансна томографія

ВСТУП

Мітохондріальні хвороби за останні 10 років стали предметом наукових досліджень великої кількості вчених [8, 36, 37, 58, 84, 90].

Поліорганність уражень при мітохондріальних дисфункціях (МТХД), прогресивний плин, тяжкий перебіг з кінцевою інвалідізацією, зростаюча кількість нозологічних форм, яким притаманні клінічний поліморфізм і генетична гетерогенність, наявність порушень енергетичного обміну не тільки при успадкованих, але і при набутих патологічних станах, ставили питання про визначення самого поняття мітохондріальної патології. І тільки інтенсивне вивчення мітохондріального геному і мітохондріальних хвороб дало можливість узагальнити це поняття і визначити його як мітохондріальна дисфункція – типовий патологічний процес, для якого не існує нозологічної і етіологічної специфічності [63], і вважати мітохондріальну дисфункцію новим патобіохімічним механізмом нейродегенеративних розладів широкого спектру (Сухоруков В.С., 2007, Беленичев І.Ф., Чернія В.І., 2010).

Оскільки з моменту появи перших досліджень порушення енергетичного обміну існувало визначення мітохондріальних хвороб (1991 рік), яке з плином часу втратило свою специфічність, дослідження цієї патології людини повинно було перейти в площину взаємодії генних мутацій, оточуючого середовища, епігенетичних факторів, взаємодії ядерного і мітохондріального геномів (Гречаніна О.Я., 2011).

Сучасному поколінню доводиться жити під час еволюційних перебудов на всій планеті, і людина, як мішень еволюції, стає потерпілою, бо підпадає під град епідемій неінфекційного характеру – серцево-судинних, психосоматичних, метаболічних, онкологічних захворювань. З'являються нові класи хвороб (мітохондріальні хвороби, хвороби геномного імпринтінгу, епігенетичні та гетерохроматинові захворювання), групування яких пов'язане з появою нових знань. Разом з тим, уважний аналіз складу груп цих хвороб показує, що одні і ті

ж хвороби наводяться дослідниками в різних групах (О.Я. Гречаніна (2011), В.М. Запорожан, 2008, С.К. Евтушенко, 2011). Такі хвороби, на нашу думку, можна назвати «перебіжчиками» – синдроми Альцгеймера, Паркінсона, Ретта, Відемана-Беквіта, Ангельмана та ін. Різні класифікації цих хвороб, на жаль, не змінюють можливостей їх лікування, а відбивають пошуки їхньої причини.

Ю.П. Лисицин (2011) об'єднав це явище теорією «хвороб цивілізації і соціальної дезадаптації», а В.М. Бондар (2010) визначив це поняття дизадаптозом – клінічним свідомством того, що вимоги, які виставляє зовнішнє середовище до організму, не відповідають генетично закріпленим адаптаційним можливостям більшої частини популяцій, що проявляється зростанням загальної захворюваності, підвищенням частоти рідкісних спадкових і неспадкових хвороб, нозологічних форм, які раніше не зустрічалися.

В основі дизадаптозу, на думку О.Я. Гречаніної (2011), лежить порушення епігенетичного статусу. Під епігенетикою розуміють процеси, які змінюють функцію ДНК (генну експресію), не змінюючи її склад (послідовність нуклеотидів) (С.Д. Елліс та ін., 2010). До епігенетичних процесів відносять множинні модифікації геному, і, перш за все, доведений процес метилування цитозинових основ. Саме метилування приймає активну участь у процесах активації роботи генів. Епігенетичні модифікації здатні закріплюватися в організмі, відбиватися на долі організму та геному, успадковуватись поза законами Г. Менделя. Коріння епігенетики йде від Ж.Б. Ламарка, який підтвердив можливість успадкування набутих ознак (трансгенерація). 20 років тому вперше з'явилися дані про те, що порушення метилування пов'язане із онкологічною патологією [255, 256, 257, 258]. Інтенсивний розвиток досліджень епігенетичних модифікацій показав, що генетика і епігенетика доповнюють одна одну. Одиницею епігенетики є епігеном – сукупність усіх епігенетичних маркерів, які зумовлюють експресію генів у даній клітині. Модифікації – це епімутації, які носять адаптивний характер.

Епігенез перебуває під впливом біохімічних реакцій і регулює – гіпо-, гіпер- і деметилування цитозинових основ. Метилування – це процес

приєднання метильної групи до цитозинових основ ДНК, яке призводить до виключення генної експресії. Включення та виключення генів, ацетилювання білків хроматину, які необхідні для збірки та упаковки ДНК, являються також механізмом реалізації епігенетичного статусу.

Найбільш важливими факторами, які у ролі тригерів призводять до порушень епігенетичного статусу, є харчування, інфекції, паління, алкоголь і стрес (Nicholas A. Bishop, Tao Lu, Bruce A. Yankner, 2010). На думку В.І. Бондар, запорукою виживання виду *Homo sapiens* – в різноманітті генетично закріплених можливостей, а індивідуума – в широті освоєння визначного адаптаційного коридору, в якому індивідуум може існувати без порушення репродуктивної здатності і розвитку змін, які носять летальний характер.

Вислів Whitelaw E. (2012) значною мірою демонструє важливість наряду сучасних наукових досліджень: «Ми повинні пам'ятати: те, що ми успадковуємо від наших батьків, – це хромосоми, а хромосоми складаються із ДНК тільки на 50%, іншу половину складають протеїни, які несуть епігенетичні маркери» [243]. До найбільш відомих епігенетичних механізмів, окрім метилування ДНК, відносяться також ремоделювання хроматину; регуляція на рівні РНК, зокрема, РНК-інтерференція, пріонізація білків, інактивація Х-хромосом.

Оскільки фенотип клітини або організму в цілому залежить від того, які типи генів транскрибуються, успадкування транскрипційного статусу генів може призводити до епігенетичних ефектів. Існує декілька рівнів регуляції експресії генів: ремоделювання хроматину (комплексу ДНК) і асоційованих білків (гістонів). Ремодування хроматину може ініціюватися посттрансляційною модифікацією гістонів – їхнім метилуванням та хімічною модифікацією азотистих основ – метилуванням цитозину.

Результат транскрипції може прямо або «побічно» регулювати активність того ж гена. Так, фактори транскрипції Hnf4 і MyoD підсилюють експресію багатьох генів у печінці і в м'язах. Інші епігенетичні зміни регулюються при експресії різних сплайсосомних варіантів мРНК або при формуванні

дволанцюгових молекул РНК (RNAi). Ці гени включаються за допомогою сигнальних систем клітин, але іноді в синцитії РНК дифузно передаються між клітинами.

На думку багатьох дослідників метилування, така із модифікацій ДНК, яка призводить до змін її структурного і функціонального статусу, є способом регулювання рівня експресії генів, структури і стабільності хроматину, бере участь у створенні генетичного і статевого різноманіття [103, 244].

Метилування, на думку С. Д. Елліс та ін., (2010) може торкатися тільки тих генів, які вже були інактивовані іншими механізмами в ембріональному стані. Зчитування генетичної інформації в ембріональній стадії може викликати зупинку механізмів метилування ДНК. Успадкованість метильованого стану і вторинна природа механізмів запуску/зупинки метилування свідчать про те, що метилування ДНК являє собою специфічну функцію клітинної пам'яті у розвитку (Р. Джиртл, 2010) [244].

Мітохондріальну генетику тісно пов'язують із епігенетикою. Гістони – високо основні білки, які формують комплекси із ДНК, створені нуклеосомами і хроматином. Ряд посттрансляційних модифікацій гістонів визначають функції хроматину, ацетилювання, метилування, фосфорилювання і убіквітинування. На думку Goto S (2008), при обмеженій дієті карбонилування гістонів йде більш швидко, що зменшує окислювальний стрес [242].

Одним із відкритих біологічних факторів є інгібітор p53 піфітрина-альфа (PFI), який відіграє важливу роль при нейродегенеративних порушеннях – епілепсії, хворобі Альцгеймера, у виникненні яких мітохондріальній дисфункції належить визначальна роль. Встановлено, що в нейронах p53 активується різними стресовими сигналами, які з'являються у відповідь на пошкодження ДНК і киснево-глюкозного голодування. Після активації p53 переноситься в ядро і ініціює транскрипцію проапоптичних факторів. Конститутивна сигналізація включає активацію NI-kB і індукує синтез антиапоптичних білків (bcl-2, bcl-x1, MnSOD, калбіндин) або інгібіторів білків апоптозу (IAPs). Для ефективної взаємодії із відповідними промоторними

районами ці фактори транскрипції потребують наявності кофактора p300. Пул p300 в ядрі лімітований, транскрипційні фактори p53 та NI-kB «змагаються» в можливості зв'язку із цілими кофакторами. В залежності від результату запускається про- або антиапоптотичний шлях. Таким чином, інгібування ядерної транслокації p53 піфітрином «побічно» активує сигнальний шлях NI-kB – шлях виживання клітини, і призводить до посилення антиапоптотичної дії інгібіторів p53.

Таким чином, сучасні знання поєднали мітохондріальну патологію із складною системою епігенетичного статусу, в роботу якої залучений обмін метіоніну. Саме тому аналіз клінічних особливостей МТХД задля ранньої діагностики і адекватного лікування потребує вивчення патогенетичних шляхів їхнього формування.

Порушення біоенергетичного обміну стають усе більш розповсюдженими в людських популяціях, число пацієнтів із МТХД зростає в геометричній прогресії, а частота сягнула 1 : 3000. До їх виникнення призводять мутації як ядерного, так і мітохондріального геному, на думку Жаданова С.І., 2007 [37].

Більшість білків МТХ кодується клітинною ДНК і потрапляє в певний субкомпартмент (мітохондріальний матрикс, внутрішню мембрану, міжмембранний простір, зовнішню мембрану) і в ньому функціонує. Забезпечення усіх життєвих процесів організму здійснюється (гіпотетично) за рахунок того, що різниця потенціалів у певній частині мембран мітохондрій передається впродовж мембрани і перетворюється в роботу в іншій області тієї ж мембрани [10].

Особливістю усіх мітохондріальних геномів (МТХГ) є максимальна структурна компактність при максимальній інформаційній завантаженості. Ця особливість сформувалась завдяки змінам генетичного коду МТХ, які дозволили скоротити необхідний для транскрипції набір тРНК. МТХ змінила свій код, на думку А. Bender et al. (2008), за рахунок того, що амінокислота метіонін в процесі еволюції накопичилась у білках дихального ланцюга (ДЛ) мітохондрій і виступила в ролі природного антиоксиданту [15]. Для здійснення

цього процесу МТХ змінила свій код. Економічність МТХ геному була досягнута за рахунок відсутності інтронів, мінімізації набору тРНК, зменшення розмірів рРНК, відсутності спейсерних ділянок та кодування деяких термінуючих кодонів, які добудовуються в процесі посттранскрипційного поліаденілування відповідної пре-мРНК [8, 14].

Оскільки численні мітохондріальні білки кодуються генами ядерного геному, синтезуються в цитоплазмі і лише потім транспортуються в мітохондрії, то і мітохондріальна дисфункція (МТХД) може бути наслідком мутацій як у мітохондріальному, так і в ядерному геномі, що потенційно збільшує кількість мітохондріальної патології і потребує диференційної діагностики сучасного рівня [83]. Мутації мітохондріального геному і його перебудови асоційовані з великою кількістю і спектром захворювань як дитячого, так і дорослого віку (Patrick F Chinnery, 2009) [89]. Вони порушують процес окисного фосфорилування і викликають порушення внутрішньоклітинної біоенергетики.

Численні публікації, присвячені діагностиці мітохондріальних хвороб, опису спектра мутацій мітохондріального генома протягом останніх 10 років, відносяться переважно до популяцій Північної Америки, Західної Європи й Австралії, у яких вивчалися порушення окисного фосфорилування (ОФ) [96, 140, 172]. Але обмеженість популяційно-етнічного складу вивчених родин з патологією ОФ, як і відсутність даних про патогенне значення більшості мутацій і ступеня гено- і фенотипових кореляцій, а також уявлень про вплив генетичного оточення на ступінь експресії мітохондріальної патології, роблять надзвичайно значущими дослідження, як фундаментальні, так і прикладні, спрямовані на розуміння мітохондріальної патології в цілому. Великого значення набуває скринінг патогенних мутацій мтДНК у генетично різних популяціях, пошук фено- і генотипових кореляцій. Визначення специфічності мутацій для конкретних клінічних проявів, як і розширення уявлень про вплив генетичного оточення на ступінь виразності генної експресії, допоможуть з'ясувати не тільки патогенетичні механізми розвитку порушень

енергетичного обміну, а і розробити адекватні методи прогнозування, лікування, реабілітації і профілактики при мітохондріальних захворюваннях.

МТХД обумовлені генетичними структурними, біохімічними дефектами МТХ, наслідком яких стає порушення тканинного дихання. Оскільки МТХ – це енергетична станція клітини, дефект її ферментів, перш за все, відбивається на функції енергозалежних органів – центральної нервової системи, скелетних і серцевих м'язів, печінки, нирок, ендокринних залоз. Сучасній медицині відомо 50 таких хвороб із поліорганим ураженням і домінуючим порушенням ЦНС та м'язів, які характеризуються м'язовою гіпотонією, мозковою атрофією, нестерпністю фізичного навантаження, птозом, полінейропатією, відсутністю рефлексів, атрофією зорового нерву, нейросенсорною глухотою, мігрєнями, летаргічними станами, порушеннями психомоторного розвитку, олігофренією, деменцією [93].

Генетична епідеміологія мітохондріальних хвороб свідчить про те, що зустрічаються ці хвороби в залежності від багатьох факторів і, перш за все, від типу мутації та варіанту клінічних проявів. Так, делеції мітохондріальної ДНК (мтДНК) не підлягають трансмісії і саме тому вони менш розповсюдженні, ніж успадковані по материнській лінії, які мають назву «точкових». Так, мутація Т8993G нерідко стає причиною тяжкої інфантильної енцефалопатії, судом і атаксії і родоводи, в яких успадковується ця мутація, малочисельні у порівнянні із родоводами, в яких сегрегує мутація G11778A мтДНК, що має невисоку пенетрантність і призводить до ураження зорового нерву [243]. Разом з тим, наведені великі родоводи в сім'ях із мутацією Ant1 ядерного геному, яка призводить до множинних делецій мтДНК і до хронічної прогресуючої зовнішньої офтальмоплегії (Taylor R.W., Turnbull D.M., 2009; van Oven M., Kayser M., 2008; Vilmi T. et al. 2005). Ці данні підкреслюють недостатню вивченість генетичної епідеміології мітохондріальних хвороб, подолати яку можливо за допомогою популяційних досліджень.

В останні роки особливий інтерес викликає дослідження ролі поліморфних варіантів генів у маніфестації поширених хвороб людини. Так,

A. Ghosh et al, 2010, Parker W. D., et al. (2008) знайшли, що у пацієнтів з хворобою Паркінсона (ХП) активність комплексу I мітохондріального дихального ланцюга, перенесення електронів є зниженою, але в генах, що кодують субодиниці комплексу I, не виявлено мутацій [181, 182]. Автори висунули гіпотезу про те, що ризик маніфестації ХП передається за допомогою загального числа несинонімічних замін у генах MTND при різних напрямках диференціювання мтДНК, а не за допомогою поодиноких мутацій. Визначена кількість несинонімічних замін у семи генах MTND і проаналізовані відмінності в загальній кількості несинонімічних замін і відношення швидкості несинонімічних замін до швидкості синонімічних замін ($K(a)/K(s)$) в генах MTND між кластерами європейської гаплогрупи мтДНК (HV, JT, KU, JWX). Серед пацієнтів з ХП часто зустрічався суперкластер JTJWX з найбільшою кількістю амінокислотних замін. Отримані результати дозволили авторам припустити, що відносний надлишок несинонімічних мутацій у генах MTND в суперкластері JTJWX асоціюється з підвищеним ризиком ХП.

Crimi M. et al. (2011) відзначили, що зміну мтДНК викликають недостатність клітинної енергії і дисфункція клітинного ланцюга перенесення електронів. Відомо, що поодинокі великомасштабні перебудови є найчастішими мутаціями мтДНК і вони призводять до виражених поліморфних клінічних ознак. Автори показали, що заміна A12308G (частий поліморфізм) використовується для визначення гаплогрупи U мтДНК, а у пацієнтів з мітохондропатіями носіїв одиначної макроделеції мтДНК вона асоціюється з підвищеним ризиком розвитку пігментної дегенерації сітківки, низькорослості, дисфагії – дизартрії і дефектів серцевої провідності. На думку авторів, унаслідок макроделецій мтДНК, гаплотип мтДНК може модулювати клінічну експресію мітохондріальних енцефаломіопатій.

Нині спектр аутичних захворювань стає ведучою проблемою нейрогенетики, поліморфізми мітохондріальної ДНК при аутизмі досліджені Rossignol D. A et al. (2012) [223].

Думка про те, що «гіпотеза про мітохондріальний каскад» може пояснити багато біохімічних, генетичних і патологічних ознак спорадичної хвороби

Альцгеймера (ХА) виникла у М. Манкузо і співав. (2009) при вивченні залучення мітохондрій у патологічний процес при хворобі Альцгеймера – нейродегенеративному порушенні, що призводить до незворотньої втрати кортикальних нейронів, появи позаклітинних синильних бляшок, що містять пептид бета-амілоїд (АП) [246]. В даний час існує патогенетична модель хвороби, заснована на тому, що хвороба Альцгеймера виникає в результаті мутації у білку амілоїдного попередника і в генах пресеніліна (5% хворих). У 95% хворих з ХА спостерігається пізній дебют, складні причини розвитку – як зовнішньосередові, так і генетичні. Порушення в мітохондріях при ХА описані багатьма дослідниками (193,194). Порушення мітохондріального дихання вивчене в головному мозку, тромбоцитах і у фібробластах хворих з ХА. Соматичні мутації в мтДНК, на думку авторів, могли викликати недостатність енергії і підвищений окислювальний стрес.

Концепція дослідження, яка підлягає доказу торкається положення: вплив поліморфізмів мтДНК на вираженість МТХД відбувається внаслідок патологічного трансформування поліморфізмів мтДНК на тлі зміненого статусу метилування як головного модифікатора генома та наявності тригерів.

Зв'язок із науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана відповідно до планів наукових досліджень кафедри медичної генетики ХНМУ: «Напрями сучасної діагностики, патогенетичної терапії та трьохрівневої профілактики природженої та спадкової патології» (№ держреєстрації 0106U001640), «Всебічний аналіз епідеміології та механізмів експресії мітохондріальних хвороб у слов'янських популяціях Східної України» (№ держреєстрації 0108U005247) та в межах НДР з пріоритетним фінансуванням, а також у рамках міжгалузевої комплексної програми «Здоров'я нації» на 2002-2011 рр..

Мета роботи: Метою роботи є розробка нового напрямку вивчення фундаментальних і прикладних проблем клінічного поліморфізму і генетичної гетерогенності мітохондріальної дисфункції, пов'язаної із складною взаємодією

популяційно-генетичних факторів, що здатні сформувати схильність до порушень енергетичного обміну на тлі зміненого епігенетичного статусу.

Відповідно до мети дослідження в роботі поставлені такі завдання:

1. Визначити генетичну епідеміологію, популяційно-генетичні особливості – поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів системи фолатного циклу, притаманних населенню України.

2. Вивчити епідеміологію гаплотипів мтДНК у вибірці пацієнтів із МТХД.

3. Вивчити клініко-генетичні особливості хворих із МТХД в регіоні дослідження.

4. Визначити спектр ураження систем та органів, асоційованих із генами тРНК- лейцин та тРНК-лізин мтДНК.

5. Провести аналіз клінічних проявів МТХД, асоційованих з «точковими» мутаціями мтДНК.

6. Вивчити основні клінічні ознаки носіїв поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR та А66G МTRR.

7. Вивчити характер фенотипових ознак у пацієнтів – носіїв поліморфізмів мтДНК та С677Т МТНFR, А66G МTRR.

8. Розробити на підставі отриманих даних континуум клінічних ознак, алгоритм та генетичний навігатор для уточнюючої діагностики МТХД.

9. Визначити ефективність нового підходу до уточнюючої діагностики МТХД.

Об'єкт дослідження: поліморфізми мтДНК та поліморфні варіанти генів ферментів фолатного циклу, спадкова патологія, МТХД.

Предмет дослідження: вивчення генетичних особливостей популяції та динамічних частот поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу як біологічних маркерів епігенетичного статусу і клінічних ознак МТХД.

Методи дослідження: сомато-генетичний із синдромологічним аналізом, генеалогічний, цитогенетичний, біохімічні, молекулярно-генетичний, математичний та статистичний.

Наукова новизна. В науковій роботі Ю.Б. Гречаніної «Вивчення впливу поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR, А66G МTRR на клінічні прояви мітохондріальних дисфункцій» розроблено новий напрям вивчення фундаментальних проблем МТХД, визначено вплив популяційно-генетичних факторів на клінічні прояви порушень енергетичного обміну.

Розроблений і використаний комплексний підхід до уточнюючої діагностики МТХД, заснований на оцінці популяційно-генетичних особливостей популяції, генетичної епідеміології поліморфізмів мтДНК і поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу як одного із біологічних маркерів епігенетичного статусу, пошуку «точкових» мутацій мтДНК і вивченні метаболічного фону, на якому реалізуються МТХД.

Вперше проведено неонатальний скринінг поліморфізмів мтДНК та С677Т МТНFR та А66G МTRR. Проведене дослідження дозволило вперше визначити складну взаємодію поліморфізмів мтДНК і поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR та А66G МTRR, здатних сформувати генетичну схильність до порушень енергетичного обміну і розвитку «каскаду хвороб» (синтропії) на тлі зміненого епігенетичного статусу. Вперше в Україні автор запровадила дослідження активності комплексів дихального ланцюга. Дослідження МТХД в Україні на прикладі населення Харківської області має піонерський характер. Виявлені мутації, в тому числі і *de novo*, та поліморфізми мітохондріального генома. Вказана робота була відзначена Державною премією Президента України для молодих учених у галузі науки і техніки в 2003 р. Проведене автором дослідження дозволило визначити, що мітохондріальні порушення відповідають за прогрес поширених захворювань – неврологічних, серцево-судинних, ендокринних. Вперше визначені фено- та генотипові асоціації при поліморфізмах мтДНК та поліморфних варіантах генів фолатного циклу С677Т МТНFR та А66G МTRR. Доведена запропонована концепція про зв'язок МТХД із порушенням епігенетичних механізмів, участь мутацій мтДНК у виникненні феномену синтропії.

Вперше із співавторами клінічно встановлений синдром Лея, як результат нової мутації і підтверджений за допомогою молекулярного дослідження: знайдена мутація *de novo* в еволюційно-консервативній ділянці комплексу ND5 12706C (Phe→Leu) в стані гетероплазмії, яка виникла в процесі гаметогенеза у матері пробанда.

Автор підійшла до розгляду МТХД як нового патобіохімічного механізму нейродегенеративних розладів широкого спектру. Вперше отримані унікальні спостереження за 91 пацієнтом, у яких поєднані фено- та генотипова синтропія, знайдені анеуплоїдія, хромосомний поліморфізм, поліморфізми мтДНК та поліморфні варіанти генів ферментів фолатного циклу як свідчення епігенетичного характеру патології. Отримані дані підкреслюють вплив оточення мтДНК та зміненого епігенетичного статусу на експресію мітохондріальних захворювань. Автор показала, що розподіл гаплотипів мтДНК можна використовувати як діагностичну матрицю при обстеженні пацієнтів із МТХД. Автором проведено вивчення кореляцій окремих органопатій із певними поліморфізмами, і отримані дані підтвердили переважне залучення в патологічний процес енерготропних органів – нервової, серцево-судинної, скелетної, м'язової, ендокринної систем, шкіри та її похідних. Відмічено найбільше залучення різних органів і систем в патологічний процес при поліморфізмах мтДНК (тРНК-лізин) 8697 G/A, 8860C, 8701 A/G, 8856G/A, 8860A, (CRS), 8251G/A, 8472C/T, 8448T/C, 8994G/A, 8337T/C, 8794C/T, 8584G/A, 8701A/G), з відповідними амінокислотними замінами: syn, Thr/Ala, Pro/Leu2, Met/Val, Met/Thr, His/Tyr, Ala/Thr, що підтверджує значущість поліморфізмів у формуванні клінічних проявів, притаманних мітохондріальним порушенням.

Автор довела залежність характеру клінічних ознак від асоціації МТХД із іншими спадковими захворюваннями як наслідок фено- і генотипової синтропії. Включення до уточнюючої діагностики досліджень генних поліморфізмів вперше показало клінічну цінність порушення обміну метіоніну як універсального донора метильних груп у формуванні перебігу різних форм

МТХД. Дисертантом вперше визначена роль епігенетичних проявів у формуванні МТХД на підставі глибокого вивчення характеру маніфестації патології. Автором розширене поняття «конгломерату» хвороб як фено-, так і генотипової синтропії і зроблений висновок про зв'язок цього явища із порушенням епігенетичного статусу.

Практичне значення отриманих результатів. Наукова робота Ю.Б. Гречаніної «Вивчення ролі поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів C677T MTHFR, A66G MTRR на клінічні прояви мітохондріальних дисфункцій» виконана вперше в Україні і показала шляхи діагностики МТХД, удосконалила консультативну, діагностичну і лікувальну допомогу хворим, а також їх родинам. Створення діагностичного алгоритму значно змінило не тільки уявлення про частоту мітохондріальної патології, а і про особливості її клінічних проявів, в основі яких встановлена генна синтропія. Феномен генної синтропії, вперше вивчений дисертантом по відношенню до МТХД, дозволив розробити персоналізовану профілактику і лікування для кожного хворого. Побудова континууму клінічних ознак МТХД визначила можливість їх ранньої діагностики. Використання комплексного підходу в діагностиці МТХД дозволило підвищити ефективність медико-генетичної допомоги населенню та лікування.

Впровадження розробленої концепції дозволило забезпечити ранню діагностику МТХД. Ступінь новизни дослідження визначена наявністю патентів, співпрацею із лабораторіями Пенсільванського та Техаського університетів, публікаціями за кордоном та Державною премією Президента України для молодих учених в галузі науки і техніки, широким впровадженням отриманих даних у практичну роботу багатьох установ.

Розроблені і використані комп'ютерна база даних та сучасні методи математико-статистичного аналізу спостережень.

Результати дослідження впроваджені в практику роботи лікувальних установ та в науково-педагогічний процес у вищих медичних навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Автор особисто опрацювала стратегію і методологію дисертаційного дослідження; здійснила самостійно інформаційно-патентний пошук і аналіз літератури з цього питання, обґрунтувала актуальність вибраної теми, визначила мету та завдання роботи, збирала клінічний матеріал. Здобувач створила унікальну базу даних хворих і сімей з МТХД, за якими веде диспансерне спостереження, самостійно провела клінічне, сомато-генетичне, синдромологічне дослідження пробандів та їх сімей. Самостійно визначила обсяг додаткового обстеження хворих, взяла участь у його проведенні і самостійно здійснила оцінку отриманих даних, спостерігаючи за хворими як у стані прогресивного перебігу хвороби, так і у випадках метаболічних кризів, консультуючи хворих у реанімаційних відділеннях різних міст України. Вільно володіючи сучасними комп'ютерними технологіями, автор самостійно проаналізувала створену нею комп'ютерну базу даних, сформулювала основні положення, висновки та практичні рекомендації. Автору належить основна роль у підготовці публікацій і доповідей.

Апробація результатів дисертації. Систематично бере участь у науково-практичних конференціях і Конгресах, які проводяться в Україні та за кордоном.

Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на межвузівській конференції молодих учених «Медицина третього тисячоліття» (Харків 2006, 2007, 2008, 2009, 2010); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хвороби печінки в практиці клініциста» (Харків, 2007); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання медичної генетики» (Київ, 2007); Міжнародній конференції з медичної генетики «Плід як частина родини» (Харків, 2007); Міжнародній конференції студентів і молодих учених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2008); Міжнародній конференції з медичної генетики «Плід як частина родини» (Харків, 2009); Міжнародній конференції студентів і молодих учених «Молодь – медицині майбутнього» (Одеса, 2008); 1st International Scientific Interdisciplinary Congress for medical students and young doctors (Харків, 2008);

III Міжнародному конгресі «Спадкові метаболічні захворювання» (Харків, 2008); IV Міжнародному Конгресі «Спадкові метаболічні захворювання», (Харків, 2010); Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Лісабон, 2008); IV З'їзді медичних генетиків України з міжнародною участю (Львів, 2008); IV Ежегодном конгрессе специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технологии и качество», (Москва, 28-29 сентября, 2009); Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное (Санкт-Петербург, 2010, 2012); IV Науково-практична конференція дитячих офтальмологів України з міжнародною участю «Вроджена та генетично обумовлена сліпота та слабкозорість. Проблеми діагностики, обстеження та комплексне лікування (Алушта, 2009); конференція ПИМ-2010 (Харків, 2010), VII Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Впровадження сучасних наукових досягнень у судову експертизу» (Харків, 2009); Міжнародний конгрес «Rare Diseases Europe» (Париж, 2007); Міжнародна конференція з медичної генетики «Плід як частина родини» (16-18 червня 2009, Одеса); ERNDIM meeting (Європейська дослідницька мережа з розвитку та поліпшення скринінгу, діагностики та лікування вроджених порушень метаболізму) Базель, Швейцарія 22, 2009 р.), Human Genome meeteng (Edinburgh, 19-23 Apr., 2001), 8th Aewiem (8-13 September 2002, Vilnius, Lithuania), SSIEM 42st Annual Symposium (Paris, France 6-9 September, 2005), The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (12-16 September, 2006, Makuhari Messe, Japan), Conference in forensic genetics and molecular anthropology (Croatia, 2007), The 5th European ISNS Congress in Newborn Screening (June 10-12, 2007, Reykjavik, Icelend), Annual Symposium Society for Study Inborn Errors Metabolism (2-5 September 2008, Lisboa), Conference in forensic genetics, molecular anthropology and individualized medicine (ISABS) (Croatia, 2009), 7th International conference on homocysteine metabolism (Prague, Czech Republic, 21-25 June,

2009), Annual Symposium Society for Study Inborn Errors Metabolism (31 August-3 September 2010, Istanbul – Turkey), Canadian Conference on Epigenetics (4-7 May 2011, Lonon, Canada), International Congress on Prevention of Congenital Diseases (May 13-14 2011, Vienna), IV International congress of Molecular Medicine «From cell to bedside» (27-30 June 2011, Istanbul), SSIEM Annual Symposium (Geneva-Switzerland, August 30 – September 2, 2011), International Congress on Prevention of Congenital Diseases (Vienna, Austria,2011).

Постійно підвищує кваліфікацію на навчальних клінічних тренінгах у провідних університетах світу – Манчестер, Базель, Лісабон.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 54 друкованих робіт, з яких – 1 монографія, 1 розділ у монографії, 25 статей в наукових виданнях, 4 методичні рекомендації МОЗ України, 7 патентів та 16 робіт у матеріалах наукових конгресів та конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 337 сторінках, побудована за загальноприйнятою формою і складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 7 розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, переліку використаних джерел. Текст дисертації ілюстрований 132 таблицями та 117 малюнками. Перелік використаних джерел містить 245 посилань, з них 47 кирилицею, 198 латиницею.

Розділ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні погляди на мітохондріальні дисфункції (МТХД)

Порушення енергетичного обміну стало проблемою, яка привернула увагу лікарів усіх спеціальностей [1, 2, 3, 4]. Поява інформації про мітохондріальні хвороби базувалася на відомих з 1960 року даних про мітохондріальний геном, який був секвенований у 1981 році (Anderson S.). За свідченням Н.Г. Даниленко, О.Г. Давиденко (2010) деякі мітохондріальні синдроми знайшли відображення в дослідженнях Лебера ще в 1971 році. Генетичні причини виникнення ряду мітохондріальних синдромів вперше були описані більше 20 років тому.

Встановлено, що мітохондрії (МТХ) виконують функцію метаболічного енергетичного центру та виробляють енергію у вигляді молекул аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ). Ці органели присутні у всіх еукаріотичних клітинах, крім еритроцитів і зрілих кератиноцитів. МТХ знаходяться частіше за все в клітинах, що споживають велику кількість енергії – у клітинах скелетної мускулатури і серцевого м'яза, у екзокринних клітинах підшлункової залози, де існує високий рівень синтезу секреторних білків [5, 6].

1.1.1. Сучасні дослідження мітохондріального геному (МТХГ)

Мітохондрії (МТХ) – це великі складні органели клітини, які оточені подвійною мембраною. За даними різних авторів, сучасне уявлення про МТХ свідчить, що вона має бактеріальне походження і є нащадком протобактерій, які жили в анаеробних нуклеотидних клітинах. МТХ дозволяли клітині-хазяїну мати аеробний метаболізм для більш ефективного вироблення енергії [7]. Мітохондрії складають 25% сумарної маси клітини, мають універсальну будову та одноманітну ультраструктуру. МТХ розташовані на певній відстані одна від одної або у вигляді довгих, розгалужених МТХ, які забезпечують АТФ віддалені частини клітини. Вони нагадують ретикулум, в якому всі складові

пов'язані між собою за допомогою міжмітохондріальних контактів (ММК) (наприклад, серцеві м'язи) та мають чотири субкомпартменти: мітохондріальний матрикс, внутрішню мембрану (7 нм) із кристами, міжмембранний простір (10-20 нм), зовнішню мембрану (7 нм).

Геном мітохондрій кодує малочисельні білки, які створюють білкові комплекси із іншими білками, які кодуються ядерними генами і приходять із цитозоля [8, 9, 10].

У гладкій зовнішній мембрані присутні моноамінооксидази, ацил-КоА-синтази і фосфоліпази A_2 . Внутрішня мембрана більш щільна, утворює складки – крипти. Порожнина, яка оточена внутрішньою мембраною, має назву матриксний простір і містить ферменти, що перетворюють піруват і жирні кислоти в ацетил-КоА, і окислюють його в циклі лимонної кислоти. Простір між зовнішньою і внутрішньою мембранами має назву міжмембранного і містить ферменти креатинкіназу й аденілаткіназу [11, 12].

МТХ мають свою мітохондріальну екстрануклеарну ДНК (мтДНК), успадковану від матері. МтДНК компактно організована, являє собою невелику кільцеву молекулу, розмір якої 16 565 пар нуклеотидів, 37 генів, які кодують дві рРНК (12S та 16S рРНК), 22 тРНК, 13 пептидів, які беруть участь в окислювальному фосфорилуванні, 13 підгрупами, що належать до комплексів I, II, IV, V [13].

У одній клітині може міститися як нормальна, так і аномальна мтДНК, їх пропорції можуть змінюватися від однієї клітини до іншої, від одного органу до іншого [14]. Кількість мутуючих мтДНК клітин можуть збільшуватися через деякий час при швидкому обміні, наприклад, кров'яних, і зменшуватися в клітинах органів з дуже низьким обміном (м'язи, мозок). Саме тому, одна і та ж делеція мтДНК може призводити до різних клінічних ознак (наприклад, синдром Кернса-Сейра та синдром Пірсона). Загальною особливістю мітохондріального геному є максимальна структурна компактність при максимальному інформаційному навантаженні. Ця особливість сформувалась за рахунок змін генетичного коду, завдяки яким скоротився необхідний для транскрипції набір

тРНК. Генетичний код мітохондрії людини показує, що 22 антикодона тРНК «впізнають» всі 60 кодонів мРНК завдяки особливій структурі рРНК та рибосомального комплексу. МТХГ відрізняється від ядерного, перш за все, тим, що амінокислота метіонін накопичується в процесі еволюції в білках дихального ланцюга мітохондрій і виступає в ролі природного антиоксиданту [15]. Це революційне дослідження змінило уявлення про універсальність геному людини, сприяло розумінню ролі незамінної амінокислоти метіоніну у функції геному, з'ясувало роль метилювання у маніфестації мітохондріальної дисфункції і сприяло створенню мітохондріальної медицини [16, 17, 18].

1.1.2 Енергетичний метаболізм мітохондрій (МТХ)

На мітохондріях проходять процеси окислювального фосфорилування та перенос електронів у дихальному ланцюзі. Ферменти дихального ланцюга знаходяться у внутрішній мембрані МТХ і здійснюють окисне фосфорилування, поєднане з утворенням АТФ [19]. Окисне фосфорилування – це процес, за допомогою якого ферментативне окислювання метаболітів перетворюється в енергію, що запасується у вигляді АТФ [20]. Для участі в енергетичному обміні МТХ потрібні більш ніж 50 ферментів і ферментних комплексів, які складаються із 40 різних білків [21].

Джерелом електронів може бути окислювання вуглеводів, ліпідів, білків або нуклеїнових кислот, хоча основними енергетичними ресурсами в більшості клітин є вуглеводи і жирні кислоти [22]. Встановлено, що на внутрішній мембрані МТХ розташовані комплекси з чотирьох основних білків – система транспорту електронів. Ці комплекси дозволяють електронам, що утворюються при метаболічному окислюванні, переходити від одного акцептора електрона до іншого. Вільна енергія, яка виділяється при переході електронів від одного комплексу до наступного, використовується для переносу протонів у міжмембранний простір. Як наслідок цього процесу на внутрішній мембрані МТХ створюється протонний градієнт, який забезпечує синтез АТФ. Наприкінці транспортного ланцюга електрони приєднуються до останнього

акцептора – молекулярного кисню з утворенням води. Накопичені в міжмембранному просторі протони перетікають по градієнту концентрації через АТФ-синтазу (цей фермент використовує енергію переносу H^+ для виробництва АТФ з АДФ і P_i) [23]. Така складна органела, як МТХ, контролюється не тільки особистим геномом, а і участю до 2500 ядерних генів у контролі структури і функції мітохондрії [24].

Експресія МТХ генів постійна і не залежить від гетероплазмії, що пов'язано з нуклеарними генами (White H. E., 2005) [25]. Велике число протеїнів респіраторного ланцюга кодується нуклеарною ДНК. Існує сукупність міжгеномних протеїнів, які також кодуються нуклеарною ДНК.

У багатьох організмах МТХ об'єднані в мережу, розміщену по всьому цитозолу. Мітохондріальна мережа високо динамічна структура, яка постійно балансує між мембранним злиттям і діленням [26]. Злиття людських мітохондрій потрібне для створення захисту від накопичення вільних радикалів, що дозволяє розсіювати енергію в клітині. Мітохондріальний ензим (Gtf-аза) знаходиться в зовнішній мембрані мітохондрії і забезпечує мітохондріальне злиття. Було знайдено, що зміни у мітохондріях впливають на важливу клітинну функцію – кальцієвий імпульс (K. A. Rasbach, 2007) [27] генерацію ROS (Yu et al., 2006) [28], нейронну пластичність (Maffson M.P.2007) [29], проміжний метаболізм (Vries et al., 2008) [30], динаміку лейкоцитів (Campello et al., 2006) [31]. Мітохондріальне розділення також є важливим фактором в ініціації апоптозу, що призводить до фрагментації мітохондрій і роз'єднання апоптозних компонентів [32, 33].

Кількість та форма мітохондрій варіюють у залежності від функції клітини. В криптах МТХ вбудовані білкові компоненти дихального ланцюга – ферменти, які беруть участь у перетворенні енергії хімічних зв'язків при окислюванні поживних речовин у енергію молекул АТФ. В матріксі МТХ, крім ДНК, знаходяться і власні рибосоми [34]. Мітохондріальна рибосома складається із великої та малої субодиниць, кожна з яких містить одну рРНК, яка кодується мітохондріальними генами. Однак на них кодується лише мала

(до 5%) частина білків, які входять до складу клітинних органел. Більша частина білків, які являються структурними та функціональними компонентами МТХ, кодується у ядерному геномі.

Апарат білкового синтезу в мітохондріях має змішане походження. Більша частина його білкових компонентів транспортується в органелу із навколишньої цитоплазми. В мітохондріях не відбувається перенос нуклеїнових кислот через мембрану органели як в одному, так і в другому напрямку. Тому всі РНК, які входять до складу апарату білкового синтезу, продукуються самою органелою. Деякі субодиничні ферменти дихального ланцюга МТХ складаються із різних поліпептидів, частина з яких кодується ядерним, а частина – мітохондріальним геномом. МТХ – це, на думку [35], наслідок об'єднання двох геномів, складові дихального ланцюга (OXPHOS) разом із 67 OXPHOS – субодиниць, які кодується нуклеарною ДНК [36, 37].

Геном МТХ виявляє значну варіабільність по набору генів, порядку їх розташування та експресії. Інtronів у неї немає, деякі гени перекриваються (тобто, остання основа одного гена являється першою основою наступного за ним гена); майже кожна пара основ належить будь-якому гену, за винятком D-петлі, області, яка відповідає за ініціацію реплікації ДНК. Мітохондріальний геном має 13 областей, які потенційно можуть кодувати білки. До них належать області, які кодують цитохром b, три субодиниці цитохром-оксидази та одну із субодиниць АТФази. Кожна клітина людини містить сотні МТХ та тисячі копій мтДНК [38]. Батьківська мтДНК спостерігається лише в скелетних м'язах.

МТХ реплікують, транскрибують і транспортують свою ДНК напівавтономно від ядерної, хоча ядерна та мітохондріальна функції взаємопов'язані. Більша частина генів експресується в одному напрямку, гени тРНК розташовуються між генами, які кодують рРНК або білок [39].

Комплементарні ланцюги в мтДНК значно різняться по плавучій щільності у лужному градієнті CsCl, оскільки мають неоднаковий зміст пуринових («важких») та піримідинових («легких») нуклеотидів. Вони носять назву H і L ланцюги. Реплікація ДНК в МТХ людини однобічна і асинхронна.

Це пов'язано з різною локалізацією точок ініціації реплікації комплементарних ниток ДНК. З початку ініціюється реплікація Н-ланцюга, а синтез L-ланцюга ініціюється після того, як вже синтезується 67% Н – ланцюга [40, 41]. Це обумовлено тим, що область ініціації реплікації L-ланцюга доступна лише в одноланцюговому стані, а це має місце тільки при розплітанні подвійної спіралі при синтезі Н-ланцюга. Ініціація реплікації Н-ланцюга відбувається в області D-петлі. D-петля є єдиною областю мтДНК, що не кодує, і містить гіперваріабельні ділянки HVS I і HVS II.

Таким чином, унікальність мітохондріального геному зумовлена його ендосимбіотичним походженням, значною кількістю копій МТХ і локалізацією в цитоплазмі. Унікальність МТХ геному забезпечується, на думку авторів, наступними феноменами [42]:

- материнським характером успадкування мтДНК;
- відсутністю ефективної ДНК-репараційної системи у мтДНК, що призводить до збільшення частоти мутацій і робить її високополіморфною інформативною системою;
- геному МТХ притаманна гетероплазмія – єдиний механізм формування розмаїття мітохондріальних геномів;
- існуванням реплікативної сегреції, яка змінює пропорції мутантної мтДНК.

Вказані вище властивості зробили мтДНК неоцінним інструментом для вивчення генетичної археології, еволюції людини, походження і диференціації різних етнічних груп, молекулярних основ деяких спадкових захворювань і процесів старіння [43, 36, 13, 5, 44].

1.1.3. Еволюційні особливості мітохондріального геному

Особливості мтДНК дозволили доповнити уявлення про еволюцію людини. В результаті вивчення поліморфізмів мтДНК були знайдені докази наявності кореляції мінливості мтДНК із расовою приналежністю і етнографічним походженням індивідуумів. Для дослідження генетичної структури популяції

було розроблено декілька підходів, які були засновані на дослідженні частот генів популяції, що вивчалась. За свідченням W. Rihard (2011), якщо частоти генів двох популяцій однакові, то їхня генетична відстань дорівнює нулю, і, навпаки, якщо вони різняться, то генетична відстань між ними велика. Автор провів філогенетичне дослідження послідовності HVS1 контрольного регіону мтДНК і виявив 5 основних гаплогруп серед європейців, що відрізняються мутаціями (транзиціями) у визначених позиціях нуклеотидних основ (H, G, T, I, U) [45] у відповідності між мотивами в нуклеотидних послідовностях HVS1 і даними по гаплотипуванню, за допомогою ПДРФ-аналізу склав характеристику основних гаплогруп мтДНК Східної Європи (H, V, U, K, G, T, I, W, X). Ці данні про характер мінливості мтДНК важливі для вивчення походження популяції та її демографічну історію. В 2004 році робочою групою у складі С.І. Жаданова, Т. Шура, О.Я. Гречаніної, Ю.Б. Гречаніної, В.А. Гусар на підставі колабораторного дослідження проведене вивчення різноманіття мітохондріального геному українців. Поєднавши найбільш інформативні методи, такі, як секвенування та рестрикційний аналіз (ПДРФ), автори провели дослідження мтДНК українців із 5 регіонів України. Авторам вдалось визначити типи мутацій у контрольному регіоні мтДНК, та регіоні, що не кодує, і встановити приналежність до визначених гаплогруп. Було встановлено, що більшість типів мтДНК належить до гаплогруп, які характерні для європейської популяції. Однак спостерігалась і домішка азіатського компонента. Дослідження також продемонстрували високий рівень різноманітності МТХГ, наявність кореляції між типами мтДНК і етнографічним походженням індивідів. Популяція українців входить у субкластер, який схожий із популяціями сербів, німців, молдаван, угорців, хорватів і чехів. Цей субкластер поєднує популяції Центральної і Східної Європи – європеїдів, пращури яких вийшли із Передньої Азії, Причорномор'я, а раніше – із регіонів глибинної Азії. В 2007 році В.А. Гусар визначила 102 поліморфні позиції HVS1 мтДНК, серед яких найбільш варіабельними були 16093, 16189, 16311, 16362. Автор знайшла додаткові популяційні поліморфізми в гаплогрупах U5, T, X і припустила, що їхнє сполучення у поєднанні з

основними мотивами можуть відігравати певну роль у проявах МТХД. Отримані молекулярно-генетичні характеристики мтДНК дозволили нам підійти до дослідження впливу поліморфізмів мтДНК на клінічні прояви МТХД в умовах зміненого епігенетичного статусу та дизадаптозу, які притаманні сучасним популяціям.

1.1.4. Патогенетичні основи МТХД

Найбільш важливими біохімічними процесами в мітохондріях є дія циклу трикарбонових кислот (ЦТК), окислення жирних кислот, карнітиновий цикл, а також робота дихальних ланцюгів, які забезпечуються ферментами [46].

ЦТК – загальний кінцевий шлях окислення ацетильних груп у вигляді ацетил-СоА, в які перетворюються в процесі катаболізму вуглеводи, жирні кислоти і амінокислоти. Внаслідок окислювального декарбоксилування пірувата в мітохондріях утворюється ацетил-СоА, який і вступає в ЦТК. Цей цикл проходить у матріксі мітохондрій і складається із восьми послідовних реакцій. Під час цих ферментативних реакцій здійснюється повне окислення однієї молекули ацетил-СоА.

За свідченням багатьох дослідників, цикл трикарбонових кислот є основою метаболізму і обидві його головні функції – забезпечення організму енергією і інтеграція як катаболічних (біорозщеплення), так і анаболічних (біосинтез) процесів роблять його життєзабезпечуючим для організму [47].

Важливими ферментами в процесах, які відбуваються в МТХ, є біогенез сукцинатдегідрогенази (СДГ) – ключового ферменту енергетичного метаболізму, альфа-гліцерофосфатдегідрогенази (ГФДГ), малатдегідрогенази (МДГ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), глутаматдегідрогенази (ГДГ). Реакції ЦТК, як і процеси переносу електронів і окислювального фосфорилування проходять на внутрішній поверхні внутрішньої мембрани. Базовий рівень енергетичного метаболізму забезпечується аеробними процесами. СДГ каталізує реакції циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса), в якому закінчується повне окислення жирів, білків і вуглеводів [48, 49], і входить до складу II комплексу дихального

ланцюга мітохондрій – сукцинат-убіхінон-оксидоредуктази. При зниженні активності СДГ підвищується активність ГФДГ, що відображає човниковий механізм зв'язку між гліколізом і ЦК. Це, в свою чергу, призводить до інтенсифікації гліцерофосфатного шунта [50]. Гліцерофосфатна човникова система [22] переносить відновлювальні еквіваленти від НАДН переважно в скелетних м'язах і мозку. В мітохондріях печінки, нирок і серця головну роль в цьому процесі відіграє малатаспартатна човникова система. Зниження активності СДГ при підвищенні активності ГФДГ, яке призводить до різкої зміни їх співвідношення, свідчить про порушення енергетичного обміну в клітинах. Підвищення співвідношення ГФДГ/СДГ є показником накопичення недоокислених продуктів обміну, зниження буферних основ крові і переключення тканинних систем на резервний шлях обміну. Поряд з гліцерофосфатним човниковим механізмом існує малатний човниковий механізм, що складається із цитоплазматичної і мітохондріальної МДГ. Оксалоацетат, який виникає в мітохондріях, зворотно відновлюється за рахунок НАДН з утворенням малата під дією мітохондріальної малатдегідрогенази (МДГ) [51].

Гліколіз, ключовим ферментом якого є ЛДГ, відображає головний анаеробний шлях утилізації глюкози, який є компенсаторним і активізується в умовах енергетичного навантаження. Він забезпечує перевтілення глюкози в лактат і піруват, що відбувається у цитозолі клітини. ЛДГ діє на останньому етапі гліколізу в анаеробних умовах, що супроводжується відновленням пірувату і лактату із виділенням НАД⁺. ГДГ локалізується виключно у матриксі мітохондрій і характеризує рівень білкового обміну [51]. Глутамат і ГДГ відіграють особливу роль в обміні аміногруп. В умовах, коли клітини потребують великих кількостей субстратів для циклу лимонної кислоти і генерації АТФ, активність ГДГ підвищується. Наслідком цього є поява альфа-кетоглутарата, який використовується в ЦТК. Дефіцит активності ГДГ може призводити до накопичення глутамата. В останні роки інтерес до глутамату як однієї з основних збуджуючих амінокислот пірамідного тракту і інтернейронів

в ЦНС виріс, тому що було доведено, що надлишок глутамата стимулює глутаматні рецептори і підвищує прихід надклітинного Ca^{2+} в клітину, що викликає її загибель [51, 52, 53].

Vockley J. (2009) [54], виходячи із сучасних досліджень, представив етапи вироблення енергії мітохондріями, що вкрай важливо для розуміння етіології, патогенезу МТХД і їх корекції. Автор підкреслив, що глюкоза розщеплюється за допомогою анаеробного гліколізу в цитоплазмі і згодом трансформується в піруват. У аеробному стані піруват трансформується в ацетилкоензім-А під дією важливого ензиматичного комплексу в аеробному метаболізмі вуглеводів піруватдегідрогенази і відповідає за необоротне перетворення пірувата в ацетилкоензім А. Цей мультиензиматичний комплекс складається з трьох каталітичних підгруп: піруватдекарбоксилази (ПК) (E1), дегідроліпоамід ацетилтрансферази (E2), дегідроліпоамід дегідрогенази (E3), протеїна X або E3BP, який відповідає за взаємодію між E2 і E3, що регулюють підгрупи (піруватдегідрогеназу, піруватдегідрогенази фосфат, які поєднують протеїни та кофактори (тіамин). ПК – мітохондріальний ензим, що містить біотин, трансформує піруват і вуглекислий газ в оксалоацетат. Це невід’ємний компонент ЦТК, що забезпечує необхідний субстрат для ліпогенезу, гліконеогенезу. Усі ці метаболічні події об’єднані у ЦТК, де електрони скупчуються у формі з’єднань вуглеводів і переносяться в нікотинамідаденінуклеотид (НАДН). НАДН та ФАДН є субстратами для наступної події – мітохондріального окислювального фосфорилування (ОКСФОС) респіраторного ланцюга, який складається з 5 комплексів. **Мітохондріальний респіраторний ланцюг** знаходиться у внутрішній мітохондріальній мембрані. 4 мультиензиматичних комплекси його працюють як транспорт електронів – комплекс 1 (НАДН-коензим Q-редуктаза, складається із 40 одиниць, комплекс 2 (сукцинат коензим Q-редуктаза, яка складається з 4 підгруп), комплекс 3 (цитохром С редуктаза, який складається з 7 підгруп) і комплекс 4 (цитохром С-оксидаза, який складається з 13 підгруп). Комплекс 5 АТФаза (складається з 14 підгруп), забезпечує АТФ синтез від АДФ і неорганічного фосфату в мітохондріальному

матриці. Існує тісний взаємозв'язок між дефектом окислювального фосфорилування і дефектом бета-окислення жирних кислот (ЖК) [55, 56].

β-окислення ЖК відбувається здебільшого в мітохондріях, а частина – в пероксисомах. Щоб довголанцюгові жирні кислоти потрапили до МТХ, потрібно утворення в зовнішній мембрані МТХ складних ефірів ациклічного ацилкарнитину за допомогою карнитинпальмітоїлтрансферази 1 (КПТ1). До внутрішньої сторони внутрішньої мембрани МТХ приєднані три молекули білка, які мають активність карнитинпальмітоїлтрансферази 2 (КПТ2), ацил КоА дегідрогенази із наддовгим вуглеводним ланцюгом (VLCAD), активність мітохондріального трьохфункціонального білка (МТР) із 3-гідроксіяцил-КоА-гідралази і довголанцюгової 3-оксотіолази. Кожний цикл призводить до продукції однієї молекули ацил-КоА із скороченим ланцюгом із двома атомами вуглеводу і однієї молекули ацетіл-КоА. З моменту, коли довжина ланцюга ацил-КоА перестає керувати довголанцюговими ферментами, всі ацил-КоА секретуються в мітохондріальній матриці, в подальшому вони метаболізуються ацил-КоА-дегідрогеназою жирних кислот із середнім вуглеводним ланцюгом (МСАД) ацил-КоА-дегідрогеназою жирних кислот із коротким вуглеводним ланцюгом (SCAD), енойл-КоА-гідратазою або кротоназою, 3-гідроксіяцил-КоА-дегідрогеназою жирних кислот із коротким вуглеводним ланцюгом (SCHAD) і оксотіолазою. Кожний поступовий крок ацил-КоА-дегідрогенази призводить до появи двох електронів. Електрони переносяться на електрон-транспортні флавопротеїни (ЕТФ), потім – на ЕТФ-дегідрогеназу (ЕТФ-ДГ). У якості кофактора у цьому процесі виступає флавінаденіндинуклеотид (ФАД), який виробляється із рибофлавіну.

Відомо, що молекули ацетіл-КоА є проміжними витоками кетонових тіл. Утворення ацето-ацетата перебігає шляхом цикла 3-гідроксі-3-метилглутарил-КоА (HMG-CoA) за участю гідроксі-метил-глутарил-КоА-синтетази (HMG-S) та HMG-CoA-ліази. За допомогою сукциніл КоА-оксоацил-КоА-трансферази (SCOT) і 3-оксотіолази позапечинкові тканини здатні утилізувати кетонові тіла.

Звазначимо, що порушення будь-якого кроку в цьому складному циклі призводить до неадекватної утилізації жирних кислот – важливого постачальника енергії, оскільки глюконеогенез не здатний сам забезпечити потреби організму в енергії.

Дефекти довго- і середньоланцюгових ферментів, дефекти кетогенеза викликають гіпокетотичну гіпоглікемію і підвищення рівня жирних кислот у плазмі. Порушення утилізації коротколанцюгових ферментів і кетонових тіл призводять до кетотичної гіпоглікемії.

В таких випадках розвивається гіперамоніємія у зв'язку з тим, що не виробляється в достатній кількості N-ацетілглутамат. На тлі цих порушень розвивається жирова дегенерація печінки [57].

Відомо, що молочна кислота (МК) присутня в крові як лактат-іон і є проміжним продуктом метаболізму вуглеводів. Локалізується переважно в м'язових клітинах і еритроцитах. Нормальний метаболізм лактату відбувається в печінці. Нормальне співвідношення «лактат/піруват» складає приблизно 6-7:1 [22, 58].

При гіпоксії блокується аеробне окислювання пірувату в оксалоацетат в циклі трикарбонних кислот з наступним гліколітичним окислюванням пірувата у лактат. Це призводить до ацидозу (лактатацидоз).

Піровиноградна кислота (ПВК) – другий центральний метаболіт вуглеводного обміну. Вона утворюється в процесі розпаду глікогену і глюкози в тканинах, при окислюванні молочної кислоти (МК), а також внаслідок перетворення деяких амінокислот. При окисному декарбоксілюванні ПВК виникає ацетіл-СоА, що вступає в ЦК. ПВК – один з основних субстратів глюконеогенезу, який бере участь у біосинтезі M-ацетілнейрамінової кислоти, глюкози, глікогену, впливає на перебіг процесів обміну речовин у центральній нервовій системі.

Таким чином, лактат є кінцевим продуктом гліколізу і глікогенолізу, утворюється в організмі внаслідок відновлення ПВК в анаеробних умовах: з кров'ю вона надходить у печінку, де знову може бути перетворена в глюкозу чи

глікоген. Значна кількість її утворюється в м'язах. Крім того, частина МК із крові поглинається серцевим м'язом, що утилізує її як енергетичний матеріал.

Підвищений рівень лактату є головним маркером МТХД, але, разом з тим, блокада дихального ланцюга через кисневу недостатність, викликає підвищення NADH, яка знижує активність піруватдегідрогенази (ПДГ) та інших ферментів метаболізму, включаючи ЦТК. При цьому відмічені високі рівні пірувату, лактату, аланіну, кетонів тіл, 3-гідроксибутірату; підвищення ацетоацетатного співвідношення із-за високого NADH. Однак рівні лактату (включаючи CSF-лактат – лактат-спинномозкової рідини) можуть бути нормальними в деяких випадках, в тому числі і при ураженні мтДНК.

Підвищення лактату і пірувату може спостерігатися і при набутих станах: голодування, злоякісні новоутвори, тяжка серцево-судинна та легенева недостатність, анемії, інсулінозалежний цукровий діабет, діабетичний кетоацидоз, дихальний алколоз (у дітей), уремії, гепатоцеребральна дистрофія, гіперфункція гіпофізарно-адреналової і симптоматико-адреналової систем, а також після введення камфори, стрихніну, адреналіну і при великих фізичних навантаженнях (до 0,57 ммоль/л), тетанія, при епілепсіях, недостатність вітаміну В1 (хвороба бері-бері), токсичній дії ацетилсаліцилової кислоти, отруєнні миш'яком, сурмою; травматичні захворювання ЦНС, запальні процеси (менінгіти, абсцеси мозку) супроводжуються підвищенням лактату і пірувату [22, 54].

При більшості перерахованих станів (лактат-ацидоз) збільшується співвідношення «лактат/піруват»; найчастіше воно складає 10:1.

Таким чином, основною причиною накопичення в крові ПВК і МК є порушення подальшого їхнього ферментативного перетворення в звичайні продукти розпаду внаслідок різних причин: як при спадкових порушеннях обміну речовин, так і при набутих станах.

Наведені дані показують, що порушення на різних етапах механізму клітинного енергообміну можуть призводити до широкого кола патології і, в першу чергу, найбільш енергозалежних органів: ЦНС та м'язової системи [5]. Оскільки вказані біохімічні зміни є наслідком порушення енергетичного обміну

без залежності від причин, яка його викликала, вони не є поодинокі специфічними для спадкової патології. Але у випадках ураження декількох сторін енергетичного метаболізму можна спостерігати певну закономірність співпадання біохімічних порушень. У таких випадках біохімічні зміни, як свідки ураження енергетичного обміну, набувають специфічний характер.

Саме тому пошук глибоких біохімічних змін може вивести на шлях патогенетичної терапії, особливо за умови глибокого клінічного вивчення ознак хвороби.

Інтенсивне вивчення мітохондріального геному і мітохондріальних хвороб призвело до появи узагальненого поняття – мітохондріальна дисфункція (МТХД). На думку Беленичева І.Ф. і Чернія В.І. (2010), це типовий патологічний процес, що не має етіологічної і нозологічної специфічності [60]. Розвиток мітохондріальної дисфункції призводить до порушення зворотнього захвату медіаторів (катехоламінів, дофаміна, серотоніна); порушення іонного транспорту, генерації і проведення імпульсу, а також синтезу білка *de novo*; порушення процесів трансляції і транскрипції; при ньому активуються «паразитарні» енергопродукувальні реакції, що призводять до істотного спаду енергетичних запасів нейрональної клітини.

Патогенез мітохондріальних порушень базується на уповільненні клітинного енергетичного метаболізму, який може виступати чинником стимуляції клітинного апоптозу. Стимуляція апоптозу, подальше розщеплення цитохрому С в цитозолі є наслідком зв'язку цитохрому С з геном *apaf1*, який активує розщеплення про-каспази [59]. Клінічний апоптоз, в свою чергу, обумовлюється транслокацією цитохрому С з мітохондрії в цитозоль. Початковою функцією мітохондріального транспортного електронного ланцюга є синтез АТФ. Перенесення знижених еквівалентів від НАДН або ФАДН₂ до молекулярного кисню пов'язане з накачуванням протонів за допомогою комплексів I, III і IV через внутрішню мітохондріальну мембрану в результаті формування градієнта протона. Розсіювання цього градієнта через сектор мембрани мітохондріальної АТФ-синтази (комплекс V) сприяє фосфорилляції

АДФ. Разом з комплексом транспортного електронного ланцюга електронні носії убіхінона і цитохрома С сприяють електронному перенесенню між комплексами [61]. Знесилення одного або декількох компонентів транспортного електронного ланцюга виникає при недостатності клітинного енергетичного метаболізму [62].

За свідченням багатьох дослідників, життя організму – це боротьба з вільними радикалами (ВР) (група молекул з високою реакційною здібністю), які мають неспаровані електрони на зовнішній орбіталі, окислюють будь-які сусідні біомолекули, і тим самим пошкоджують клітину. Захистом від вільних радикалів є система антиоксидації [63]. Вільні радикали (ВР) поділяють на природні (первинні, вторинні, третинні) і чужорідні. До первинних ВР відносять семіхінони (відкриті в 1932 році Михаелісом) аніон-радикали, які з'являються у якості побічного продукту (окислювально-відновлювальні реакції); супероксид-аніон – радикал кисню, який утворюється з 2-5% молекул кисню, які беруть участь у тканинному диханні та нітроксид (монооксид азоту – закис азоту).

Виникнення первинних радикалів контролюється ферментними системами. Під впливом, наприклад, металів з перемінною валентністю з первинних радикалів утворюються вторинні (радикал гідроксилу і ліпідів). Третинні – радикали антиоксидантів [63].

За ствердженням І.Ф. Беленічева, В.І. Чернія (2010), зниження доставки кисню до нервової клітини в умовах гострої ішемії призводить до ряду регуляторних функціонально-метаболических змін у мітохондріях [60]. Серед них – порушення стану мітохондріальних ферментних комплексів пригнічує аеробний синтез енергії. Загальна реакція організму на гостру кисневу недостатність характеризується активацією регуляторних компенсаторних механізмів. Як свідчать автори, у нейрональній клітині включаються особливі механізми внутріклітинної сигнальної передачі, які носять каскадний характер. Ці механізми відповідають за експресію генів і формування адаптивних ознак. Встановлено, що така активація виявляється вже через 2-5 хвилин кисневого

голодування. Вона перебігає на тлі зниження дихання, яке пов'язане з пригніченням МФК-1 (мітохондріального ферментного комплексу).

В процесі адаптації ключову роль відіграють так звані ранні гени [64-65]. Продукти ранніх генів регулюють експресію генів пізньої дії. На думку авторів, в мозку до таких генів належать NGFI-A, c-jun, junb, c-fos. Підтвердженням такого припущення є отримані результати гіпоксінегативної дії в чутливих до неї структурах мозку, коли спостерігалось підвищення експресії мРНК всіх цих генів, так само як і мРНК генів мітохондріальних антиоксидантів.

Відомо, що при низьких концентраціях кисню цей процес контролюється перш за все специфічним чинником транскрипції (Hif-1), відкритим на початку 90-х років. Головна його функція полягає у регуляції кисневого гомеостазу. За допомогою цього механізму організм у відповідь на тканинну гіпоксію контролює експресію білків, відповідальних за механізм доставки кисню в клітину. На думку [66], цей чинник регулює адаптивні відповіді клітини на зміни оксигенації тканин. Якщо організм в умовах пониженого вмісту кисню перебуває тривалий час, він переходить на новий рівень регуляції кисневого гомеостазу, який характеризується економічністю енергетичного обміну. Автор виказав думку про суть такої економічності: вона полягає у зміні кінетичних властивостей ферментів окислювального метаболізму, який супроводжується збільшенням ефективності окислювального фосфорилування, появою нової популяції дрібних мітохондрій із набором ферментів, що дозволяють їм працювати в цьому новому режимі. Крім того, в даних умовах адаптація до гіпоксії на клітинному рівні тісно пов'язана з експресією транскрипції індукованих гіпоксією генів пізньої дії, які беруть участь у регуляції множинних клітинних і системних функцій і потрібно для формування адаптивних ознак. Автор зазначає, що активація нейроапоптозу є першопричиною розвитку стійких порушень когнітивно-мнестичних функцій ЦНС. Нейроапоптоз розвивається як каскадний процес, який супроводжується активацією специфічних про- або антиапоптичних білків, а також особливих протеолітичних ферментів – каспаз. Серед чинників запуску апоптозу автор зазначає утворення активних

форм кисню в процесі «збоченого» окислювального метаболізму в клітині. Автор, як і інші дослідники [3, 67] доводить, що центральна роль у продукції АФК і подальшому розвитку апоптозу і некрозу належить мітохондріям, зміні проникності їх мембран у результаті формування специфічного комплексу мітохондріальних пір і ініціації мітоптоза [68, 69]. Первинним джерелом АФК виявляються мітохондрії. АФК, особливо супероксид, який утворюється в умовах ішемії і гіпоксії в так званих паразитарних реакціях в початковій ділянці дихального ланцюга мітохондрій (Coqh2-nad^+) за участю Nadh-Coqh2 -редуктази, активність якої підвищується при блокаді цитохром-залежного рецептора на зовнішній поверхні мембрани мітохондрії на тлі підвищення відновлених флавінів. Окрім супероксиду, ключова роль у розвитку мітохондріальних порушень і апоптозу належить NO і його агресивній формі – пероксинітриту. Мітохондрія нейронів є важливим джерелом NO . Мітохондріальна NOS при певній концентрації L-аргініну здатна продукувати супероксид і значно активуватися у відповідь на розвиток глутаматної ексайтотоксичності і поглинання мітохондріями кальцію. Утворення пероксинітриту сприяє відкриттю гігантської пори мітохондрій, нітрозилує цитохром C в мітохондріях. Це призводить до зміни його функцій. Він стає нездатним підтримувати перенесення електронів у дихальному ланцюзі і не відновлюється аскорбатом; [70] вважає, що оскільки одночасно відбувається вихід цитохрому C (у тому числі і нітрованого) у цитоплазму, то можна передбачати участь такого процесу нітрозилування і в інших сигнальних процесах [70, 71]. Пероксинітрит нейтралізує гуанін, що призводить до розриву ланцюгів ДНК і до мутацій або запуску процесів апоптозу.

Крім того, під дією гідроксил-радикала відбувається відкриття мітохондріальних пір з експресією і виходом в цитозоль проапоптичних білків. Відкриття пір відбувається за рахунок окислення тіолових груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій, що перетворює його на проникний неспецифічний канал-пору. Відкриття пір перетворює мітохондрії з «електростанцій» в «топку» субстратів окислення без утворення АТФ. У

точних біохімічних дослідженнях було встановлено, що порушення кисневого режиму тканин, гіперпродукція ексайтотоксичних амінокислот, зниження «нормальної» акумуляції Ca^{++} мітохондріями, пошкодження мембрани мітохондрій АФК підсилює відкриття пір і вивільнення апоптогенних білків з пошкоджених мітохондрій [52-53]. Мітохондріальна пора є каналом, що проходить через обидві мітохондріальні мембрани і складається з трьох білків: транслокатора аденінових нуклеотидів, потенціалзалежного аніонного каналу (поріна) і бензодіазепінового рецептора. Коли цей комплекс зв'язується з Ca^{++} , то через мембранну пору можуть проходити речовини з невеликою молекулярною масою. Це призводить до зниження мембранного потенціалу і набухання матриксу. При цьому цілісність зовнішньої мембрани порушується, і з міжмембранного простору в цитоплазму виходять білки апоптозу: чинник, що індукує апоптоз (Apoptosis-inducing factor – AIF), вторинний мітохондріальний активатор каспаз (second mitochondria-derived activator of caspases – Smac) і деякі прокаспази. Встановлено, що індукуючий чинник спрямовує в ядро, де викликає деградацію ДНК. З мітохондрії через відкриту пору виходить цитохром С, який в нормі служить кінцевою ланкою електронно-транспортного ланцюга. У цитоплазмі цей білок зв'язується з білком Araf-1 і формує апоптосомний комплекс. Він за допомогою Smac і Omi/htra2 активує прокаспазу-9 та стає каспазой-9 і перетворює два інших профермента в каспазу-3 і 7, які розщеплюють структурні білки, призводячи до появи біохімічних і морфологічних ознак апоптозу [3, 67]. З числа морфологічних ознак найбільш характерні «відлущування» клітини від матриксу, зморщування мембрани, стискування ядра і формування бульбашок з клітинним вмістом – апоптозних тілець. Виходу цитохрому С в цитоплазму сприяє зниження рН при розвитку лактат-ацидозу, посилення окислювальної модифікації мітохондріальних білків і ліпідів. Останню реакцію викликають АФК, які утворюються в результаті «паразитарних» енергетичних реакцій. Цитохром С може вивільнитися у відповідь на підвищення концентрації іонів Ca^{++} , яке викликає відкриття пори, а також контролюватися білками сімейства Bcl-2. Саме вони регулюють

апоптоз на рівні мітохондрій. У запуску апоптозу, викликаного пошкодженнями ДНК, активацією онкогенів і гіпоксією, бере участь білок 53 (p53), який взаємодіє з Вах, стимулюючи «рецептори смерті» і апоптозні гени.

На думку [67] високу міру консерватизму геному, яка абсолютно необхідна для збереження досягнень біологічної еволюції забезпечує у еукаріоті саме білок p53, названий вартовим генома. Він відстежує появу розривів у ДНК і відповідає за активацію генів, що кодують ті білки, які забезпечують репарацію ДНК; блокування синтезу білків клітинного розподілу; включає програму апоптозу, якщо кількість пошкоджень ДНК перевищує критичний рівень.

Білок p53 активує модулятор суїциду PUMA (p53 upregulated modulator of Apoptosis), який потім зв'язує Bcl-2 і виводить з ладу, що перешкоджає апоптозу. Таким чином, вихід цитохрому С із мітохондрій вже нічим не стримується. Деякі білки, що зв'язують іони кальцію, наприклад Alg-2, що кодується однойменним геном (Apoptosis-linked gene-2), теж беруть участь у розвитку нейроапоптозу. Так, взаємодією Alg-2 і білка Alix (Alg-interacting protein X, відомий і як Air1) здійснюється регуляція нейроапоптозу [72, 74]. Взнявши до уваги викладене вище, можна уявити собі наступний сценарій подій, покликаних захистити організм від АФК, що генеруються мітохондріями. Утворившись у мітохондріях, АФК викликають відкриття пори і, як наслідок, – вихід цитохрому С в цитозоль, що негайно включає додаткові антиоксидантні механізми, а потім мітоптоз. Якщо в мітоптоз вирушає лише невелика частина внутріклітинної популяції мітохондрій, то концентрації цитохрому С і інших мітохондріальних проапоптичних білків в цитозолі не досягають значень, необхідних, щоб активувати апоптоз. Якщо ж все більше і більше мітохондрій стають суперпродуцентами АФК і «відкривають кінгстон», ці концентрації зростають і починається апоптоз клітини, що містить багато дефектних мітохондрій. Внаслідок відбувається очищення тканини від клітин, мітохондрії яких утворюють надто багато АФК [73].

Таким чином, можна говорити про мітохондріальну дисфункцію як про новий патобіохімічний механізм нейродегенеративних розладів широкого

спектру. Нині виділяють два види мітохондріальної дисфункції – первинну, як наслідок природженого генетичного дефекту, і вторинну, яка виникає під дією різних чинників: гіпоксії, ішемії, оксидативного і нітרוзуючого стресу, експресії прозапальних цитокінів. У сучасній медицині усе більш значиме місце полідає вчення про полісистемні порушення клітинного енергообміну, так званої мітохондріальної патології, або мітохондріальної дисфункції. На підставі отриманих даних Беленичев І.Ф., Черній В.І.(2010) визначили, що мітохондріальні дисфункції – різнорідна група патології, викликана генетичними, біохімічними і структурно-функціональними дефектами мітохондрій з порушенням клітинно-тканинного дихання [60]. Саме таке визначення ми вважали слушним задля вивчення ролі поліморфізму в мтДНК у маніфестації клінічних ознак МТХД.

1.1.5. Особливості клінічних форм МТХД

Аналіз даних світового досвіду дозволив з'ясувати, що МТХД – гетерогенна група спадкових захворювань, яка характеризується патологією в системі МТХ (порушення структури, функції МТХ та мутації в мтДНК), що призводить до органопатій і, як наслідок, до тяжких інвалідизуючих захворювань [4, 7].

Первинні МТХД мають свій особливий тип успадкування – материнський (цитоплазматичний, неменделівський).

Біохімічне визначення первинних МТХД – це порушення ферментів або ферментних комплексів, безпосередньо залучених у виробництво хімічної енергії за допомогою окислювального фосфорилування (піруват-дегідрогеназний комплекс, дихальний ланцюг і АТФ-синтаза) [22, 23].

З точки зору клінічних ознак, патофізіології та генетики між окремими порушеннями існує значне перекривання: так, наприклад, в біосинтезі деяких білків беруть участь різні ферментні комплекси і накопичені метаболіти можуть інгібувати інші ферменти.

Мітохондріальні дисфункції класифікуються за типом мутацій. Чим більше накопичується мутацій у мтДНК, тим важче перебіг захворювання. З

еволюційної точки зору мутації можуть бути патогенними, слабо патогенними та нейтральними [34, 38]. Патогенні мутації знижують адаптацію їх носіїв, а потім швидко втрачаються в геномі. Висока швидкість мутування мтДНК є матрицею для їхнього незалежного виникнення на гетерогенному генетичному фоні, тому що дефектні мітохондрії з хронічною інтоксикацією вільними радикалами кисню проліферують швидше нормальних, компенсуючи недостатність енергії [75].

В 1992 році Wallace запропонував класифікацію мітохондріопатій у залежності від характеру мутацій:

- місенс-мутації (нейроофтальмопатія Лебера, пігментний ретиніт);
- мутації у генах т-РНК (синдром MERRF, синдром MELAS);
- делеції або дуплікації ділянок мтДНК (зовнішня офтальмопатія; синдром Кернса-Сейра; синдром Пірсона; асиметричний птоз; двобічний птоз, який поєднаний з офтальмопарезом та слабкістю м'язів нижніх кінцівок; ділятаційна кардіоміопатія; NARP-синдром, проксимальна міопатія з фокальною деплецією мітохондрій);
- мутації, що знижують число копій мтДНК (летальна інфантильна дихальна недостатність; синдром молочнокислого ацидозу);
- мутації в ядерній ДНК (фумарова ацидемія; глутарова ацидемія; дефіцит ацил-СоА-дегідрогенази жирних кислот із довгим вуглецевим ланцюгом; дефіцит 3-гідроксіацил-СоА-дегідрогенази жирних кислот із довгим вуглецевим ланцюгом; дефіцит ацил-СоА-дегідрогенази жирних кислот із середнім вуглецевим ланцюгом; дефіцит ацил-СоА-дегідрогенази жирних кислот із коротким вуглецевим ланцюгом; підгостра некротизуюча енцефаломієлопатія Лея; прогресуюча склерозуюча поліодистрофія Альперса; трихополідистрофія Менкеса).

Існує і спрощена класифікація мітохондріопатій: змістовні заміни в структурних генах; мутації в генах рибосомних і транспортних РНК; структурні перебудови великих сегментів мтДНК, OXPHOS. Остання класифікація достатньо часто зустрічається, і ми вважаємо її найбільш лаконічною і змістовною.

Порушення функції комплексу дихального ланцюга об'єднує велику кількість нозологічних форм. Комплекс I, функція якого полягає у транспорті електронів від NADH до CoQ; CoQ перенесення електронів до наступного комплексу (Комплекс III). Синдром Лея є найбільш загальним представником такого порушення. Кофактором у цьому ланцюзі є флавін [76]. Ферментом комплексу I виступає NADH-CoQ редуктаза. Цей комплекс є найбільшим у респіраторному ланцюзі. Він складається із 46 протеїнів, 7 мітохондріальних білків. Порушення комплексу I призводить до енцефаломіопатії, кардіоміопатії, синдрому Лея, Барт синдрому та інших.

Мутації мтДНК у комплексі I зустрічаються при синдромах MELAS (tRNA^{Leu}), міопатії (tRNA^{Leu}), Лебера (LHON) (tRNA^{Lys}), MERF (tRNA^{Lys}), Leigh (ND4), діабеті та синдромі Фанконі (множинні делеції), атаксії, гіпогонадізмі (множинні делеції).

Порушення комплексу I можуть бути викликані також мутацією ядерної ДНК. В такому випадку захворювання відрізняються чітким аутосомно-рецесивним успадкуванням, клінічними проявами енцефалопатії, кардіоміопатії, макроцефалії та лейкодистрофії, наявністю багатьох порушень, викликаних змінами у комплексі I [77, 4].

Комплекс II представлений ферментами сукцинат-дегідрогеназою – CoQ оксиредуктазою, в ньому сукцинатоксидаза перетворюється у фумарат, здійснюється перенесення електронів до убіхінону (CoQ). Цей комплекс є єдиним, який кодується у ядрі. Його кофактором є флавін та залізо-сульфатний протеїн. З порушенням комплексу II пов'язані синдром Кернса-Сейра, синдром Лея, лейкоенцефалопатія, феохромоцитома, парагангліома [4, 8, 78].

Ензимом комплексу III є цитохром C редуктаза, яка складається із 10 нуклеарних субодиниць та 1 мітохондріальної, має білок, який є компонентом супер комплексу I, III та IV, в ньому електрони переносяться від CoQ до цитохрому C. Мітохондріальні дефекти представлені випадками синдрому Лебера (LHON), кардіоміопатією [79].

Комплекс IV має діючий фермент цитохром С оксидазу, складається із 10 нуклеарних субодиниць та 3-х мітохондріальних. Активним його ензимом є цитохром С оксидаза. Мітохондріальні мутації у цьому комплексі призводять до проявів синдрому Лебера, енцефалопатії, міоглобулінурії, порушень слуху, нуклеарні мутації – до синдрому Лея (Leigh), лейкоцистозу та енцефалопатії [80].

Комплекс V (фермент – АТФ-5 синтаза) складається із 16 нуклеарних субодиниць та 2-х мітохондріальних. Цей комплекс здійснює синтез АТФ, його дефіцит призводить до неонатальної гіпотонії, кардіоміопатії, лактат-ацидозу [81, 82].

Комбінація дефіциту I, III, IV та V комплексів викликається мутаціями мтДНК. Всі ці комплекси, включаючи і комплекс II, складають мітохондріальний протеїн. Делеції мітохондріальної ДНК пошкоджують всі комплекси.

Таким чином, завдяки численным дослідженням сформовані діагностичні маркери мітохондріальних хвороб: ураження багатьох органів, високий рівень молочної кислоти, ураження м'язів, очей, ендокринної системи, порушення рухів, гастроінтестинальні ураження (MNGIE) [83].

Характер успадкування МТХЗ встановлений багатьма дослідженнями [84, 85], які підтвердили здебільшого прояви аутосомно-рецесивного успадкування, іноді – аутосомно-домінантного (наприклад, PEO), спорадичного синдрому (синдром Кернса-Сейра), Х-зчепленого (синдром Barth), материнського. Загалом, мітохондріальні порушення передаються через материнські мітохондрії.

Дослідження останніх років свідчать про різноманітність фенотипу однієї і тієї ж мутації. Так, мутація A3243G може бути асоційована з класичним варіантом MELAS [24, 86], так і з іншими формами МТХД.

Як клінічні, так і клініко-біохімічні порушення є гетерогенними і часто неспецифічними у пацієнтів, які страждають від мітохондріального порушення. Симптоматологія варіює залежно від віку дебюту (від самого народження до дорослого віку) і від перебігу хвороби (швидко прогресуюча, статична). У деяких пацієнтів буває уражена тільки одна тканина, тоді як інші пацієнти страждають від мультисистемного порушення [8, 5].

У більшості пацієнтів скарги на м'язові та/або неврологічні порушення є основними, що виявляються в даний час, симптомами. Деякі симптоми є вікзалежними (затримка в розвитку в неонатальному віці і нестерпимість фізичних навантажень у дорослому віці), тоді як інші симптоми (гіпотонія, розумова відсталість) можуть виявлятися в будь-якому віці [87].

Мітохондріальні хвороби можуть маніфестувати різними ознаками, в різному органі та в різному віці [4, 5, 6]. В неонатальному віці маніфестують синдром мітохондріальної деплеції (MDS), MELAS та NARP синдроми, хоча останні частіше зустрічаються у підлітків. Такі синдроми, як діабет з глухотою (MIDD), синдром Лебера, хронічна прогресуюча зовнішня офтальмоплегія (CPEO), мітохондріальна нейрогастроінтестинальна енцефаломіопатія (MNGIE), маніфестують у дорослих і мають прогресивний перебіг, який триває роками [5]. Дані сучасної літератури і наш досвід свідчать про існування провокуючих факторів загальних для всіх метаболічних хвороб, в тому числі і для мітохондріальних. До них належать: інфекція, голодування, супер-стрес, травма, операція, переохолодження, прийом антибіотиків аміноглюкозидного ряду, вальпроатів, антиретровірусних препаратів [88].

N. Blau (2010) систематизував різні ознаки для мітохондропатій. Однак автор відзначає, що багатьох пацієнтів, особливо дітей, які задовольняють морфологічним, біохімічним та/або молекулярно-біологічним критеріям, встановленим для мітохондріального порушення, не можна включити ні в одну з вище зазначених категорій. Додаткове ускладнення полягає в тому, що у декількох пацієнтів відбувається поступова зміна клінічної картини з одного вираженого клінічного фенотипу в іншій.

Найбільш частіші клінічні симптоми мітохондріопатії (за N. Blau, 2006): з боку ЦНС: напади, гіпотонія/гіпертонія, м'язова спастичність, транзиторний парепарез, летаргія/кома, затримка психомоторного розвитку/регресія, екстрапірамідні синдроми, атаксія (епізодична), порушення цілеспрямованих рухів, центральна гіповентиляція легенів, уповільнення/ акселерація зростання голови, сліпота, глухота (перцептивна); з боку скелетно-м'язової системи:

нестерпимість фізичного навантаження/легка стомлюваність, м'язова слабкість; з боку серця: кардіоміопатія (гіпертрофічна або ділятована), порушення провідності; очей: птоз, обмежені рухи очей, страбізм, катаракта, пігментна дегенерація сітківки, атрофія зорового нерва; печінки: печінкова недостатність, нирок: дисфункція ниркових каналців; ендокринної системи: нецукровий діабет, затримка статевого дозрівання, гіпотиреоз, гіпопаратиреоз, цукровий діабет, дисфункція екзокринної підшлункової залози, дисфункція яєчників; ШКТ: діарея (атрофія кишкових ворсинок), аномалія розвитку кишечника; інше: затримка розвитку, низькорослість, панцитопенія, анемія.

Таким чином, високий рівень клінічного поліморфізму та генетичної гетерогенності, різний вік маніфестації, здатність фенотипів мітохондріальних дисфункцій змінювати кардинально свій синдромальний характер ускладнюють діагностику МТХД, затримують термін початку лікування і реабілітації і негативно впливають на прогноз.

1.1.6. Діагностика МТХД

Діагностика мітохондріальних хвороб має значні труднощі у зв'язку з поліорганністю ураження, високою кількістю неспецифічних ознак, що потребує виключення пошкоджень, які викликані неспадковими порушеннями.

Диференційна діагностика дає можливість за допомогою функціонально-діагностичних тестів звузити коло діагностичного пошуку мітохондріальних хвороб [36, 1, 24]. Більшість авторів вважає доцільним проводити паралельно дослідження показників метаболізму і, перш за все, лактату в плазмі крові та в спинномозковій рідині. Визначення рівня лактату є першою ланкою в складній системі діагностики МТХД. Лактат накопичується у хворого як наслідок анаеробного розпаду глюкози.

Підвищений рівень концентрації лактата в ЦСР є важливим показником ураження ЦНС, проте вони легко можуть викликатися стресом (страх венопункції), надмірними скороченнями м'язів (епілептичний стан), аноксією і іншими умовами. Достовірне значення дають лише аналізи, отримані на

підставі двох або більше досліджень рівня лактата крові. У деяких пацієнтів з підтвердженим мітохондріальним дефектом не виявляється накопичення лактата в крові або сечі, проте в ЦСР рівень лактата часто підвищений. При деяких типах органічної ацидурії, виділення лактата з сечею може бути підвищеним [90]. Його рівень може підвищуватися при багатьох системних порушеннях під впливом накопичення токсинів. Тому гіпоксія, гіпотонія, кардіоміопатія, ниркова дисфункція, шок, сепсис супроводжуються підвищенням рівню лактату, але встановлено, що підвищення лактату притаманне і деяким метаболічним захворюванням (органічні ацидурії, дефекти циклу Кребса, метаболізму пирувата, окислення жирних кислот, метаболізму глікогену, дефекту біотинідази і тіаміну, порушенню комплексу окислювального фосфорилування в мітохондріях) [91]. Відомо, що у пацієнтів з ураженням ЦНС лактат підвищується тільки в спинномозковій рідині [22]. Завдяки появі магнітно-резонансної спектроскопії стало можливим визначення рівня лактату в мозку неінвазивним методом. Загалом встановлено, що підвищення рівня лактату є інформативним, але існує обмеження: так, при синдромах Кернса-Сейра, Лебера, MERRF рівень його може бути незначно підвищеним або нормальним [4].

Підвищений рівень креатинкінази притаманний мітохондріопатіям, дефектам окислення жирних кислот, дефектам гліколізу.

Зміна рівня сечової кислоти несе в собі велике інформативне значення, її підвищення свідчить про порушення відкладення запасних речовин у глікогенах, порушення жирних кислот, МТХД. Знижений рівень сечової кислоти свідчить про порушення обміну пуринів, або про дефіцит кофактору молібдену. Зниження рівня міді притаманне хворобі Менкеса, церулоплазміну – хворобі Вільсона, Менкеса.

Гіпотиреоз та гіпопаратиреоз, у поєднанні з іншими ознаками, притаманні мітохондріопатіям.

Особливе значення дослідники надають пошуку гострої метаболічної хвороби в неонатальному періоді в так званій «безсимптомний інтервал», коли у малюків уже з другого дня життя розвивається м'язова гіпотонія, виникають

проблеми з вигодовуванням, блювота, млявість, аномальне дихання, церебральні пароксизми. В таких випадках стандартні лабораторні дослідження найчастіше бувають нормальними або свідчать про інфікування [92].

Жодна з клінічних ознак не є специфічною або помітною. Підозра на те, що пацієнт страждає від мітохондріального порушення, виникає в тому випадку, коли доведена наявність щонайменше двох хронічних і нез'ясованих симптомів з вищезгаданого обширного переліку, які переважно спостерігаються в двох не пов'язаних один з одним органах [93].

Для діагностики мітохондріальних захворювань, на думку N. Blau, 2010 необхідно проведення таких досліджень: лактат і піруват у крові; кетонів тіла в крові; амінокислоти в крові і сечі; органічні кислоти в сечі; КТ/МРТ або МРС головного мозку. Забір зразків слід проводити у пацієнта після прийому ними їжі (Blau N., (2010), Hoffmann G.F., 2011).

Деякі автори відзначають, що в одній або декількох біологічних рідинах більшості пацієнтів можна знайти накопичення метаболітів, асоційованих з мітохондріальним обміном [94]. Автор вважає, що в діагностиці мітохондропатій особливу увагу слід звернути на рівень концентрації лактата, бо після відновлення і трансамінування накопиченого пірувата утворюється надлишок лактата і аланіна.

Якщо на шляху окислення пірувата зустрічається серйозна перешкода, і продукований лактат не можна адекватно видалити периферичними тканинами, то він накопичується в крові, сечі та/або ЦСР, залежно від ураженої тканини. Знижена активність дихального ланцюга проводитиме зміну рівноважного стану реакції лактатдегідрогенази в процесі перетворення пірувата в лактат. Тому у пацієнтів з дефектом дихального ланцюга повинне виявлятися підвищене відношення лактат/піруват в крові, тоді як недостатність піруватдегідрогенази повинна призводити до нормального відношення лактат/піруват. Проте цей механізм для диференціальної діагностики не у всіх випадках виявляється корисним. Більш того, у деяких пацієнтів накопичення лактата в крові або сечі не відбувається.

Встановлено, що сучасний метод газової хроматографії дозволяє визначити відповідні метаболіти [95]. Корисним також може бути визначення рівня концентрації і асоційоване з ним відношення кетонів тил, ацетоацетата і 3-гідроксібутрата [96]. У деяких пацієнтів з мітохондріальним порушенням спостерігаються кетоз і кетоацидурия. Іншим показником мітохондріального дефекту може бути нефізіологічне підвищення рівня кетонів тил після їжи [97, 98]. Підвищене відношення 3-гідроксібутрат/ацетоацетат може свідчити про наявність дефекту в печінковій тканині дихального ланцюга. За даними авторів, діагностичну цінність має аналіз амінокислот у крові і сечі. При мітохондріальному порушенні у багатьох пацієнтів відбувається підвищення рівня аланіна. Недостатність комплексу E3 призводить до підвищення рівня амінокислот з розгалуженим бічним ланцюгом. Наявність дефекту дихального ланцюга може вказувати важка форма генералізованої аміноацидурії, асоційованої з тубулопатією де Тоні-Дебре-Фанконі.

Ком'ютерна томографія і магнітно-резонансна томографія (КТ і МРТ) можуть нести важливу інформацію про локалізацію патологічних змін. Симетричні ураження в базальних ядрах і в мозковому стовбурі головного мозку переконливо указують на наявність синдрому Лея. За допомогою протонної МРС можна знайти підвищений вміст лактата в специфічних ділянках головного мозку [99, 100].

У здорових людей швидкість кетогенеза, а отже, рівень концентрації ацетоацетата і 3-гідроксібутрата в крові після їжи знижується, проте при мітохондріальних порушеннях він може підвищуватися (Бережной В.В., 2009). Підвищений рівень аміаку в сироватці, підвищений рівень концентрації креатинкінази або білка в ЦСР не є показниками мітохондріального порушення. У разі виявлення порушення повинні братися до уваги дефекти орнітинового циклу, цироз печінки, м'язова дистрофія або некроз головного мозку. Проте пацієнти з синдромом Кернса-Сейра і з синдромом Лея часто мають підвищений рівень концентрацій білка в ЦСР (1). Можливо проведення пренатальної діагностики [102].

Своєчасна діагностика МТХД можлива на всіх етапах онтогенезу людини.

1.2 **Порушення обміну метіоніну як глобальна проблема медицини**

1.2.1. **Роль метіоніну у забезпеченні модифікації генної експресії**

Спостереження за хворими із МТХД дозволило нам відмітити значну частоту асоціацій клінічних проявів порушення МТХ із ознаками іншого метаболічного захворювання – порушення обміну метіоніну. Існуючі теоретичні дані про те, що відкриття мітохондріальних пор з експресією і виходом в цитозоль проапоптичних білків відбувається за рахунок окислення тіолових груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій, навело на припущення про не випадковий взаємозв'язок між МТХД і функцією фолатного циклу. Додали підставу для підтвердження цієї гіпотези знайдені високі частоти поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу (ФЦ) при МТХД в регіоні дослідження.

Як відомо, в основі функціонування будь-якої живої системи лежить генетичний код. Генетичний код довгий час вважався незмінним, універсальним, зосередженим в ядрі клітини. Проте затвердження поняття про ядерно-цитоплазматичну спадковість дозволило підійти до іншої оцінки генетичного коду. Встановлено, що генетичний код схильний до еволюції, яка призвела до виникнення варіантів генетичного коду, специфічних для видів або внутріклітинних органелл, наприклад, мітохондрій. Завдяки багатьом дослідженням вдалося встановити, що один із варіантів генетичного коду, можливо, є стародавньою адаптацією, що захищає від окислювального стресу, викликаного переходом до аеробного дихання, і що призводить до високої концентрації метіоніну в мітохондріях [15].

Для трансляції генетичної інформації використовується два генетичні коди: перший – локалізований в ядрі клітини і він існує для синтезу білків, закодованих у клітинному ядрі. Це стандартний код. Інший – «сучасний, альтернативний генетичний код», який транслює мітохондріальний геном. Цей альтернативний код відкритий лише в 1979 р. Причини виникнення «сучасного коду» вивчалися більше 30 років. Висловлювалося припущення, що причини

виникнення змін у генетичному коді пов'язані з нейтральним еволюційним механізмом, оскільки «принцип кодування амінокислот не повинен мінятися» [15]. Існувала стійка думка, що «будь-яка зміна значення окремого кодону призведе до помилок у кожному трансльованому білку, що не може не мати згубних наслідків для клітини».

Була висловлена гіпотеза «захоплення» кодону, згідно з якою GC-багаті кодони можуть зникати з генома в результаті зміни загального вмісту нуклеотидних залишків G і C. Однак цей кодон може знову з'явитися завдяки дрейфу генів. Такий кодон може бути «захоплений» шляхом невірної прочитання будь-якої тРНК з іншої сім'ї кодонів. При цьому перекодований кодон експресує абсолютно нейтрально, без появи «хворих білків» [15].

Інша гіпотеза названа гіпотезою «двозначного прочитання». Згідно з цією гіпотезою той кодон, що перекодував геном, експресує не нейтрально: мутації в тРНК призводять до прочитування кодону двома різними тРНК – звичайною і мутантною. Це і призводить до перекодування кодону [15].

Прихильники гіпотези «захоплення» кодону показали, що адаптивне антиоксиданте накопичення метіоніна в комплексах клітинних дихальних ланцюгів пояснює використання нестандартного генетичного коду в мітохондріях. Автори показали, що «перекодування» кодону AUA з ізолейцина в метіонін, яка спостерігається в мітохондріях, виявилася сприятливою у функціональному значенні. Вони довели, що перекодування кодону призводить до накопичення метіоніна в тих амінокислотах, які легко окисляються, і зосереджені в мембрані мітохондрій, Це призводить до посилення антиоксидантних властивостей клітин за рахунок накопичення метіоніна. Автори відкрили таємницю: «метіонін є тим, що пройшов шлях свого еволюційного відбору антиоксидантним будівельним білком для комплексів клітинного дихального ланцюга». Окислювальний стрес, з їхньої точки зору, і сформував генетичний код мітохондрій.

Представлене дослідження викликало інтерес тією обставиною, що центральною фігурою в цьому процесі є метіонін, порушення обміну якого, за

нашими спостереженнями і даними світової літератури, претендує на глобальну участь в патології людини.

Метіонін – незамінна сірковмісна амінокислота, що входить до складу білків. Як найповніша характеристика метіоніна представлена в Human Metabolome Database (HMD). Як випливає з світового досвіду, зосередженого в цьому енциклопедичному виданні, метіонін легко окислюється під впливом активних частинок кисню. Основними продуктами окислення метіоніну є R- і S-метіонінсульфоксид, які можна, у свою чергу, розділити на 2 групи стереоспецифічних метіонінсульфооксидредуктаз (MCP) за допомогою низької витрати метаболічної енергії на 1 молекулу $NA DPH/H^+$. Обидва ці типи MCP є життєво важливими для функції організму.

Та обставина, що метіонін є еволюційно відібраним антиоксидантом, пояснює широкий діапазон патології, що виникає при порушенні обміну цієї сірковмісної амінокислоти.

Метіонін володіє унікальними функціями: бере участь в реакціях трансметилювання; слугує донором метильних груп в синтезі біологічно активних речовин; бере участь в синтезі нуклеїнових кислот.

Метіонін є акцептором метілу для 5-метил трансферази (метіонін синтази) в єдиній реакції, а також є метильним акцептором в катаболізмі бетаїна HMD (Human Metabolome Database, 2005). Метіонін – попередник цистеїна, бере участь в біосинтезі останнього. При цьому в процесі катаболізму сірка метіоніна перетворюється на сірку цистеїна. Вуглецевий скелет цистеїну походить із серина.

Визначена його біологічна функція: незамінна амінокислота; компонент аміноацил тРНК біосинтази; компонент метаболізму гліцина, серіна та треоніна; компонент гістидінового обміну; компонент метіонінового, селеноамінокислотного, тірозинового метаболізму.

В метаболізмі метіоніна велику роль відіграє фолатний цикл. Цикл, у свою чергу, складається з багатьох «кроків», які здійснюються за допомогою багатьох ферментів. У фолатному циклі продуктом обміну є метильні групи –

СНЗ. Перетворення метильних груп у моноглутамати здійснюється шляхом гідролізації за допомогою ферменту птероїлполіглутаматгідролази [102, 103, 104].

Моноглутамат у кишківнику всмоктується і відновлюється до тетрагідрофолата (ТНФ) – біологічно активного з'єднання. Після метилювання фолатів вони потрапляють в кров у вигляді 5-метилтетрагідрофолата (5-СН₃-ТНФ), джерелом якого є їжа, і кишково-печінковий цикл: птерил-моноглутамат всмоктується з кишечника, потрапляє в печінку, тут метілується до 5-метилтетрагідрофолата, який потім виділяється з жовчю в кишківник, всмоктується в ньому і розповсюджується з кровотоком. 5-метилтетрагідрофолат є донором метильних груп і основним джерелом тетрагідрофолата. Тетрагідрофолат виступає як акцептор великого числа моноуглецевих фрагментів, перетворюючись на різні види фолатів (5, 10-метилентетрагідрофолат – 5, 10-СН₂ – ТНФ; 5-10-метилентетрагідрофолат – 5, 10-СН – ТНФ; 10-формілтетрагідрофолат – 10-СНО – ТНФ).

Фолати є специфічними коферментами у ряді внутрішньоклітинних реакцій.

Утворення метіоніна з гомоцистеїна, його реметилювання відбувається за участю 5, 10-метилентетрагідрофолата і 5-метилентетрагідрофолата. Каталізатором реметилювання гомоцистеїна в метіонін є цитоплазматичний фермент метіонін-синтаза (MTR), робота якого здійснюється за участю метилкобаламіна, похідного вітаміну В12. Метилкобаламін виконує роль проміжного переносника метильної групи при реметилюванні гомоцистеїна в метіонін, яке забезпечує метіонін-синтаза. В процесі цього перетворення відбувається окислення кобаламіна і фермент MTR переходить у неактивний стан. Але функція ферменту відновлюється в процесі метилювання за участю ензима метіонін-синтази-редуктази (MTRR). Оскільки кобаламін є акцептором метильної групи 5-МТНФ, дефіцит вітаміну В12 призводить до «пастки для фолата». Нездатність регенерувати метіонін призводить до виснаження його запасу і викиду в кров гомоцистеїна [105, 106].

Донором метильної групи є активована форма метіоніна – S-аденозілметіонін. Вона використовується і для метилювання ДНК, РНК, білків, фосфоліпідів.

Ключову роль у синтезі метіоніну з гомоцистеїна відіграє 5, 10-метілен-тетрагідрофолатредуктаза (MTHFR), яка відновлює 5, 10-метілентетрагідрофолат до 5-метілтетрагідрофолата, який несе на собі метильну групу для реметилування метіоніну з гомоцистеїна [106, 107].

Окрім цього шляху реметилування метіоніна з гомоцистеїна існують ще два альтернативних. Другий шлях здійснюється в печінці – реметилування відбувається за участю бетаїна – донора метильної групи і ферменту гомоцистеїнметилтрансферази. Третій шлях – перетворення в цистеїн через цистатіонін за участю CBS, кофактором якої є вітамін B6.

В 2007 році Kelly T., Williams and Kevin L. Shalinske опублікували нові уявлення про регуляцію метаболізму метильних груп і гомоцистеїна. Автори вказують на тісний взаємозв'язок метаболізму фолатів, метильних груп і гомоцистеїна, розрив якої призводить до розвитку численних клінічно значущих порушень. Автори вважають, що підтримка в нормі гомеостазу метильних груп і гомоцистеїна залежить від балансу між: S-аденозілметіоніном (SAM)-залежним трансметилуванням, яке утилізує метильні групи і продукує гомоцистеїн; зворотним реметилуванням гомоцистеїна в метіонін за допомогою фолат-залежних і незалежних механізмів; і катаболізмом гомоцистеїна шляхом транссульфатування. Нині метаболісти всього світу дійшли до висновку, що метаболізм фолатів, метильних груп і гомоцистеїна можна вважати важливими метаболічними шляхами, які потрібні для оптимального стану здоров'я. Різні харчові, гормональні і генетичні чинники можуть впливати на зв'язок цих метаболічних шляхів. Результатом такого впливу є розвиток патологічних станів, які відносяться до поширених захворювань людини – кардіоваскулярним, онкологічним, нейродегенеративним і природженим вадам розвитку.

Механізм взаємозв'язку між фолатами, метильними групами і гомоцистеїном обґрунтований багатьма дослідниками [156, 157, 2]. Так, встановлено, що S-аденозілметіонін є універсальним донором метильних груп для метилтрансфераз. Метилтрансферази впливають на метилування нуклеїнових

кислот, ліпідів і протеїнів. Дія SAM-залежних метилтрансфераз продукується S-аденозилгомоцистеїном (SAH), який у подальшому перетворюється на гомоцистеїн під дією SAH-гідролази. Гомоцистеїн може реметилювати в метіонін. Відбувається це за участю як фолат-залежних, так і фолат-незалежних механізмів. Для того, щоб відбулося фолат-залежне реметилювання, B12-залежний ензим-метіонін синтаза (MS) повинен утилізувати метильну групу з 5-метилтетрагідрофолата. Фолат-залежне реметилювання гомоцистеїна здійснюється за допомогою бетаїн-гомоцистеїн S-метилтрансферази (BHMT), яка каталізує цей процес, використовуючи бетаїн. Бетаїн – донор метильних груп, який утворюється при окисненні холіна. SAM-залежне трансметилювання відбувається у всіх тканинах. Трансметилювання і транссульфатування за участю BHMT є тканеспецифічним, оскільки здійснюється переважно в печінці і нирках. За допомогою множинних метилтрансфераз: гуанініноацетат метилтрансфераза (GAMT), фосфатиділетаноламін N-метилтрансфераза (PEMT), гліцин N-метилтрансфераза (GNMT). GAMT і PEMT є найбільшими споживачами метильних груп, які вони одержують з SAM. GAMT дуже важлива при продукції креатініна, PEMT – при утворенні фосфатиділхоліна.

Фолат-залежне реметилювання гомоцистеїна за участю бетаїна впливає на метаболізм метильних груп і гомоцистеїна. BHMT використовує метильну групу, жертвуючу бетаїном для реметилювання гомоцистеїна в метіонін, який може потім бути відновленим в SAM. BHMT відіграє регуляторну роль у гомеостазі гомоцистеїна. Показано, що печінкова BHMT-активність і/або мРНК експресія підвищена у діабетичних щурів і при лікуванні глюкокортикоїдами.

Посилення функції BHMT сприяють збільшенню реметилювання гомоцистеїна, призводячи до пониження плазмових рівнів гомоцистеїна. Експериментально доведено, що BHMT є ключовим модулятором плазмових рівнів гомоцистеїна [108]. Транссульфатування призводить до необоротного катаболізму гомоцистеїна.

Виходячи з отриманих даних, метаболізм фолатів, метильних груп і гомоцистеїна включає широкий ряд функцій, у тому числі синтез і метаболізм численних біологічних з'єднань, епігенетичне регулювання геної експресії.

Враховуючи наведенні дані, можна припустити, що дефект роботи метильних груп – головних модифікаторів геному – несе за собою довгий ланцюг генетичних подій, які призводять до багаточисельних порушень в організмі людини. Як свідчить А.М. Вайсерман (2011), якщо умови, в яких відбувається розвиток організму, і ті, в котрих він живе протягом життя, не співпадають, це може призвести до виникнення різних патологічних відхилень, автор називає їх епігенетичними хворобами адаптації. Прикладом подібних патологічних проявів, на думку автора, є висока схильність до ожиріння і діабету II типу у людей, які проходили свій антенатальний розвиток на тлі голоду. Подібний процес спостерегається у сучасних популяцій: війни, голод, які потерпали українці, вплинули на функцію адаптивних генів ферментів фолатного циклу, універсальним біологічним продуктом і донором якого є метіонін. Популяція вижила за рахунок адаптивних поліморфних варіантів генів ферментів MTHFR, MTRR, MTR. Зі зміною умов життя, підвищенням білкового навантаження на тлі дії тригерів (суперстресів, харчування, паління, інфекцій, травм та інших) адаптивні гени набули якості генів схильності до різних форм спадкової патології [107].

1.3. Епігенетична регуляція функції геному

Епігенетика являє собою процеси, які змінюють функцію ДНК, не торкаючись послідовності нуклеотидів. Цей революційний термін вперше був запропонований Конрадом Халл Уодінгтоном в 1947 р., а пізніше, через 10 років, автор розгорнув це поняття як епігенетичний ландшафт для визначення дії каузальних механізмів. В 2004 р. D. Haig визначив цей процес «як гени генотипу здійснюють фенотипові ефекти». Вітчизняні вчені розпочали вивчати епігенетичну мінливість у 70-х рр. минулого сторіччя (група Б. Ванюшина, 1970 р.; В.С. Гайцхокі та Є.Л. Паткін, 1999; С.А. Назаренко, 2005; І.В. Лебедев; В.А. Поляков, Ю.Л. Волянський, А.М. Вайсерман, О.Я. Гречаніна, 2004 р.).

Концепція Уодінгтона пояснювала процес диференціації клітин в організмі, виходячи із припущення, що всі клітини спочатку несуть на собі закладені можливості стати будь-якого із клітин (тотипотентність). В подальшому диференціація йде шляхом реакції на отримання певних гормональних і інших біологічних сигналів, які активують різні групи генів (генна експресія). Такі процеси були віднесені до епігенетичних. В останній час виникає все більше доказів того, що епігенетичні модифікації, які виникли де-ново можуть не тільки закріплюватися в організмі, впливати на долю організму, але і на долю генома і успадковуватися поза менделевськими законами. Епігенетичні модифікації носять вузько спрямований характер і відповідають величині впливу. Не можна стверджувати, що епігенетика нова наука, бо її корені тісно переплетені з науковими даними Ж.Б. Ламарка, який стверджував, що існує можливість успадкування набутих ознак (трансгенерація).

В 1992 р. М. Szyf вперше заявив про зв'язок гіпо- і гіперметилування ДНК із онкологічною патологією. R. Holliday (2006) [109] визначив, що одиницею епігенетики є епігеном (сукупність усіх епігенетичних маркерів, які зумовлюють експресію генів у даній клітині). Біологічними маркерами епімутацій (спрямованих, адаптивних змін) є біохімічні реакції, які впливають на процеси епігенеза – гіпо-, гіпер-, деметилування цитозинових острівців, (прикріплення метильної групи до цитозинових основ ДНК, яке призводить до виключення генів); ацетилювання гістонів (білків хроматина, які необхідні для збірки та упаковки ДНК); сумоїлування, убіквітинування. Задля зчитування спадкової інформації потрібний доступ до певного фрагменту ДНК. Такий доступ можливий тільки у випадку нещільного контакту ДНК і гістонів. Встановлено, що зв'язок між ними зменшується за допомогою модифікації їхніх кінцевих ділянок – хвостів, якщо щільність не зменшиться, то ген залишається неактивним.

Одним із недавніх важливих відкриттів є сайленсинг інтерференційної РНК (RNAi) [110] – утворення двунитчатої антизмістової РНК, дія сайленсинга строго специфічна, а вибір генів, на яких здійснюється ця дія, строго обмежений.

Глобальний сенс біологічної різниці між епімутаціями та «точковими» мутаціями, є той факт, що генетичні ознаки можуть відтворюватися необмежено довго, поки на шляху не виникають мутації в визначених генах, а запущені певними чинниками епімутації відтворюються у межах одного організму або 3-4-х подальших генерацій, тобто вони кінцеві, які при відсутності подальшої дії чинника, що викликав їх, зникають. Крім того, генетичні маркери знаходяться усередині нуклеотидів та змінюють їх послідовність, а епігенетичні – на нуклеотидах (метилування) або поза їх межею – ацетилювання гістонів, мікроРНК.

До найважливіших тригерів (провокаторів), що призводять до порушення епігенезу належать: харчування, інфекції, паління, алкоголь, стрес.

В 2004 р. групою дослідників була висунута гіпотеза гістонового кода (Т.Jenuwein, С.Allis), а в 2005 р. НL.Schubert et al., MF.Dion et al. підтвердили, що для більшої частки генома специфічні модифікації гістонів та експресія генів не пов'язані (всі активні гени мають однакові мітки, які відсутні на неактивних).

Для оцінки мовчазного хроматина, який проявляє динамічні якості, було проведено ряд досліджень [111], які довели, що проста молекулярна модифікація гістонів, яка служить міткою пам'яті для відтворення стану мовчання хроматину в ході клітинного розподілу, може бути відсутньою. Автори припустили, що існує більш тонкий набір взаємодій, який, можливо, регулює цей стан.

1.3.1. Метилування як головна реакція епігенезу

Головною епігенетичною міткою та ключовою реакцією епігенезу є метилування. Сайти метилування палиндромні, за метилування не модифікованої ДНК та ДНК, з вже метильованою однією ниткою, відповідальні різні ферменти. Метильована батьківська нитка передає мітку дочірній ДНК, що дозволяє передати метельований стан наступним поколінням [112]. Головною метою метилування є приєднання метильної групи до цитозину в

C5-позиції цитозинового кільця (CpG), механізм передачі метильної мітки – напівконсервативне відтворення метилування. Метильована ДНК людського організму складає 1% [113]. Поза CpG-островків метилування зустрічається в ембріональних стовбурових клітинах. За метилування відповідають три фермента DNMT – ДНК – метилтрансферази, пов'язані із послідовностями ДНК, структура яких залишається незмінною. DNMT активізуються в ранньому ембріональному періоді. Втрата здібності підтримати метилування призводить до формування захворювань типу ICF (імунодефіцит, центромірна нестабільність, лицеві аномалії, та рак). Епігенетична модифікація без змін послідовності ДНК (метилування) транскрипційно інактивує хроматин, що обумовлено надмолекулярними змінами його компактизації. В нормальних соматичних клітинах метилування відповідає за інактивацію X-хромосоми, геномний імпринтинг, регуляцію тканиноспецифічної експресії генів, контроль геномної активності [114]. Відомо, що регуляторні елементи генома (промотори, енхансери, ізолятори, репресори) метилуються задля супресії їхньої функції. На думку [102], метилування може торкатися тільки генів, інактивованих раніше іншими механізмами в ембріональному стані. Метилування як специфічна функція клітинної пам'яті – універсальний та оборотний механізм, що створює генетичне різноманіття. Проте, крім білків метилування в останній час виявлені білки Polycomb, Trithorax, які беруть участь в процесі виключення/включення активності кластерів генів в ході розвитку.

Вид клітин та організму залежить від типу генів, які транскрибуються, та від успадкування цього статусу, який носить епігенетичний характер. Існує декілька рівнів регуляції експресії генів – ремоделювання хроматину (комплекс ДНК, одиниця, що повторюється – нуклеосома, яка складається із білкового октамеру, що містить по дві молекули кожного корового гістона). Ремоделювання ініціюється посттрансляційною модифікацією амінокислот гістонів (метилуванням цитозину). Відомо, що метилування цитозинових основ ДНК визначає взаємодію між ДНК та хроматиновими білками. Така взаємодія регулює експресію генів за допомогою механізмів компактизації-декомпактизації. До

складу хроматина входять еволюційно консервативні білки – гістони (H2A, H2B, H3, H4). Гістони складаються із глобулярного домену та гнучких (відносно неструктурованих) консервативних гістонових хвостів. Гістон організує нуклеотидну послідовність, яка потім компактизується, ущільнюється в 40 разів. В подальшому складаються в петлі, ущільнюючись у 680 разів в метафазі як останньому рівні компактизації. Кінцеве ущільнення відбувається в 10 000 разів. На N-кінцях кожний четвертий амінокислотний залишок – лізин або аргінін. Певна структура хроматину підтримується в процесі електростатичної взаємодії між негативно зарядженими фосфатними групами ДНК та позитивно зарядженими кінцевими ділянками гістонів. Експресія генів регулюється хімічно модифікованими нуклеосомними гістонами (ацетильованими, метильованими, фосфорильованими, АДФ-рибозильованими, біотинильованими). Кожна клітина містить в собі ферменти – амілтрансферазу та деацетилтрансферазу гістонів, які забезпечують мобільність хроматину. Деацетилювання гістонів нуклеосом та їхнє метилування, особливо дев'ятого лізингового залишку гістону та метилування гістонів є важливою часткою механізмів репресії генів. Це перебудовує генну структуру хроматину, збільшує ступінь компактизації та призводить до репресії транскрипції генів, які локалізуються в цій ділянці хроматину. Можливі варіації гістонів.

Дослідження, що проводяться нині, свідчать про можливу первинну роль некодуєчих РНК в перемиканні епігенетичних переходів, вони зберігають успадкованість специфічних станів хроматину і його матриці. Відомо, що малі РНК в основному транскрибуються з ендегенних транспозонів та інших послідовностей, що повторюються [115, 116]. В цілому доведено, що інтерференційна РНК пройшла еволюційний етап для підтримки стабільності геномів за допомогою мобільних елементів ДНК і вірусів, і тепер є висококонсервативною.

Гени *Polysomb* і *Trithorax* відносяться до основних ефекторів, які передають сигнали до хроматинової матриці і беруть участь в підтримці клітинної ідентичності (забезпечують клітинну пам'ять) [117]. Вони є не тільки

ключовими регуляторами проліферації клітин і клітинної ідентичності, але і беруть участь в декількох сигнальних каскадах. Все вказане відбувається за допомогою структури хроматину [118]. В деяких випадках пухлини супроводжуються зниженням рівня репресованих гістонових міток, збільшенням загального ацетилювання, яке викликає підвищення рівня транскрипції генів і нестабільності геному [119]. Всі дослідження, що проводяться, свідчать про те, що порушення регуляції геному, яке проявляється на рівні певних гістонових міток, часто є результатом дії ензимів Polycomb, Trithorax [120].

Сайленсинг, як результат впливу ензима Polycomb та інактивована Х-хромосома, є кращим доказом регуляторів між активним і неактивним хроматином (факультативним). На відміну від конститутивного гетерохроматину, який може бути індукований в некодуючих та високоповторюючих регіонах, факультативний ГХ зустрічається в кодуючих районах генома, там де сайленсинг генів залежить від можливих епігенетичних дій.

Інактивація Х-хромосоми – є одним з самих вивчених варіантів утворення факультативного гетерохроматину. Суть інактивації – пригнічення однієї Х-хромосоми із жіночого набору задля вирівнювання дози експресії зчеплених з Х-хромосомою генів з індивідуумами із чоловічим каріотипом (одною Х і гетероморфною Y-хромосомою). Сайленсинг гену по всій неактивній хромосомі індукує компактизацію високого рівня, яка видна як тільце Бара, яке знаходиться на периферії ядра клітин у осіб жіночої статі. Інактивація хромосоми відбувається за допомогою великої РНК [121]. Інактивована Х-хромосома у зв'язку з дисбалансом геному веде за собою фенотипічні прояви, можливе утворення компаундів (О.Я. Гречаніна, 2004).

За даними [122, 123], біологічною функцією механізмів РНК-сайленсинга є регуляція експресії генів і збереження стабільності генома шляхом формування стабільного гетерохроматину в центромірах і теломірах. Вони також захищають від транспозонів і РНК-вірусів, порушуючи їх РНК-транскрипти. Малі РНК ініціюють збірку гетерохроматину у зв'язку з ефекторним комплексом RNAi [104].

Відомо, що ДНК упакована архітектурними білками, гістонами, які збираються в нуклеосоми. ДНК обертається навколо нуклеосом. Основна маса гістонів відкладається після реплікації ДНК, у фазі S, а варіанти гістонів – упродовж всього клітинного циклу. Центроміри ідентифікуються спеціальним варіантом гістонів – H3, а заміщення варіантів – H33. Коли відбувається фосфорилювання гістону H2AX, настає репарація двониткових розривів ДНК. Гістон H2AZ відіграє роль в регулюванні транскрипції, а інші варіанти H2A диференціюють хроматин, таким чином встановлюючи і підтримуючи епігенетичні стани. Еволюція більшості гістонів була спрямована на більш щільнішу упаковку ДНК [124].

Відомо, що існують два фундаментальні процеси клітинного ділення, які подвоюють і передають генетичну інформацію – мітоз і мейоз. Мітоз є ядерним діленням в соматичних клітинах, яке включає ідентичний розподіл в дочірній клітині дуплікованного генетичного матеріалу у вигляді хромосом. На початку мітоза хромосоми конденсуються, а гістон H3 фосфорилює. Одиначний сайт (центроміра) на кожній сестринській хроматиді формує так звану кінетохору, на якій прикріплюються трубочки веретена, і вона є контрольною точкою клітинного циклу. Мейоз за своєю суттю – редукційне ядерне розділення, яке відбувається в зародкових клітинах для виробництва клітини з гаплоїдним геномом перед заплідненням. Для мейозу потрібні центроміри, теломіри, зчеплення і джерела реплікації. Помилки реплікації або репарації ДНК призводять до мутацій та перебудов хромосом. Помилки сегрегації в процесі ядерного розділення викликають втрату або придбання хромосом – анеуплоїдію. Ініціація реплікації ДНК контролюється епігенетичними механізмами. Репарація ДНК включає епігенетичні зміни в структурі хроматину. Специфічні зміни в хроматиновій матриці, наприклад, такі, як варіантні гістони та їх посттрансляційні модифікації відіграють важливу роль у розпізнаванні ушкоджень ДНК і в рекрутуванні відповідних механізмів репарації [125]. Інші реакції зміни хроматину, як ацетилювання гістонів, убіквітинування, метилювання, також дуже важливі для успішної репарації ДНК. Роль

хроматину в репарації ДНК динамічна у відповідь на ушкодження. Модифікації гістонів не наслідують при діленні [126].

Хромосомна відмінність між статтю чоловічою і жіночою пов'язана з такими проблемами як дисбаланс генів, зчеплених з X. Це може призвести до порушення у кількості генних продуктів (РНК і білків), різниці в контролі метаболізму. Для уникнення цього існують механізми компенсації дози генів, які урівноважують рівні кількості продуктів, які зчеплені з X-генами. Таким механізмом є виключення (сайленсування) більшості генів на одній активній X-хромосомі (ефект лайонізації) [127]. Інактивація X-хромосоми регулюється в ході розвитку організму. Для стабілізації рівня гетерохроматину на рівні структури хроматину сайленсинг хромосоми настає в результаті модифікації гістонових «хвостів», включення/виключення варіантних гістонів і метилування ДНК в CpG-островках. Деякі гени уникають виключення і не вимагають компенсації дози (15%), тому що у обох статей в цьому так званому псевдоаутосомному районі є присутніми дві копії генів [128]. Багато хто з них знаходиться на короткому плечі X-хромосоми, відносно нещодавно придбаному в ході еволюції. X-інактивація регулюється центром – головним локусом. В соматичних клітинах X-інактивація стабільна.

Патерни метилування ДНК визначаються станом модифікації, що лежить в основі хроматину. Причиною практично всіх мутацій (одна третина усіх «точкових») є підвищена мутабільність 5-метилцитозина та передача мутантної тимінової основи при реплікації ДНК (варіант транзиції С-Т в послідовностях CpG) [129].

Геномний імпринтинг – це епігенетична система регуляції генів, що змінює експресію генів однієї із хромосом. До імпринтингу здатні тільки декілька сотень генів організму, він є наслідком батьківського успадкування, а не статі. Він проявляється специфічною експресією батьківського гена. Діплоїдні клітини з двома копіями батьківських генів будуть експресувати тільки одну батьківську копію імпринтованого гена та сайленсувати іншу, а неімпринтовані гени будуть експресуватись в діплоїдній клітині обома

батьківськими копіями [130]. Геномний імпринтинг це cis – діючий механізм, який придбається однією батьківською гаметою. В основному гени імпринтингу зібрані в кластери разом з некодуючою РНК. Гени-імпринти можуть модифікувати видалені регуляторні елементи, які діють на множинні гени. Біологічна функція імпринтингу впливає на розвиток організму.

1.3.2. Епігенетика і хвороби людини

W. Reick et al., 2001 узагальнив особливості епігенетичного програмування генома:

- малюнки метилування ДНК мають просторову, тимчасову і тканину специфічність;
- специфіка метилування ДНК успадковується дочірніми клітинами;
- специфічні мітки метилування стираються в пам'яті примордіальних статевих клітин;
- в ході дозрівання статевих клітин відбувається відновлення малюнків метилування відповідно до статевої належності організму;
- після злиття статевих клітин відбувається деметилування генома;
- в процесі ембріогенезу метилування соматичних клітин відбувається *de novo*.

Епімутації, окрім прогресивної біологічної ролі в розвитку організму, природно можуть призводити і до патологічних наслідків – епігенетичних хвороб [130]. Деякі області генома функціонально нерівноцінні і у разі успадкування пацієнтами обох гомологічних хромосом (або їх сегментів) – однобатьківської дісомії – спостерігається втрата експресії деяких генів, або в материнських алелях та підвищення рівня експресії батьківських генів (при батьківській дісомії) або у батьківських алелях і підвищення експресії материнських генів (при материнській дісомії). Однобатьківська дісомія, як і змінені ДНК-модифікації (епімутації, що змінюють метилування), є молекулярною основою формування багатьох неврологічних і психічних порушень [132].

До формування схожого фенотипу може призвести і епімутація і генетична мутація, що пов'язано з тим, що генетична мутація порушує функцію гена, яка невірно регулюється при дії на даний локус епімутації. Існує й інший вид захворювань, при якому генетичні мутації призводять до втрати функцій білків, що беруть участь в метилуванні ДНК або ремоделінгу хроматину. Тоді специфічні фенотипи виникають як наслідок зміни епігенетичних станів в одному або декількох локусах. Епігенотип (епігенетичний стан геномного локуса) встановлюється на підставі наявності або відсутності метилування ДНК, модифікацій хроматину і варіантної активності некодуючих РНК [133].

Метильні модифікації можуть бути моно-, ді- і триметильованими, що складає потенційний «гістоновий код», який лежить в основі хроматину. Проте існує ще маса некодуючих РНК-транспортні, рибосомні, сплайсосомні, мала ядерцева РНК, мікро РНК, короткоінтерферуюча РНК, мала двониткова. Багато з них регулюють модифікації хроматину, імпринтинг, метилування ДНК і транскрипцію сайленсингу.

Генетичні механізми поділяються на два класи: транс-ефекти – втрата або дисфункція чинників, що асоціюються з хроматином, що в свою чергу змінює структуру хроматину і експресію генів в певних ділянках генома – і цис-ефекти – мутації в некодуючих ділянках, можливо, необхідні для регуляції. Результатом може бути збільшення повторів ДНК, зміна хроматину, яка впливатиме на стабільність генома та експресію генів.

Створена класифікація епігенетичних захворювань: (по С.А. Назаренко, 2004; С. Д. Эллис та спіав. 2010).

1. Порушення геномного імпринтингу:

- синдром Прадера-Віллі;
- синдром Ангельмана;
- синдром Беквіта-Відемана;
- синдром Рассела-Сільвера;
- псевдогіпопаратиреоїдизм.

2. Порушення, що впливають на структуру хроматину в транс-конфігурації:

- синдром Рубінштейна-Тейбі;
- синдром Ретта;
- зчеплена з X-хромосомою альфа-таласемія з розумовою відсталістю;
- синдром імунодефіциту, нестабільності центромірної ділянки та лицьових аномалій (ICF);
- спондилоепіфізарна дисплазія Шимке;
- дефіцит метилентетрагідрофолатредуктази.

3. Порушення, що впливають на структуру хроматину в цис-конфігурації:

- таласемія;
- синдром ламкої X-хромосоми;
- плече-лопаточно-лицьова міопатія.

С.А. Назаренко (2004), поділив усі епігенетичні стани в залежності від глобального або локального ефекту:

1. Порушення епігенетичного статусу окремих ділянок генома (локальний ефект):

– хвороби, обумовлені успадкованими мутаціями, що порушують моноалельну експресію генів – хвороби геномного імпринтінгу (синдроми Відемана-Беквіта, Прадера-Віллі, Ангельмана);

– хвороби, обумовлені порушенням статусу метилювання окремих генів у результаті *de novo* виниклих мутацій в соматичних клітинах – ракові хвороби, пов'язані з втратою імпринтінгу, що призводить до активації неактивних генів або до пригнічення експресії активних генів; та ракові хвороби, обумовлені гіперметилюванням промоторів генів пухлинних супресорів та їх інактивацією.

2. Порушення епігенетичного статусу всього геному (глобальний ефект):

– хвороби, обумовлені успадкованими мутаціями генів, продукти яких залучені в підтримку рівня метилювання ДНК або модифікацію структури хроматину – синдроми ICF, ATR-X, синдром Ретта, Рубінштейна-Тейбі, Коффіна-Лоурі.

– хвороби, обумовлені глобальним порушенням метилювання генома в результаті *de novo* виниклих мутацій в соматичних клітинах – ракові хвороби, пов'язані з глобальним метилюванням генома, що призводить до активації онкогенів ретротранспозонів та хромосомної нестабільності.

Підводячи підсумок вищенаведеному, можна сказати, що усі нові відкриття – це модифікація давно відомих понять, що отримали нове життя і нове трактування завдяки успішному розвитку молекулярної медицини. Не можна стверджувати однозначно, що будь-який з біологічних процесів, що відбувається, несе шкоду або користь, так само і метилювання, як головна епігенетична модифікація, бере участь і в процесах подальшого розвитку та еволюції організму, і в процесах, що гальмують їх, що, можливо, і є суттю біологічної рівноваги усього живого в природі. І приставка епі – не означає бути поза генетичною основою, а значить, бути в гущі генетичних подій, тільки забарвлюючи їх в епігенетичний, більш тонкий відтінок (S. Ali, 2010.)

Ще в 1988 році Н.М. Cooper, Youssoufian висловили думку про те, що одна третина виникаючих точкових мутацій є наслідком підвищеної мутабельності 5-метилцитозину та передачі мутантної тимінової основи при реплікації ДНК (транзиції С-Т в послідовностях CpG-островків), що стало для нас серйозною підставою розглянути роль поліморфних варіантів генів мтДНК та поліморфних варіантів генів фолатного циклу як таких, що потенційно можуть вплинути на первинні біохімічні продукти та відбитися на формуванні фенотипу – клінічних ознак МТХД. Віднесення до епігенетичних хвороб дефіциту метилентетрагідрофолатредуктази навело нас на гіпотезу про існуючий зв'язок між функцією фолатного циклу і МТХД, зумовленими порушеннями дихальних ланцюгів.

Розділ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика обстежених груп

Для вивчення МТХД, крім клінічної картини, яка важлива, але недостатня, використовуються сучасні методи, серед яких: МРТ головного мозку, електроміографія, цитологічні дослідження біоптатів тканин, імуногістохімічні дослідження цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази, НАДН, АТФ-ази та ін., а також вимірювання активності окремих мітохондріальних ферментів та їх комплексів у гомогенатах м'язів, дослідження електронно-мікроскопічними методами структури мітохондрій, дослідження полярографічними методами поглинання кисню ізольованими мітохондріями, вимірювання рівня лактату в плазмі крові та спинномозковій рідині (СМР) та неінвазивне вимірювання рівня лактату в головному мозку і СМР сучасними методами МРТ класичних біохімічних показників [С.Н. Иллариошкин, 2007]. Підтверджуюча діагностика мітохондріальної патології за допомогою методів молекулярної діагностики набуває особливої актуальності.

Системний підхід до вивчення проблеми став методологічною основою дисертаційного дослідження, і саме тому на першому етапі дослідження вивчені особливості поліморфізмів мітохондріальної ДНК як еволюційно сформованих генів схильності та поліморфні варіанти генів ключових ферментів фолатного циклу як одні із маркерів епігенетичного статусу популяції. Вказані дослідження були виконані за допомогою неонатального молекулярно-генетичного скринінгу та селективного скринінгу хворих із різними формами спадкової патології, які знаходяться на диспансерному нагляді в ХСМГЦ. Молекулярно-генетичний скринінг здійснювався в межах двох міжнародних проєктів: “Етногеноміка народів Східної Європи: виявлення гаплотипів мітохондріальної ДНК та Y-хромосоми в популяціях України та їх аналіз методом медіаних сіток (INTAS)” та “Всебічний аналіз епідеміології і

механізмів експресії мітохондріальних хвороб слов'ян в популяціях Східної України”.

Дизайн дослідження виглядає так.

Обсяг досліджень. Для досягнення мети і вирішення завдань дисертаційного дослідження **проведений комплексний аналіз:**

- 5895 реєстраційних карт (ф. №149) – даних генетичного моніторингу ПВР за 2000-2010 роки;
- 1938 генетичних карт сімей, у яких в процесі селективного скринінгу знайдені поліморфні варіанти генів фолатного циклу;
- 200 реєстраційних карт (ф. № 149) новонароджених і результатів молекулярно-генетичного дослідження гаплогруп мтДНК;
- 200 реєстраційних карт (ф. № 149) і результатів молекулярно-генетичного дослідження поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу.

Обстежено

- 652 пацієнти із різними формами спадкової патології;
- 203 пацієнта із клінічно встановленим діагнозом МТХД;
- 142 особи без ознак МТХД.

Проаналізовано

- 2445 молекулярно-генетичних досліджень поліморфізмів та 49 «точкових» мутацій.

Всі обстежені хворі знаходяться на диспансерному нагляді у дисертанта, який особисто здійснює діагностику, лікування і реабілітацію.

Математико-статистичний аналіз отриманих даних проведено Ю.Б. Гречаніною та А.Є. Філатовою на підставі договору про науково-технічну співпрацю з ХНПУ.

Визначення «точкових» мутацій мтДНК у хворих із клінічно встановленим діагнозом Ю.Б. Гречаніною МТХД проведене на базі лабораторії молекулярної генетики, (Мінськ, Білорусь, зав. лабораторією, професор Н.Г. Даниленко, А.Л.Фадєєва) та молекулярно-генетичної лабораторії ХСМГЦ (зав. лабораторією В.А. Гусар).

При проведенні неонатального молекулярно-генетичного скринінгу автор базувалась на молекулярно-генетичному аналізі гаплогруп митохондріальної ДНК 57 пацієнтів із підозрою на МТХД та 83 особи без ознак порушень енергетичного обміну і 200 новонароджених із популяції.

Другий етап – клініко-генетичне, комплексне біохімічне, цитогенетичне, молекулярно-генетичне, електронно-мікроскопічне (за показаннями), морфофункціональне (за показаннями) дослідження пацієнтів з клінічно встановленим діагнозом митохондріальної дисфункції; 203 особи склали основну групу (ОГ1), носії поліморфізмів митохондріальної ДНК - 37 осіб (ОГ2); носії поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR та А66G МTRR - 91 особа (ОГ3); пацієнти із клінічно встановленою МТХД – 75 осіб (ОГ4); і 142 особи без ознак митохондріальної дисфункції і дефіциту фолатного циклу (КГ). ОГ2, ОГ3 і ОГ4 – складові ОГ1 і саме тому контрольна група була єдиною для порівняння.

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR і А66G МTRR проведене у 200 новонароджених із популяції та у 1938 пацієнтів із різними спадковими захворюваннями. Автором особисто обстежено 652 пацієнта із різними спадковими захворюваннями. При проведенні молекулярно-генетичних досліджень автором виконаний підбір клінічного матеріалу та фено-генотипічні співставлення.

Дисертаційне дослідження виконане на кафедрі медичної генетики ХНМУ, в Українському інституті клінічної генетики та Харківському спеціалізованому медико-генетичному Центрі на підставі договору про науково-технічну співпрацю між ХСМГЦ, кафедрою медичної генетики ХНМУ, Новосибірським Інститутом Цитології і Генетики Сибірського відділення РАН, Університетом Пенсільванії (лабораторія молекулярної антропології, м. Філадельфія, США).

Визначення генетичних і епігенетичних особливостей популяції проведене у співпраці із Техаським Університетом (кафедрами педіатрії і дерматології – Брендон Б. Холмс, Сильвія Жукс, Пітер Л. Реді, Рубен К.

Маталон). Генетичний поліморфізм метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), метіонінсинтазиредуктази (MTRR), редукованого переносника фолатів (RFC-1) вивчений у 200 новонароджених із популяції задля визначення частоти поліморфних варіантів генів ключових ферментів фолатного циклу, причетних до біологічних маркерів епігенетичного статусу.

З метою визначення генетичних і епігенетичних особливостей хворих на спадкову патологію, в тому числі і мітохондріальну, колективом кафедри медичної генетики і ХСМГЦ проведений селективний скринінг на поліморфні варіанти генів фолатного циклу в 2008-2011 рр. Здобувач входив до складу дослідницької групи, яка виконувала пріоритетне наукове дослідження “Напрямки сучасної діагностики, патогенетичної терапії та трьохрівневої профілактики природженої та спадкової патології” (№ держреєстрації 0106U001640), та міжгалузевої комплексної програми «Здоров’я нації» на 2002-2011 рр. Обстежено 1938 пацієнтів, здобувач виконала – 652 (33%) проведеного дослідження по вказаній темі.

2.2. Анамнез

Анамнезу життя і хвороби надавався пріоритетний характер, враховуючи наявність у кожному індивідуальному випадку тригерів і медіаторів, прогресивний плин хвороби та спадковий характер. Розроблена генетична карта для отримання необхідної інформації.

2.3. Сомато-генетичне дослідження із синдромологічним аналізом

Для встановлення діагнозу мітохондріального захворювання, проведення диференційної діагностики з набутими захворюваннями, використовувалося комплексне обстеження, яке базувалось, перш за все, на глибокому аналізі

історії хвороби пацієнтів та соматогенетичному дослідженні із синдромологічним аналізом. Опис та оцінка фенотипу проводились відповідно до методики Є.Д. Черствого.

Синдромологічний аналіз проводився з метою виявлення стійкого сполучення ознак, ідентифікації основних шляхів патогенезу та етіологічних факторів, виділення синдромів. Визначення найбільш суттєвих, характерних для даного захворювання ознак проводилось шляхом співставлення клінічних проявів патології з конкретним симптомокомплексом.

Основною частиною синдромологічного аналізу був фенотипічний аналіз, при якому проводилось ретельне вивчення взаємозв'язку симптомів у хворого та його родичів. Інформація, яка отримувалась на підставі фенотипового аналізу, була узагальнена та оцінена з точки зору особливостей розвитку окремих клінічних симптомів та всього захворювання. Виділялися високо специфічні та відносно специфічні ознаки, що дозволяли встановити діагноз. Здобувачем особисто створена комп'ютерна база даних, яка в подальшому була впроваджена в повсякденну практику ХСМГЦ.

Ознаки аналізувались за допомогою таблиць, каталогів та сучасних комп'ютерних каталогів – HuGENaV, Metabolome Database, OMIM, METAGENE, HMDB, KEGG, HumanCyc, PubChem.

В ході проведення медико-генетичного консультування проводився аналіз родоводу. Він використовувався для встановлення спадкового характеру ознаки, визначення типу успадкування (материнського, цитоплазматичного, або ядерного, менделюючого).

Оцінка родоводу використовувалась як спроба припустити орієнтовний процент гетероплазмії мітохондріальної ДНК на підставі виразності клінічної симптоматики. Технічно він складався з двох етапів: складання родоводів та генеалогічного аналізу.

2.4. Сучасні візуальні технології

2.4.1. Ультразвукове дослідження

Абдомінальне ультразвукове дослідження, візуалізація щитовидної залози, судин та нейросонографічне обстеження дітей з підозрою на мітохондріальну патологію проводилось в ХСМГЦ на апаратах (HD11XE Phillips, Xario SSA-660A№28730-680E, Toshiba), які працюють в реальному масштабі часу з використанням трансабдомінального, конвексного, секторного (для НСГ частотою 5,0/7,5МГц) та лінійного датчиків. УЗД було використане як базове універсальне дослідження і виконувалося всім обстеженим основних і контрольних груп.

2.4.2. Магнітно-резонансні дослідження

Магнітно-резонансна томографія (МРТ) головного мозку була проведена 203 пацієнтам, хребта та спинного мозку – 199 пацієнтам (шийного, грудного та поперекового-крижового відділів). Дослідження проводилось за загально-прийнятою методикою у відповідності до протоколу проведення дослідження.

МРТ головного та спинного мозку проводили з використанням апаратів:

- Magnetom Concerto 0,2 Tl;
- General Electric Signa 1,5 Tl;
- Simens Magnetom C! 0,35 Tl.

При проведенні МРТ головного мозку використовували:

- Зображення -T1, T2, PD;
- товщину зрізу 2-5 мм;
- площість зрізу – аксіальну, фронтальну, сагітальну.

Контрастне посилення не використовували.

57 пацієнтам була проведена МРТ головного мозку в режимі ангіографії (3D SOF).

15 пацієнтам була проведена МР – спектроскопія (апарат General Electric Signa 1,5 Tl). Використовували зображення - T1, T2, PD; товщину зрізу 2-5 мм; площість зрізу – аксіальну, фронтальну, сагітальну.

25 пацієнтам було проведено спіральну томографію внутрішніх органів (грудної клітини, черевної порожнини, малого тазу). Дослідження проводили на апараті Somatom Emotion загальноприйнятою методикою у відповідності до протоколу проведення дослідження. Використовували товщину зрізу – 5мм, 8мм, 4мм (для реконструкції), площину зрізу – аксіальну. Контрастне посилення не використовували.

2.5. Молекулярно-генетичні дослідження

Аналіз мінливості високополіморфних генетичних систем, до числа яких відноситься мтДНК, проводився у декілька етапів з використанням наступних методів: *екстракції (виділення) ДНК, полімеразної ланцюгової реакції (ПЦР), аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ-аналіз).*

Виділення ДНК. Проводили з цільної крові методом фенол-хлороформної екстракції і експрес-методом із використанням тест-систем. Лізис 200 мкл крові проводився в 300 мкл лізуючого буфера (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH=8,0, 10mM EDTA, 1% SDS, протеїназа К в концентрації 0.2 мг/мл) протягом 12-16 годин при 37°C. Після інкубації лізат депротейнізували послідовно фенолом, фенол/хлороформом і хлороформом. Потім депротейнізовану ДНК концентрували осадженням в етанолі. Для оцінки якості і кількості виділеної ДНК проводився електрофорез в 1% агарозному гелі і детекція ДНК в УФ-світлі після фарбування гелів бромистим етидієм. Розчин ДНК зберігався при – 20°C.

Для отримання великого числа копій фрагментів отримані зразки виділеної нативної ДНК ампліфікували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для пошуку поліморфізмів генів системи фолатного циклу C677T MTHFR і A66G MTRR використовували алель-специфічну ПЛР.

Реакція ампліфікації.

Використовувалися наступні програми ампліфікації з відповідним температурним режимом: 94°C, 2 мін.; 94°C, 15 сек.; 56°C, 20 сек.; 72°C, 1 мін.; 72°C, 3 мін.; 4°C, пауза протягом 36 циклів. І програма для алель-специфічної ПЛР:

Оцінку продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофореза в 2% і 3% агарозних гелях з подальшою детекцією в УФ-світлі.

Рестрикційний аналіз (ПДРФ). За допомогою ПДРФ-аналізу визначали мутації кодуючого регіону мтДНК.

Для проведення рестрикційного аналізу кодуючого регіону мтДНК використовували реакційну суміш (об'єм 15 мкл: 10x Буфер – 1,5 мкл; 25мМ MgCl₂ – 1,5 мкл; 10мМ dNTP – 0,15 мкл; праймери – 1,5 мкл, по 0,75 мкл кожного; Taq-полімераза – 0,15 мкл; H₂O – 8,7 мкл; ДНК- 0,5 мкл), аналогічну ампліфікаційній суміші. Праймери і температура їх відпалу змінювалися залежно від визначення мутації.

Оцінку продуктів рестрикції проводили подальшою детекцією в УФ-світлі.

В якості біологічного матеріалу використовувалася ДНК, виділена з лейкоцитів периферичної крові. Виділення ДНК проводили з використанням тест-системи НПФ «ЛПТЕХ», а також фенол-хлороформною екстракцією. Для виявлення мутацій мтДНК застосовували метод ПЛР з подальшою рестрикцією. Ампліфікацію проводили у відповідності до протоколів дослідження. Рестрикційний аналіз проводили з використанням наступних рестриктаз: *HAE III*, *MspI*, *BglI* (НПО «Ферментас»). Результати детектували у агарозному (2-3%) та акриламідному гелях.

Делеції в мтДНК досліджували двома методами: методом Long PCR і методом із застосуванням трьох праймерів, який був розроблений в лабораторії цитоплазматичної спадковості Інституту генетики і цитології НАН Білорусі.

Методика із застосуванням трьох праймерів дозволяла виявляти найбільш поширену делецію (виявляється ~ у 30 % пацієнтів, які страждають на синдром Кернса-Сейра): послідовність прямого праймера (F) гомологічна ділянці за межами делеції, послідовність одного зворотного праймера (R1) – гомологічна стрічній ділянці за межами делеції, а послідовність другого зворотного праймера (R2) гомологічна ділянці делеції.

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів фолатного циклу проведено разом з кафедрою педіатрії Техаського університету. Праймери були придбані в BioSynthesis Inc., Lewisville, Техас. Агароза була придбана ISC BioExpress, Kaysville, Юта. ДНК була ізольована із зразків крові, нанесених на фільтровальний папір під час скринінга новонароджених. Фрагменти генів MTHFR, MTRR та RFC-1 були ампліфіковані методом ПЛР.

В табл. 2.1 наведені нуклеотидна послідовність праймерів, температура віджигу, довжина продукту ПЛР, рестрикційні ферменти для визначення поліморфних сайтів при проведенні ПДРФ аналізу, електрофоретична розгонка фрагментів ДНК і очікувані результати електрофорезу. Ампліфіковані ПЛР продукти для кожного набору праймерів піддані ПДРФ аналізу. Оброблені рестриктазами ПЦР фрагменти C677T, A1298C, G1793A (MTHFR) і G80A (RFC-1) мутації були розділені електрофоретично в 3% високоочищеному агарозному гелі, забарвленому бромистим етидіумом (для 200-800 пар нуклеотидів). Оброблені ПЛР-фрагменти для мутації MTRR A66G були розділені електрофоретично в 4% високоочищеному агарозному гелі, забарвленому бромистим етидіумом.

Таблиця 2.1

Нуклеотидна послідовність праймерів

Позиція	Екзон	Секвенс 5'-3'	Темп. відж.	Раз.	Нуклеаза	Паттерн.
C677T	Ex4-F Ex4-R	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA ^a AGGACGGTGCGGTGAGAGTG ^a	65	198	Усил. HinfI сайт	175/23
A1298C	Ex7-F Ex7-F	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC ^b C CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG ^b	65	163	Втрата MboII сайта	84/56
G1793A	Ex11-F Ex11-R	CTCTGTGTGTGTGCATGTGTGCG ^c GGGACAGGAGTGGCTCCAACGCAGG ^c	65	310	Втрата BsrBI сайта	233/77
A66G	Ex5-F Ex54-R	GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT ^d GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA _d	65	66	Втрата NdeI сайта	44/22
G80A	Ex2-F Ex2-R	AGTGTCACCTTCGTCCCCTC ^e CTCCCGCGTGAAGTTCTT ^e	58	230	Втрата CfoI сайта	162/125/ 68/37

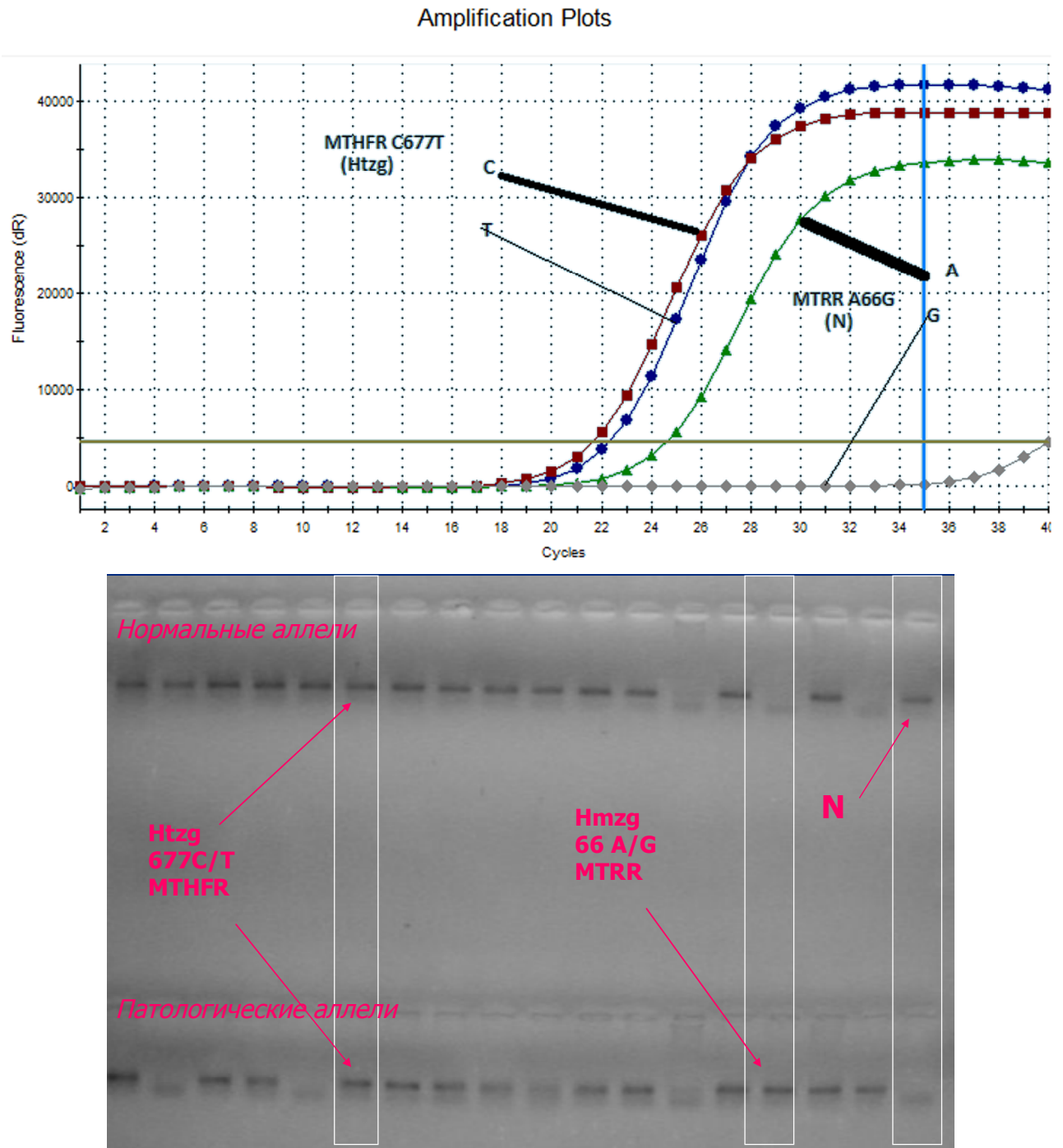


Рис. 2.1. Фрагмент геля із детекцією поліморфізмів
C677T та A66G генів системи фолатного циклу

Нуклеотидні послідовності ГВС I контрольного регіону та кодуючої області мтДНК визначали за допомогою секвенування на автоматичному секвенаторі ABI 3730 з використанням набору Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems). Продукти ПЛР для проведення сиквенсової реакції очищали за допомогою «QIAEX II» (Qiagen) (1/9– Exonuclease I/SAP).

Розподіл продуктів реакції проводили в 4.75% поліакриламідному гелі. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей і детекції нуклеотидних замін використовували програму “Sequence Navigator” (Applied Biosystems).

За допомогою рестрикційного аналізу (метод ПДРФ) визначали гаплогрупи відповідно до класифікації гаплотипів мтДНК. Використовували наступні рестрикційні ферменти: AluI, NlaIII, Hinf I, BstO I (MVA I), AccI, BstI, HaeIII, BSU RI, Ava II, Tas I, MSE I (TRU II), Hae III. Оцінку продуктів рестрикції проводили в 2% -3% агарозному гелі.

Для оцінки генетичного різноманіття виборки, яка вивчалась, був використаний пакет статистичних програм для популяційної генетики Arlequin ver 3.01, до якого включені показники молекулярного різноманіття нуклеотидних послідовностей (D і θ_{π}), тест на селективну нейтральність (Tajima's neutrality test, D). Для порівняльного аналізу використовувалась інформація про нуклеотидні послідовності ГВС I контрольного регіона і рестрикційному поліморфізмі кодуючого регіону мтДНК в інших європейських та азіатських популяціях (2).

В статистичному аналізі отриманих даних використовувався метод Хи-квадрат для визначення значущості при $p < 0.05$ (SPSS for Windows Version 14.0; SPSS Inc., Чикаго, Іллінойс).

2.6. Аналіз вільних амінокислот методом високоефективної рідинної хроматографії

Визначення рівня вільних амінокислот (АК) в біологічних рідинах проводили із використанням методу, що проводився в декілька етапів і який включав: доколонну дериватизацію із фенілізотіоціанатом та отримання фенілтіокарбамілових похідних АК (реакція Едмана, метод Pico-tag); поділення методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із використанням хроматографічної колонки із зворотною фазою (Pico-tag колонка 3,9 × 30 см) та УФ-детектуванням; кількісний розрахунок отриманих даних та інтерпретація результатів. Етап дериватизації базувався на реакції вільних аміногруп білка із фенілізотіоціанатом (ФТЦ) із утворенням фенілтіокарбамілових похідних (ФТК-похідних) АК. Ці похідні аналізували із використанням ВЕРХ.

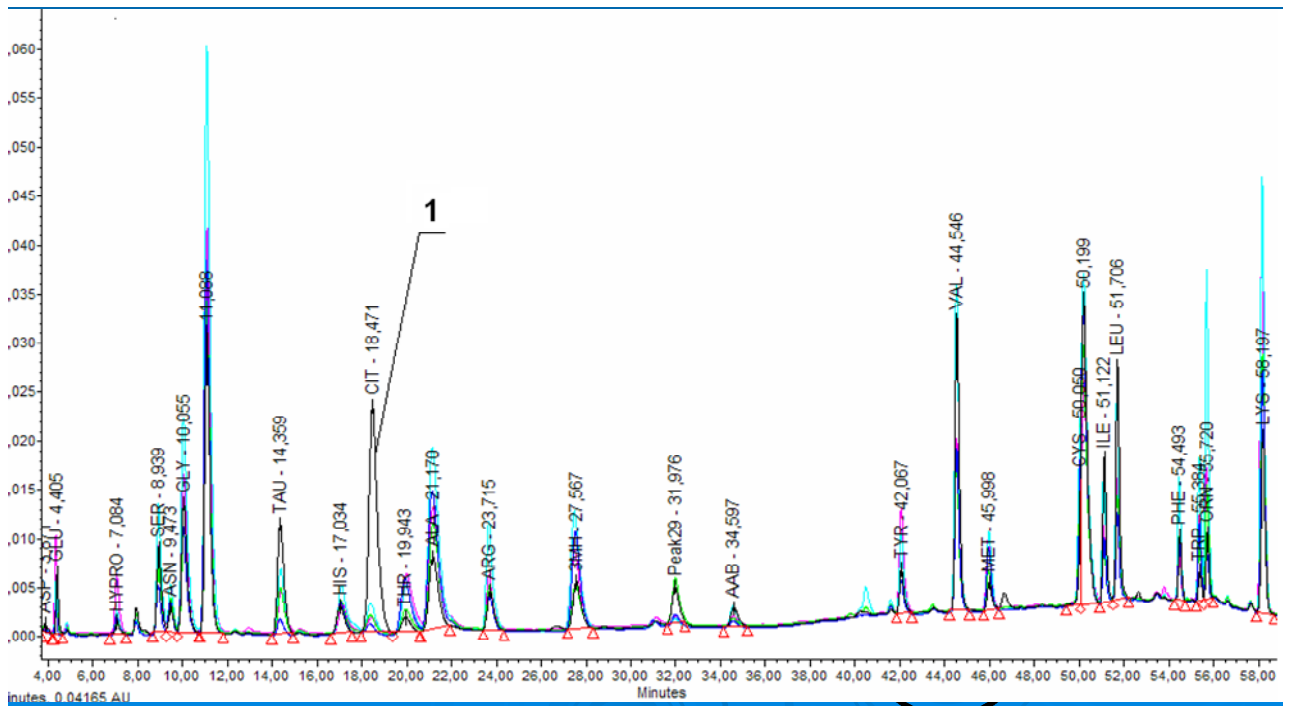


Рис. 2.2. Хроматограма вільних амінокислот крові пацієнта з поєднаною патологією – цитрулінемією та мітохондріальною дисфункцією

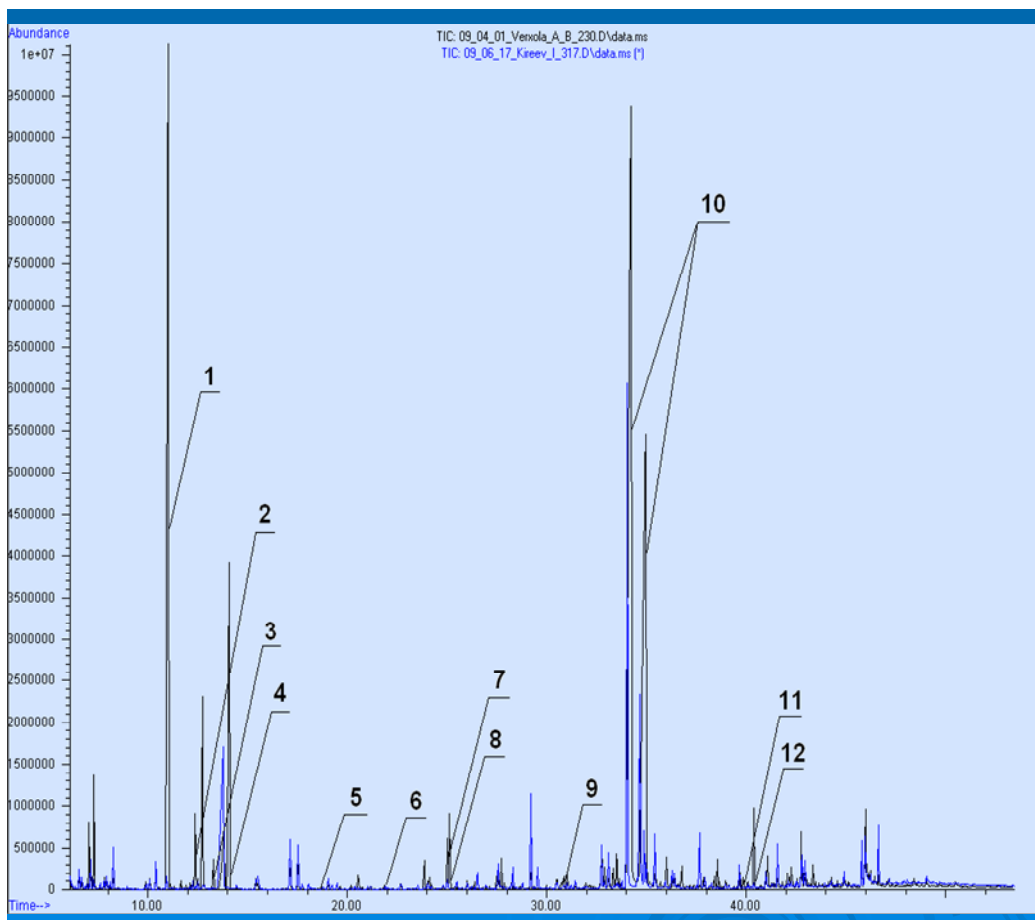


Рис. 2.3. Хроматограма сечі пацієнта з поєднаною патологією – цитрулінемією та мітохондріальною дисфункцією

Розподілення ФТК-похідних АК проводили із використанням хроматографічної системи «Waters»: насоси високого тиску (модель 510), модуль, що контролює роботу насосів, інжектор (Autosampler 717 Plus), детектор «Waters» 486 (діапазон вимірювання 190-600 нм), модуль контролю температурного режиму. В процесі пробопідготовки використовували робочу вакуумну станцію для висушування зразків Waters, систему для дегазації та фільтрації розчинників. Контроль за роботою хроматографічної системи «Waters» здійснювали за допомогою ПЕОМ та програмного забезпечення «EmpowerPro».

В якості матеріалу для дослідження використовували зразки сироватки крові. Осадження білка проводили із використанням 10% розчину сульфоналіцілової кислоти та наступним центрифугуванням. Перед хроматографічним розділенням проводили дериватизацію зразків. Розподілення АК на хроматографічній колонці проводили методом градієнтного елюювання. Детекцію зразків проводили при $\lambda = 254$ нм.

Кількісний розрахунок рівня вільних АК проводили за графіками калібровочної залежності в мкмоль/мл. Інтерпретацію результатів проводили шляхом порівняння отриманих кількісних даних для індивідуальних АК з віковими референтними значеннями.

2.7. Визначення органічних кислот сечі за допомогою газової хроматографії мас-спектрометрії

Визначення рівня органічних кислот, що екскретуються із сечею, проводили із використанням методу, який включав: екстракцію органічних сполук із сечі, дериватизацію із BSTFA з утворенням триметилсилільних похідних, поділення методом газової хроматографії (ГХ), фрагментація органічних сполук методом електронного удару, детекцію із використанням

мас-селективного детектору; кількісний розрахунок отриманих даних та інтерпретація результатів.

Матеріалом для дослідження органічних кислот, що екскретуються із сечею, були зразки ранкової сечі без додавання консервантів. Після збору сечу в охолодженому стані транспортували в лабораторію у посуді, що захищав від дії сонячного світла.

У якості внутрішнього стандарту використовували ізопропілмалонову кислоту (ІМК). Для побудови калібрувальних кривих готували розчини органічних сполук: оксалової кислоти, яблучної кислоти, шикімової кислоти, бурштинової кислоти, малонової кислоти, тартарової кислоти, малеїнової кислоти, лимонної кислоти, DL-ізолимонної кислоти тринатрієвої солі, молочної кислоти, адипінової кислоти, 5-оксопроліну; метілмалонової кислоти, гліколієвої кислоти, 3-метилглутарової кислоти, глутарової кислоти, 3-метіладипінової кислоти, N-ацетіл-аспарагінової кислоти, N-ацетіл-L-тирозин, S-2-гідроксибутирової кислоти, R-3-гідроксибутирової кислоти, L-гліцеринової кислоти (моногідрат гемікальцієвої солі), гліцерилу.

Хроматографічний аналіз проводили із використанням газового хроматографу 6890N, мас-селективного детектора 5975 С VL MSD, автоінжектора 7683В, капілярної колонки HP-5MS, 30мх0,252ммх0,25мкм. Для ідентифікації та розрахунку кількості органічних кислот використовували програмне забезпечення AMDIS v.2,65 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System); MSD Productivity ChemStation Software G1701EA, бібліотека спектрів NIST\ЕРА/NIH Mass Spectral Library (NIST05) NIST Mass Spectral Search Program (Version 2.0d). Розрахунок кількості органічних кислот проводили із урахуванням рівню креатиніну сечі. Вимірювання концентрації креатиніну проводили з використанням тест-систем на автоматичному біохімічному аналізаторі, Vitalab Selectra E.

Home Browse Search About Downloads Contact Us

Human Metabolome Database

Version 2.0 | [Version 1.0](#)

Search: Search [\[Advanced\]](#)

Showing metabocard for **2-Methyl-3-ketovaleric acid (HMDB00408)**

Legend: metabolite field enzyme field Show Similar Structures

Version	2.0
Creation Date	2005-11-16 15:48:42
Update Date	2005-11-16 15:48:42
Accession Number	HMDB00408
Common Name	2-Methyl-3-ketovaleric acid
Description	2-Methyl-3-ketovaleric acid is a metabolite of beta-leucine in the beta-keto pathway of leucine metabolism. 2-Methyl-3-ketovaleric acid is a known pathological metabolite and associated with propionic acidemia, especially during periods of ketoacidosis; a severe deficiency of propionyl-CoA carboxylase in cultured fibroblasts has been detected in some neonatal cases. (PMID 7389125, 6820422, 7119896, 7430116, 3356699) 2-Methyl-3-ketovaleric acid induces a strong activity of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH; the rate-limiting enzyme in GTP synthesis), mimicking glucose. (PMID: 11145582)
	<ol style="list-style-type: none"> 2-Methyl-3-ketovalerate 2-Methyl-3-oxo-pentanoate

Рис. 2.4. Пошук метаболічних маркерів з використанням програми Human Metabolome Database

THE **MERCK MANUALS** FOR HEALTHCARE PROFESSIONALS ONLINE MEDICAL LIBRARY

SECTION: Pediatrics
SUBJECT: Inherited Disorders of Metabolism
TOPIC: Amino Acid and Organic Acid Metabolism Disorders

DISORDERS OF AMINO ACID AND ORGANIC ACID METABOLISM—Continued

DISEASE (OMIM NUMBER)	DEFECTIVE PROTEINS OR ENZYMES	DEFECTIVE GENE OR GENES (CHROMOSOMAL LOCATION)	COMMENTS
Disorders of branched-chain amino acid (valine, leucine, isoleucine) metabolism			
Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria; 248600)	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKD)		Biochemical profile: Elevated plasma valine, leucine, isoleucine, and alloisoleucine Clinical features (molecular forms do not correlate with clinical forms except that a high percentage of type II mutations are associated with thiamin responsiveness): In classic form, hypertonemia, seizures, coma, death In intermediate form, retardation, neurologic symptoms, full-blown picture developing with stress In intermittent form, symptoms only with stress (eg, fever, infection)
Type IA	BCKD E1 α component	BCKDHA (19q13)*	Thiamin-responsive form, similar to mild intermediate form
Type IB	BCKD E1 β component	BCKDHB (6p22-p21)*	E3 subunit deficient form, similar to intermediate form but accompanied by severe lactic acidosis because E3 is needed for pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase
Type II	BCKD E2 component	DBT (1p31)*	Acute treatment: Peritoneal dialysis, hemodialysis, or both; aggressive nutrition management, including high-dose glucose, insulin, and special hyperalimentation Chronic treatment: Dietary branched-chain amino acid restriction, thiamin supplementation as needed
Type III	BCKD E3 component	DLD (7q31-q32)*	
Propionic acidemia (606054)	Propionyl-CoA carboxylase		Biochemical profile: Elevated plasma glycine, urine methylcitrate, 3-hydroxypropionate, propionylglycine, and tiglylglycine Clinical features: Hypotonia, vomiting, lethargy, coma, ketoacidosis, hypoglycemia, hyperammonemia, bone marrow suppression, mental and physical retardation Treatment: High-dose glucose and aggressive fluid resuscitation during acute episodes; for extreme hyperammonemia, may need hemodialysis or peritoneal dialysis; for long-term management, controlled intake of threonine, valine, isoleucine, and methionine; carnitine supplementation; biotin for responsive patients (see also multiple carboxylase deficiency and biotinidase deficiency)
Type I	α -Subunit	PCCA (13q32)*	
Type II	β -Subunit	PCCB (3q21-q22)*	

Рис. 2.5. Електронний каталог Merck

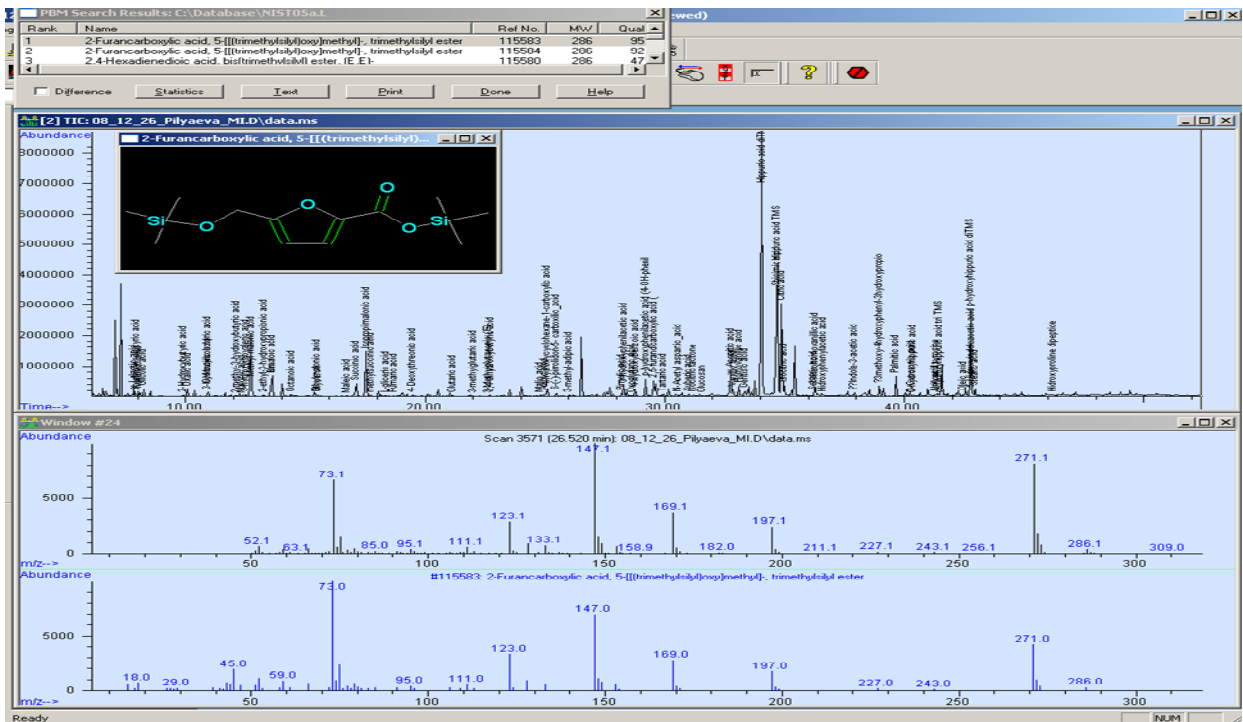


Рис. 2.6. Загальна іонна хроматограма, мас-спектр, хімічна формула речовини

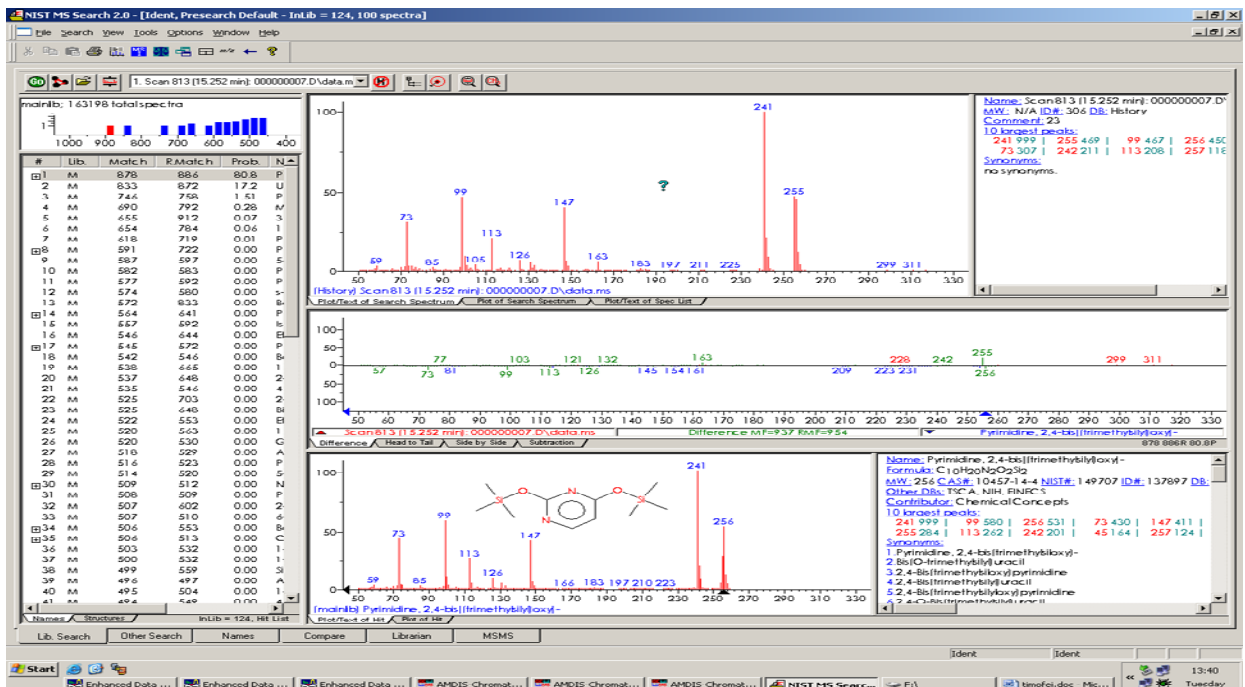


Рис. 2.7. Ідентифікація органічних сполук за допомогою програми Nist

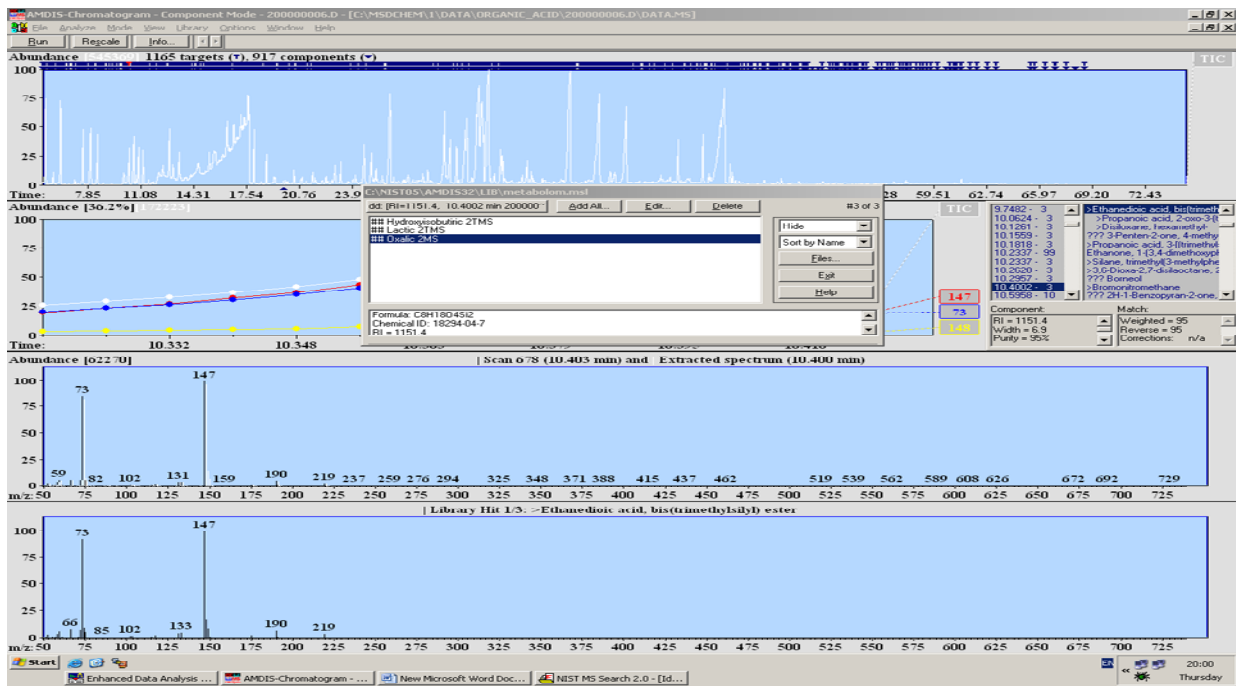


Рис. 2.8. Ідентифікація органічних кислот за індексом утримання.

Програма AMDIS

Метод екстракції органічних кислот сечі із утворенням триметилсилільних похідних проводили за стандартною методикою силілювання ОК (І.В. Новікова, А.Л. Фадєєва). Якісну ідентифікацію сполук проводили з використанням програм ChemStation та AMDIS із урахуванням результатів автоматичного порівняння отриманих мас-спектрів із даними електронної бібліотеки Nist, а також часу та індексів утримування речовин. У програмі ChemStation передбачене створення методу для напівкількісного аналізу речовин. Для отримання більш точних результатів, кількісний та напівкількісні розрахунки виконували на основі сигналів цільового та характеристичних іонів із урахуванням літературних даних. Внутрішній контроль якості виконували шляхом порівняння площин піків внутрішнього стандарту, що отримані у різні дні. Зовнішній контроль якості виконували шляхом участі у міжнародних програмах контролю якості лабораторних досліджень «ERDNIM».

2.8. Інтерпретація отриманих результатів

При інтерпретації результатів дослідження враховували, що зміни у профілі ОК сечі можуть бути як наслідком порушення обміну речовин, так і результатом незбалансованої дієти, бактеріологічного ураження сечостатевої шляхів, змін кишкової мікрофлори та ін. До виявлення ОК у сечі у патологічних кількостях можуть призвести помилки при зборі та транспортуванні біологічного матеріалу, проведені пробопідготовки, налаштування ГХМС для проведення аналізу.

Саме тому інтерпретацію отриманих результатів виконували лише шляхом співставлення отриманих даних, даних інших лабораторних досліджень та клінічних даних про пацієнтів.

2.9. Визначення рівня лактату крові ензиматичним методом

Визначення рівня лактату проводили з використанням ензиматичного методу, що заснований на властивостях лактатдегідрогенази каталізувати зворотну реакцію у лужному середовищі. Для зсуву реакції переважно в бік створення лактату, піруват видаляли із реакції трансамінування за допомогою АЛТ і глутамату. Піруват утримували семікарбазидом або гідразинном. Вуглецьвісні реагенти інгібували ЛДГ і формували з'єднання із NAD, що абсорбували при $\lambda = 340$ нм.

Матеріалом для дослідження були зразки венозної крові, отримані натщесерце та зібрані у пробірки із інгібітором гліколізу. Процедура дослідження лактату крові включала такі етапи: депротейнізацію зразків, нейтралізацію центрифугату, проведення реакції, вимірювання і кількісний розрахунок отриманих даних. Для вимірювання використовували такі обладнання: автоматичний біохімічний аналізатор Selectra E ($\lambda = 340$ нм), твердотільний термостат ($t = 30$ °C). Контроль якості дослідження проводили із використанням контрольного матеріалу «Sentinel», Італія.

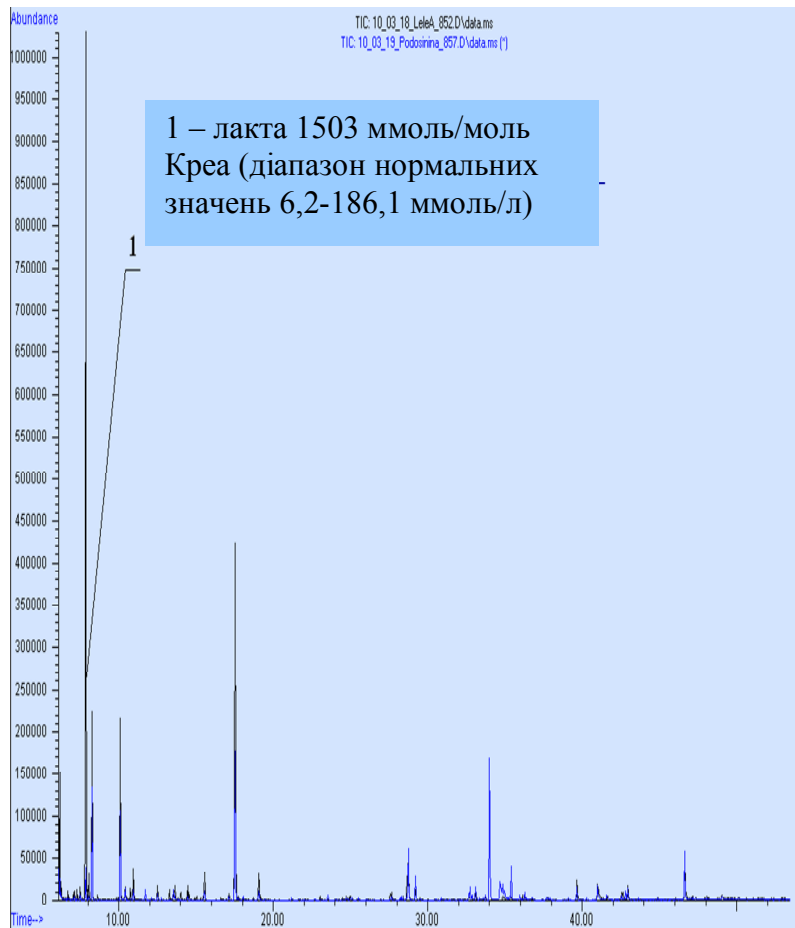


Рис. 2.9. Хроматограма сечі пацієнта із лактатацидозом

2.10. Визначення рівня біохімічних показників крові

Визначення рівня біохімічних показників, у тому числі ферментів, виконували з використанням класичних методів дослідження. Матеріалом для дослідження були зразки венозної крові, отримані натщесерце. Для дослідження використовували тест-системи «Elitech», France. Вимірювання показників проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі “Selectra E”, (“Vital Scientific”, Голландія).

2.11. Математико-статистичні методи

В процесі уточнюючої діагностики МТХД важливою була оцінка фенотипічних ознак. Основною особливістю вихідних даних, що описують фенотип, була наявність великого обсягу інформації, представленої в слабо

структурованому або неструктурованому вигляді. При цьому практично всі ознаки фенотипу носили описовий характер. Виключенням були антропометричні ознаки (вік, стать, маса й довжина тіла). Тому на першому етапі обробки даних була виконана формалізація зібраної інформації.

Було припущено, що вектор ознак фенотипу $\vec{x} = (x_1, x_2, \dots, x_m)$ формує безліч X , яке являє собою багатомірний простір ознак (m – мірність простору ознак). Тоді кожний пацієнт – це об’єкт ω_i у багатомірному просторі ознак ($i = \overline{1, N}$, N – кількість хворих). В результаті кожний об’єкт ω_i у багатомірному просторі ознак описується вектором $\vec{x}_i^\omega = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{im})$, а із сукупності об’єктів ω_i ($i = \overline{1, N}$) формується таблиця експериментальних даних (ТЕД) типу «об’єкт-ознака» (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Таблиця експериментальних даних

Об’єкти (пацієнти)		Вихідні ознаки					
		x_1	x_2	...	x_j	...	x_m
ω_1	\vec{x}_1^ω	x_{11}	x_{12}	...	x_{1j}	...	x_{1m}
ω_2	\vec{x}_2^ω	x_{21}	x_{22}	...	x_{2j}	...	x_{2m}
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
ω_i	\vec{x}_i^ω	x_{i1}	x_{i2}	...	x_{ij}	...	x_{im}
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
ω_N	\vec{x}_N^ω	x_{N1}	x_{N2}	...	x_{Nj}	...	x_{Nm}

Для подальшої статистичної обробки експериментальних даних було необхідно, щоб ознаки x_j ($j = \overline{1, m}$) були виражені в кількісній, ординальній або номінальній шкалах. Тому для формалізації вихідних даних усі ознаки, що

мали описовий характер, були розбиті на ознаки, які можна виміряти в ординальній або номінальній шкалах.

Вихідну безлічі ознак X було розбито на непересічні підмножини X_k таким чином, що $\bigcup_{k=1}^K X_k = X, X_k \cap X_l = \emptyset, k, l = \overline{1, K}, k \neq l$. В результаті були виділені дві підмножини ознак: X_1 – ознаки клінічного фенотипу й X_2 – системні ознаки. При цьому кожне із підмножин X_k ($k=1,2$) у свою чергу було розбито на підмножини ознак X_k^p так, що підмножини X_k^p стали містити однорідні за змістом ознаки виходячи з логіки подальшої обробки експериментальних даних. Ознаки були позначені таким чином: $x_i^{k,p} \in X_k^p, i = \overline{1, m_{k,p}}$, де $m_{k,p}$ – кількість ознак підмножини X_k^p . Таким чином, була запропонована наступна розбивка багатомірного простору ознак на підмножини, що дозволяє розв'язати завдання формалізації експериментальних даних при діагностиці МТХД.

Для проведення клініко-генетичної оцінки хворих с клінічно значущим порушенням енергетичного обміну були відібрані: група пацієнтів з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції, яка складала основну групу (ОГ1 -203 пацієнта); основна група 2 (ОГ2) – 37 хворих із молекулярно підтвердженою мутацією мітохондріальної ДНК (поліморфізмами мітохондріальної ДНК); основна група 3 (ОГ3) – 91 пацієнт із ознаками порушеного реметилування метіоніну, підтверджена молекулярно-генетичним і біохімічним дослідженнями; основна група 4 (ОГ4) – 75 пацієнтів із клінічно встановленими нозологічними формами МТХД (мітохондріальною енцефалопатією – 31, MERRF синдромом – 3, DIDMOAD синдромом – 1, MELAS – 9, Leigh синдромом – 6, MNGIE – 11, синдромом Кернса-Сейра – 7, Менкеса – 2, Лебера – 4); контрольна група (КГ) – 142 особи без ознак мітохондріальної дисфункції і порушення обміну метіоніну.

Загальна характеристики досліджуваних груп представлена в табл. 2.3.

Якісний склад досліджуваних груп пацієнтів

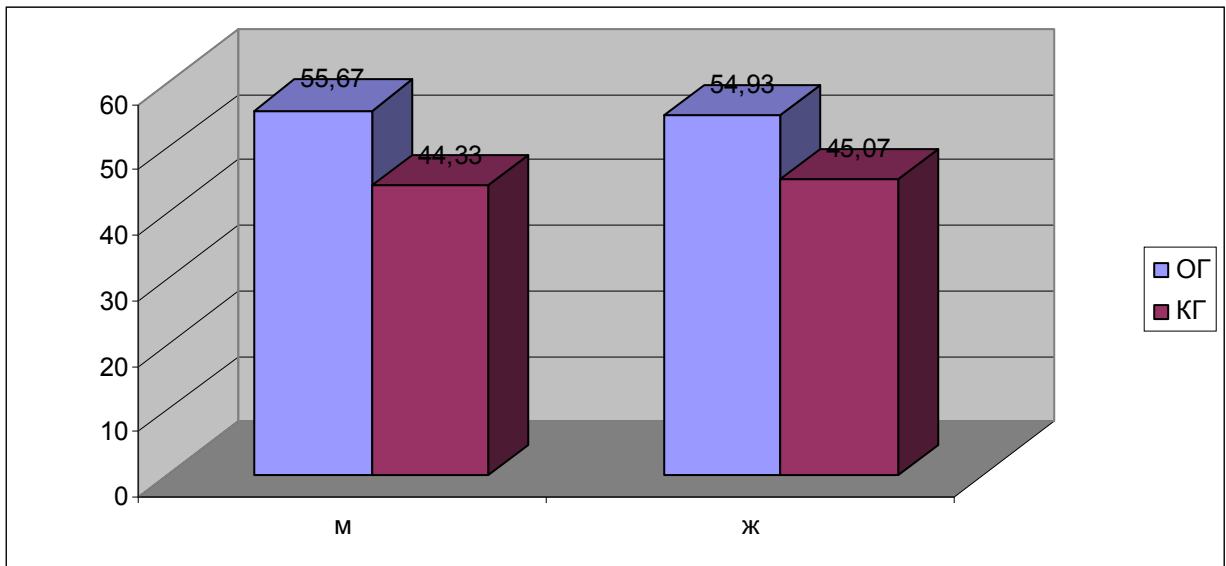
Групи					
Кількість пацієнтів (%)	КГ	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
загальне	142 (100%)	203 (100%)	37 (100%)	91 (100%)	75 (100%)
чоловіків	78 (54,93%)	113 (55,67%)	14 (37,84%)	39 (42,86%)	34 (45,33%)
жінок	64 (45,07%)	90 (44,33%)	23 (62,16%)	52 (57,14%)	41 (54,67%)
у віці до 11 років	61 (42,96%)	108 (53,20%)	17 (45,94%)	42 (46,15%)	42 (56%)
у віці від 12 до 17 років	33 (23,24%)	52 (25,62%)	13 (35,14%)	15 (16,48%)	15 (20%)
у віці від 18 до 35 років	39 (27,46%)	32 (15,76%)	7 (18,92%)	29 (31,87%)	15 (20%)
старше 35 років	9 (6,34)	11 (5,42%)	0 (0%)	5 (5,5%)	3 (4%)

При порівнянні даних груп по зацікавленим ознакам був виконаний аналіз однорідності груп по статі й віку з використанням χ^2 критерію. Для перевірки однорідності за віком усі розглянуті групи були розбиті на 4 вікові категорії: до 11 років, від 12 до 17 років, від 18 до 35 років, старше 35 років. Результати розрахунків критерію χ^2 для перевірки однорідності груп по статі представлені в табл. 2.4.

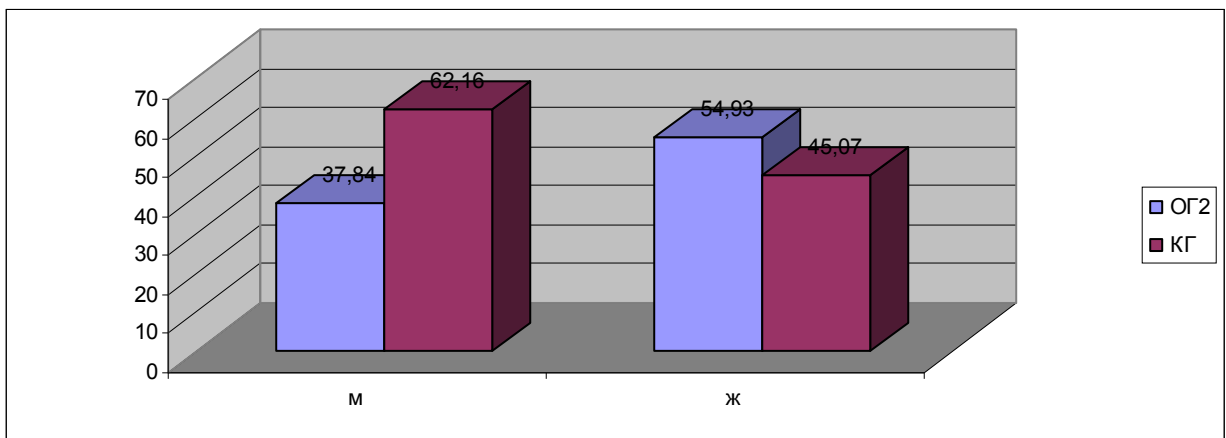
Значення критерію χ^2 для порівняння груп на однорідність статі

Групи	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
КГ	0,018	3,432	3,233	1,81
ОГ2	-	-	0,273	-

Оскільки усі значення $\chi^2 < \chi_{0,95}^2(1) = 3,841$, то розглянуті пари груп однорідні по статі. Гістограми розподілу частот по статі представлені на рис. 2.10.

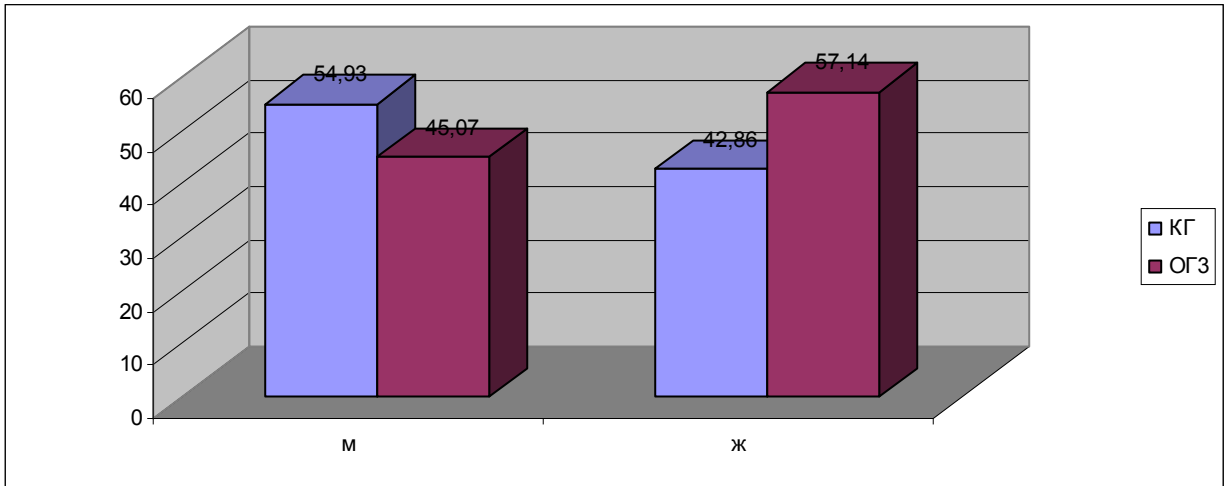


а)

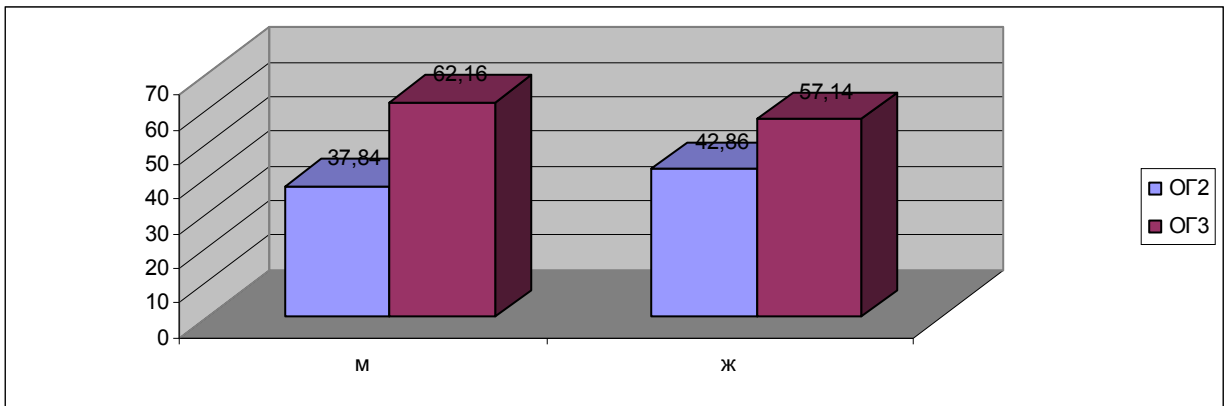


б)

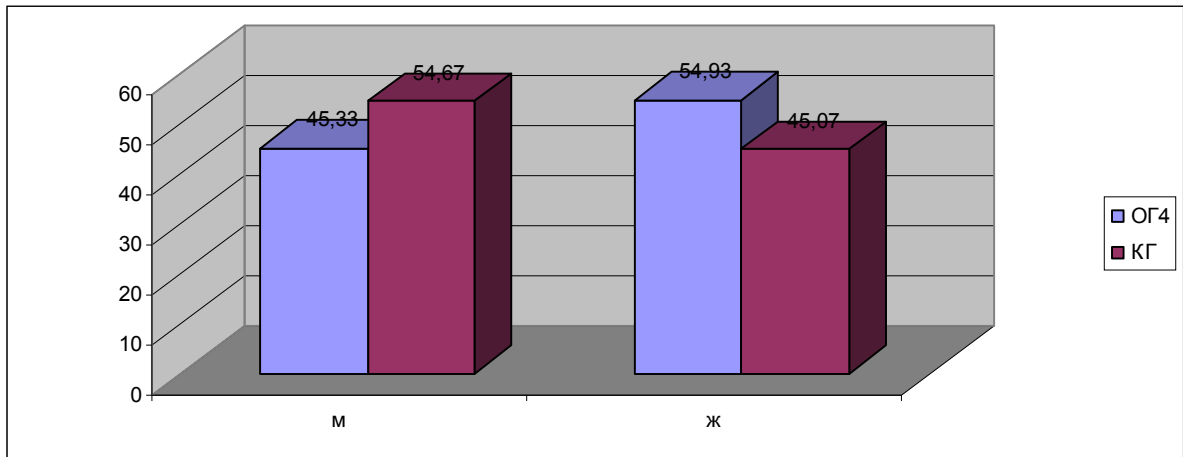
Рис. 2.10. Гістограми розподілу частот (%) по статі: а) ОГ1 і КГ; б) ОГ2 і КГ



в)



г)



д)

Рис. 2.10. Гістограми розподілу частот (%) по статі:
в) ОГ3 і КГ; г) ОГ2 і ОГ3; д) ОГ4 і КГ

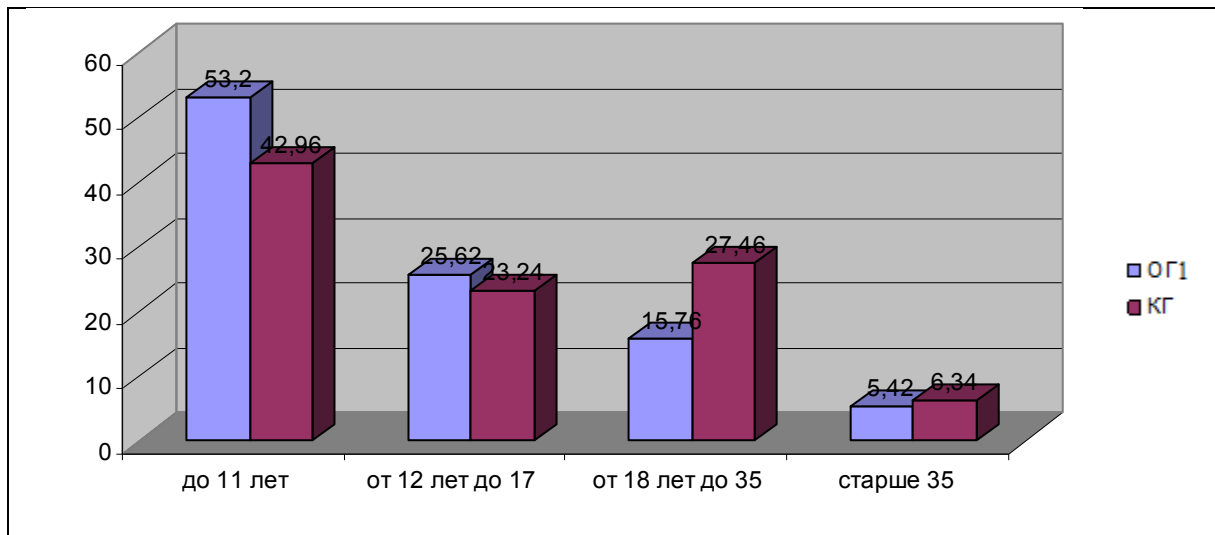
Результати розрахунку критерію χ^2 для перевірки однорідності груп по віку представлені в табл. 2.5.

Таблиця 2.5

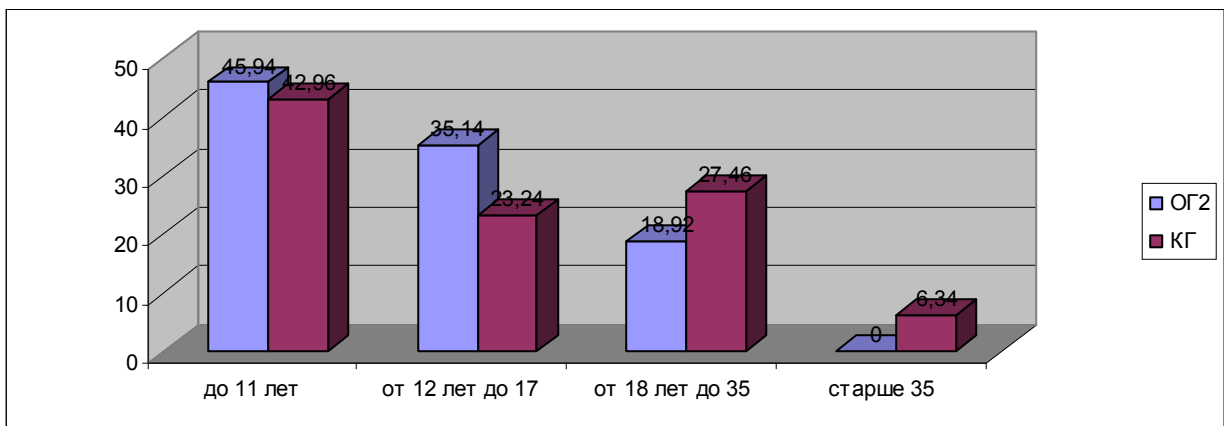
Значення критерію χ^2 для порівняння груп на однорідність по віку

Групи	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
КГ	7,662	4,856	1,791	3,576
ОГ2	-	-	7,785	-

Оскільки усі значення $\chi^2 < \chi_{0,95}^2(3) = 7,815$, то аналізовані пари груп однорідні за віком. Гістограми розподілу частот по віковим категоріям представлені на рис. 2.11.



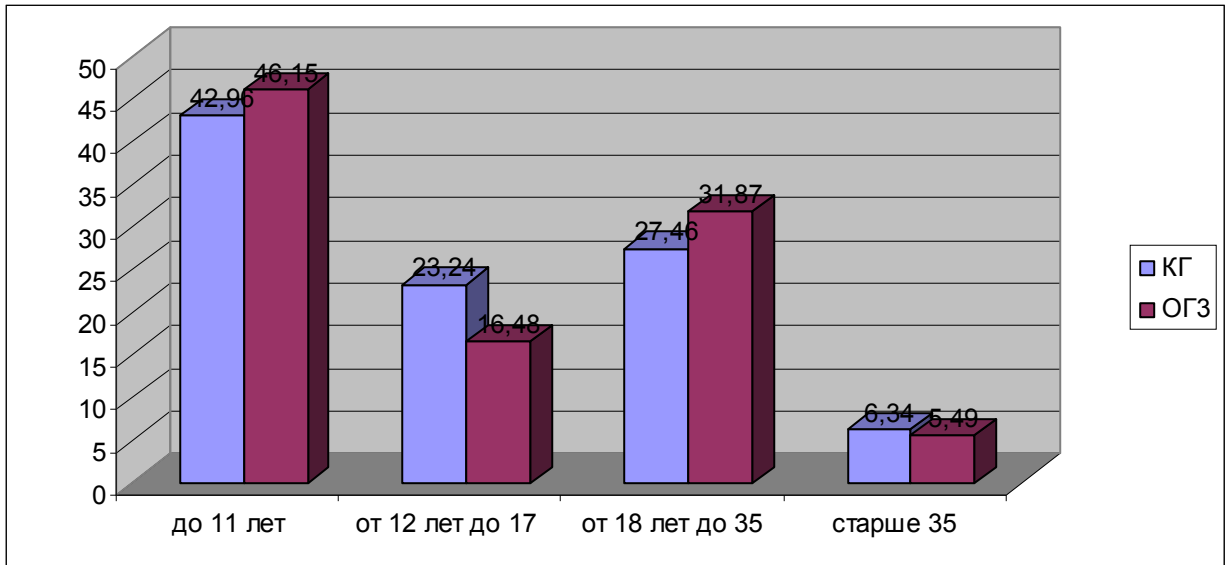
а)



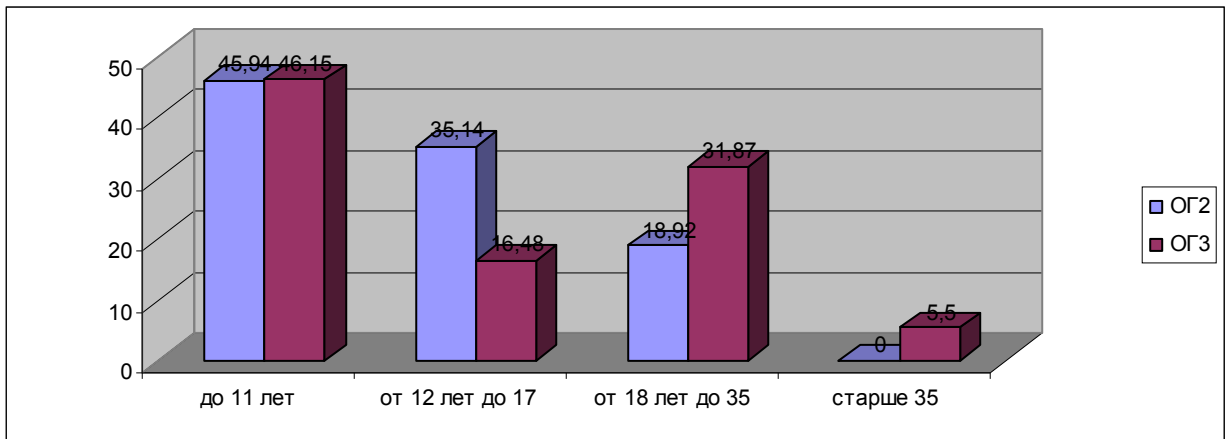
б)

Рис. 2.11. Гістограми розподілу частот (%) по віковим категоріям:

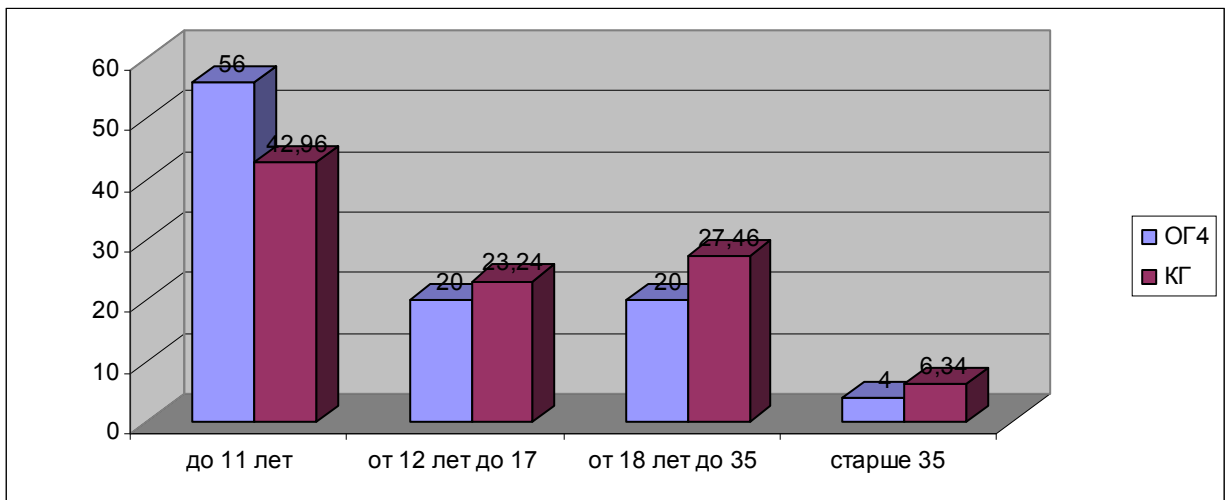
а) ОГ1 і КГ; б) ОГ2 і КГ



B)



Г)



Д)

Рис. 2.11. Гістограми розподілу частот (%) по віковим категоріям:

в) ОГЗ і КГ; г) ОГ2 і ОГЗ; д) ОГ4 і КГ

В процесі уточнюючої діагностики МТХД важливою була оцінка фенотипічних ознак. Основною особливістю вихідних даних, що описують фенотип, була наявність великого обсягу інформації, представленої в слабо структурованому або неструктурованому вигляді. При цьому практично всі ознаки фенотипу носили описовий характер. Виключенням були антропометричні ознаки (вік, стать, маса й довжина тіла). Тому на першому етапі обробки даних була виконана формалізація зібраної інформації.

Було припущено, що вектор ознак фенотипу $\vec{x} = (x_1, x_2, \dots, x_m)$ формує безліч X , яке являє собою багатомірний простір ознак (m – мірність простору ознак). Тоді кожний пацієнт – це об'єкт ω_i у багатомірному просторі ознак ($i = \overline{1, N}$, N – кількість хворих). В результаті кожний об'єкт ω_i у багатомірному просторі ознак описується вектором $\vec{x}_i^\omega = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{im})$, а із сукупності об'єктів ω_i ($i = \overline{1, N}$) формується таблиця експериментальних даних (ТЕД) типу «об'єкт-ознака» (табл. 2.6).

Таблиця 2.6

Таблиця експериментальних даних

Об'єкти (пацієнти)		Вихідні ознаки					
		x_1	x_2	...	x_j	...	x_m
ω_1	\vec{x}_1^ω	x_{11}	x_{12}	...	x_{1j}	...	x_{1m}
ω_2	\vec{x}_2^ω	x_{21}	x_{22}	...	x_{2j}	...	x_{2m}
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
ω_i	\vec{x}_i^ω	x_{i1}	x_{i2}	...	x_{ij}	...	x_{im}
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
ω_N	\vec{x}_N^ω	x_{N1}	x_{N2}	...	x_{Nj}	...	x_{Nm}

Для подальшої статистичної обробки експериментальних даних було необхідно, щоб ознаки x_j ($j = \overline{1, m}$) були виражені в кількісній, ординальній або номінальній шкалах. Тому для формалізації вихідних даних усі ознаки, що мали описовий характер, були розбиті на ознаки, які можна виміряти в ординальній або номінальній шкалах.

Вихідну безліч ознак X було розбито на непересічні підмножини X_k таким чином, що $\bigcup_{k=1}^K X_k = X$, $X_k \cap X_l = \emptyset$, $k, l = \overline{1, K}$, $k \neq l$. В результаті були виділені дві підмножини ознак: X_1 – ознаки клінічного фенотипу й X_2 – системні ознаки. При цьому кожне із підмножин X_k ($k = 1, 2$) у свою чергу було розбито на підмножини ознак X_k^p так, що підмножини X_k^p стали містити однорідні за змістом ознаки виходячи з логіки подальшої обробки експериментальних даних. Ознаки були позначені таким чином: $x_i^{k,p} \in X_k^p$, $i = \overline{1, m_{k,p}}$, де $m_{k,p}$ – кількість ознак підмножини X_k^p . Таким чином, була запропонована наступна розбивка багатомірного простору ознак на підмножини (табл. 2.7), що дозволяє розв'язати завдання формалізації експериментальних даних при діагностиці МЗ.

Ознаки, що входили у підмножини X_1^i ($i = \overline{1, 21}$) і X_2^j ($j = \overline{1, 7}$), вимірялися в дихотомічній шкалі, тому було прийняте значення 0 – відсутність ознаки, значення 1 – наявність. Значення ознак $x_i^{1,22} \in X_1^{22}$ ($i = 1, 2$) вимірялися як у кількісній шкалі (вік, маса й довжина тіла), так і в дихотомічній (стать). Оскільки норми по зросто-ваговим показникам залежать від віку пацієнта, то для зручності спільного аналізу даних хворих, що належать різним віковим групам, пропонувалося навести кількісні ознаки (маса й довжина тіла) підмножини X_1^{22} з урахуванням вікових норм до ординальної шкали. При цьому значення 0 ознака приймає, якщо показник у нормі, значення +1 – якщо показник перевищує норму, значення -1 – якщо показник нижче норми.

Характеристики підмножин X_k^p

Підмножина ознак X_k^p		$m_{k,p}$	Підмножина ознак X_k^p		$m_{k,p}$
позначення	назва		позначення	назва	
підмножина X_1 – ознаки клінічного фенотипу					
X_1^1	шкіра	28	X_1^{12}	верхня та нижня щелепа	5
X_1^2	нігті	7	X_1^{13}	зуби	5
X_1^3	волосся	6	X_1^{14}	язик	6
X_1^4	подшкірна клітковина	3	X_1^{15}	піднебіння	6
X_1^5	м'язи	4	X_1^{16}	шия	5
X_1^6	череп	22	X_1^{17}	грудна клітина	9
X_1^7	обличчя	8	X_1^{18}	хребет	7
X_1^8	вушні раковини	12	X_1^{19}	живіт, таз та сідниці	10
X_1^9	область очей та очне яблуко	33	X_1^{20}	верхні кінцівки	26
X_1^{10}	ніс	15	X_1^{21}	нижні кінцівки	31
X_1^{11}	губи та порожнина рота	15	X_1^{22}	антропометричні ознаки	4
підмножина X_2 – патології систем організму					
X_2^1	нервова система	30	X_2^5	сечовидільна система	11
X_2^2	серцево-судинна система (ССС)	15	X_2^6	статева система	11
X_2^3	дихальна система	12	X_2^7	ендокринна система	7
X_2^4	травна система	12			

Із аналізу табл. 2.7 видно, що мірність вихідного простору ознак досить висока, тому було необхідно зменшити мірність цього простору. Для цього підмножини X_k^P були описані однією інтегральною ознакою $x_0^{k,p}$, що характеризує цю підмножину (крім підмножини X_1^{22}). Позначення ознак в ТЕД показані в таб. 2.8.

Таблиця 2.8

Позначення ознак в ТЕД

Позначення ознаки	Назва ознаки	Позначення ознаки	Назва ознаки
$x_0^{1,1}$	шкіра	$x_0^{1,16}$	шия
$x_0^{1,2}$	нігти	$x_0^{1,17}$	грудна клітина
$x_0^{1,3}$	волосся	$x_0^{1,18}$	хребет
$x_0^{1,4}$	підшкірна клітковина	$x_0^{1,19}$	живіт, таз та сідниці
$x_0^{1,5}$	м'язи	$x_0^{1,20}$	верхні кінцівки
$x_0^{1,6}$	череп	$x_0^{1,21}$	ніжні кінцівки
$x_0^{1,7}$	обличчя	$x_1^{1,22}$	маса тіла
$x_0^{1,8}$	вушні раковини	$x_2^{1,22}$	длина тела
$x_0^{1,9}$	область очей, очне яблуко	$x_0^{2,1}$	нервова система
$x_0^{1,10}$	ніс	$x_0^{2,2}$	ССС
$x_0^{1,11}$	губи та порожнина рота	$x_0^{2,3}$	дихальна система
$x_0^{1,12}$	верхня та нижня щелепи	$x_0^{2,4}$	травнева система
$x_0^{1,13}$	зуби	$x_0^{2,5}$	сечовидільна система
$x_0^{1,14}$	язик	$x_0^{2,6}$	статева система
$x_0^{1,15}$	піднебіння	$x_0^{2,7}$	ендокрина система

Тоді ознаки $x_0^{k,p}$ прийняли наступні значення: 0 – немає відхилень в ознаках підмножини X_k^P ; 1 – відхилення в ознаках підмножини X_k^P слабкі; 2 – істотні відхилення в ознаках підмножини X_k^P . В результаті такого кодування отримана нова ТЕД, статистичні характеристики якої представлені в табл. 2.8. У табл. 2.9 прийняті наступні позначення: $n_{l(a)}^{k,p}$ – кількість ознак $x_l^{k,p}$ ($l \in \{0,1,2\}$), що приймають значення $a \in \{-1,0,1,2\}$.

Таблиця 2.9

Статистичні характеристики закодованої ТЕД

Позначення ознак	Група																			
	КГ				ОГ1				ОГ2				ОГ3				ОГ4			
	$n_{l(-1)}^{k,p}$	$n_{l(0)}^{k,p}$	$n_{l(1)}^{k,p}$	$n_{l(2)}^{k,p}$	$n_{l(-1)}^{k,p}$	$n_{l(0)}^{k,p}$	$n_{l(1)}^{k,p}$	$n_{l(2)}^{k,p}$	$n_{l(-1)}^{k,p}$	$n_{l(0)}^{k,p}$	$n_{l(1)}^{k,p}$	$n_{l(2)}^{k,p}$	$n_{l(-1)}^{k,p}$	$n_{l(0)}^{k,p}$	$n_{l(1)}^{k,p}$	$n_{l(2)}^{k,p}$	$n_{l(-1)}^{k,p}$	$n_{l(0)}^{k,p}$	$n_{l(1)}^{k,p}$	$n_{l(2)}^{k,p}$
$x_0^{1,1}$	-	17	104	21	-	39	124	40	-	12	15	10	-	10	28	53	-	42	42	24
$x_0^{1,2}$	-	117	24	1	-	162	40	1	-	31	4	2	-	68	15	8	-	13	13	3
$x_0^{1,3}$	-	89	51	2	-	116	84	3	-	26	7	4	-	49	27	15	-	40	40	2
$x_0^{1,4}$	-	117	17	8	-	132	52	19	-	29	6	2	-	62	29	0	-	39	39	1
$x_0^{1,5}$	-	125	17	0	-	81	103	19	-	17	16	4	-	62	26	3	-	51	51	11
$x_0^{1,6}$	-	84	46	12	-	86	90	27	-	18	10	9	-	52	24	15	-	34	34	7
$x_0^{1,7}$	-	87	52	3	-	96	70	37	-	16	13	8	-	35	42	14	-	48	48	0
$x_0^{1,8}$	-	100	38	4	-	108	56	39	-	12	14	11	-	52	31	8	-	41	41	1
$x_0^{1,9}$	-	33	78	31	-	28	86	89	-	7	7	23	-	8	45	38	-	41	41	28
$x_0^{1,10}$	-	69	72	1	-	74	117	12	-	17	11	9	-	24	45	22	-	48	48	3
$x_0^{1,11}$	-	41	99	2	-	93	103	7	-	17	18	2	-	23	66	2	-	45	45	2

Позна- чення ознак	Група																			
	КГ				ОГ1				ОГ2				ОГ3				ОГ4			
	$n_{i(-1)}^{k,p}$	$n_{i(0)}^{k,p}$	$n_{i(1)}^{k,p}$	$n_{i(2)}^{k,p}$	$n_{i(-1)}^{k,p}$	$n_{i(0)}^{k,p}$	$n_{i(1)}^{k,p}$	$n_{i(2)}^{k,p}$	$n_{i(-1)}^{k,p}$	$n_{i(0)}^{k,p}$	$n_{i(1)}^{k,p}$	$n_{i(2)}^{k,p}$	$n_{i(-1)}^{k,p}$	$n_{i(0)}^{k,p}$	$n_{i(1)}^{k,p}$	$n_{i(2)}^{k,p}$	$n_{i(-1)}^{k,p}$	$n_{i(0)}^{k,p}$	$n_{i(1)}^{k,p}$	$n_{i(2)}^{k,p}$
$x_0^{1,12}$	-	123	13	6	-	155	47	1	-	30	2	5	-	76	13	2	-	17	17	0
$x_0^{1,13}$	-	88	13	41	-	116	31	56	-	25	5	7	-	41	32	18	-	32	32	5
$x_0^{1,14}$	-	123	18	1	-	179	15	9	-	31	2	4	-	68	18	5	-	14	14	0
$x_0^{1,15}$	-	85	56	1	-	106	95	2	-	18	16	3	-	35	55	1	-	49	49	0
$x_0^{1,16}$	-	51	91	0	-	125	74	4	-	27	9	1	-	42	43	6	-	41	41	1
$x_0^{1,17}$	-	96	31	15	-	94	70	39	-	15	10	12	-	60	22	9	-	36	36	6
$x_0^{1,18}$	-	82	8	52	-	78	20	105	-	19	1	17	-	47	18	26	-	29	29	10
$x_0^{1,19}$	-	136	5	1	-	173	24	6	-	31	1	5	-	83	5	3	-	13	13	0
$x_0^{1,20}$	-	58	82	2	-	87	95	21	-	16	10	11	-	44	36	11	-	47	47	1
$x_0^{1,21}$	-	94	26	22	-	109	59	35	-	22	5	10	-	48	26	17	-	37	37	4
$x_1^{1,22}$	17	110	15	-	51	123	29	-	8	23	6	-	16	62	13	-	21	46	8	-
$x_2^{1,22}$	6	116	20	-	31	155	17	-	1	34	2	-	2	84	5	-	2	73	0	-
$x_0^{2,1}$	-	92	30	20	-	68	33	102	-	8	6	23	-	25	25	41	-	9	25	41

Позна- чення ознак	Група																			
	КГ				ОГ1				ОГ2				ОГ3				ОГ4			
	$n_{I(-1)}^{k,p}$	$n_{I(0)}^{k,p}$	$n_{I(1)}^{k,p}$	$n_{I(2)}^{k,p}$	$n_{I(-1)}^{k,p}$	$n_{I(0)}^{k,p}$	$n_{I(1)}^{k,p}$	$n_{I(2)}^{k,p}$	$n_{I(-1)}^{k,p}$	$n_{I(0)}^{k,p}$	$n_{I(1)}^{k,p}$	$n_{I(2)}^{k,p}$	$n_{I(-1)}^{k,p}$	$n_{I(0)}^{k,p}$	$n_{I(1)}^{k,p}$	$n_{I(2)}^{k,p}$	$n_{I(-1)}^{k,p}$	$n_{I(0)}^{k,p}$	$n_{I(1)}^{k,p}$	$n_{I(2)}^{k,p}$
$x_0^{2,2}$	-	93	31	18	-	117	33	53	-	22	2	13	-	60	16	15	-	37	31	7
$x_0^{2,3}$	-	133	5	4	-	156	19	28	-	28	1	8	-	79	7	5	-	50	23	2
$x_0^{2,4}$	-	114	13	15	-	89	35	79	-	18	4	15	-	34	24	33	-	12	38	25
$x_0^{2,5}$	-	131	7	4	-	113	21	69	-	20	8	9	-	45	8	38	-	18	34	23
$x_0^{2,6}$	-	117	7	18	-	177	5	21	-	33	0	4	-	70	12	9	-	62	9	4
$x_0^{2,7}$	-	128	0	14	-	161	7	35	-	28	3	6	-	74	10	7	-	56	16	3

Таким чином, запропоновано подання вихідного простору ознак X у вигляді ієрархічної структури непересічних підмножин X_k^p , що характеризуються інтегральними ознаками $x_0^{k,p}$, яке дозволило не тільки формалізувати вихідні дані при діагностиці МТХД, але й скоротити розмірність багатомірного простору ознак з 365 до 32.

Рішення задачі пошуку ознак, за якими порівнювані групи відрізняються один від одного, було вирішено за допомогою оцінки зв'язку в таблицях спряженості номінальних ознак загального вигляду (табл. 2.9). В табл. 2.9 прийняті наступні позначення: n_{fg} – число пацієнтів, у яких ознака x_{ik} відноситься до класу f і одночасно ознака x_{ij} відноситься до класу g ; $n_{f\bullet}$ – загальне число пацієнтів, у яких ознака x_{ik} відноситься до класу f ; $n_{\bullet g}$ – число пацієнтів, у яких ознака x_{ij} відноситься до класу g ; l, p – число градації ознак x_k і x_j відповідно; N – довжина вибірки

Таблиця 2.10

Таблиця спряженості номінальних ознак загального виду

Градації (класи) ознак		x_1					Σ
		1	...	g	...	p	
x_2	1	n_{11}	n_{1p}	$n_{1\bullet}$

	f	n_{fg}	$n_{f\bullet}$

	l	n_{l1}	n_{lp}	$n_{l\bullet}$
Σ		$n_{\bullet 1}$...	$n_{\bullet g}$...	$n_{\bullet p}$	N

У цьому випадку в якості одного з ознак виступило позначення групи (2 градації), а в якості іншої ознаки – одна із ознак безлічі X (див. табл. 2.9).

Для оцінки істотності зв'язку двох номінальних ознак на основі аналізу таблиць спряженості (табл. 2.10) використовувались методи порівняння емпіричних і теоретичних частот по Брандту й Снедекору. Оцінка заходу близькості по всіх клітинах таблиці спряженості здійснювалась за допомогою критерію $\chi_{кр}^2$:

$$\chi_{кр}^2 = \sum_{f=1}^l \sum_{g=1}^p \frac{(n_{fg} - n'_{fg})^2}{n'_{fg}},$$

Коефіцієнт Крамера V , заснований на значенні критерію $\chi_{кр}^2$, показав ступінь зв'язку двох номінальних ознак у таблицях спряженості загального виду й розраховується по наступному вираженню:

$$V = \begin{cases} \sqrt{\frac{\chi_{кр}^2}{N(w-1)}}, & \text{якщо } \chi_{кр}^2 > \chi_{1-\alpha}^2(v), \\ 0, & \text{якщо } \chi_{кр}^2 \leq \chi_{1-\alpha}^2(v), \end{cases}$$

де $w = \min(l, p)$; $\chi_{1-\alpha}^2(v)$ – табличне значення розподілу хи-квадрат з вірогідністю помилки 1-го роду α та числом ступенів свободи $v = (l-1)(p-1)$.

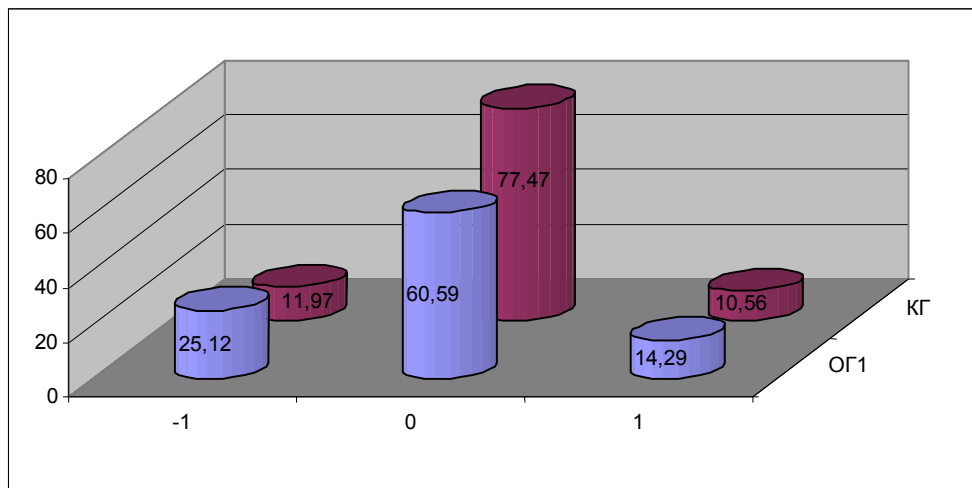
Розглянуті групи були порівняні по зросто-ваговим показникам. Результати аналізу наведені в табл. 2.11.

Таблиця 2.11

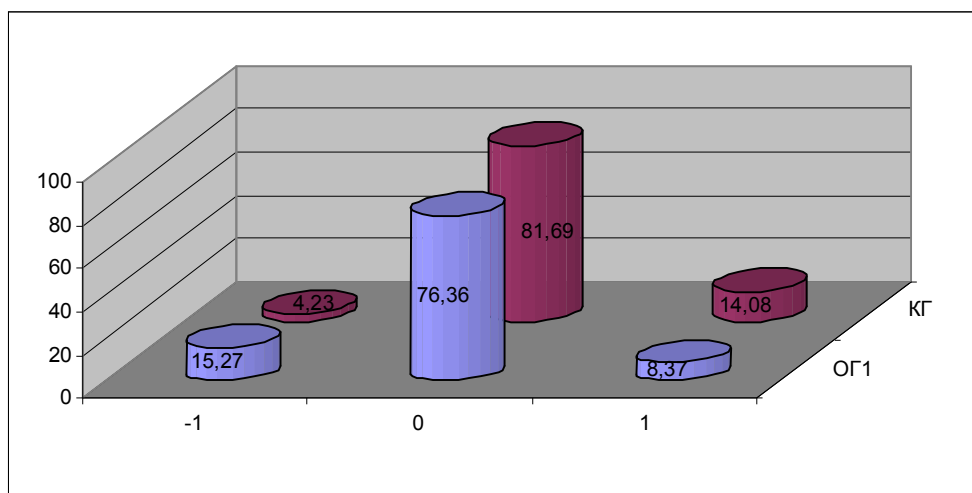
Результати порівняння груп по зросто-ваговим показникам

Коефіцієнт Крамера V при порівнянні груп за								
вагою					зростом			
Групи	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
КГ	0,185	0	0	0,203	0,189	0	0,149	0,238
ОГ2	-	-	0	-	-	-	0	-

Із табл. 2.11 видно, що істотні відмінності по зросто-ваговим показникам були виявлені при порівнянні ОГ1 і КГ, ОГ3 і КГ та ОГ4 і КГ. На рис. 2.12 зображені гістограми розподілу частот зросто-вагових показників для зазначених груп.

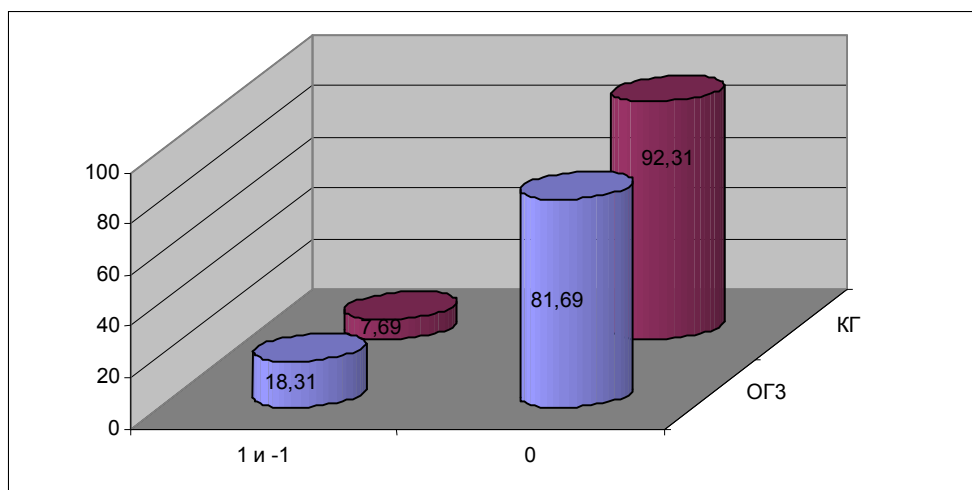


а)

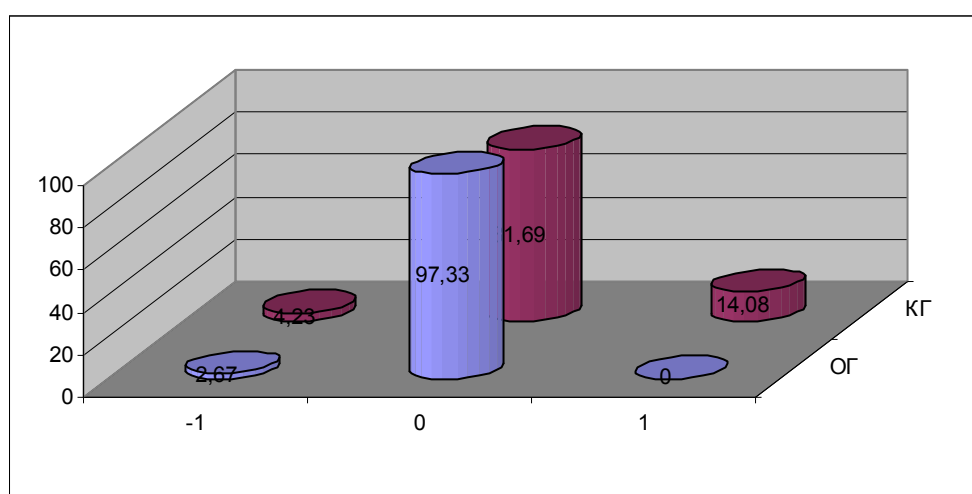


б)

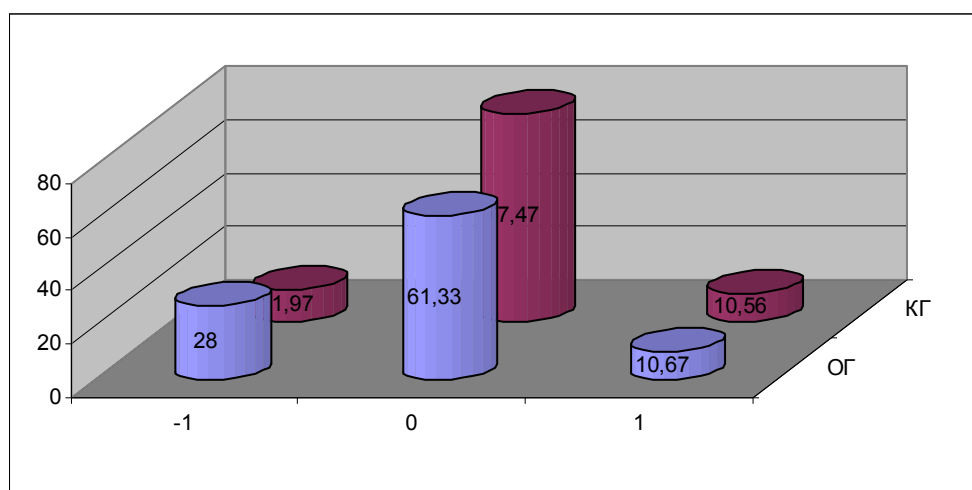
Рис. 2.11. Гістограми розподілу частот (%) зросто-ваговим показникам для ОГ1, ОГ3 і КГ: а) розподіл частот по зросту (ОГ1 і КГ); б) розподіл частот по вазі (ОГ1 і КГ);



в)



г)



д)

Рис. 2.11. Гістограми розподілу частот (%) зрісто-ваговим показникам для ОГ1, ОГ3 і КГ: в) розподіл частот по вазі (ОГ3 і КГ); г) розподіл частот за зростом (ОГ4 і КГ); д) розподіл частот по вазі (ОГ4 і КГ)

Для того, щоб перевірити наявність відмінностей ОГ1 и КГ по всьому безлічі ознак фенотипу, були обчислені абсолютні частоти наявності кожного зі значень інтегральних ознак $x_l^{k,p}$ у всіх пацієнтів ТЕД. Позначимо для i -го пацієнта ($i = 1, N$) через $n_{i(a)}$ – кількість інтегральних ознак фенотипу $x_l^{k,p}$, що приймають значення $a \in \{0,1,2\}$. Отримані значення $n_{i(a)}$ виступають у ролі ознак, за якими визначаються відмінності між ОГ1 і КГ.

При заповненні таблиці спряженості для об'єктів, описаних не номінальними ознаками, необхідно спочатку визначити межі інтервалів, по яких розподіляються частоти влучення кількісних ознак $n_{i(a)}$ для приведення їх до номінальної шкали. З цією метою були знайдені максимальні й мінімальні значення ознак $n_{i(a)}$ ($a \in \{0,1,2\}$). Ширину інтервалів визначимо по наступному вираженню:

$$\Delta n_{i(a)} = \frac{\max_i n_{i(a)} - \min_i n_{i(a)}}{3}.$$

Результати розрахунків параметрів, необхідних для переходу від кількісної шкали до номінальної, наведені в табл. 2.12.

Таблиця 2.12

Параметри інтервалів ознак $n_{i(a)}$

		$n_{i(0)}$	$n_{i(1)}$	$n_{i(2)}$
$\min_i n_{i(a)}$		3	0	0
$\max_i n_{i(a)}$		27	19	18
$\Delta n_{i(a)}$		8	6,3	6
Інтервал	1	3-11	0-6	0-6
	2	12-19	7-12	7-11
	3	20-27	13-19	12-18

Розрахунки коефіцієнта Крамера V для кожної ознаки $n_{i(a)}$ ($a \in \{0,1,2\}$) показали, що по всім ознакам $n_{i(a)}$ є істотні відмінності між розглянутими парами груп (табл. 2.13). Так як умова застосовності критерію χ^2 для порівняння груп за ознакою $n_{i(2)}$ не виконувалося для трьох інтервалів, то 2-й і 3-й інтервали були об'єднані.

Таблиця 2.13

Відмінності між групами за узагальненою ознакою $n_{i(a)}$ фенотипу

		ОГ1		ОГ2		ОГ3		ОГ4	
		$\chi_{кр}^2$	V	$\chi_{кр}^2$	V	$\chi_{кр}^2$	V	$\chi_{кр}^2$	V
КГ	$n_{i(0)}$	31,00	0,3	16,56	0,304	34,19	0,38	46,53	0,46
	$n_{i(1)}$	11,18	0,18	14,33	0,28	24,84	0,33	165,09	0,87
	$n_{i(2)}$	48,61	0,36	52,34	0,54	22,84	0,31	12,62	0,24
ОГ2	$n_{i(0)}$	-		-		74,15	0,76	-	
	$n_{i(1)}$					7,23	0,24		
	$n_{i(2)}$					6,62	0,23		

Таким чином, у цілому по фенотипу досліджувані пари груп не є однорідними, тому доцільно виділити фенотипічні ознаки, за якими ці групи значно розрізняються. Якщо при порівнянні груп за ознакою $x_l^{k,p}$ не виконувалося умова застосовності критерію χ^2 , то градації ознаки 1 (слабкі відхилення від норми) і 2 (сильні відхилення від норми) об'єднувалися (це відповідає об'єднанню всіх значень ознаки $x_l^{k,p}$, відмінних від норми).

В табл. 2.14 наведено результати розрахунків коефіцієнта Крамера V для визначення ступеня відзнаки ОГ1 та КГ по кожній із розглянутих ознак $x_l^{k,p}$.

Таблиця 2.14

Відмінності між ОГ1 та КГ по ознакам_i^{k, p}

Градациї	Ознака	Група		$\chi^2_{кр}$	V	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V	
		ОГ1	КГ				ОГ1	КГ				
0	$x_0^{1,5}$ (м'язи)	81	125	81,80	0,49	$x_0^{2,5}$ (сечовидільна система)	113	131	244	57,21	0,41	
1		103	17				21	7				28
2		19	0				69	4				73
	Σ	203	142			Σ	203	142	345			
0	$x_0^{2,1}$ (нервова система)	68	92	49,62	0,38	$x_0^{2,4}$ (травна система)	89	114	203	47,43	0,37	
1		33	30				35	13				48
2		102	20				79	15				94
	Σ	203	142			Σ	203	142	345			
0	$x_0^{1,8}$ (вупні раковини)	108	100	22,15	0,253	$x_0^{1,16}$ (пшия)	125	51	176	22,02	0,25	
1		56	38				78	91				169
2		39	4				39	4				43
	Σ	203	142			Σ	203	142	345			

Градация	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V
0	$x_0^{1,7}$ (обличчя)	96	87	183	21,9	0,25	$x_0^{1,9}$ (область очей, очне яблуко)	28	33	61	18,63	0,233
		70	52	122				86	78	164		
		37	3	40				89	31	120		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{2,3}$ (дыхальна система)	156	133	289	17,77	0,227	$x_0^{1,17}$ (грудная клітина)	94	96	190	15,44	0,212
		19	5	24				70	31	101		
		28	4	32				39	15	54		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{1,4}$ (подпирна клітковина)	132	117	249	12,75	0,192	$x_0^{1,18}$ (хребет)	78	82	160	12,75	0,192
		52	17	69				20	8	28		
		19	8	27				105	52	157		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{1,11}$ (губи та порожнина рога)	93	41	134	12,65	0,191	$x_0^{1,20}$ (верхні кінцівки)	87	58	145	12,04	0,187
		103	99	202				95	82	177		
		7	2	9				21	2	23		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		

Градациї	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V
0	$x_0^{1,19}$ (живіт, тазта сідниці)	173	136	309	9,98	0,17	$x_0^{1,10}$ (ніс)	74	69	143	9,72	0,168
1		24	5	29				117	72	189		
2		6	1	7				12	1	13		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{2,2}$ (ССС)	117	93	210	9,57	0,167	$x_0^{1,6}$ (череп)	86	84	170	9,54	0,166
1		33	31	64				90	46	136		
2		53	18	71				27	12	39		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{2,7}$ (ендокрин- на система)	161	128	289	9,27	0,164	$x_0^{1,14}$ (язик)	179	123	302	6,47	0,14
1		7	0	7				15	18	33		
2		35	14	49				9	1	10		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{1,21}$ (нижні кінцівки)	109	94	203	6,3	0,135	$x_0^{1,1}$ (шкіра)	39	17	56	5,71	0
1		59	26	85				124	104	228		
2		35	22	57				40	21	61		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		

Градациї	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V	Ознака	Група		Σ	$\chi^2_{кр}$	V
0	$x_0^{1,12}$ (верхня та нижня щелепи)	155	123	278	5,63	0	$x_0^{1,13}$ (зуби)	116	88	204	2,83	0
1		48	19	67				31	13	44		
2		203	142	345				56	41	97		
	Σ						Σ	203	142	345		
0	$x_0^{2,6}$ (статева система)	177	117	294	2,09	0	$x_0^{1,15}$ (піднебіння)	106	85	191	1,97	0
1		5	7	12				97	57	154		
2		21	18	39				203	142	345		
	Σ	203	142	345			Σ	203	142	345		
0	$x_0^{1,3}$ (волосся)	116	89	205	1,06	0	$x_0^{1,2}$ (нігті)	162	117	279	0,36	0
1		87	53	140				41	25	66		
2		203	142	345				203	142	345		
	Σ						Σ	203	142	345		

2.12. Дослідження активності цитрат-синтази та I, II, III, IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій

Для проведення дослідження використовувався біоптат м'язів. З метою збереження активності ферментів одразу після забору біологічного матеріалу він розміщався в умовах з температурою не більш $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рідкий азот). Зберігали зразки в низькотемпературних морозильних камерах.

Гомогенат готувався за класичною методикою з використанням ізоляційного буферу (сахароза, ЕДТА, Тризма-основа, $\text{pH}=7,4$).

Цитрат-синтаза каталізує конденсацію оксалоацетата та ацетил КоА з утворенням цитрил – КоА та вільного КоА. Активність цитрат-синтази вимірювалась шляхом оцінки концентрації оптично активного комплексу, що утворювався в результаті реакції 5,5-дітіобіс-2-нітробензойної кислоти з наопрацьованими вільними КоА, спектрофотометричним методом на довжині хвилі 412 нм.

Отримане значення активності цитрат-синтази використовувалось для розрахунку активності комплексів 1, 2/3 та 4, яка виражалась по відношенню до активності цитрат-синтази.

Вимірювання активності 1-го комплексу дихального ланцюга мітохондрій (NADH-оксидоредуктази).

I комплекс дихального ланцюга мітохондрій каталізує окислення NADH, відщеплюючи від нього два електрони, які переносяться по окисленно-відновлюваним компонентам комплексу I на молекулу-перенощика в якості якої виступає убіхінон (CoQ10). Убіхінон ступенево відновлюється, приймаючи на себе по два електрони та протони і, таким чином, перетворюється в убіхінон. Активність комплексу I оцінювалась за рівнем зниження концентрації NADH з використанням ротенона з метою затримки реакції. Вимірювання концентрації NADH виконувалось спектрофотометричним методом на довжині хвилі 340 нм.

Вимірювання активності 2/3-го комплексів дихального ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогеназа/цитохром C-редуктаза)

Сукцинатдегідрогенази (комплекс II) окислює янтарну кислоту в fumarову. Електрони переносяться із комплексу II за допомогою убіхінона, який при цьому відновлюється до убіхінола. Убіхінол, в свою чергу, утворюється для відновлення цитохром C. Ця реакція каталізує цитохром C – редуктазою (комплексом III).

Активність цього ферменту оцінюється за рівнем підвищення концентрації цитохрому C при його відновленні, яка забезпечується комплексами II/III та залежить від концентрації субстрата реакції – янтарної кислоти. Для зупинки реакції по витіканню заданого терміну використовувався антиміцин A. Вимірювання виконувалось спектрофотометричним методом на довжині хвилі 550 нм.

Вимірювання активності IV комплексу дихального ланцюга мітохондрій (цитохром C оксидаза)

Цитохром C оксидаза окислює відновлений цитохром C. Активність цього комплексу оцінюється за рівнем зниження концентрації відновленого цитохрома C при його окисленні під дією цитохром C оксидази. Активність фермента значно залежить від концентрації цитохрома C, і тому виражається у вигляді константи швидкості першого порядку. Вимірювання виконувалось спектрофотометричним методом на довжині хвилі 550 нм.

Розрахунок активності ферментів.

Активність ферментів розраховувалось за законом Ламберта-Бера:

$$C=A/\varepsilon' \text{ (моль/хв/л),}$$

де A – поглинання / хвилину;

ε' – коефіцієнт поглинання, для цитрат-синтази = $13,6 \cdot 10^3/1000$ = моль/хв./мл;

*50 (коефіцієнт розведення 20 мкл проби в 1000 мкл загального обсягу реагентів);

*5 (коефіцієнт розведення гомогената буфером, може бути іншим)= моль/хв./мл (краще виражати в нмоль/хв./мл).

Розділ III МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ мтДНК ТА ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ C677T MTHFR ТА A66G MTRR

3.1. Генетична епідеміологія поліморфізмів мтДНК

Поліморфізм клінічних проявів мітохондріальних захворювань залежить від ураження енерготропних органів і тканин, зумовлених порушенням системи синтезу АТФ, що значно ускладнює діагностику цих станів. Можливості молекулярно-генетичної верифікації клінічного діагнозу МХТД залишаються обмеженими, що значною мірою залежить від наявності стертих форм захворювання, феномену синтропії, або новими, раніше не відомими, формами захворювань [135]. Труднощі діагностики пов'язані ще з тим, що МХТД виникають в залежності від багатьох факторів, в тому числі, від типу мутації, генної взаємодії, які визначають варіанти клінічних проявів.

Встановлено, що делеції мтДНК не підлягають трансмісії і саме тому вони менш розповсюдженні ніж ті, що успадковані по материнській лінії, які мають назву «точкових» [136, 137].

Існуючу недостатність вивченості генетичної епідеміології МХТД, на думку [138], можливо подолати за допомогою популяційних досліджень. Саме тому на підставі договору про співпрацю з Лабораторією Молекулярної Антропології Університету Пенсильванії групою вчених, до складу якої входив і пошукувач, було проведене вивчення генетичного різноманіття мітохондріального геному, особливостей генетичної епідеміології, клінічних форм і патогенетичних механізмів реалізації порушень мітохондріального енергетичного метаболізму в популяціях Східної України для їхньої ранньої діагностики та адекватної терапії. Такий напрям досліджень був обумовлений обмеженістю популяційно-етнічного складу вивчених до того родин з патологією окисного фосфорилування, відсутністю даних про патогенне значення більшості мутацій, про ступінь гено- і

фенотипічних кореляцій, відсутність уявлень про вплив генетичного оточення мтДНК на ступінь експресії мітохондріальної патології.

Були проведені молекулярно-генетичні дослідження (рис. 3.1); визначення частоти МТХД у структурі спадкових синдромів, вивчення клініко-генетичних особливостей МТХД; вивчення патогенетичних механізмів мітохондріальних енергетичних порушень; створення діагностичних алгоритмів для проведення генетичного скринінга МТХД у досліджуваній популяції.

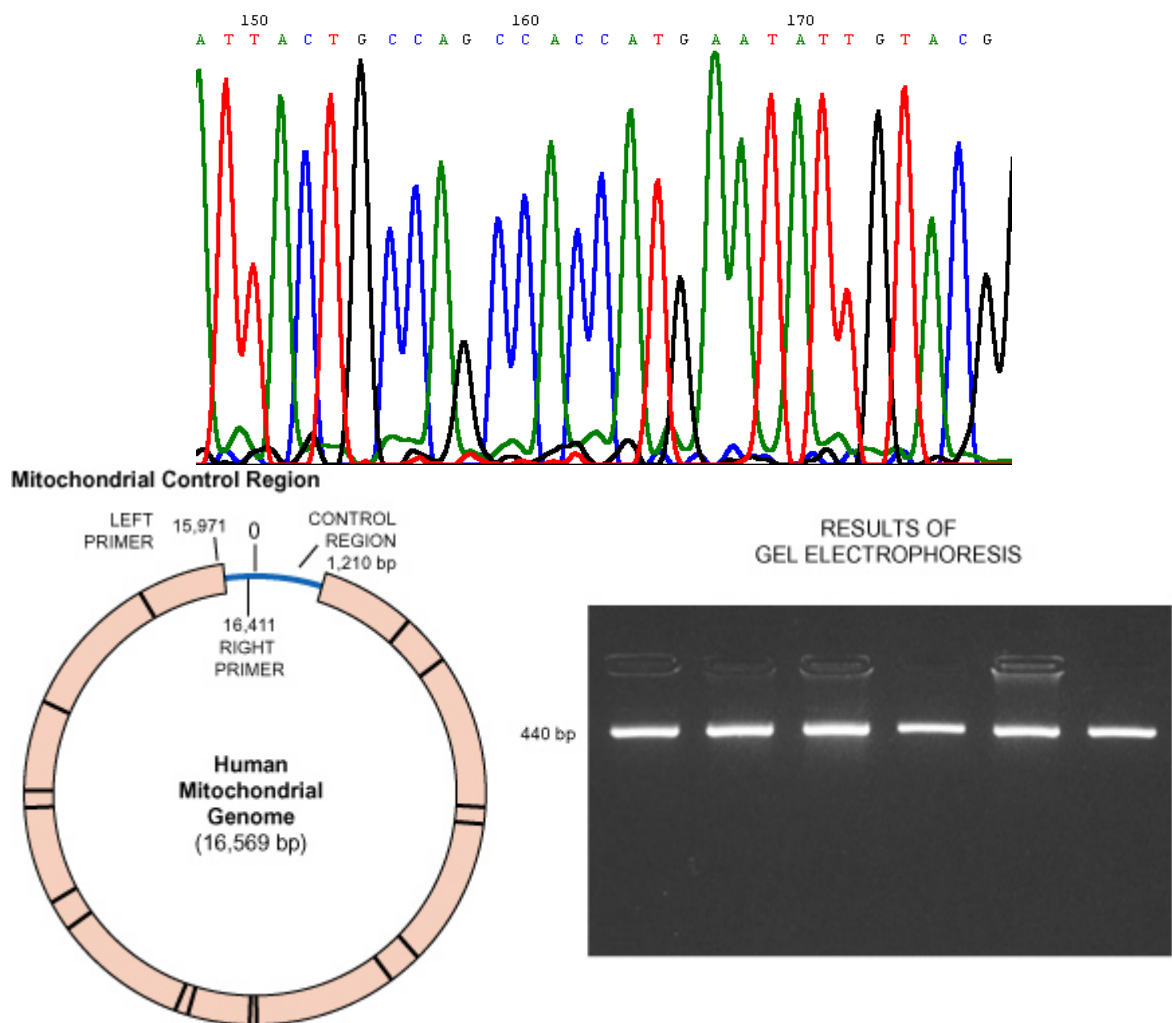


Рис. 3.1. Молекулярно-генетичні дослідження (фрагмент сіквенса гіперваріабельного сегменту ГВС I та ПДРФ-аналіз)

Проведене дослідження дозволило вперше отримати нові дані щодо генетичної епідеміології спадкових захворювань енергетичного обміну, асоційованих із поліморфізмами МТХД, в популяціях України на прикладі населення Харківської області.

Ендосимбіотичне походження, локалізація в цитоплазмі і висока кількість копій МТХ визначають унікальність мітохондріального геному. У відповідності до сучасних даних мітохондріальний геном виглядає унікальним завдяки встановленим його характеристикам [139-144].

Йому притаманний материнський характер успадкування мтДНК, яка передається від матері всім її нащадкам і від її дочок – усім її поколінням. Сини не передають свою мтДНК, тому що частка батьківських мтДНК мала і може передаватися не більше однієї молекули мтДНК на 25 тис. материнських мтДНК. Ці молекули не можуть бути виявлені існуючими методами [145].

В мітохондріальному геному відсутня комбінативна мінливість – мтДНК належить тільки одному з батьків, отже, рекомбінаційні події відсутні, а нуклеотидна послідовність змінюється з покоління в покоління тільки за рахунок послідовного накопичення мутацій.

МтДНК не має інтронів, від цього існує велика ймовірність того, що випадкова мутація вражає кодуєчий район мтДНК. В ній відсутня ефективна ДНК-репараційна система, що призводить до збільшення частоти мутацій мтДНК у порівнянні з ядерною. Саме тому мтДНК посідає особливе місце серед високополіморфних інформативних генетичних систем.

Уперше докази про етнічну диференціацію, тобто кореляцію мінливості мтДНК із расовою приналежністю і етногеографічним походженням індивідуумів, були отримані в результаті вивчення поліморфізму мтДНК у населення Африки, Азії, Європи й Америки [146].

За допомогою інформативних методів аналізу поліморфізму мтДНК (секвенування та ПДРФ-аналіз регіону, що некодуються), була отримана детальна інформація про варіації мтДНК у різних етнорасових групах людей. [45, 50]. В подальшому генетична структура популяції вивчалась на підставі

дослідження частот генів популяції. Було прийнято положення: якщо частоти генів двох популяцій однакові, то їхня генетична відстань дорівнює нулю, і навпаки, якщо вони різняться, то генетична відстань між ними велика [10]. Richards із співавторами (Richards et al., 1998) провели філогенетичне дослідження послідовності HVS I контрольного регіону мтДНК і виявили п'ять основних гаплогруп серед європейців, що відрізняються мутаціями (транзиціями) у визначених позиціях нуклеотидних основ: H, J, T, I, U [147].

Macaulay із співавторами [148] у відповідності між мотивами в нуклеотидних послідовностях HVS I і даними по гаплотипуванню за допомогою ПДРФ-аналізу склав характеристику основних гаплогруп мтДНК Східної Європи, а Т. Шурр, О.Я. Гречаніна, С.І. Жаданов, Ю.Б. Гречаніна, В.А. Гусар (2007) вивчили їх у популяції українців.

Участь у міжнародному проекті INTAS «Етногеноміка народів Східної Європи: виявлення гаплотипів мітохондріальної ДНК та У хромосоми в популяціях України та їхній аналіз методом медіанних мереж», міжнародному проекті «Всебічний аналіз епідеміології і механізмів експресії мітохондріальних захворювань у слов'янських популяціях Східної України» дозволила дисертанту провести збір біологічних зразків і виконати клініко-генетичну частину молекулярно-генетичного дослідження і у співавторстві із учасниками проектів опублікувати його результати.

Частоти основних гаплогруп мтДНК в українській популяції виглядали наступним чином. (табл. 3.1)

Розрахунок частот гаплотипів у популяційній вибірці показав наявність вираженого європеїдного компонента, представленого відповідними гаплогрупами (H, U, J, T, V, HV, pre-V, I, W, X, N), сумарна частота яких склала 95,6% з розподілом на групи H-29,8%, U-17,5%, J-12,3%, T – 15,8%, V – 3,5%, HV-3,5%, pre-V-2,9%, W-1,75%, X-1,75%, N-1,2%. Найбільше поширення доводиться на гаплогрупи H, U, J, T (75,4%). Також виявлена монголоїдна домішка (гаплогрупи A, B, C, D і Z) із частотою 2,0%.

Частоти основних гаплогруп мтДНК в українській популяції

Гаплогрупи	Пацієнти/Частота %	Контроль/Частота %
H	17/29,8	24/29
I	-	4/4,8
J	7/12,3	10/12
K	7/12,3	9/10,8
NV	3/5,3	-
T	9/15,8	5/6
U	10/17,5	26/31
V	2/3,5	1/1,2
W	1/1,75	-
X	1/1,75	4/4,8
Всього	57/100	83/100

Розрахунок частот гаплотипів у вибірці пацієнтів з клінічно-встановленим діагнозом мітохондріальної патології продемонстрував наявність євроспецифічних гаплогруп: H, pre-V, V, J, T, U, I, W, X, N (які представлені із частотами 24,0%, 2,0%, 2,0%, 12,0%, 16,0%, 18,0%, 2,0%, 2,0% і 8,0%, відповідно), сумарна частота яких склала 84,0%. Азійські гаплогрупи (C і A) виявлені із частотою 4,0%. Висока частота гаплогруп T (16,0%), U5 (14,0%), X (8,0%) і N (10,0%) у досліджуваній вибірці, у порівнянні з контрольною, ймовірно, обумовлена нестабільністю позицій 16189 і 16294, що втримуються в основних нуклеотидних мотивах даних гаплогруп (рис. 3.2).

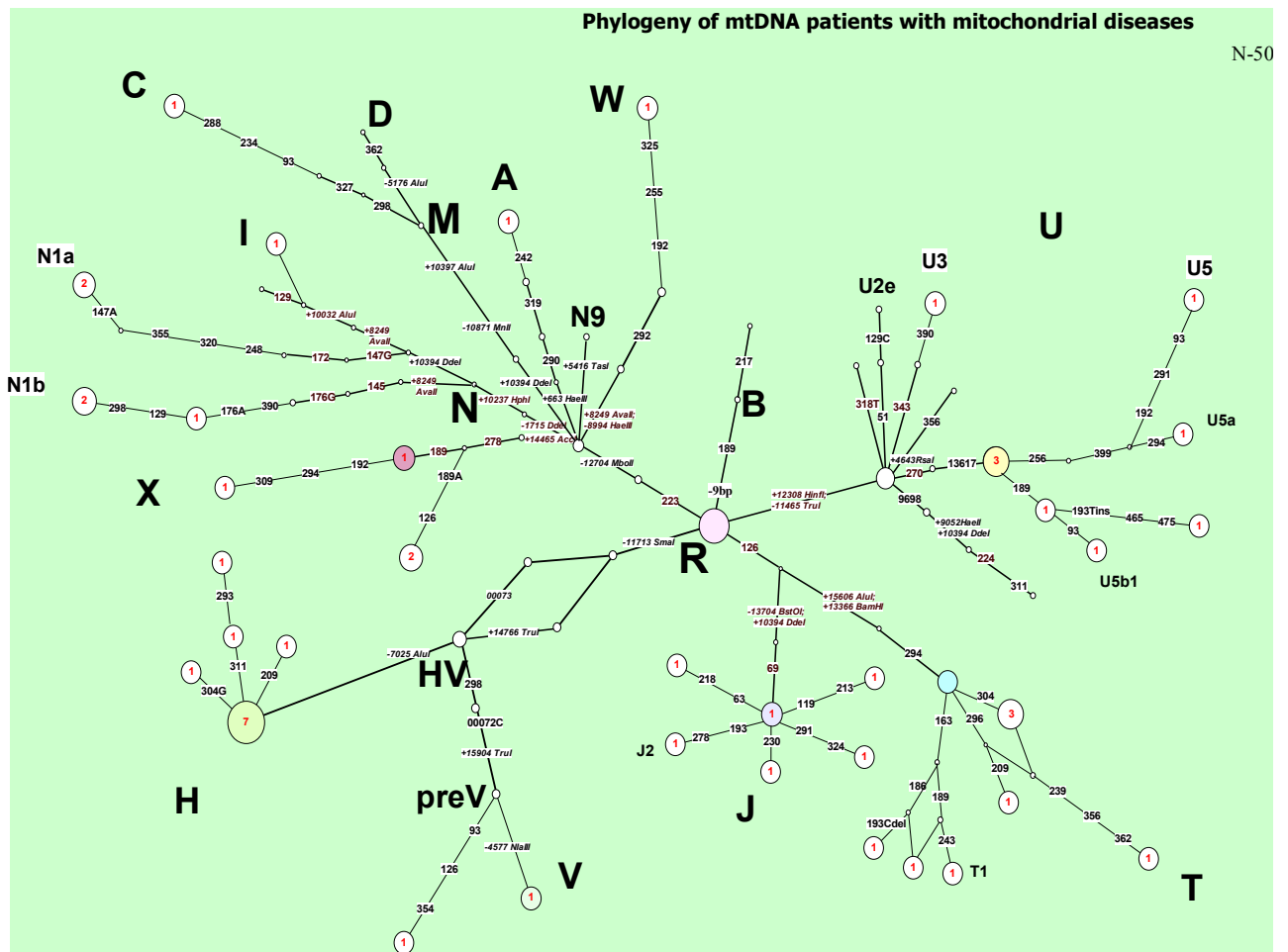


Рис. 3.2. Медіанна мережа, що відбиває філогенетичні відносини гаплотипів мтДНК у вибірці пацієнтів з підозрою на мітохондріальну патологію (В.А. Гусар)

Встановлено 55 поліморфних позицій із найбільш варіабельними 16189 та 16204, визначені поліморфізми в генах тРНК^{les} та тРНК^{leu} кодуючого регіону, знайдені мутації у пацієнтів із типами ГВС I мтДНК, які визначають гаплогрупи Н та Х, дозволили автору запідозрити вплив генетичного фону українців на клінічні прояви МТХД, що стало предметом поглибленого доказового дослідження пошукувача і підтвердило доцільність самого наукового пошуку.

Визначення однієї із складових генетичного фону популяції – наявність здебільшого європеїдних гаплогруп мтДНК підкреслило адекватне прагнення пошукувача вивчити особливості МТХД в регіоні дослідження, в якому діагноз

мітохондріальної дисфункції як самостійного захворювання раніше не встановлювався.

Поява нових знань про те, що мутація, яка передається в сім'ї в декількох поколіннях, *може викликати захворювання, які істотно відрізняються від статі родича, що передає цю мутацію*, призвела до розуміння ролі епігенома (зміненої генетичної інформації, яка виникла без зміни в нуклеотидній послідовності ДНК) в питаннях хвороб і здоров'я [149]. Встановлено, що епігенетичні мутації можуть змінювати метилування ДНК і бути основою цілої низки неврологічних порушень та вад розвитку. Автори вважають, що до одного і того ж фенотипу можуть призводити як генетичні мутації, так і епігенетичні, оскільки генетичні мутації порушують функцію гена, яка неадекватно регулюється в тих випадках, коли на даний локус впливають епігенетичні дефекти [150, 151].

Встановлено, що існує клас захворювань, в якому генетичні мутації викликають втрату функцій білків, які беруть участь у метилуванні ДНК або ремоделюванні хроматину. При цих захворюваннях фенотипи виникають в наслідок зміни епігенетичного стану в одному або більше локусах [152, 153].

Взаємовідносини між геномом і епігеномом, за даними HudaY. Zoghbi, Miller, Arthur L. Beaudet (2010), О.Я. Гречаніної (2011), поширили коло мутаційних явищ, які викликають захворювання людини. Наведені автори підкреслюють, що такі захворювання можуть бути успадкованими, виникати *de novo*, можуть бути генетичними або епігенетичними, на їх прояви впливає оточуюче середовище (режим харчування), які можуть змінювати епігеном (зокрема метилування ДНК), що особливо яскраво простежується на ДЗНТ, психічних захворюваннях та онкологічній патології.

Одним із біологічних маркерів зміненого епігенетичного статусу визнане метилування ДНК, пов'язане із функцією фолатного циклу.

Саме тому ми вважали доцільним проведення молекулярно-генетичного дослідження епідеміології поліморфних варіантів генів ферментів фолатного

циклу для подальшого вивчення впливу генетичного фону на формування клінічних ознак МТХД.

3.2. Генетична епідеміологія поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу C677T, A1298C, G1793A MTHFR, A66G MTRR, G80A RFC-1

У 70-ті роки минулого століття були розпочаті дослідження ферментів фолатного циклу. Тоді був виявлений зв'язок спадкового дефіциту ферменту MTHFR з порушенням обміну гомоцистеїну та були зроблені спроби з'ясування генетичної природи дефіциту данного ферменту. MTHFR [MIM 236250] є ключовим ферментом фолатного циклу, який переводить фолієву кислоту в її активну форму 5 – метилтетрагідрофолат. Фермент MTHFR належить до групи флавопротеїнів та складається із двох однакових субодиниць.

В роботі фолатного циклу бере участь фермент MTR, який каталізує відновлення (реметилювання) гомоцистеїну в метіонін. Для функціонування данного ферменту потрібний метилкобаламін, похідний вітаміну B12. MTR забезпечує перетворення гомоцистеїну в метіонін за допомогою реакції, в якій метилкобаламін виступає в ролі проміжного переносника метильної групи. При цьому відбувається окислення кобаламіну, та фермент MTR переходить в неактивний стан. Відновлення його функції можливе в ході реакції метилювання за участі ферменту MTRR.

Ген MTHFR розташований на короткому плечі першої хромосоми (1p36.3).

Існує ряд алельних варіантів цього гену, що викликають важку недостатність ферменту, але більшість із них є рідкісними.

Найбільш вивчений поліморфізм C677T: точкова заміна (місенс-мутація) цитозину (C) на тимін (T) в позиції 677, що призводить до заміни амінокислотного залишка аланіну на валін (Ala222Val) у сайті зв'язування фолата. У осіб, гетерозиготних по даній мутації, відмічається термолабільність

ферменту та зниження його активності приблизно до 35%, у гомозигот – до 70%. Наявність цієї мутації може супроводжуватися підвищенням рівня гомоцистеїну в крові.

Іншим поліморфізмом гену MTHFR є точкова заміна аденіна (A) на цитозин (C) в позиції 1298, яка призводить до заміни амінокислотного залишку глутаміна на аланін (Glu429Ala) в регуляторному домені фермента. Алель A1298C трохи знижує активність ферменту. У відмінності від поліморфізму C677T, гетерозиготність та гомозиготність по мутації A1298C не супроводжуються підвищенням концентрації загального гомоцистеїна та зниженням рівня фолата в плазмі. Однак компаунд – гетерозиготність по двох алелях 677T та 1298C супроводжується зниженням активності ферменту на 40-50% та підвищенням концентрації гомоцистеїну в плазмі, зниженням рівня фолата (як це буває при гомозиготному носійстві алеля 677T).

Нещодавно знайдений поліморфізм гена MTHFR – T1059C: автори опублікованих досліджень свідчать, що ця мутація є мовчазною та передається в поєднанні з мутацією A1298C. Також описані поліморфізми T1317C та G1793A.

Ген MTRR картований на хромосомі 5 в локусі 5p15.3-p.15.2. Фермент MTRR [MIM 602568] бере участь у відновленні активності MTR [MIM 156570] – ферменту, що безпосередньо здійснює метилювання гомоцистеїна. Він підтримує потрібні рівні метилкобаламіну (III) і активує кофактор синтезу метіоніна. MTRR відноситься до групи флавопротеїнів, має молекулярну масу 77,7 кДа. Складається із 698 амінокислот.

Поліморфізмом гена MTRR є A66G – точкова заміна аденіну (A) на гуанін (G) в позиції 66, яка призводить до заміни амінокислотного залишку ізoleyцина на метіонін (Ile22Met). Даний поліморфізм в 4 рази знижує активність ферменту MTRR. Гомозиготність поліморфізму A66G призводить до помірного підвищення гомоцистеїна в плазмі, яке не залежить від рівнів фолатів, кобаламіну та піридоксину. Деякі автори відмічають значне збільшення ризику розщілини хребта у пацієнтів, які є гомозиготними носіями

у поєднанні з незначними рівнями кобаламіну або гомозиготними компаунд-носіями C677T MTHFR / A66G MTRR.

У гені MTR (5p15.3-p15.2), що каталізує реметилювання гомоцистеїна в метіонін, описаний поліморфізм в позиції A2756G в сайті зв'язування ферменту MTR, який призводить до заміни аспарагінової кислоти на гліцин. Більшість досліджень свідчать про знижений рівень гомоцистеїну в плазмі, частіше при гомозиготному носійстві A2756G, ніж при гетерозиготному.

Поліморфні варіанти генів MTHFR та MTRR, обумовлюючи різну функціональну значимість білкових продуктів, впливають на широкий спектр біохімічних реакцій у ході фолатного циклу, та, на думку ряду авторів, можуть розглядатись як фактор ризику деяких захворювань. Однак роль їх в етіопатогенезі різної патології остаточно не встановлена.

Дослідження останніх років свідчать про важливість процесу метилювання в етіології та патогенезі багатьох спадкових хвороб, що відкриває нові можливості їх лікування. Метилювання ДНК відіграє важливу роль у формуванні та підтримці епігенетичної мінливості – спадкового динамічного процесу, який визначає ступінь активності генів [6, 8].

Згідно із сучасним уявленням, під епігенетичними процесами розуміють успадковані, стабільні, але потенційно оборотні зміни експресії генів, які не пов'язані з порушенням їх нуклеотидної послідовності [1, 8, 9]. Власне, метилювання і є основним епігенетичним модифікатором генома, оскільки залучено в такі фундаментальні процеси життєдіяльності клітини, як регуляція експресії генів і підтримки стабільності генома. Профіль метилювання значно впливає на функціональний стан генів та стабільно передається в ряді клітинних поколінь. Дестабілізація геному настає в разі зміни епістатуса. Встановлено, що метилювання ДНК визначає взаємодію між ДНК та білками, що розпізнають модифіковані основи, регулює генну експресію через механізм компактизації – декомпактизації хроматину, являючись основним модифікатором геному [3, 8, 9].

Першою в світі звернула увагу на фолати як на критичний фактор при поширених хворобах Люсі Уїлс у 1931 р., і лише через 60 років група по дослідженню вітамінів при Медичній дослідницькій раді в 1991 році

підтвердила велику клінічну значущість фолатів, починаючи із ембріонального періоду онтогенезу [7].

У 1995 р. метааналіз, проведений 27 дослідницькими установами, довів, що гомоцистеїн є незалежним диференційованим фактором ризику відносно атеросклерозу коронарних, церебральних та периферійних судин. В цьому ж році були відкриті поліморфні варіанти окремих нуклеотидів, пов'язані із фолатами і вітамінами групи В, які впливали на ризик розвитку судинної патології, раку, нейродегенеративних захворювань [5, 9]. Встановлено, що фолати здатні взаємодіяти із протеїнами, які кодуються цими модифікованими генами, що відкрило реальні можливості профілактики нетрадиційної смертності від перелічених захворювань.

Метилування ДНК здійснюється, головним чином, в результаті оборотної хімічної модифікації цитозина (С), шляхом приєднання метильної групи з S – аденозилметіоніна (SAM) до вуглецю, розташованому в 5'-положенні піримідинового кільця, що призводить до утворення 5'метілцитозина. Цитозин метилується тільки в тому випадку, якщо поряд з ним знаходиться гуанін (G) у поєднанні CpG, де p – залишок фосфорної кислоти, що зв'язується з залишком цукру з утворенням цукрофосфатного остова ДНК (2). SAM, що є універсальним донором метильних груп для цілого ряду акцепторів (норадреналін, гуанідіацетат, гліцин, нуклеїнові кислоти, гормони та ін.), утворюється з метіоніну в процесі реметилування останнього із гомоцистеїну. Отже, при дефіциті метіоніну буде спостерігатися дефіцит SAM. (4).

Фолати забезпечують продукцію універсального донора метильних груп – SAM. Рівень метилування генома може визначатися генетичними факторами, які беруть участь у метаболізмі SAM, наприклад, мутаціями гена MTHFR. Ферменти залучені у функціонування епігенетичного профілю генома. У осіб, гомозиготних по мутації, значно знижений рівень геномного метилування в периферичних лейкоцитах [20]. Отже, порушення роботи даних ферментів може призводити до епігенетичних порушень.

Таким чином, на епігенетичному статусі гена можуть відбитися зміни локусів, які тим або іншим способом залучені в регуляцію структури хроматину,

тобто поліморфні варіанти гену MTHFR можуть впливати на характер метилювання ДНК, змінюючи рівень SAM. Було показано, що наявність гомозиготної заміни 677T в гені MTHFR у жінок збільшує ризик народження дитини з синдромом Енгельмана та епімутацією в центрах імпринтінгу [6, 27].

Метіонін вступає у взаємодію із АТФ, внаслідок чого виникає S-аденозилметіонін (SAM). Останній у якості донора метильних груп метилює ДНК, ліпіди і білки. Знижена концентрація SAM або підвищена інгібіція метилтрансферази може призвести до порушень регуляції генної експресії, білкової функції та метаболізму ліпідів і нейротрансмітерів. Таким чином, порушення метаболізму фолатів можуть суттєво порушувати функцію клітин, особливо під час інтенсивного росту [4]. Встановлено, що недостатня кількість фолатів в клітині у вигляді 5 метилентетрагідрофолата (5- MTHFR) виникає і внаслідок зниження переносника фолатів (RFC-1). RFC-1 є первинним білком для інтерналізації 5-MTHFR і тому мутації в гені RFC-1 асоціюються із недостатньою абсорбцією фолатів. Встановлено, що поліморфний варіант G80A RFC-1 (заміна гістидіна на аргінін) пов'язаний із більш низьким статусом фолатів як незалежно, так і внаслідок мутацій у інших генах, що пов'язані із метаболізмом гомоцистеїна, наприклад, MTHFR [5].

Виконуючи стратегію наукового пошуку, ми провели вивчення генетичної епідеміології поліморфних варіантів генів фолатного циклу, який забезпечує біогенез незамінної амінокислоти метіоніну разом із професором Р. Маталоном кафедри педіатрії, біохімії і генетики Техаського університету (США).

Метою цього фрагменту дослідження було вивчення частоти генетичної варіації генів, «залучених» до шляху реметилювання гомоцистеїну.

Були вивчені генотипи та частоти алелів MTHFR C677T, A1298C, G1793A, MTRR A66G і RFC-1 G80A групою вчених: професорами О.Я. Гречаніною (Україна), Ю.Б. Гречаніною, В.А. Гусар (Україна), R. Matalon (США) у 200 новонароджених.

Це дослідження являє собою першу роботу, присвячену опису частот поліморфних алелів і генів, які регулюють метаболізм фолатів, в українській популяції. Розподіл і частоти поліморфізмів в MTHFR C677T, A1298C, G1793A, MTRR A66G і RFC-1 G80A відображені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Розподіл генотипів та частот алелів
генів MTHFR (C677T, A1298C, G1793A); MTRR (A66G); RFC-1 (G80A)

	Українці	Євреї ашкенази	Афро-американці	Європейці	Іспанці
MTHFR C677T	N=199	n=155	N=97	N=159	n=96
Гомозиготи	7.04% (n=14)	26.5% (n=41)	1.0% (n=1)	11.3% (n=18)	26.0% (n=25)
Гетерозиготи	40.70% (n=81)	42.6% (n=66)	21.6% (n=21)	42.8% (n=68)	43.8% (n=42)
Норма	52.26% (n=104)	31.0% (n=48)	77.3% (n=75)	45.9% (n=73)	30.2% (n=29)
Частота алеля	27.39% (109/398)	47.7% (148/310)	11.9% (n=23/194)	32.7% (104/318)	47.9% (92/192)
MTHFR A1298C	N=200	n=149	N=97	N=159	n=96
Гомозиготи	8.50% (n=17)	8.1% (n=12)	2.1% (n=2)	8.8% (n=14)	4.2% (n=4)
Гетерозиготи	39.50% (n=79)	38.3% (n=57)	26.8% (n=26)	47.2% (n=75)	27.1% (n=26)
Норма	52.00% (n=104)	53.7% (n=80)	71.1% (n=69)	44.0% (n=70)	68.8% (n=66)
Частота алеля	28.25% (113/400)	27.2% (81/298)	15.5% (30/194)	32.4% (103/318)	17.7% (34/192)
MTHFR G1793A	N=195	n=117	N=97	N=159	n=95
Гомозиготи	0.00% (n=0)	0.0% (n=0)	0.0% (n=0)	0.6% (n=1)	0.0% (n=0)
Гетерозиготи	4.62% (n=9)	2.6% (n=3)	6.2% (n=6)	12.6% (n=20)	11.6% (n=11)
Норма	95.38% (n=186)	97.4% (n=114)	93.8% (n=91)	86.8% (n=138)	88.4% (n=84)
Частота алеля	2.31% (9/390)	1.3% (3/234)	3.1% (6/194)	6.9% (22/318)	5.8% (11/190)
MTRR A66G	N=200	n=123	N=97	N=159	n=96
Гомозиготи	35.50% (n=71)	19.5% (n=24)	10.3% (n=10)	29.6% (n=47)	7.3% (n=7)
Гетерозиготи	43.00% (n=86)	47.2% (n=58)	47.4% (n=46)	49.7% (n=79)	42.7% (n=41)
Норма	21.50% (n=43)	33.3% (n=41)	42.3% (n=41)	20.8% (n=33)	50.0% (n=48)
Частота алеля	57.00% (228/400)	43.1% (106/246)	34.0% (66/194)	54.4% (173/318)	28.6% (55/192)
RFC-1 G80A	N=190	n=122	N=101	N=131	n=108
Гомозиготи	38.42% (n=73)	28.7% (n=35)	20.8% (n=21)	29.0% (n=38)	26.0% (n=30)
Гетерозиготи	43.16% (n=82)	45.9% (n=56)	45.5% (n=46)	47.3% (n=62)	43.8% (n=54)
Норма	18.42% (n=35)	25.4% (n=31)	33.7% (n=34)	23.7% (n=31)	30.2% (n=24)
Частота алеля	40.00% (152/380)	48.4% (118/244)	56.4% (114/202)	47.3% (124/262)	47.2% (102/216)

Як свідчать наведені дані досліджень, в Україні, в порівнянні із популяціями євреїв Ашкеназі, афро-американців, іспанців і європейців, притаманна більш низька поширеність індивідів гомозиготних по MTHFR (7,04%) у порівнянні із євреями Ашкеназі (26,5%, $p < 0,0001$) і іспанцями (26,0%, $p < 0,0001$) та європейцями (11,3%, $p < 0,0001$) і вища, ніж у афроамериканців (1,0%, $p < 0,0001$).

Частота алелю A1298C у українців склала 28,5% у порівнянні с європейцями (32,4%, $p < 0,0001$). Частота алелю G1793A MTHFR (2,31%) також була нижче європейської (6,9%, $p < 0,0001$), а гомозиготних носіїв при цьому поліморфізмі не спостерігалось.

Відомо, що фермент метіонінсинтаза-редуктаза (MTRR) підтримує в організмі необхідні рівні кобаламіну, активованого кофактору синтезу метіоніну. Амінокислотна заміна ізoleyцина на метіонін підвищує рівень гомоцистеїну в плазмі, який не залежить від рівня фолатів, кобаламіну і піридоксину в плазмі (17). Поєднання дефіциту кобаламіну із цим поліморфізмом призводить до складних уражень (розщеплення хребта та розшарування спинного мозку (О.Я. Гречаніна, 2012 та 18). Поширеність гомозиготності цих індивідів по алелю MTRR A66G була самою високою серед українців і склала 35,5%, як і частота мутантного алелю 66G – 57% (табл. 3.3). Гомозиготність по алелю RFC-1 G80A (GG) в дослідженій групі склала 38,42%, що також вище у порівнянні із досліджуваними групами. Але частота алеля 80A в української популяції була нижчою (40,0%).

Вивчення розподілу складу гетерозигот за алелями C677T, A1298C, G1798A MTHFR, A66G MTRR та G80A RFC-1 дозволило отримати нові дані. Відомо, що взаємодія між двома і більше генами, які кодують білки, котрі беруть участь у метаболізмі гомоцистеїну, формує негативні ефекти поліморфізму. Нами був зареєстрований розподіл структури гетерозигот двох, трьох, чотирьох та п'яти алелів MTHFR, MTRR, RFC-1 як і іншими дослідниками (табл. 3.3–3.4) [8, 12].

Розподіл гетерозигот для трьох алелів
в генах MTHFR (C677T, A1298C, G1793A); MTRR (A66G); RFC-1 (G80A)

	MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTHFR G1793A	MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G	MTHFR C677T, MTHFR A1298C, RFC-1 G80A	MTHFR C677T, MTHFR G1793A, MTRR A66G	MTHFR C677T, MTHFR G1793A, RFC-1 G80A
Українці	1.54% (3/195)	6.53% (13/199)	6.84% (13/190)	0.0% (0/195)	0.53% (1/188)
Афро-американці	0.0% (0/97)	2.1% (2/97)	X	0.0% (0/97)	X
Європейці	5.0% (8/159)	10.7% (17/159)	X	2.5% (4/159)	X
Іспанці	5.3% (5/95)	6.2% (6/96)	X	4.2% (4/95)	X
Євреї ашкенази	0.0% (0/116)	16.5% (20/121)	X	0.0% (0/106)	X
	MTHFR C677T, MTRRA66G, RFC-1 G80A	MTHFR A1298C, MTHFR G1793A, MTRR A66G	MTHFR A1298C, MTHFR G1793A, RFC-1 G80A	MTHFR A1298C, MTRR A66G, RFC-1 G80A	MTHFR G1793A, MTRR A66G, RFC-1 G80A
Українці	8.42% (16/190)	1.0% (2/195)	2.13% (4/188)	6.84% (13/190)	0.00% (0/188)
Афро-американці*	X	3.1% (3/97)	X	X	X
Європейці**	X	5.0% (8/159)	X	X	X
Іспанці*	X	7.4% (7/95)	X	X	X
Євреї ашкенази*	X	0.0% (0/107)	X	X	X

Розподіл гетерозиготних компаундів в генах MTHFR
(C677T, A1298C, G1793A); MTRR (A66G); RFC-1 (G80A)

	MTHFR C677T, MTHFR A1298C	MTHFR C677T, MTHFR G1793A	MTHFR C677T, MTRRA66G	MTHFR C677T, RFC-1 G80A	MTHFR A1298C, MTHFR G1793A
Українці	12.56% (23/199)	1.54% (3/195)	20.10% (40/199)	20.00% (38/190)	4.1% (8/195)
Афро-американці	4.1% (4/97)	0.0% (0/97)	7.2% (7/97)	X	5.2% (5/97)
Європейці	22.6% (36/159)	5.0% (8/159)	20.1% (32/159)	X	10.1% (16/159)
Іспанці	14.6% (14/96)	5.3% (5/95)	18.8% (18/96)	X	9.5% (9/95)
Євреї ашкенази	2.3% (33/148)	0.0% (0/116)	21.5% (26/121)	X	0.9% (1/117)
	MTHFR A1298C, MTRR A66G	MTHFR A1298C, RFC-1 G80A	MTHFR G1798A, MTRR A66G	MTHFR G1793A, RFC-1 G80A	MTRR A66G, RFC-1 G80A
Українці	20.00% (40/200)	20.00% (38/190)	1.54% (3/195)	2.13% (4/188)	16.84% (32/190)
Афро - американці	15.5% (15/97)	X	3.1% (3/97)	X	X
Європейці	22.6% (36/159)	X	6.9% (11/159)	X	X
Іспанці	12.5% (12/96)	X	8.4% (8/95)	X	X
Євреї ашкенази	26.8% (33/123)	X	0.0% (0/107)	X	X

Як видно із табл. 3.4, в популяції, що вивчалась, спостерігались всі можливі комбінації складної гетерозиготності. Разом з тим, не було виявлено жодного випадку подвійної гетерозиготності по MTHFR C677T / A1298C або MTHFR C677T / G1793A. Крім того, в нашому дослідженні не було знайдено гомозиготності за алелем C677T та гетерозиготності за алелем A1298C та G1793A.

Подвійна гомозиготність за MTHFR C677T/ MTRR A66G та MTHFR C677T / RFC-1 G80A (GG) зустрілась із частотою 3,5% (7/199) та 2,1% (4/190) відповідно. Подвійна гомозиготність за MTRR A66G і RFC-1 G80A (GG) зустрічалась із частотою 12,1% (23/190).

Комбінація трьох поліморфних сайтів MTHFR, MTRR і RFC-1 показана в таблиці 4. Складна гетерозиготність за алелями MTHFR C677T / MTHFR G1793A / MTRR A66G і MTHFR G1793A / MTRR A66G/ RFC-1 G80A не була виявлена в дослідженій популяції. Серед наших зразків були виявлені дві потрійні гомозиготи за MTHFR C677T / MTRR A66G / RFC-1 G80A (GG) (1,05%) і дві потрійні гомозиготи за MTHFR A1298C / MTRR A66G / RFC-1 G80A (GG) (1,05%) з частотою 1,05%.

Серед п'яти можливих комбінацій по чотирьом складним гетерозиготам MTHFR, MTRR і RFC-1 тільки MTHFR C677T / MTHFR A1298C / MTHFR G1793A / RFC-1 G80A (0,53%) і MTHFR C677T/ MTHFR A1298C / MTRR A66G / RFC-1 G80A (3,16%) були виявлені в ході даного аналізу. Гетерозиготність за MTHFR C677T / MTHFR A1298C / MTHFR G1793A / MTRR A66G, MTHFR C677T / MTHFR G1793A / MTRR A66G / RFC-1 G80A і MTHFR A1298C / MTHFR G1793A / MTRR A66G / RFC-1 G80A не спостерігалась. Крім того, гомозиготність по чотирьом поліморфним алелям (п'ять можливих комбінацій) не спостерігалася.

Жоден із індивідуумів серед представників української популяції не був гетеро- або гомозиготним по всім п'яти поліморфним алелям.

За даними декількох досліджень з ризиком розвитку дефектів закриття нервної трубки (ДЗНТ) асоціюються різноманітні поліморфні варіанти.

Зокрема, гомозиготність за MTHFR C677 [25, 26], гомозиготність за MTRR A66G [18, 27-29], гомозиготність за RFC-1 G80A (GG) [30], складна гетерозиготність за MTHFR C677T і MTRR A66G [18] і складна гетерозиготність за MTHFR A1298C і RFC-1 G80A [6] корелює з підвищеним ризиком виникнення ДЗНТ. Складна гетерозиготність за MTHFR C677T і A1298C не пов'язана з ДЗНТ, хоча корелює з підвищеним рівнем гомоцистеїна. Таким чином, ці генотипи важливі для моніторингу в популяціях з дефіцитом фолієвої кислоти.

В даному аналізі, 7,0% нашої популяції (n=199) були гомозиготними за MTHFR C677T, тоді як 35,5% (n=71) були гомозиготними за RFC-1 G80A (табл. 3.2) Крім того, 3,5% (n=199) і 3,2% (n=190) мало важку гомозиготність за MTHFR C677T / MTRR A66G і MTHFR A1298C / RFC-1 G80A (G/G) відповідно. Нарешті, наша українська популяція в 12,56% (23/199) випадків мала складну гетерозиготність за поліморфними алелями MTHFR C677T/A1298C.

Аналізуючи отримані дані, відзначимо, що населення України має високий дефіцит фолатів і відповідно високий ризик ураження нервової системи. Ми порівняли ці дані із даними генетичного моніторингу ВВР, який проводиться в регіоні дослідження з 1999 року і знайшли фенотипову кореляцію експериментальних даних – нашій популяції притаманна висока частота уражень нервової системи (рис. 3.3)

.Багато дослідників відмітили розповсюдженість алеля MTHFR C677T в різних популяціях. Порівняння цих даних з даними по українській популяції демонструє більш низьку частоту, ніж середня частота (27,4%) алеля MTHFR C677T, аналогічну для Нідерландів (26,0) і Турції (28,0%) [25]. Гомозиготність за алелем MTHFR 677T є відомим показником ризику ДНТ в уражених пацієнтів та їх матерів. Фактично матері, які гомозиготні за варіантом MTHFR 677T, мають підвищений ризик (60,0%) народити немовлят із ДНТ, оскільки немовля із гомозиготною мутацією має підвищений ризик 90% (4,29). В Україні частота гомозиготних носіїв 677T складає 7,0%.

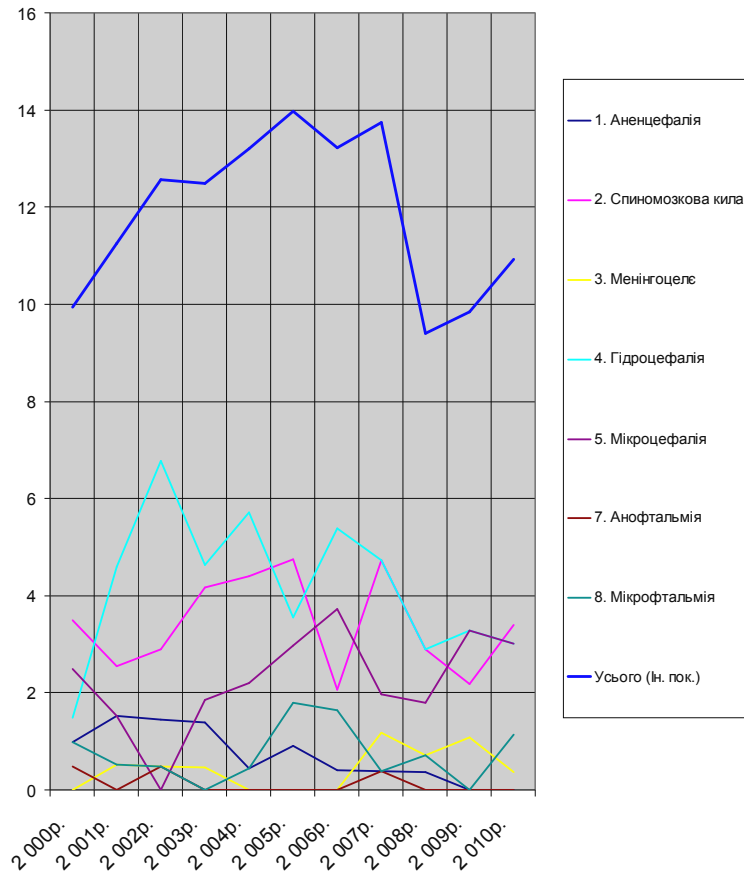


Рис. 3.3. Порівняльна характеристика ПВР нервової системи за даними генетичного моніторингу (2000–2010 рр.) (інтенсивний показник)

Вивчення частоти алеля MTHFR A1298C виявило діапазон частот від 17,0% в китайській популяції, до 36,0% в канадській популяції [33]. В українській популяції ми відмітили частоту мутантного алеля (28,25%), що засвідчує незначні його розповсюдження MTHFR A1298C у порівнянні з іншими популяціями, які були проаналізовані іншими дослідниками [33]. Крім того, ми не виявили подвійних гомозигот за алелями MTHFR C677T і A1298C.

Відомо, що гомозиготність за MTHFR A1298C не пов'язана із підвищеною концентрацією гомоцистеїна в крові. Однак існує взаємодія між поліморфними варіантами C677T і A1298C гену MTHFR, так як гетерозиготність для обох алелей пов'язана з найбільш низькою активністю ферментів, ніж для будь-якого одного алелю, що призводить до підвищення рівня гомоцистеїну в крові (9-11). Виявлена частота гетерозиготних носіїв в української популяції дорівнює 39,5%

Поліморфізм MTRR є поширеним для більшості популяцій. Однак ми відмітили саму найвищу частоту алеля MTRR 66G, яка спостерігалася у 57,0%, за винятком аномально високого показника в російській популяції [34]. Крім того, українська популяція мала більш високу частоту гомозиготних носіїв (35,5%).

Wilson та співав. (2010) відмітили, що комбінація гомозиготних генотипів MTRR A66G та MTHFR C677T пов'язана з чотирьохкратним збільшенням частоти ураження ЦНС у дітей та їх матерів. Крім того, коли гомозиготний 66G генотип поєднувався з низьким рівнем кобаламіну, ризик для матерів підвищувався майже в п'ять разів (а) [18]. Вочевидь, що поліморфізм 66G MTRR може збільшувати ризик ДНТ в українській популяції як незалежно, так і в поєднанні з іншими мутаціями і факторами впливу оточуючого середовища.

RFC-1 G80A поліморфізм також є генетичним показником ризику ураження ЦНС, як незалежно, так і в поєднанні з іншими мутаціями і низьким рівнем фолатів (6,30). Ми відмічаємо високу частоту алеля 80A (40,0%), а також високу частоту гомозиготного генотипу (38,4%).

Гомозиготний генотип знайдено з частотою 3,2%. Вважається, що RFC-1 відіграє роль у транспортуванні фолатів. Така частота RFC-1 є свідченням вірогідності впливу мутації RFC-1 в українській популяції, враховуючи недостатній статус фолатів. Важливо те, що поліморфізми MTRR A66G та RFC-1 G80A свідчать про високий рівень ризику в українській популяції уражень центральної нервової системи та ВВР.

В досліджуваній вибірці частота гетерозиготного алеля 677CT склала 43.3%. За даними багатьох дослідників, поліморфізм MTHFR C677T в гомозиготному стані є високим показником ризику розвитку ДНТ (у матерів, які мають даний варіант поліморфізму, ризик народження дітей з такою вадою на 60%). В нашій вибірці відсоток гомозиготних носіїв C677T склав 8.7%. Даний показник нижче у порівнянні з аналогічними в європейській популяції (11.3%). Слід відмітити, що очікувана частота генотипу TT також склала 8.9%.

Існують різні гіпотези, одна із яких припускає, що носії високої частоти алеля 677T могли мати селективні переваги у природному відборі, оскільки під час голоду зниження активності MTHFR призводить до зниження реметилювання гомоцистеїну, і, таким чином, тетрагідрофолат зберігається для життєво важливого синтезу ДНК та РНК.

Поліморфізм MTRR A66G є поширеним для більшості популяцій. Тим не менш, і в дослідженні Matalon R., Grechanina E. et al. (2008), та в проведеному нами дослідженні, була виявлена висока частота даного алеля у порівнянні з частотами інших популяцій, за виключенням російської популяції. Крім того, у українського населення спостерігався високий відсоток (35.5%) гомозиготних носіїв A66G (в європейській популяції 29.6%). У вибірці пацієнтів відсоток гомозиготних носіїв склав 37.0%, а частота мутантного алеля – 58.0%. Очікувана частота генотипу GG склала 33.6% при частоті 37.0%, що спостерігалась. Зазначимо, що для гомозиготного генотипу MTRR A66G ризик розвитку ДНТ більш високий, навіть незалежно від прийому фолієвої кислоти.

За даними літератури наявність компаундів гомозиготних генотипів MTHFR C677T та MTRR A66G пов'язана з 3-х та 4-х кратним ризиком розвитку ДНТ. Також гомозиготний генотип A66G може супроводжуватися низькими рівнями кобаламіну, у зв'язку з чим, для матерів ризик підвищується майже у 5 разів. Таким чином, поліморфізм MTRR A66G може збільшувати ризик розвитку ДНТ у популяції українців як незалежно, так і у поєднанні з іншими мутаціями та зовнішніми факторами.

Таким чином, поєднання поліморфних варіантів генів MTHFR та MTRR, обумовлюючи різну функціональну активність білкових продуктів, можуть впливати на спектр біохімічних реакцій у ході фолатного циклу. Така особливість при розподілі компаундів може служити предметом наступних фено-генотипових зіставлень.

Була висунута гіпотеза про взаємозалежний вплив поліморфізмів у компаунді на пристосованість особи: приєднання поліморфізму A66G MTRR

Hmzg до С677Т МТНFR Htzg підвищує пристосованість особини з довірчою ймовірністю 95%. Внаслідок взаємної компенсації мутантних алелів компаунд С677Т МТНFR Htzg / А66G MTRR Hmzg підтримується природним відбором.

Поєднання поліморфізмів С677Т МТНFR та А66G MTRR може виявлятися інакше, ніж просто сума ефектів дії кожного з них. Їх спільний вплив призводить до посилення, або, навпаки, до компенсації фенотипових проявів кожного окремо і, таким чином, впливає на виживання особин із різноманітними компаундними генотипами, і, як наслідок, спричиняє їх нерівноважний розподіл. Із цього виходить, що вивчення поширеності в Україні поліморфізмів С677Т МТНFR, А66G MTRR, їх компаундів та взаємовплив є актуальним для діагностики гіпергомоцистеїнемії, її корекції, виділення груп ризику та адекватного їх спостереження.

Розділ IV КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХВОРИХ ІЗ МТХД

4.1. Загальна характеристика обстежених пацієнтів

Мітохондріальна дисфункція в сучасному розумінні – це патологічний неспецифічний процес, який може виникнути при різних видах патології, до яких приводять різні патогенетичні фактори, і цей процес стає невід’ємною частиною патології. Мітохондріальна дисфункція може бути як первина, так і вторинна, така, що входить до складу багатьох синдромів. Оскільки від узгодженої роботи мітохондріальних ферментів залежить все енергопостачання клітини, будь-який дефект однієї із ланок цього ланцюга буде призводити до енергетичної недостатності (недостатності виробки АТФ в циклах клітинного дихання). Чим більш залежні тканьові елементи органів від аеробного дихання, тим вище його уразливість. Головні біохімічні процеси, порушення яких може призводити до розвитку клінічної картини мітохондріальних порушень, відбуваються в циклі трикарбонних кислот (цикл Кребса), карнітиновому циклі, окисленні жирних кислот, транспорті електронів у дихальному ланцюгу і окислювальному фосфорилуванні. Нині стало відомо, що спектр зв’язку мітохондріальних порушень із різними патологічними станами поширюється, доказаний внесок порушення окислення жирних кислот у розвиток гіпоглікемії у дітей, синдрому раптової смерті.

Діагностика мітохондріальної дисфункції була проведена на підставі клінічних, біохімічних, молекулярно-генетичних і морфологічних показників. Оскільки МТХД є наслідком мутацій як ядерного, так і мітохондріального геному, то і успадкування характеризувалось різними варіантами: аутосомно-домінантним, аутосомно-рецесивним, Х-зчепленим, материнським, спорадичним. Загалом, передача патогенних мутацій мітохондрій відбувається через

цитоплазму яйцеклітини. В останні роки була з'ясована вірогідність розвитку хвороби від сполучення генетичного поліморфізму і несприятливих факторів зовнішнього середовища. Поняття генетичного поліморфізму визначається, як наявність двох і більше альтернативних варіантів генів, які зустрічаються в популяції з частотою не менше 1-5%. В геномі людини генетичний поліморфізм, також як і мутації, в 95% випадків обумовлений одонуклеотидними замінами SNP (single nucleotide polymorfism – одонуклеотидний поліморфізм). Важливою особливістю цих замін є те, що деякі з них асоційовані із спадковою схильністю людини до того чи іншого захворювання.

Таким чином, враховуючи ряд факторів, таких, як швидкість розвитку патологічного процесу в мітохондріях, різну ступінь і полісистемність ураження органів і систем, генетичну гетерогенність, зростаючу частоту, а також можливість етіопатогенетичної терапії – роблять мітохондріальні дисфункції доступними для адекватної профілактики, своєчасної терапії і реабілітації (Н.Г. Даниленко).

Для проведення клініко-генетичної оцінки хворих із клінічно значущим порушенням енергетичного обміну були відібрані: група пацієнтів з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції, яка склала основну групу ОГ1 – 203 пацієнта; основна група 2 (ОГ2) – 37 хворих із молекулярно підтвердженою мутацією мітохондріальної ДНК (поліморфізмами мітохондріальної ДНК); основна група 3 (ОГ3) – 91 пацієнт із ознаками порушеного реметилування метіоніну, підтвердженого молекулярно-генетичним і біохімічним дослідженнями; основна група 4 (ОГ4) – 75 пацієнтів із клінічно встановленими нозологічними формами МТХД (мітохондріальною енцефалопатією – 31, MERRF синдромом – 3, DIDMOAD синдромом – 1, MELAS – 9, Leigh синдромом – 6, MNGIE – 11, синдромом Кернса-Сейра – 7, Менкеса – 2, Лебера – 4); і контрольна група (КГ) – 142 особи без ознак мітохондріальної дисфункції.

Загальна характеристики досліджених груп представлена в табл. 4.1.

Якісний склад досліджених груп пацієнтів

Групи					
Кількість пацієнтів (%)	КГ	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
загальне	142 (100%)	203 (100%)	37 (100%)	91 (100%)	75 (100%)
чоловіків	78 (54,93%)	113 (55,67%)	14 (37,84%)	39 (42,86%)	34 (45,33%)
жінок	64 (45,07%)	90 (44,33%)	23 (62,16%)	52 (57,14%)	41 (54,67%)
у віці до 11 років	61 (42,96%)	108 (53,20%)	17 (45,94%)	42 (46,15%)	42 (56%)
у віці від 12 до 17 років	33 (23,24%)	52 (25,62%)	13 (35,14%)	15 (16,48%)	15 (20%)
у віці від 18 до 35 років	39 (27,46%)	32 (15,76%)	7 (18,92%)	29 (31,87%)	15 (20%)
старше 35 років	9 (6,34)	11 (5,42%)	0 (0%)	5 (5,5%)	3 (4%)

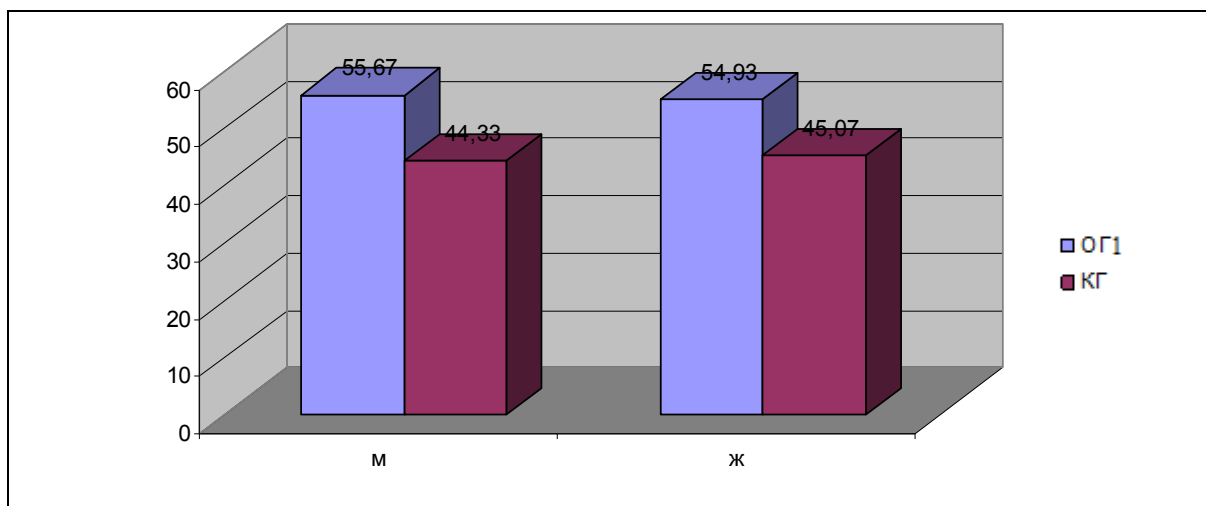
При порівнянні даних груп по зацікавленим ознакам був виконаний аналіз однорідності груп по статі й віку з використанням χ^2 критерію. Для перевірки однорідності за віком усі розглянуті групи були розбиті на 4 вікові категорії: до 11 років, від 12 до 17 років, від 18 до 35 років, старше 35 років. Результати розрахунків критерію χ^2 для перевірки однорідності груп по статі представлені в табл. 4.2.

Значення критерію χ^2 для порівняння груп на однорідність статі

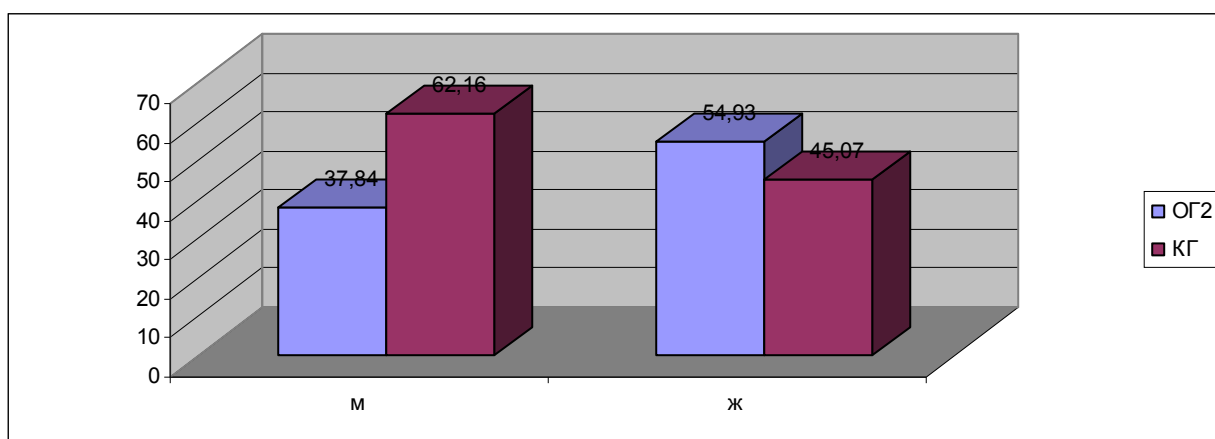
Групи	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
КГ	0,018	3,432	3,233	1,81
ОГ2	-	-	0,273	-

Оскільки усі значення $\chi^2 < \chi_{0,95}^2(1) = 3,841$, то розглянуті пари груп однорідні по статі.

Гістограми розподілу частот по статі представлені на рис. 4.1.



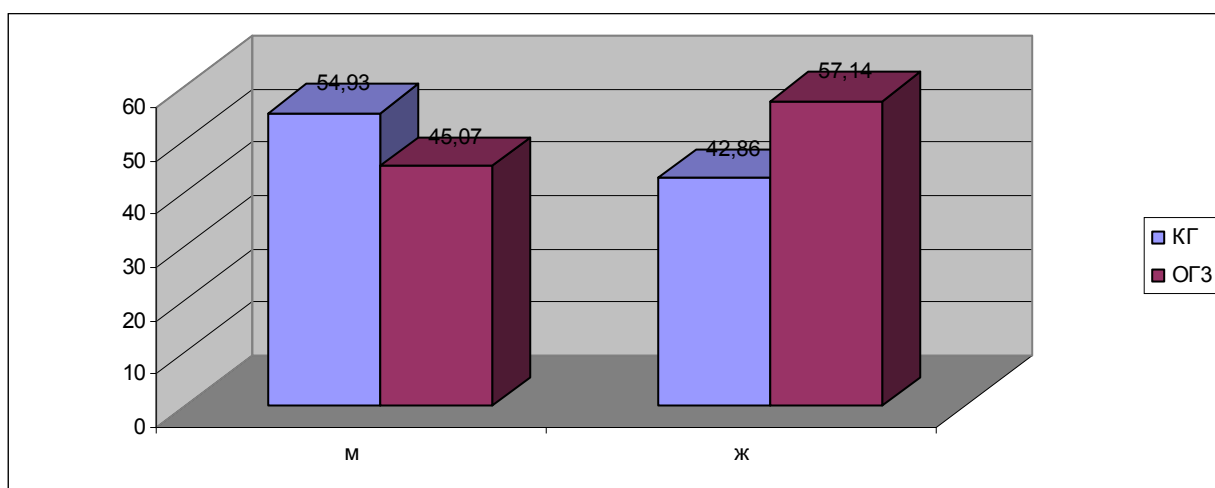
а)



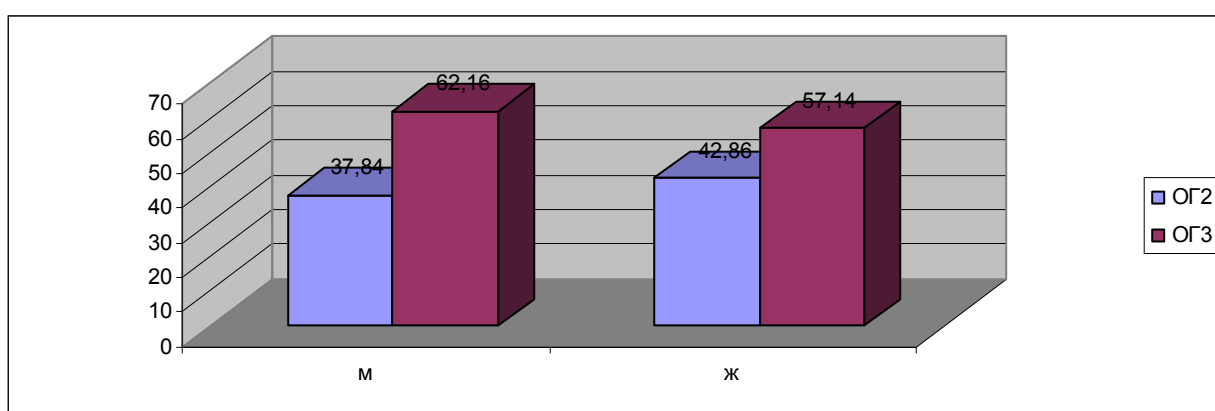
б)

Рис. 4.1. Гістограми розподілу частот (%) по статі:

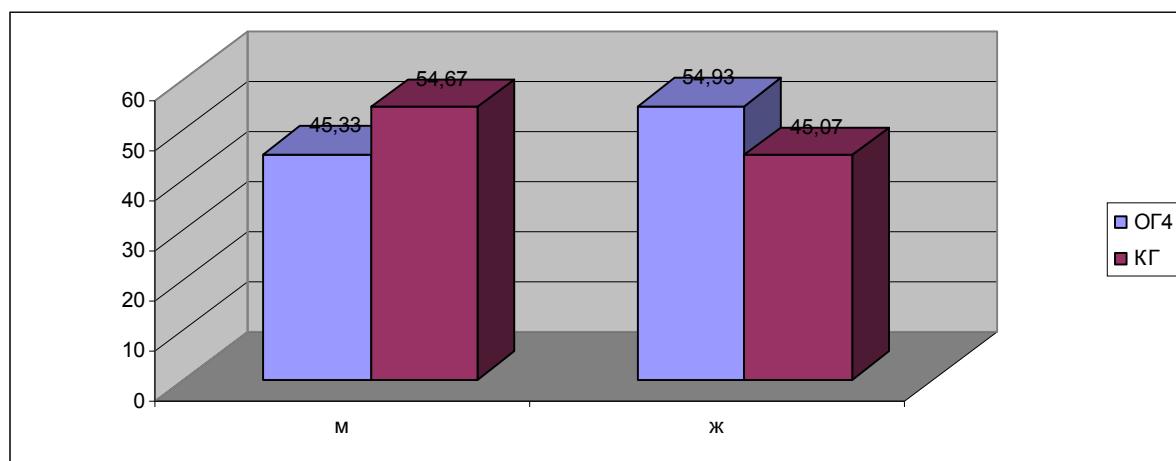
а) ОГ1 і КГ; б) ОГ2 і КГ



в)



г)



д)

Рис. 4.1. Гістограми розподілу частот (%) по статі:

в) ОГ3 і КГ; г) ОГ2 і ОГ3; д) ОГ4 і КГ

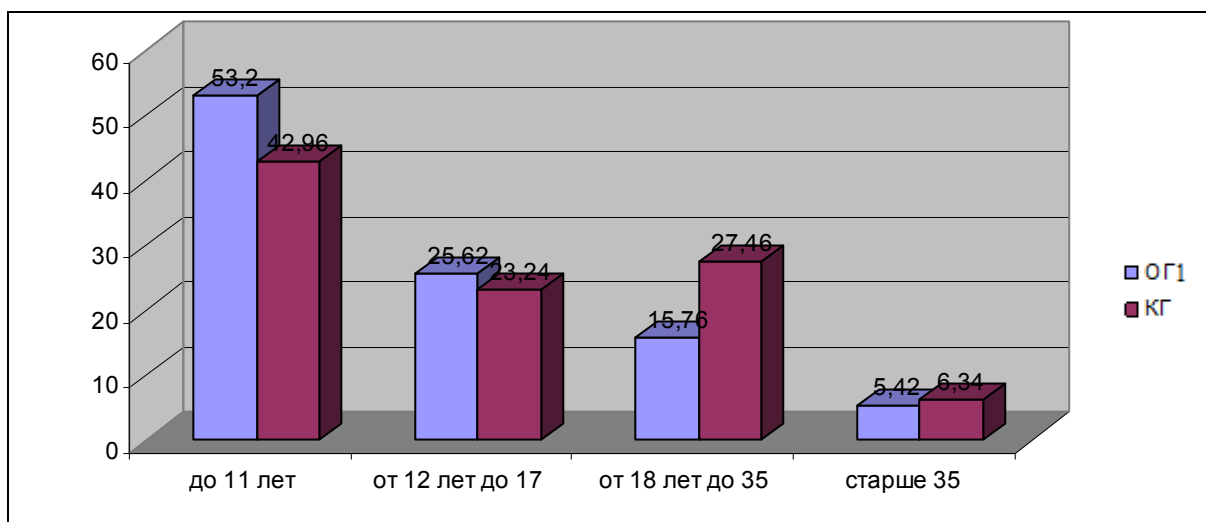
Результати розрахунку критерію χ^2 для перевірки однорідності груп по віку представлені в табл. 4.3

Таблиця 4.3

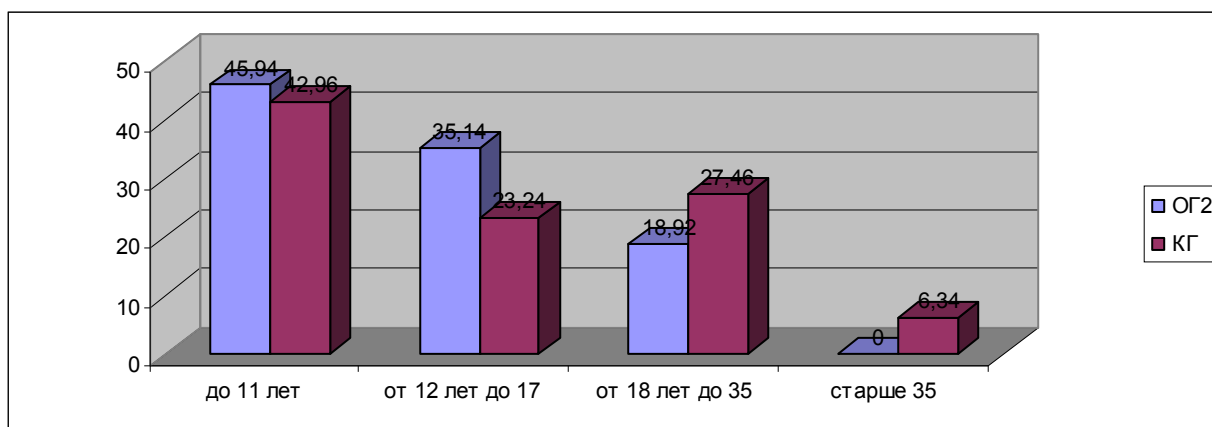
Значення критерію χ^2 для порівняння груп на однорідність по віку

Групи	ОГ1	ОГ2	ОГ3	ОГ4
КГ	7,662	4,856	1,791	3,576
ОГ2	-	-	7,785	-

Оскільки усі значення $\chi^2 < \chi_{0,95}^2(3) = 7,815$, то аналізовані пари груп однорідні за віком. Гістограми розподілу частот по віковим категоріям представлені на рис.4.2.

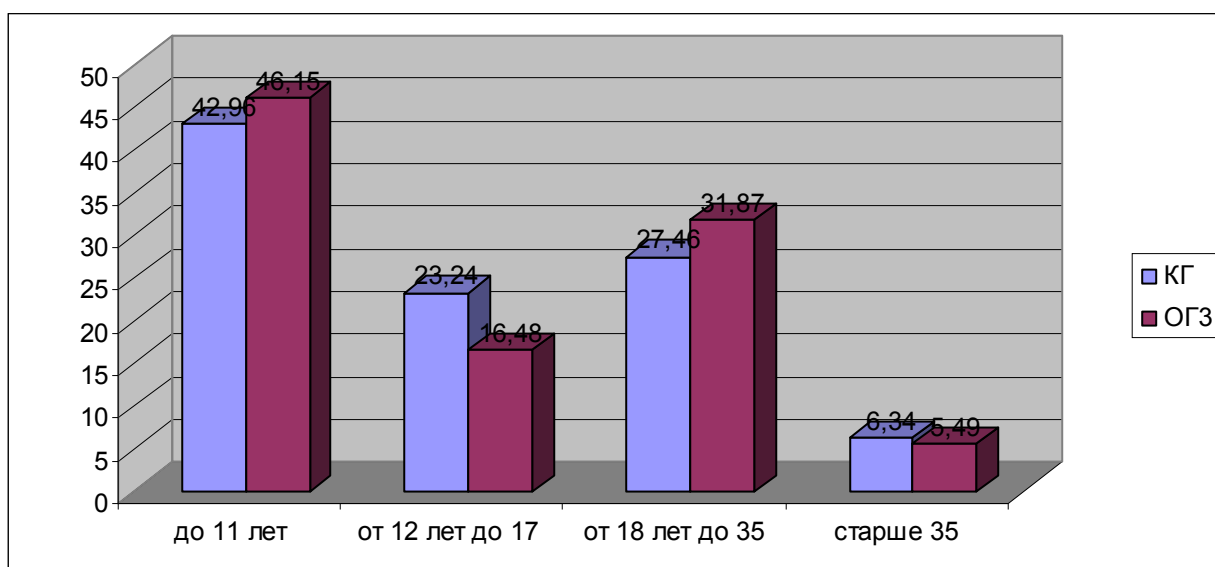


а)

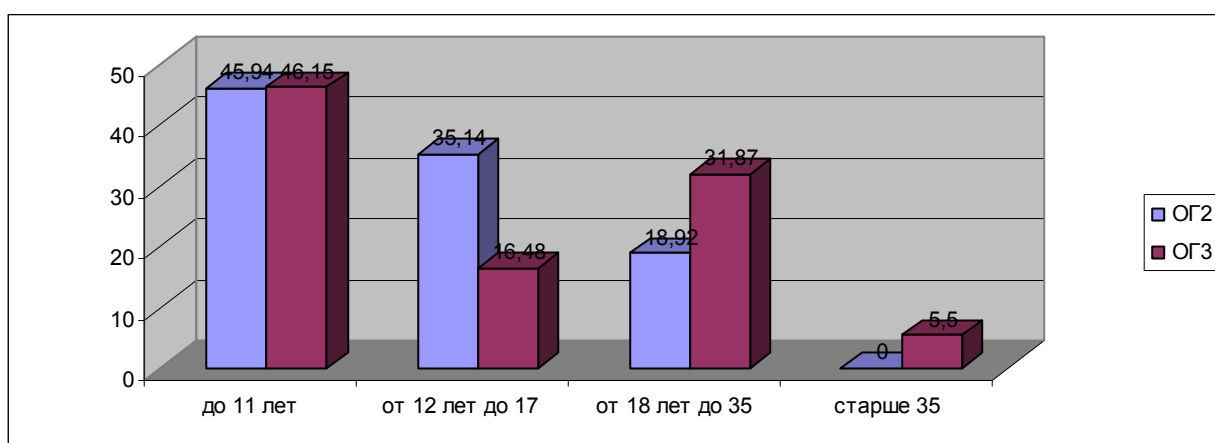


б)

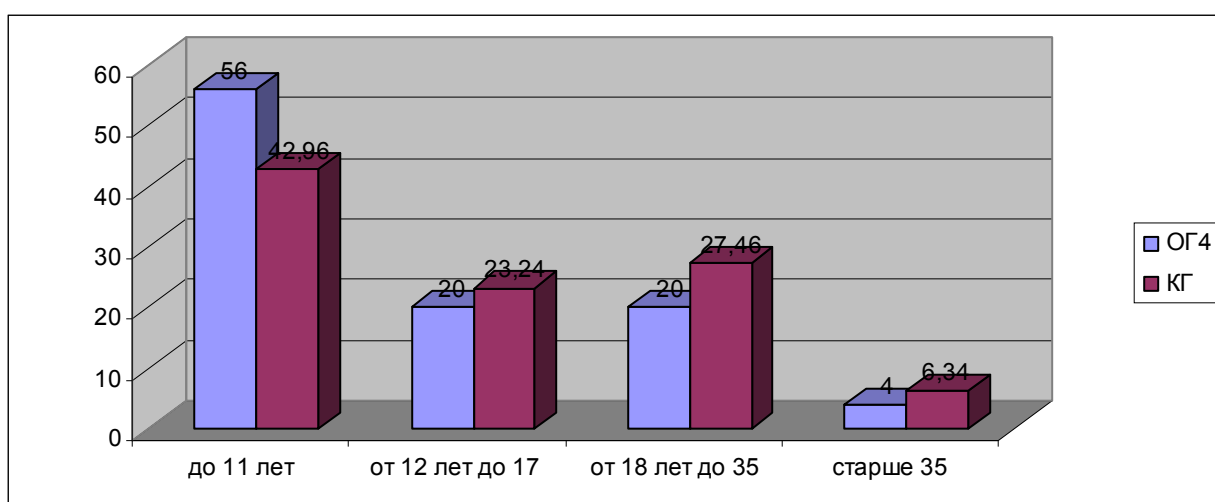
Рис. 4.2. Гістограми розподілу частот (%) по віковим категоріям:
а) ОГ1 і КГ; б) ОГ2 і КГ



в)



г)



д)

Рис. 4.2. Гістограми розподілу частот (%) по віковим категоріям:

в) ОГ3 і КГ; г) ОГ2 і ОГ3; д) ОГ4 і КГ

Таким чином, розподіл груп за статтю і віком відповідає вимогам доказовості висновків по цим критеріям.

4.1.1. Клінічні ознаки виявлених МТХД

Ретельне вивчення скарг, анамнезу хвороби і життя обстежених хворих було основою для пошуку порушень енергетичного обміну. Даючи оцінку отриманим даним, відмітимо головні характеристики. Так, скарги були викликані одночасним ураженням різних органів і систем і підтверджували порушення, перш за все, енерготропних органів – сітківки, нервової системи, м'язів, серця, нирок.

В уражених індивідів виявлені різні комбінації нервово-м'язових та інших симптомів, які втягували різні незалежні системи органів, що можна пояснити тканинспецифічною експресією визначеного генетичного дефекту. Перебіг хвороби варіював. Але у всіх випадках відмічений прогресивний перебіг. Дефекти дихального ланцюга проявлялись у будь – якому віці. Внутрішньоутробний розвиток був серйозно порушений, що призводило до тяжкої внутрішньоутробної гіпотрофії і вад розвитку мозку. У маленьких дітей часто (до 87%) проявлялась енцефаломієлопатія, у дорослих – міопатія.. Встановлені різні варіанти МТХД моногенної природи, які супроводжувались типовими сполуками ознак і характеризувались клінічним поліморфізмом.

Аналіз фенотипу пацієнтів з МТХД виявив найбільш значущі зміни у м'язовій та нервовій системі. Ураження м'язової системи притаманне мітохондріальній патології, бо саме вона є найбільш енерготропною системою. Клінічно спостерігалась різна ступінь м'язової гіпотонії, в окремих випадках – дистонії. Морфологічно ці клінічні ознаки характеризувались симптомом “червоних рваних волокон”, при поляграфічному дослідженні в таких випадках відмічалось зниження ферментної активності, при електронній мікроскопії – структурні і кількісні зміни мітохондрій, які супроводжувалися м'язовою слабкістю, підвищеною стомлюваністю, дифузними м'язовими болями, атрофією і гіпотрофією м'язів. Такі зміни в ОГ1 знайдені у 103 (60,10%) пацієнтів, тоді як в КГ – лише 17 (11,97 %) осіб мали слабке ураження м'язів (рис. 4.3 а, б, в). Знайдені зміни підтверджені статистичними розрахунками і

демонструють різницю фенотипових ознак між основною і контрольною групами (табл. 4.4, рис. 4.3–4.7).

Рисунок 4.3 яскраво демонструє різницю фенотипових ознак в ОГ1 і КГ: найчастіше було ураження у обстежених хворих із МТХД енерготропних органів – нервової, сечовидільної систем та м'язів (коефіцієнти Крамера (0,37, 0,40 та 0,48) відповідно).

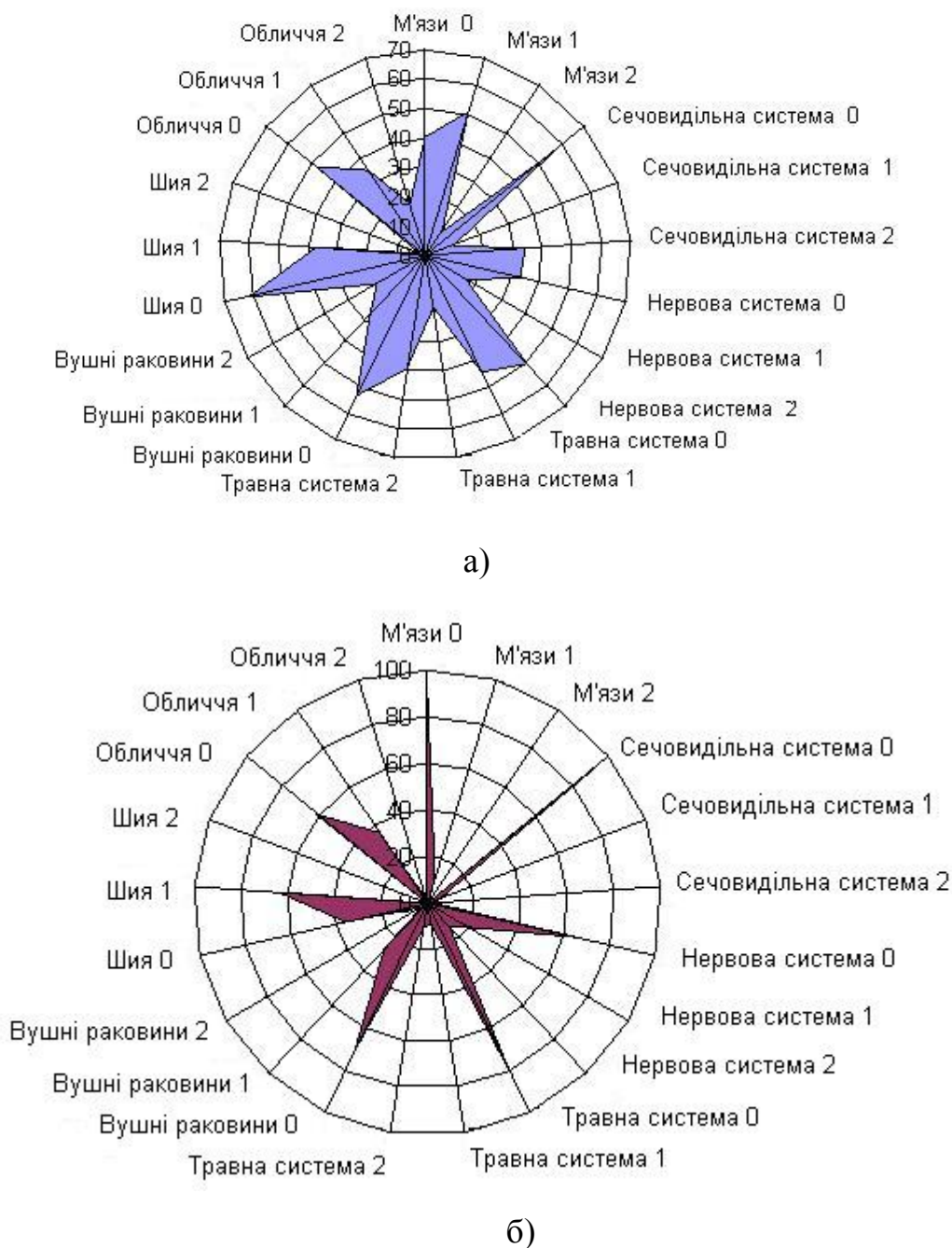


Рис. 4.3. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (м'язи, сечовидільна система, нервова система, травна система, вушні раковини, шия, обличчя) порівнюваних груп ОГ1 і КГ: а) діаграма ОГ1; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.3. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (м'язи, сечовидільна система, нервова система, травна система, вушні раковини, шия, обличчя) порівнюваних груп ОГ1 і КГ: в) діаграми ОГ1 і КГ

Таблиця 4.4

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,5}$ «м'язи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,5}$	0	81 (39,9%)	125 (88,03%)	206 (127,93%)	81,80	0,49
	1	103 (50,74%)	17 (11,97%)	120 (62,71%)		
	2	19 (9,36%)	0 (0%)	19 (9,36%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.5

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,1}$ «нервова система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{2,1}$	0	68 (33,5%)	92 (64,79%)	160 (98,29%)	49,62	0,38
	1	33 (16,26%)	30 (21,13%)	63 (37,39%)		
	2	102 (50,24%)	20 (14,08%)	122 (64,32%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.6

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,5}$ «сечовидільна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{2,5}$	0	113 (55,67%)	131 (92,25%)	244 (147,92%)	57,21	0,41
	1	21 (10,34%)	7 (4,93%)	28 (15,27%)		
	2	69 (33,99%)	4 (2,82%)	73 (36,81%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.7

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,4}$ «травна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{2,4}$	0	89 (43,84%)	114 (80,28%)	203 (124,12%)	47,43	0,37
	1	35 (17,24%)	13 (9,16%)	48 (26,40%)		
	2	79 (38,92%)	15 (10,56%)	94 (49,48%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Поглиблене вивчення стану центральної нервової системи у обстежених пацієнтів дозволило знайти широкий діапазон змін, який свідчить, з одного боку, про діагностичну значущість клінічних ознак ураження ЦНС для діагностики МТХД, з другого – про певну специфічність, притаманну мітохондріальним дисфункціям .

Оцінка неврологічного статусу як в основній, так і в контрольній групах проводилась за допомогою клінічних, нейрофізіологічних та візуальних методів пошукувачем (як генетиком і неврологом), а в складних випадках обговорювалась на засіданні експертної ради за участю к.м.н, доцента Л.В. Молодан – ведучого нейрогенетика установи.

Був проведений аналіз неврологічного статусу в обстежених групах.

Проведений аналіз показав, що більшість хворих - 193 (95,07 %) з МТХД мали скарги з боку як центральної, так і периферійної нервової системи.

Найбільш часто пацієнти відмічали слабкість, стомлюваність та нетерпимість фізичних навантажень, які мали місце у 81 (39,9%), 78 (30,42%) та 94 (46,30%) хворих відповідно. Проведений аналіз показав, що нетерпимість фізичних навантажень є важливою ранньою ознакою мітохондріальної дисфункції, вона передувала розвитку слабкості, підвищеній втомлюваності.

55 (27,09%) хворих турбувала загальна слабкість, 14 (6,89%) – слабкість у ногах, 2 (0,9%) – слабкість у руках. У 4 (1,97%) хворих відмічалась пароксизмальна м'язова слабкість.

З високою частотою зареєстрований головний біль, який мав місце у 81 (39,9%) хворого. При цьому дифузний характер головного болю відмічений у 44 (21,67%) хворих, біль у лобно-скриневих ділянках – у 30 (14,77%), в області тім'ячка – у 5 (2,46%), в зоні потилиці – у 8 (3,94%). Гемікранія, мигренеподібний головний біль, мала місце у 4 (1,97%) хворих.

У 45 (22,16%) хворих головний біль супроводжувався важкістю в голові, почуттям тиску на очні яблука, нудотою, блювотою у 30 (14,77%), 25 (12,31%) і 17 (8,37%) відповідно.

Скарги на судоми мали місце у 46 (22,66%) хворих.

Вони були представлені поліморфними приступами, генералізованими нападами, міоклонусами, абсансами у 7 (3,44%), у 23 (11,33%), у 11 (5,41%), у 9 (4,43%) хворих відповідно.

Енурез мав місце у 10 (4,92%), логоневроз- у 2 (0,98%), сногворіння у 3 (1,47%), невроз нав'язливих рухів- у 2(0,98%), афективно-респіраторні напади – у 2 (0,98%) . Синкопальні стани відмічені у 6 (2,95%) хворих.

На затримку психомоторного розвитку у дитини скаржилось 47 (23,15%) батьків хворих, на розумову відсталість – 12 (5,91%).

З високою частотою зареєстровані скарги на порушення емоційно-вольової сфери, які були представлені емоційною лабільністю 67 (33%), депресивними та фобічними станами 6 (2,95%) та 3 (1,47%) відповідно, агресивністю 4, неадекватністю поведінки тощо.

Скарги на головокружіння пред'являли 19 (9,35%) пацієнтів, на хиткість при ходьбі 13 (6,4%), приступи втрати свідомості 6 (2,95%).

Порушення формули сну мали місце у 12 (5,91%) хворих.

У 5 (2,46%) пацієнтів мали місце скарги на приступи “дурнотного” стану, що супроводжувалися почуттям нестачи повітря, серцебиттям, страхом смерті, внутрішнім тремтінням, підвищенням артеріального тиску, поліурією наприкінці приступу.

35 (17,24%) пред’являли скарги на зниження гостроти зору, 2 (0,98%) – слуху.

Проведений аналіз показав, що зміни в неврологічному статусі мали 135 (66,50 %) хворих (табл. 4.5, діаграма 3) та 50 осіб (35,21%).

Зміни з боку черепно-мозкової інервації були представлені:

– послабленим актом конвергенції – у 124 (61,08%) хворих з птозом – 11 (5,4%),

– офтальмоплегією – 5 (2,46%), страбізмом – 18 (8,8%), ністагмом – 16 (7,8%), симптомом Манна – 39 (19,2%), симптомом Грефе – 2 (0,98%), екзофтальмом – 5 (2,46%), енофтальмом – 1 (0,49%), зниженням гостроти зору – 35 (17,2%), ураженням VIII пари – 2(0,98%), бульбарні порушення мали місце у 2 (0,98%) хворих.

З високою частотою у хворих на МТХД виявлені тонусні порушення, які мали місце у 121 (59,6%) пацієнта і були представлені у більшості випадків м’язовою гіпотонією. М’язова гіпотонія у 80 (39,4%) хворих носила дифузний характер, у 6 (2,95%) пацієнтів відмічене зниження м’язового тону у нижніх кінцівках, у 5 (2,46%) – верхніх кінцівках, у 1 (0,49%) пацієнта відмічено зниження тону в руках і підвищення в ногах. Підвищення м’язового тону за пластичним типом відмічене – у 7 (3,44%), за спастичним типом – у 9 (4,43%). Підвищення тону за гемітипом мало місце у 3 (1,47%) хворих. 6 (7,88%) пацієнтів відмічені тонусні порушення дистонічного характеру, коли гіпотонія змінювалась гіпертонусом. Парези мали місце у 16 (7,88%) хворих, геміпарез у 3 (1,47%) хворих, тетрапарез у 6 (2,95%) хворих.

Парези периферійного типу відмічені у 10 (4,92%) хворих.

Пірамідна симптоматика мала місце у 57 (28,07%) пацієнтів, у 43 (21,18%) вона носила двобічний характер, у 3 (1,47%) за гемітипом.

Сенсорні порушення зафіксовані у 8 (3,94%) хворих. Вони були представлені поліневритичним типом порушення чутливості у 5 (2,46%) пацієнтів. Гемігіпостезія мала місце у 2 (0,98%) хворих, парестезії – у 1 хворого.

Рідко зустрілися прояви вестибуло-атактичного та мозочкового синдрому, вони зафіксовані у 19 (9,35) та 2 (0,98%) хворих відповідно.

Епісиндром мав місце у 46 (22,66%) хворих. Він був представлений поліморфними приступами у 7 (3,44%) хворих, генералізованими нападами у 19 (9,35%), які носили клоніко-тонічний характер у 14 (6,89%), клонічний характер у 2(0,98%), тонічний характер – у 4 (1,97%) хворих. Джексоновські моторні приступи відмічені у 2 (0,98%)хворих. Абсанси та міоклонуси мали місце у 9 (4,43%) та 11 (5,41%) хворих відповідно.

Мнестичні та інтелектуально-мнестичні порушення мали місце у 6 (2,95%) та 17 (8,37%) хворих відповідно. Затримка психомоторного розвитку відмічена у 47 (23,15%) дітей.

З високою частотою відмічені порушення емоційно-вольової сфери та розлади поведінки: астено-невротичний синдром у 67 (33%), астено-депресивний синдром у 6 (2,95%), фобічний синдром у 3 (1.47%), рухова розгальмованість у 12 (5,91%), агресивність у 4(1.97%).

Відмічений прогредієнтний перебіг захворювання у 89% хворих, у 9% мав місце кризовий перебіг хвороби з розвитком метаболічної кризи.

Міопатичний симптомокомплекс та його прояви зареєстровані у 80 (39,4%) хворих.

Таким чином, ураження нервової системи при МТХД зустрічались з високою частотою, відрізнялись клінічним поліморфізмом проявів та конгломератом змін, рано маніфестували, мали прогредієнтний перебіг. Ранніми ознаками були нетерпимість фізичних навантажень, м'язові порушення, загальна слабкість, підвищена стомлюваність, які здебільшого передують іншим симптомам ураження нервової системі і є маркерною ознакою порушення енергетичного обміну. Ранніми проявами з боку неврологічного статусу були тонусні порушення, які у більшості випадків були

представлені дифузною м'язовою гіпотонією як ранній прояв міопатичного симптомокомплексу. З високою частотою мали місце зміни з боку черепно-мозкової іннервації, у тому числі і глазо-рухові порушення, прояви цефалгічного лікворно-гіпертензійного, епілептиформного синдромів, порушення емоційно-вольової сфери, пірамідною симптоматикою, затримкою темпів психомоторного розвитку тощо.

При дослідженні сечовидільної системи в ОГ 1 були отримані дані про її ураження у 90 (44,34%) пацієнтів, тоді як у КГ – лише у 11 (8,75%), що відповідає клінічній характеристиці мітохондріальних захворювань. Сечовидільна система при МТХД найбільш часто вражається у вигляді симптомокомплексу Фанконі, а також різних функціональних порушень нирок – гематурії, початкових ознак сечокам'яної хвороби (рис. 4.3).

При дослідженні шлунково-кишкової системи були отримані свідчення про ураження у 114 (56,16%) пацієнтів із МТХД, тоді як серед осіб КГ – лише у 28 (19,72%). Отримані результати свідчать про значне залучення до патологічного процесу травної системи при МТХД. Зміни травної системи при клінічному обстеженні носили різноманітний характер, що, на нашу думку, частіше за все зумовлено слабкістю гладких м'язів, і, в окремих випадках, ендотеліальною дисфункцією. Відмічені гастропатії, порушення функції підшлункової залози у вигляді проносів, блювоти, метеоризма, “пустої” прямої кишки (мітохондріальний панкреатит), зміни функції печінки на тлі підвищених амінотрансфераз, гепатомегалії, гепатоза.

Генералізоване порушення травлення пов'язане з мітохондріальною дисфункцією – нейро-шлунково-кишковою енцефалопатією. При цьому захворюванні дебют кишкових симптомів спостерігався у дитячому або у постпубертатному періоді і виявлявся у вигляді хронічної діареї, стазу, нудоти і блювання, що призводило до виснаження і кахексії. За даними 158 при цьому спостерігається втрата подовжнього шару м'язової оболонки, утворення і розриви дивертикулу, кишкова склеродерма і випадки псевдонепрохідності. Електрофізіологічні дослідження виявляють захворювання нервової системи і

внутрішніх органів поряд з недостатністю провідності; біохімічно має місце лактат-ацидоз. Позакишкові симптоми відзначались різноманітністю, однак усі вони були характерними для МТХД. Цей факт підтверджує і 159. При цьому синдромі, крім ураження ШКТ, відзначалась затримка росту; з боку головного мозку - лейкоцистоз, атаксія. У процесі розвитку хвороби розвивалась офтальмоплегія, птоз, нейросенсорна глухота. У процес залучались черепно-мозкові нерви, їхня поразка супроводжувалась дизартрією, дисфонією, прозопоплегією, нерідко розвивалась блокада серця. У хворих спостерігалась нестерпність фізичних навантажень, слабкість і рвани «червоні волокна», виявлені при біопсії м'язів.

Встановлено, що при синдромі MNGIE спостерігаються множинні делеції ДНК, мутація локалізована на хромосомі 22q. Рецидиви у сибсів, висока частота споріднення батьків та відсутність передачі мутації від батьків потомству під час розмноження – усе це відповідає аутосомно-рецесивному типу спадкування [160].

Наведене власне спостереження свідчить про складність своєчасної діагностики через відсутність обізнаності лікарів про наявність мітохондріального генезу уражень травної системи:

Хвора С., 1972 р. народження, направлена до ХСМГЦ з діагнозом: хронічний панкреатит із зовнішньосекреторною недостатністю в стадії загострення. Хронічний коліт із синдромом мальабсорбції. Дисбактеріоз 2 ст. Хронічний гастродуоденіт, дуоденогастральний рефлюкс. Хронічний холецистит з гіпомоторною ДЖВШ. Вторинна залізодефіцитна анемія. Кахексія 4 ст. Пропалс мітрального клапану 1-2 ст., дві аномальні хорди у лівому шлуночку. Хронічний пієлонефрит.

Скарги: різке прогресуюче зниження ваги (на 30 кг протягом 7 років), біль в епігастральній та мезогастральній ділянках, метеоризм, різка загальна слабкість, зниження працездатності, швидка втомлюваність.

Анамнез хвороби. Вважає себе хворою з 1998 р. (до цього періоду вага складала 60-65 кг), коли вперше з'явилися болі в епігастральній ділянці та

лівому підребр'ї, атонія кишкового тракту. Початок захворювання зв'язує з тривалим лікуванням антибіотиками з приводу аднекситу. Спостерігалася у гастроентеролога з діагнозом: хронічний панкреатит. Пройшла кілька курсів стаціонарного лікування в гастроентерологічному відділенні без ефекту.

Анамнез життя: народилася від 2-ї вагітності, 2-х термінових пологів, з масою 3500. З перенесених захворювань відзначає ОРЗ, краснуху, тонзилектомію, хронічний пієлонефрит, бронхіт, холецистит. Менструації з 13 років, регулярні до 1998 р., протягом останніх 1,5 років – аменорея. Вагітність у 1995 р. – термінові пологи, хлопчик часто хворіє ОРЗ, спостерігається у невропатолога з діагнозом: гіперкінетичний синдром.

Родовід обтяжений мультифакторіальною патологією (гіперкінетичний синдром, гіпертонічна хвороба, хронічний гастрит).

Фенотип: зріст 166 см, вага 35 кг, виражена кахексія (рис. 4.4). Монголоїдний розріз очей, відстовбурчені вушні раковини, сколіоз грудного відділу хребта, міопія, астигматизм, множинні стрії.



Рис. 4.4. Синдром MNGIE

(Мітохондріальна нейро-шлунково кишкова енцефалопатія)

Дані додаткового обстеження:

ТСХ амінокислот крові: підвищення рівня серину, проліну, гліцину, аспарагінової кислоти.

Біохімічний аналіз крові: гіпоглікемія, зниження загального білка.

Абдомінальна ехографія: помірні дифузні зміни паренхіми печінки, низьке розташування жовчного міхура, ознаки панкреатопатії.

ФГДС: гіперемія нижньої третини стравоходу. Дуодено-гастральний рефлюкс. Еритематозна гастропатія. Еритематозна дуоденопатія.

Іригоскопія: хронічний коліт.

ЯМРТ: гіпотрофія кори головного мозку.

Невропатолог: психогенна анорексія.

Встановлено діагноз: мітохондріальна нейро-шлунково-кишкова енцефалопатія (MNGIE синдром).

Дане спостереження обговорене Міжнародним консилиумом у складі професора Р.Маталона (Техас, США) і професора О.Я.Гречаніної: діагноз MNGIE підтверджено. Призначено енерготропну терапію. Виробляється пошук мутації за допомогою молекулярного дослідження в США.

В отриманих статистичних характеристиках ОГ1 часто відмічаються черепно-лицеві аномалії, які відносяться до групи малих аномалій розвитку і часто відмічаються при МТХД, але не носять специфічний характер (рис. 4.5, а, б, в, табл. 4.8–4.10)

Ми припустили, що виявлені малі аномалії розвитку (МАР) в регіоні і в КГ є достатньо частими, підпадають у популяційну частоту в регіоні дослідження, відбиваючи генетичні характеристики популяції. Наведені МАР частіше зустрічаються в пацієнтів ОГ1. Разом з тим, деякі зміни обличчя (губи, ротова порожнина) частіше зустрічаються в КГ, що можна пояснити поширеністю сполучно-тканинних дисплазій у регіоні дослідження.



а)



б)

Рис. 4.5. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (область очей та очне яблуко, дихальна система, верхня та нижня щелепи, грудна клітка, підшкірна клітковина, хребет, губи і порожнина рота) порівнюваних груп ОГ1 та КГ:

а) діаграма ОГ1; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.5. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (область очей та очне яблуко, дихальна система, верхня та нижня щелепи, грудна клітка, підшкірна клітковина, хребет, губи і порожнина рота) порівнюваних груп ОГ1 та КГ:

в) діаграми ОГ1 и КГ

Таблиця 4.8

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,16}$ «шия»

Градация ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,16}$	0	125 (61,58%)	51 (35,92%)	176 (97,5%)	22,02	0,25
	1, 2	78 (38,42%)	91 (64,08%)	169 (102,5%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.9

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,7}$ «обличчя»

Градация ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,7}$	0	96 (47,29%)	87 (61,27%)	183 (108,56%)	21,9	0,252
	1	70 (34,48%)	52 (36,62%)	122 (71,1%)		
	2	37 (18,23%)	3 (2,11%)	40 (20,34%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.10

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,9}$ «область очей, очне яблуко»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,9}$	0	28 (13,79%)	33 (23,24%)	61 (37,03%)	18,63	0,233
	1	86 (42,37%)	78 (54,93%)	164 (97,30%)		
	2	89 (43,84%)	31 (21,83%)	120 (65,67%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		



а)



б)

Рис. 4.6. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (шкіра, верхня та нижня щелепи, зуби, статевая система, піднебіння, волосся, нігті) порівняльних груп ОГ1 та КГ: а) діаграма ОГ1; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.6. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (шкіра, верхня та нижня щелепи, зуби, статевая система, піднебіння, волосся, нігті) порівняльних груп ОГ1 та КГ: в) діаграми ОГ1 и КГ

Наступною фенотиповою ознакою, яка притаманна МТХД, були зміни з боку скелету. Так, грудна клітка була зміненою у 109 пацієнтів ОГ1 (53,69 %), проти 46 осіб КГ (32,39%). Ці дані свідчать про те, що при МТХД часто відмічаються деформації грудної клітки, що пов'язане із слабким м'язовим каркасом і вторинною сполучнотканинною дисплазією (рис. 4.5, а, б, в).

Таблиця 4.11

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,3}$ «дихальна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{2,3}$	0	156 (76,85%)	133 (93,66%)	289 (170,51%)	17,77	0,227
	1	19 (9,36%)	5 (3,52%)	24 (12,88%)		
	2	28 (13,79%)	4 (2,82%)	32 (16,61%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.12

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,17}$ «грудна клітка»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,17}$	0	94 (46,31%)	96 (67,61%)	190 (113,92%)	15,44	0,212
	1	70 (34,48%)	31 (21,83%)	101 (56,31%)		
	2	39 (19,21%)	15 (10,56%)	54 (29,77%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Таблиця 4.13

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,18}$ «хребет»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,18}$	0	78 (38,42%)	82 (57,75%)	160 (96,17%)	12,75	0,192
	1	20 (9,85%)	8 (5,63%)	28 (15,48%)		
	2	105 (51,73%)	52 (36,62%)	157 (88,35%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

При оцінці стану дихальної системи відзначено її ураження у 47 ((23,15%) пацієнтів ОГ1 проти 9 в КГ (6,13 %). Ці дані свідчать про схильність до частих застудних захворювань хворих з МТХД, яка зумовлена змінами з боку гладких м'язів.

Зміни шкіри і підшкірної клітковини знайдені у 164 пацієнтів з МТХД і 125 осіб КГ. Хоча значні зміни здебільшого спостерігались в ОГ1, що пов'язане із ураженням шкіри при МТХД, обумовленим зв'язком мітохондрій з процесами старіння клітин організму, зміни у контрольній групі також викликають увагу. Виходячи із досвіду ХСМГЦ, регіону дослідження притаманні рідкісні хвороби, пов'язані із екто- і мезодермальною дисплазією – факоматози (гамартози), які вперше в світі були описані одним із засновників

клінічної генетики С.М. Давиденковим ще в 1911 році саме на Слобожанщині. Через 60 років цей факт був підтверджений дослідженнями О. Я. Гречаніної та Л.В. Молодан.

Зміни з боку ендокринної системи, розбіжність у групах були незначною і не носили специфічного характеру.

Зміни з боку серцево-судинної системи носили приблизно однаковий характер в обох групах. Разом з тим, в ОГ1 ураження серцево-судинної системи були за клінічними ознаками більш важкими і уявляли собою структурні аномалії серця у вигляді кардіоміопатії, пролапса клапанів, додаткових хорд, так і функціональні аномалії у вигляді порушень ритму серця і блокад (табл. 4.13)

Таблиця 4.14

Таблиця спряженості за ознакою $\chi_0^{2,2}$ «ССС»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$\chi_0^{2,2}$	0	117 (57,63%)	93 (65,49%)	210 (123,12%)	9,57	0,167
	1	33 (16,26%)	31 (21,83%)	64 (38,09%)		
	2	53 (26,11%)	18 (12,68%)	71 (38,79%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Щодо ураження скелету при МТХД, то нами відмічені значні зміни, які носять прогресивний характер і охоплюють частіше за все хребет, грудну клітку та верхні кінцівки.

В останній час з'явилися дані про можливу причетність порушень енергетичного обміну до патології кістяка. Н.М. Емануель, Є.Б. Бурлакова, 2010 встановили нові механізми мембранолізу (цитолізу) і апоптозу (загибель ядра). Цими авторами був знайдений особливий вид ураження тканин - кальцифікуючий мембраноліз, при якому руйнуються кислі фосфоліпідні зовнішніх клітинних мембран, що призводить до вивільнення азотистих

компонентів фосфоліпідів (серин, етаноламін, фосфоетаноламін), відтворення надмірних кількостей оксалату і фосфату, вивільнення мембранозв'язуючого кальцію з наступною кальцифікацією м'яких тканин. Було показано, що таке явище присутнє при дизметаболических нефропатіях, інтерстиціальних нефритах, сечокам'яній хворобі й супроводжується появою в сечі речовин, які можуть призвести до каменеутворення в сечовиводячих шляхах (кальцій, оксалати, фосфати), а також сполук, що утворюють матрицю конкременту (метаболіти колагену, глікозаміноглікани), або кристалоутворення (перекиси ліпідів, лізофосфоліпідів) [161].

Процес супроводжується зниженням енергопродукції і утворенням інгібіторів кальцієвого кристалоутворення (неорганічні пірофосфати, АТФ і др.) і збільшеною активацією фосфоліпаз з утворенням множинних ліпідних медіаторів запалення і зниженням активності Са-Mg-АТФаз, [162].

Кальцифікуючий мембраноліз супроводжується активацією процесів пероксидації з підвищенням активності ксантинооксидази, яка 1-2 доби зберігається навіть при транзиторному підвищенні в крові паратгормона [163].

Таблиця 4.15

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,21}$ «нижні кінцівки»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ1	КГ			
$x_0^{1,21}$	0	109 (53,7%)	94 (66,2%)	203 (119,9%)	6,3	0,135
	1	59 (29,06%)	26 (18,31%)	85 (47,37%)		
	2	35 (17,24%)	22 (15,49%)	57 (32,73%)		
Σ		203 (100%)	142 (100%)	345 (200%)		

Аналіз ведучих клінічних ознак поліорганного ураження при МТХД дозволяє сформулювати клінічний континуум ознак мітохондріальної дисфункції на підставі наступних даних (рис. 4.7).

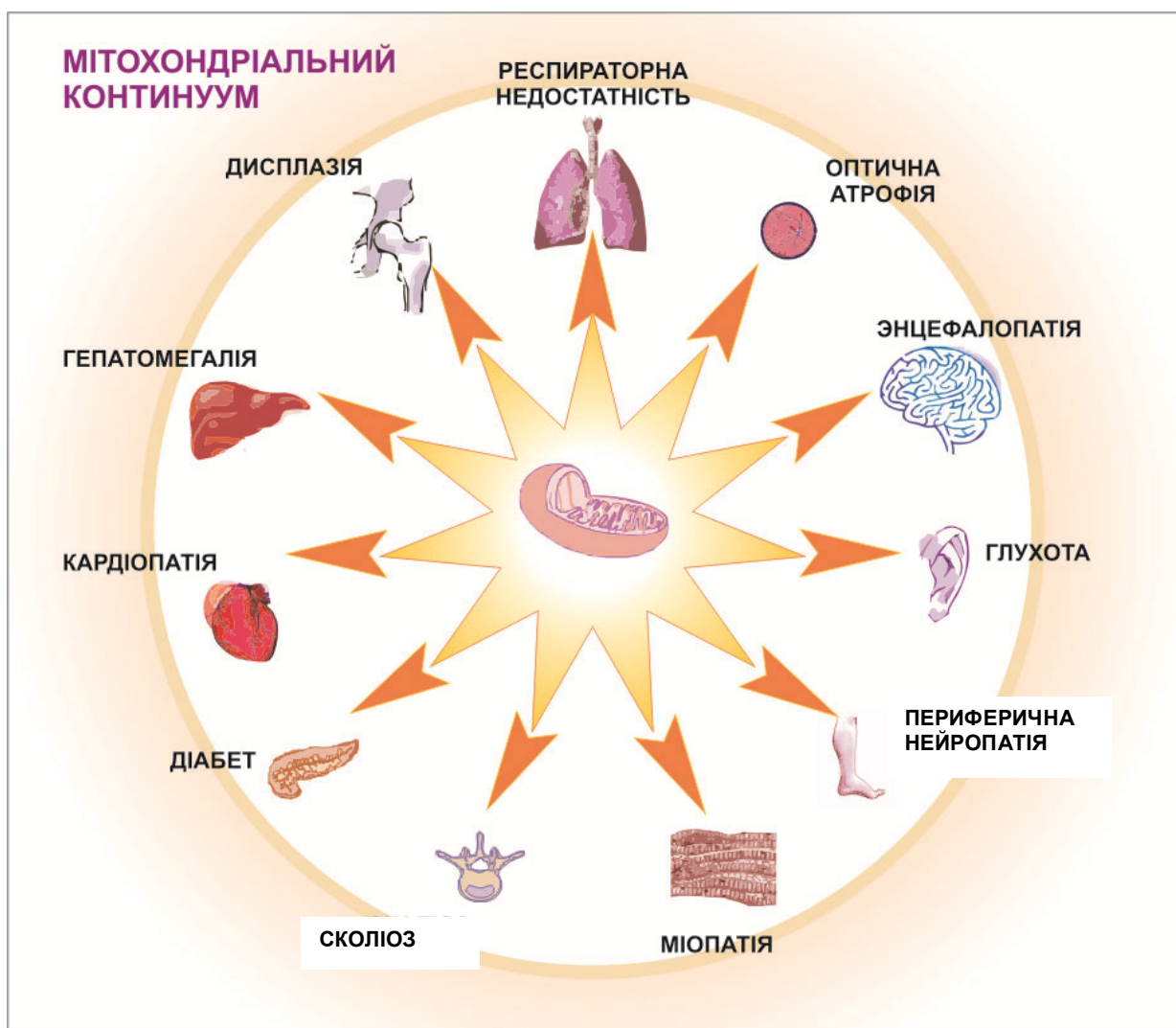


Рис. 4.7. Мітохондріальний континуум патологічних змін з боку органів хворого з порушенням енергетичного обміну (за В.П. Пузирьовим, 2007)

Найбільш частими клінічними ознаками (органопатії) при дефектах дихального ланцюга були:

– **ЦНС:** ураження мозку, пре-, перинатальна енцефалопатія у вигляді дегенеративних процесів у мозку – гліоз, гіпотрофія, судомний синдром – міоклонуси, епі-еквіваленти, резистентна до терапії епілепсія, полінейропатія, патологічні рефлекси, зниження чутливості, летаргія, кома, затримка психомоторного розвитку, деменція, атаксія, дистонія, «метаболічна криза», зменшення розмірів турецького сідла.

– **Очі:** птоз, амбліопія, офтальмоплегія, пігментний ретиніт, атрофія зорових нервів, ністагм, катаракта.

- **Серце:** кардіоміопатія, аритмії, порушення провідної системи серця.
- **Печінка:** прогресуюча печінкова недостатність, помірна гепатомегалія.
- **Селезінка:** спленоомегалія, неоднорідність паренхіми селезінки.
- **Нирки:** тубулопатія, нефрит, ниркова недостатність.
- **Шлунково-кишковий тракт:** рецидивуюча блювота, діарея, атрофія ворсин, порушення екзокринної функції підшлункової залози, хронічний панкреатит.
- **Ендокринна система:** низький зріст, цукровий діабет.
- **Кістковий мозок:** панцитопенія, макроцитарна анемія.
- **Шкіра:** раннє старіння, недостатній розвиток підшкірно-жирової клітковини.
- **Скелет:** аномалії розвитку, остеопороз, остеопенія.

Звертає на себе увагу клінічна ознака МТХД – зміна характеру обличчя – губ і порожнини рота, які викликані, здебільшого, м'язовою гіпотонією і формують гіпомімічне обличчя. Загалом, мало дослідників звертають увагу на характер виразу обличчя як діагностичну ознаку хвороби.

Якщо морфогенетичні особливості обличчя увійшли в медицину і клінічну генетику як суттєва ознака тієї чи іншої патології – моногенної чи хромосомної, то вираз обличчя в діагностичному пошуку спадкової патології ще недостатньо висвітлений.

Ми звернули увагу на те, що на тлі м'язової гіпотонії вій, губ, порожнини рота та шиї при МТХД формується характерна ознака – гіпомімічне обличчя. Сумарно ця ознака присутня майже у абсолютної кількості пацієнтів із МТХД (97%).

Клінічний випадок.

Хв.К, 18 років.

Скарги: на болі в хребті, колінних, ліктьових, плечових суглобах, скутість, швидко втомлюваність, слабкість, аменорею, затримку росту і статевого розвитку, деформацію хребта, грудної клітини.

Анамнез: Хвора від народження, батьки помітили набряк нижніх кінцівок, який через 2 тижні пройшов без лікування. Через рік дівчинка почала відставати у рості, психічно розвивалась з випередженням. Фізичний розвиток з 11 років характеризувався зниженням росто-вагових показників, інтелектуальний розвиток був високим. Психоемоційний розвиток також був нормальним. У 12-літньому віці була травма гомілкостопного суглобу, у зв'язку з чим лікувалася в стаціонарі. Через тиждень з'явилися болі в лівому гомілковостопному суглобі, які порушували ходьбу. Був встановлений діагноз хронічного артриту, дисгенезія гонад, мозаїчна форма синдрому Шерешевського-Тернера. Із перелічених захворювань у дитинстві відмічала ГРЗ, ексудативний діатез, травма лівої гомілки і лоба. У 1993 р. встановлений діагноз ревматоїдного артриту, суглобна форма, прогресуючий хронічний плин, хронічний тонзиліт. З 15 років, у зв'язку з первинною аменореєю, отримувала гормональне лікування, після чого з'явилися менструалоподібні виділення, в 18 років самостійно припинила гормональне лікування. В 19 років з'явилися зміни з боку хребта, кіфосколиоз, дифузний остеопороз, контрактури великих суглобів. Сформувалася вторинна кардіоміопатія, пролапс мітрального клапану. У 2004 р. був енергетичний перелом стегна, після чого різко з'явилася м'язова гіпотонія, остеопороз, дислокація С4 -С5, болі в суглобах і обмеження рухів у них. Хвора втратила здатність самостійно рухатись. Разом з ортопедами-травматологами проводилися реабілітаційні заходи, спрямовані на нормалізацію енергетичного обміну й обміну сполучної тканини. Останні характеризувались ураженням проміжного обміну глікозаміногліканів (мукополісахаридів). Запідозрене формування в хворої з мозаїчною формою синдрому Шерешевського-Тернера, вторинної мітохондріопатії, порушення обміну глікозаміногліканів.

При ехографії органів черевної порожнини відмічені периваскулярна інфільтрація в печінці, сполучнотканинні структури у перипортальній області, ознаки панкреатопатії, ознаки дуоденіту.

Нирки – двосторонній нефроптоз, диспластичні і метаболічні зміни, гідрокалікоз. При гінекографії: значна гіпоплазія матки, дисгенетичні яєчники.

Рентгенограма черепа і грудного відділу хребта (22.01.2002 р.): у грудному відділі виявлений кіфосколіоз Th6-T7, у Th8-th9 - частковий анкілоз, у сегментах С3-С7 і Th6-th10 – спонділоартроз і остеохондроз. На тлі дифузного остеопорозу відзначається завуальованість крижово клубових зчленувань. Кістки таза без особливостей.

При обстеженні: анемія (104 г/л до 116 г/л), ШОЄ від 20 до 50 мм/год.

При високоефективній рідинній хроматографії - зниження рівня гистидина і треоніна.

Біохімічний профіль: підвищення лужної фосфатази (209,1 О/л до 240,7 О/л) (при нормі до 104 О/л), підвищення холестерину до 66,58 ммоль/л, АСТ від 41,4 до 60,2; зниженням рівня альбуміну до 32,19.

Серомукоїди у динаміці – сіалові кислоти – 327-415-980 Од. (норма до 200), глікопротеїди – 0,74-0,79 (норма 0,25-0,45), кальцій – 2,3-3,0 ммоль/л (норма 2,2-3,2), лужна фосфатаза – 10,5-12,1-13,0 Од. (норма 2-5), холестерин 4,5 ммоль/л. (норма 3,6-6,2), тимолова проба 12,0 Од (норма 0-4), β – ліпопротеїди 41 Ед. (норма 35-45); глобуліни α 1-5,0% (норма 4-7), α 2 – 13,5% (норма 7-9), β – 16,2% (норма 9-14), γ – 18,7% (норма 14-19).

Таблиця 4.16

Результати обстеження пацієнтки

Глікозаміноглікан и сироватки крові:	11.02.02	10.06.02	11.06.02	13.11.02	26.06.03	23.04.04	Норма
Загальні	16,8 Од.	4,7 мг./сутки (норма 3,5-5,5)	14,9 Од.	16,0 Од.	23,6 Од.	29,8 Од.	11,1- 13,1
Розчинні сульфоглі-кани (хондроїтін- 6-сульфати)	10,6 Од.		8,3 Од.	8,4 Од.	13,7 Од.	20,0 Од.	5,4-6,3
Середньо-розчинні сульфоглі-кани (хондроїтін- 4-сульфати)	5,0 Од.		4,7 Од.	5,7 Од.	8,1 Од.	7,9 Од.	3,5-4,3
Важко-розчинні сульфоглікани	1,2 Од.		1,9 Од.	1,9 Од.	1,8 Од.	1,9 Од.	2,5- 3,1

У іммунограммі (21.04.04.), значне порушення співвідношення імуннорегуляторних клітин, яке привело до дисбалансу (за рахунок зниження CD4 і підвищення CD8). Підвищення іммуноглобулінів А і G на тлі високого ШОЄ (52 мм/ч) свідчить про активність запального процесу. Незважаючи на різке зниження хелперного ланцюга імунітету компенсаторного характеру, на тлі аутоімунного процесу іммуностимуляція не показана.

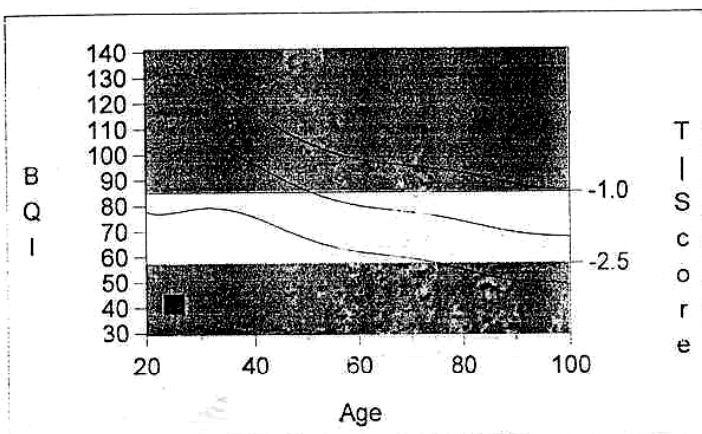


Рис. 4.8. Очі: праве око: кришталік підвищеної ехогенності, деструктивні і фіброзні зміни склоподібного тіла, відшарування задньої гіалоїдної мембрани, у склоподібному тілі низько-ехогенна дрібно-дисперсна суспензія – запальний ексудат – увеїт, склоподібне тіло помутніле, зменшене, макула промінує до 1,6 мм, розширений субретинальний простір з рідиною – кіста в макулярній області

Birth Date.....1980-10-30
 Height.....140.0 Cm
 Ethnicity.....Korean
 Foot Size.....200 mm
 Measured Times.....1

Gender.....Female
 Weight.....35.0 Kg
 Menopause or not.....Yes
 Foot Supporter.....2
 Regi. Date.....2005-09-07

Graph



Left Foot
 T-Score : -3.3



Normal



Osteopenia



Osteoporosis

Result

Measured Date.2005-09-07 09:25
 BQI[Bone Quality Index].....41.6
 T-Score.....-3.3
 Z-Score.....-3.5
 Menopause or not.....Yes

SOS[m/s].....1462.6
 BUA[dB/MHz].....12.4
 Young Adult(T-Ratio).....40.0 %
 Age Matched(Z-Ratio).....39.8 %
 Taking Medicine or not.....Yes

Comment

Рис. 4.9. Поширений остеопороз



Рис. 4.10. Фенотипові ознаки синтропії в динаміці перебігу хвороби, у пацієнтки з мозаїчною формою синдрому Шерешевського-Тернера (46XX/45X). Мукополісахаридоз. МТХД. Гомоцистинурія III. Поліморфізм мтДНК 8697G/A, 8860 G в тРНК-лізін, С677Т МТНFR Htrzgt та А66G МТRR Hmzgt

Кіфотична деформація на рівні верхнього грудного відділу (за рахунок порушень в зв'язковому апараті) із помірно вираженими гіпотрофічними змінами в дисках, без дискогенної компресії хребтового каналу. За рахунок посилення кіфозу відзначається зниження висоти тіл хребців.

Проведена молекулярна діагностика: секвенування і ПДРФ-аналіз мтДНК, виділеної зі зразків крові і волосся. Знайдені поліморфізми 8697G/A, 8860G у гені тРНК-лізін, поліморфні гени фолатного циклу у гетерозиготному стані С677Т МТНFR та у гомозиготному МТRR А66G .

На підставі проведеного дослідження встановлений діагноз: Мозаїчна форма синдрому Шерешевського-Тернера (46XX/45X), недиференційований мукополісахаридоз, МТХД, гомоцистинурия ІІІ, поліморфізм мтДНК 8697G/A, 8860 G в тРНК-лізін, С677Т МТНFR Htrzgt та А66G МТRR Hmzgt.

Наведене спостереження, з одного боку, є ілюстрацією нашого припущення про те, що мозаїчні форми хромосомних хвороб несуть у собі потенціал маніфестації того чи іншого метаболічного порушення, яке і визначає подальший розвиток клінічних ознак. Важка травма стала тригером, який ініціював маніфестацію порушення обміну речовин – глікозаміногліканів. МТХД приєдналася на тлі важкої дезорганізації обміну сполучної тканини. Наявність дефіциту фолатного циклу дозволяють віднести це спостереження до епігенетичної хвороби.

Порушення епігенетичного статусу у пробанда маніфестувало на стадії раннього онтогенезу, про що свідчить наявність мозаїчної форми хромосомної анеуплоїдії, клінічні ознаки якої виявлялись вже при народженні (перманентний набряк нижніх кінцівок, перевага горизонтальних над вертикальними біометричними даними, широка шия, низька лінія росту волосся на потилиці, результати цитогенетичного дослідження). Перші роки розвитку дитини характеризувались відставанням у рості на тлі високого інтелектуального розвитку. Перша енергетична травма стала тригером маніфестації порушеного обміну глікозаміногліканів, які мали прогресуючий плин. Тільки після другої травми (перелом стегна) порушення обміну набуло кінцевий маніфест – розвився стан дезадаптації. На фоні кризи був з'ясований статус фолатного циклу, який забезпечує метилування ДНК. Знайдені поліморфні варіанти генів ферментів фолатного циклу. Ця інформація підтвердила порушення епігенетичного статусу, а знайденні поліморфізми мітохондріальної ДНК -

наявність у хворої фено- і генотипічної синтропії, як наслідок генної взаємодії на тлі зовнішньосередовішніх негативних впливів.

4.2. Клініко-генетична характеристика хворих із мітохондріальною дисфункцією, асоційованою із «точковими» мутаціями мтДНК

Все частіше зустрічається припущення, що МТХД можуть бути одним із класів дегенеративних захворювань і тому потребують включення в коло диференційної діагностики в неврологічній клініці [165, 166, 167, 168]. МТХД зустрічаються як серед моногенних спадкових хвороб, так і серед мультифакторіальних, також і серед екзогенних захворювань. Аналіз отриманих даних, співставлення із світовим досвідом дозволили з'ясувати, що МТХД – гетерогенна група спадкових хвороб, яка характеризується патологією в системі мітохондрій (порушення структури і функції), що призводить до органопатій тих органів, в яких вони максимально містяться. В роботі використана класифікація МТХД, яка розроблена в 1992 році Wallace, і вивчалась патологія, яка виникла внаслідок мутацій мітохондріальної ДНК – місенс-мутацій (нейроофтальмопатія Лебера, пігментний ретиніт), мутації у генах т-РНК (синдром MERRF, синдром MELAS), делеції або дуплікації ділянок мтДНК (зовнішня офтальмопатія, синдром Кернса-Сейра, синдром Пірсона, асиметричний, двобічний птоз, який поєднаний із офтальмопарезом та слабкістю м'язів нижніх кінцівок, диліатційна кардіоміопатія, NARP-синдром).

Комплексна клінічна, біохімічна і молекулярна діагностика була проведена у 75 пацієнтів ОГ1 з підозрою на мітохондріальну патологію. Така кількість пацієнтів була відібрана із 203 обстежених з підозрою на МТХД на підставі наявності у них клінічно встановлених нозологічних форм МТХД.

Клінічні ознаки пацієнтів ОГ4 було проаналізовані за допомогою розрахунків коефіцієнта Крамера V для визначення ступеня відмінності між групами по кожному з розглянутих ознак. Розподіл фенотипових ознак представлений на рис. 4.11 (а,б,в) і в таблицях 4.17-4.22.

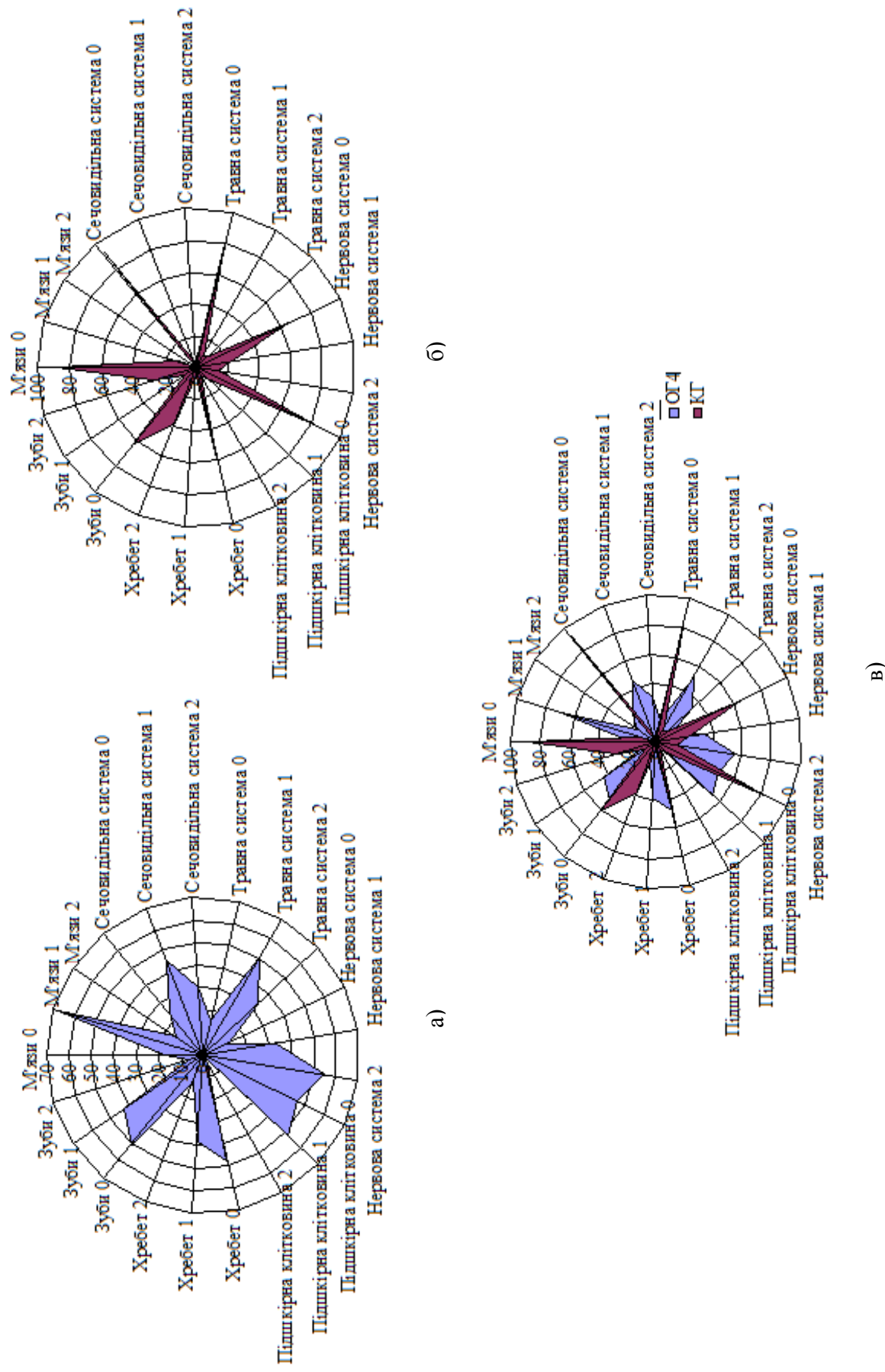


Рис. 4.11. Діаграми розподілу фенотипових ознак (м'язи, сечовидільна система, нервова система, травна система, підшкірна клітковина, хребет, зуби) порівнюваних груп ОГ4 і КГ: (а) діаграма ОГ4; (б) діаграма КГ; (в) діаграми ОГ4 та КГ

Звертає на себе увагу високий ступінь ураження м'язів у більшості пацієнтів із нозологічними формами МТХД (82,67% в ОГ4 проти 11,97% в КГ). Отримані дані підкреслюють значну діагностичну вагу ураження м'язів при МТХД, специфічність цієї ознаки і глибокі морфологічні зміни.

Зміни з боку нервової системи при певних нозологічних формах МТХД знайдені майже у абсолютної більшості хворих (88,00% в ОГ4 проти 35,21% в КГ). (табл. 4.20). Таким же широко розповсюдженим ураженням при МТХД була і травна система: 84,00% пацієнтів із ОГ4 мали значний ступінь ураження шлунку, підшлункової залози, печінки, кишковника (в КГ 19,72%) .

Зміни з боку хребта відносяться до поширених в Україні порушень, які, перш за все, характеризуються поширеним остеопорозом. Серед пацієнтів ОГ4 половина мала такі зміни(52,00%), у осіб КГ – 42,15%.

Наведені дані демонструють високу діагностичну значущість патологічних змін з боку нервової, сечовидільної, травної, скелетної систем, на підставі яких клінічний діагноз МТХД може бути встановлений. Така можливість реалізує ранню базову терапію МТХД, але в теперішній час з'явилися нові напрямки уточнюючої діагностики – біохімічної, молекулярно-генетичної і морфологічної, що дає можливість у кожного пацієнта визначити генетично гетерогенні варіанти МТХД і розробити напрямки персоналізованої реабілітації.

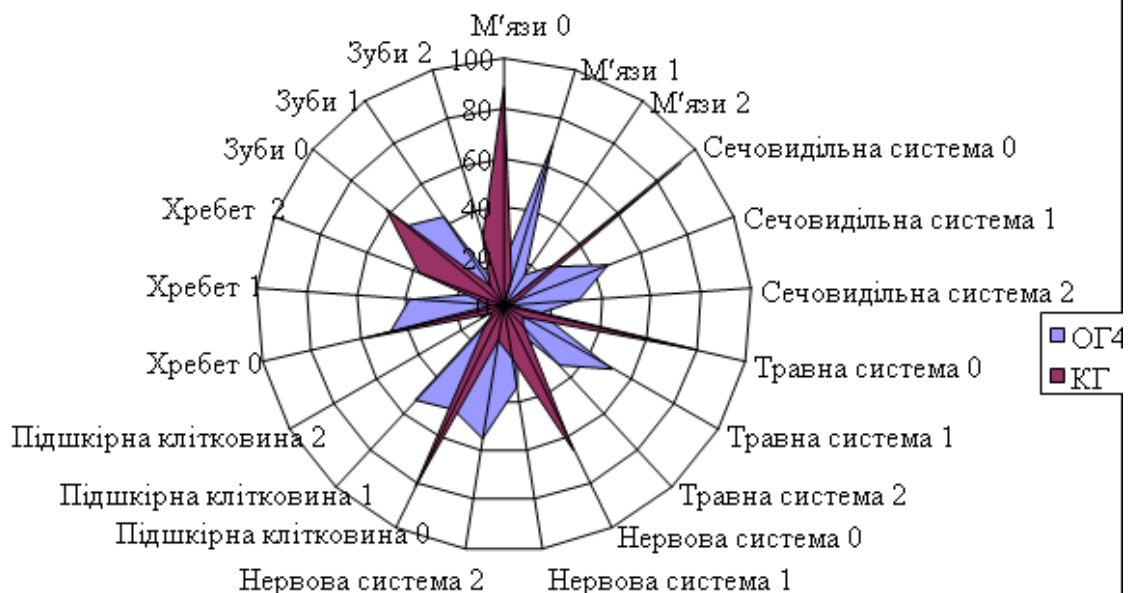


а)



б)

Рис. 4.12. Діаграми розподілу фенотипових ознак (м'язи, сечовидільна система, травна система, нервова система, підшкірна клітковина, хребет, зуби) порівняних груп ОГ4 та КГ: а) діаграма ОГ4; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.12. Діаграми розподілу фенотипових ознак (м'язи, сечовидільна система, травна система, нервова система, підшкірна клітковина, хребет, зуби) порівняних груп ОГ4 та КГ: в) діаграми ОГ4 та КГ

Таблиця 4.17

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{1,5}$ «м'язи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{1,5}$	0	13 (17,33%)	125 (88,03%)	138 (105,36%)	108,56	0,71
	1	51 (68 %)	17 (11,97%)	68 (79,97%)		
	2	11 (14,67%)	0 (0%)	11 (14,67%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

Таблиця 4.18

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{2,5}$ «сечовидільна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{2,5}$	0	18 (24%)	131 (92,25%)	149 (116,25%)	106,3	0,7
	1	34 (45,33%)	7 (4,93%)	41 (50,26%)		
	2	23 (30,67%)	4 (2,82%)	27 (33,49%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

Таблиця 4.19

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{2,4}$ «травна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{2,4}$	0	12 (16%)	114 (80,28%)	126 (96,28%)	84,72	0,62
	1	38 (50,67%)	13 (9,16%)	51 (59,83%)		
	2	25 (33,33%)	15 (10,56%)	40 (43,89%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

Таблиця 4.20

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{2,1}$ «нервова система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{2,1}$	0	9 (12%)	92 (64,79%)	101 (76,79%)	61,02	0,53
	1	25 (33,33%)	30 (21,13%)	55 (54,46%)		
	2	41 (54,67%)	20 (14,08%)	61 (68,75%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

Таблиця 4.21

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{1,4}$ «підшкірна клітковина»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{1,4}$	0	35 (46,67%)	117 (82,40%)	152 (129,07%)	41,6	0,44
	1	39 (52%)	17 (11,97%)	56 (63,97%)		
	2	1 (1,33%)	8 (5,63%)	9 (6,96%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

Таблиця 4.22

Таблиця сполученості за ознаками $x_0^{1,18}$ «хребет»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ4	КГ			
$x_0^{1,18}$	0	36 (48%)	82 (57,75%)	118 (105,75%)	41,58	0,44
	1	29 (38,67%)	8 (5,63%)	37 (44,3%)		
	2	10 (13,33%)	52 (36,62%)	62 (49,95%)		
Σ		75 (100%)	142 (100%)	217 (200%)		

У 49 пацієнтів ОГ4 було проведене молекулярно-генетичне дослідження.

Спектр досліджених мутацій визначався клінічними формами і частотою певних мутацій (табл. 4.23).

Таблиця 4.23

Спектр досліджених нозологічних форм МТХД, асоційованих із мутаціями мітохондріальної ДНК

Мутація	Синдроми	Кількість досліджених зразків (n = 49)
T8993G в гені АТР6	Синдром Лея і синдром NARP	9
A8344G в гені тРНК ^{ly5}	Синдром MERRF	7
A3243G в гені тРНК ^{leu}	Синдром MELAS	27
Делеція крупного фрагмента молекули мтДНК	Синдром Кернса-Сейра, синдром Пірсона, прогресуюча зовнішня офтальмоплегія	6

Молекулярне дослідження біологічних зразків пацієнтів виконувалось у Департаменті антропології Університету Пенсільванії (Prof. T.G.Schurr, Ph.D., MD. S.I. Zhadanov, Філадельфія, США), в лабораторії цитоплазматичної спадковості Інституту генетики і цитології НАН Білорусі (проф. Н.Г. Даниленко) у відповідності із договором про науково-технічну співпрацю, в лабораторії молекулярної діагностики ХСМГЦ (В.А. Гусар, А.Л. Фадеева). При проведенні молекулярного дослідження T.G. Schurr проскринував 200 здорових осіб, що мали гаплогрупи Н і Х, з бази даних ХСМГЦ на мутацію 12706С.

Серед обстежених хворих значної уваги заслуговує синдром Кернса-Сейра, якому притаманна висока частота спорадичних випадків (обстежено 6 осіб).

Ведучими клінічними ознаками синдрому Кернса-Сейра були ураження ЦНС, зору, серця, слуху, м'язів (табл. 4.24).

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому Кернса-Сейра у обстежених хворих

Нервова система	Орган зору	М'язова система	Орган слуху	Серце	Лабораторні та інструментальні дані
Затримка фізичного розвитку, проксимальна м'язова слабкість	Офтальмоплегія, пігментна ретинопатія	Міопатія з синдромом червоних рваних волокон	Приглухуватість	Кардіоміопатія, серцеві блокади	Підвищений рівень лактата, делеції мтДНК, біохімічний дефект комплексів дихального ланцюга

Синдром Кернса-Сейра було діагностовано у 6 хворих, у котрих він мав неменделюючий характер успадкування і був спорадичним.

Клінічній картині були притаманні ознаки:

- 1) початок захворювання у віці до 20 років;
- 2) прогресуюча зовнішня офтальмоплегія;
- 3) пігментний ретиніт;
- 4) атріовентрикулярна блокада серця, мозочковий синдром.

Птоз, як правило, був симетричним і білатеральним; рух очних яблук різко обмежений, знижена гострота зору, на очному дні виявлена пігментна грануляція.

Міопатичний синдром маніфестував після виникнення птозу. Обличчя було маскоподібним, гіпомімічним, змінений тембр голосу, часті поперхування, стомлюваність.

Відмічена поява міалгій, крампі, міотонії, інтенційного тремору після фізичних навантажень. Ендокринні розлади були варіабельними (низькорослість, гінекомастія, гіпогонадизм, цукровий діабет, гіперальдостеронізм, гіпопаратиреоз, дефіцит гормону росту).

У деяких хворих відмічено порушення емалегенезу. Ураження нирок відмічалось по типу ниркового тубулярного ацидозу або синдрому де Тоні-Дебре-Фанконі. Зустрічались два варіанти синдрому: повний та неповний. Повний варіант включав у себе хронічну прогресуючу зовнішню офтальмоплегію, пігментний ретиніт і атріовентрикулярну блокаду. Неповний, в свою чергу, розподілявся на два варіанти. Перший включав хронічну прогресуючу зовнішню офтальмоплегію, міопатію нисходячого типу. Другий тип характеризувався тільки ізольованою хронічною прогресуючою зовнішньою офтальмоплегією. Перебіг захворювання прогресуючий.

Диференційний діагноз проводився із іншими формами прогресуючих міопатій (окулофарінгодістальною міопатією, супрануклеарним латеральним паралічем погляду зі сколіозом та інш.), а також із захворюваннями, що супроводжуються птозом (міастенія, діабетична поліневропатія, синдром Толоза-Ханта, офтальмоплегічна мігрень). У двох дітей (рідних брата і сестри) синдром Кернса-Сейра був підтверджений за допомогою молекулярно-генетичного дослідження (рис. 4.13).



Рис. 4.13. Синдром Кернса-Сейра у сестри і брата

Дослідження зразків на наявність делецій мтДНК у 3 випадках клінічно встановлених діагнозів синдрому Кернса-Сейра не виявило позитивних результатів, оскільки реакція ампліфікації не пройшла (рис. 4.14). Ми пояснили

це тим, що виділення ДНК з використанням тест-систем не завжди забезпечує вихід ДНК належної якості, або з тим, що якість ДНК знизилася в результаті тривалого зберігання.

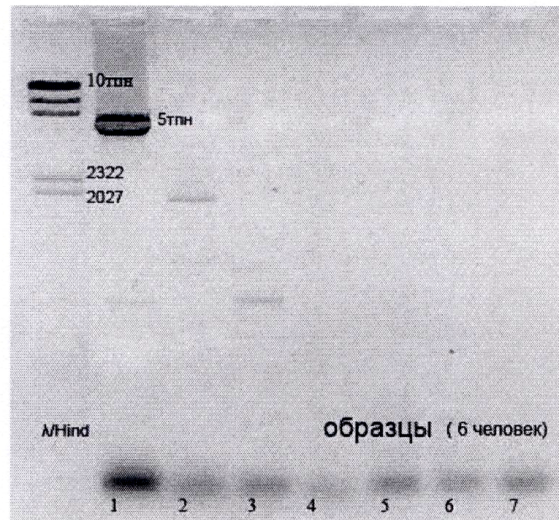


Рис. 4.14. Результати ампліфікації ДНК; 10 т.п.н. – довжина фрагмента без делеції; 5 т.п.н. – довжина фрагмента за наявності делеції; 1 – зразок мтДНК з делецією; 2, 3, 4 – досліджувані зразки, ампліфікація яких не пройшла (немає ні фрагмента завдовжки 10 т.п.н., ні фрагментів більш короткої довжини A/Hind-маркер довжини фрагмента 1 т.п.н. – 10 т.п.н.

При проведенні методу з використанням трьох праймерів найбільш поширеної делеції в зразках виявлено не було (рис. 4.15).

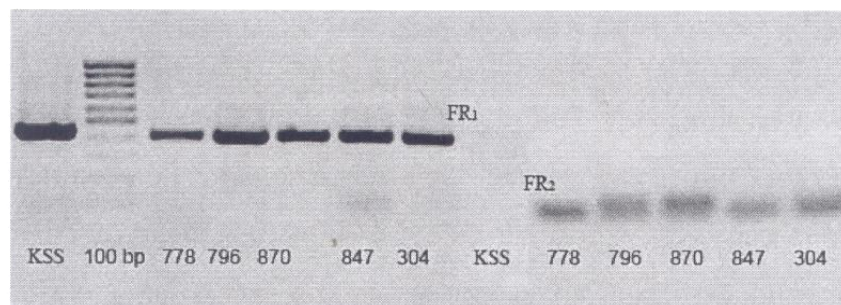


Рис. 4.15. Ампліфікована ДНК в агарозному гелі: FR1 – ділянка ДНК, що складається з фрагментів, розташованих за межами можливої делеції; FR2 – ділянка ДНК, фрагмент можливої делеції, що містить; KSS – зразок мтДНК з делецією; 778, 796, 870, 874, 304 – інші досліджувані зразки; 100 bp – маркер довжини фрагмента

Таким чином, із 6 хворих з підозрою на синдром Кернса-Сейра, у трьох (50%) знайдена делеція мтДНК, яка призвела до маніфестації синдрому.

Підгостра некротизуюча енцефаломієлопатія Лея характеризувалась поліорганичним ураженням нервової, легеневої системи, органів зору, печінки, серця. Ці ознаки наведені в табл. 4.25.

Таблиця 4.25

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому Лея (Leigh disease, n = 9)

Нервова система	Орган зору	Легені	Печінка	Серце	Метаболізм	Лабораторні та інструментальні дані
М'язова слабкість, гіпотонія, тремор, атаксія, позитивний симптом Бабінського, відсутність сухожильних рефлексів, спастичні парези, клонічні судоми, затримка психомоторного розвитку, деменція	Ністагм, зорова атрофія, кольорова сліпота, офтальмоплегія	Хронічна дихальна недостатність	Порушення глюконеогенезу	Гіпертрофічна кардіоміопатія, асиметрична септальна гіпертрофія	Лактатацидоз	Підвищений рівень лактата, зниження толерантності до глюкози, некротизуюча енцефалопатія, фокальні некрози стовбура мозку, проліферація судин стовбура мозку

Серед обстежених хворих з підозрою на синдром Лея відмічено, що захворювання маніфестувало до 7-ми років життя, мало як аутосомно-рецесивне, так і Х – зчеплене рецесивне успадкування і мітохондріальне. Критеріальними ознаками хвороби були неврологічні порушення (атаксія, затримка психомоторного розвитку або його регресія); м'язова гіпотонія або спастичність; атрофія

зорових нервів, птоз, пігментний ретиніт, офтальмоплегія, ністагм; респіраторний дістрес-синдром; Рейє-подібний синдром; лактат-ацидоз; гостре виснаження після звичайних інфекцій; симетричне ураження базальних гангліїв, спонгіозна дегенерація середнього мозку за даними ЯМРТ.

Молекулярно-генетичне дослідження синдрому Лея проводилось у відповідності до вищеописаної методики. Результати ампліфікації представлені на рис. 4.16.

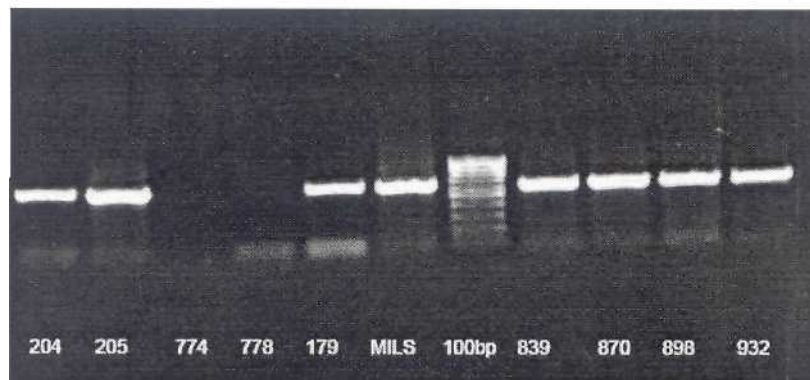


Рис. 4.16. Перевірка ампліфікації в агарозному гелі: 774, 778 – ампліфікація не пройшла; MILS (синдром Лея) – зразок з мутацією; 100 bp – маркер довжини фрагментів; 204, 205, 179, 839, 870, 898, 932 – ампліфікація пройшла успішно

Подальша рестрикція не виявила мутацію Т8993G в гені АТР6. Результати представлені на рис. 4.17.

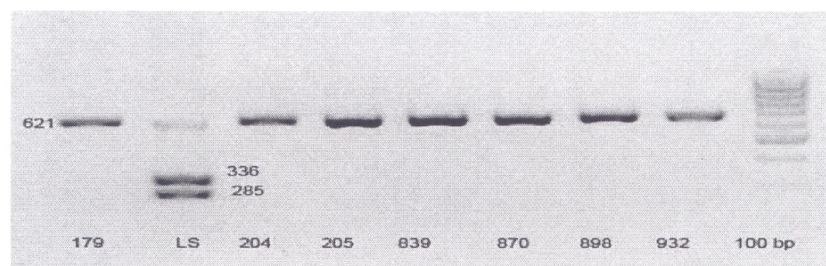


Рис. 4.17. Рестрикційні фрагменти в поліакріламідному гелі при дослідженні на мутацію Т8993G в гені АТР6: 621 – довжина фрагмента без мутації (п.н), 336, 285 – довжини фрагментів, на які рестриктаза розрізає ген за наявності мутації (п.н.); 179, 204, 205, 839, 870, 898, 932 – досліджувані зразки без мутації, LS (MILS) – зразок з мутацією; 100 bp – маркер довжини фрагмента 100 – 1000 п.о.

З 2002 року в рамках спільного проекту «Всебічний аналіз епідеміології та механізмів експресії мітохондріальних хвороб у слов'янських популяціях східної України» з лабораторією молекулярної генетики й генетики розвитку людини при Інституті цитології й генетики Сибірського відділення РАН (м. Новосибірськ, Росія) і Департаментом антропології Університету Пенсільванії (м. Філадельфія, США) був проведений детальний скринінг патогенних мутацій мтДНК і дослідження стану енергетичного обміну у обстежених хворих робочою групою ХСМГЦ у складі: Ю.Б. Гречаніна, В.А. Гусар та Н.П.Федосеєва, в процесі якого знайдена мутація 12706С ND5.

За свідченням Liolitsa D. et.al [13], у пацієнтів із синдромом Лея зустрічаються різні ядерні генні дефекти і мутації мтДНК. Частіше за все – це мутації у мтДНК, які відбуваються в гені ND5, що дозволяє вважати ген ND5 «гарячою точкою» при мітохондріопатіях. Більшість таких мутацій описані як унікальні генетичні дефекти з неоднозначними патогенетичними ролями, оскільки не була доведена їхня асоціація з фенотипом синдрому Лея. Механізми експресії описаних мутацій все ще залишаються нез'ясованими. A.Morgan-Hughes J.A., Hanna M.G. [171] описали мітохондріальні енцефаломіопатії та припустили, що додатковими механізмами, які визначають фенотипічну експресію, можуть бути генетичний фон і екологічний фактор.

Ми запідозрили, що у хворої Г. виникла гетероплазмична мутація *de novo* 12706С ND5, асоційована з клінічною маніфестацією фатального синдрому Лея з незвичайним симптоматичним ушкодженням і асиметрією головного мозку. Була висунута гіпотеза: у пробанда Г. можна припустити ймовірність виникнення мутації у зародкових клітинах матері пробанда із МТХД. Раніше мутація 12706С була описана як причина істотного зменшення активності комплексу I у пацієнтів із Лея-подібним синдромом [172] і припущення її ролі у розвитку ідіопатичної хвороби Паркінсона. Комплекс I дихального ланцюга (мітохондріальна NADH-Хінон) оксидоредуктаза – один з найбільш складних міжмембранних ферментних комплексів. Цей фермент каталізує перенос електронів від NADH до убіхінону й переміщує протони з мітохондріального

матрикса в міжмембранний простір. Потік електронів і протонів створює електрохімічний градієнт на внутрішній стороні мітохондріальної мембрани, що забезпечує функціонування протонного насоса, який використовується при синтезі АТФ. Комплекс I складається, принаймні, з 43 різних субодиниць, сім з яких кодуються мтДНК (позначуваних ND1-6 I 4L), а інші – ядерною ДНК. Однак скоординовані взаємодії між ядерним геномом і мітохондріальним, які забезпечують роботу цього життєво необхідного комплексу протеїнів, залишаються до кінця не вивченими.

Проведений філогенетичний аналіз позитивних випадків з мутацією 12706С, продемонстрував, що всі мутації відбулися при різних гаплогрупах мтДНК шляхом незалежних мутаційних подій. Даний аспект мутації 12706С підтверджує її патогенетичне значення в розвитку синдрому. Представлений клінічний опис випадку є ілюстрацією маніфесту цієї мутації (табл. 4.26).

МтДНК аналізувалася за допомогою саузерн-блотт гібридизації, з наступною рестрикцією ферментами *SnaBI* и *PvuII*, для виключення мутацій/перебудов мтДНК, що часто зустрічаються. Регіон, що кодує мтДНК, був ампліфікований зі специфічним набором праймерів на ділянки, що перекриваються, розміром 3-4 Кб в обох пробандів. Обидва зразки були секвеновані з використанням BigDye Terminator Pre-Mix kits, v3.1 (Applied Biosystems), очищені з використанням Centri-Sep columns (Princeton Separations) і розігнані на секвенаторі ABI 3100 Gene Analyzers у Центрі Секвенування відділу генетики Університету Пенсільванії. Секвенсові файли були впорядковані з використанням програми Sequencher 3.1 (GeneCodes Corp.) і рівнялися зі стандартною Кембриджською послідовністю (Cambridge Reference Sequence, CRS). Наявність мутації 12706С підтверджена при використанні методу мутаційно-специфічної рестрикції з ферментом *BsaXI* з наступної ПЛР-ампліфікацією фрагмента 460 п.н. (позиції 12385-12845 т.п.н.). Крім того, був проведений скрінінг на мутацію ND5 серед 187 здорових осіб і пацієнтів з мітохондріальною хворобою, що підходять по гаплогрупам, обраним серед учасників з інших біомедичних проектів.

Характер маніфестації та клінічні ознаки de novo гетероплазмичної мутації 12706С гену ND5 у хворої Г. з синдромом Лея

Періоди онтогенезу		Ознаки
1	2	3
проембріональний		Без прекоцепційної підготовки. У матері – часті інфекції. Вегето-судинна дистонія
ембріональний		Загроза переривання
антенатальний		Переношена вагітність. Пізній гестоз.
постнатальний	1 рік	відставання в психомоторному розвитку, неврологічні зміни – пірамідна недостатність, недостатня надбавка у вазі.
	2 роки	+ помірна лікворна гіпертензія
	7 років	Пневмонія, пароксизм важкої гіперактивності і гіпертензії (240/140 мм рт. ст), синусова тахікардія (ЧСС - 160-180), перманентна гіперглікемія, булімія, полідипсія, поліурія, біль в черевній і грудній порожнинах, загальна слабкість
	7 років 1 міс.	В стаціонарі – гіповентиляція, центральні неврологічні порушення, правостороння м'язова гіпотонія, підвищення сухожильних рефлексів з рук справа, зниження - з ніг, позитивний с. Бабінського зліва, правосторонній парез VII пари ЧМН, екзотропія і ністагм. Свідомість ясна. Двостороння дольова пневмонія. Виділена Е.соіі. Брадіпное, загрожуюча гіпоксія. Назотрахеальна вентиляційна підтримка. МРТ: зміна густини спинномозкової рідини в лівій внутрішній капсулі, пошкодження правого базального ганглія, кортикальний ішемічний інфаркт, кортикальна гіпотрофія в лобовоскроневій області. Зупинка серця. Кардіопульмональна реанімація, відновлення спонтанної серцевої діяльності. Стабілізація стану

1	2	3
постнатальний	7 років 2 міс.	Ефективна інтенсивна медикаментозна терапія. Розвинувся персистуючий резидуальний геміпарез.
	7 років 3 міс.	Прогресуюча серцева недостатність. Легенева гіповентиляція. Низький діурез. Зниження маси тіла. Субфебрилітет, задишка, розлитий черевний біль. Двостороння дифузна інфільтрація легенів (Pseudomonas aeruginosa), пірамідна недостатність, бульбарні порушення, пригнічений кашльовий рефлекс і повна відсутність ковтальних рефлексів. Трахеотомія. ІВЛ. Промивання бронхів. При ЕхоКГ: легенева гіпертензія, дилатація правих відділів серця, трикуспідальна регургітація IV ст., гіпертрофія міокарду правого та дискенезія лівого шлуночка, перикардіальний випот. WPW-синдром. КТ: множинні кісти, коркова атрофія, гідроцефалія з обмеженим лікворовідтоком. УЗД: токсичний набряк паренхіми печінки, нирок і підшлункової залози. Підвищення рівня ОА.
	7 років 5 міс.	2-місячна госпіталізація позитивно вплинула на поліпшення серцевого викиду, регрес пневмонії, поліпшення неврологічного статусу. Батьки відмовилися від подальшого лікування.
	7 років 10 міс.	Хвора померла на фоні інтермітуючої пневмонії і зупинки серця.

Було проведено дослідження вторинної структури білка і молекулярне моделювання.

У цілому, з GenBank були взяті 974 амінокислотні послідовності і упорядковані з використанням CLUSTAL W відповідно до протоколу UniProtKB

(<http://www.ebi.uniprot.org>). Послідовності *ND5/NuoL/MnhA*, відібрані для упорядкування, включали наступні послідовності: *Homo sapiens* ND5 (P03915), *Bos taurus* (P03920), *Callus gallus* (PI8940), *Xenopus laevis* (P03922), *Salmo salar* (Q9ZZM3), *Brachydanio rerio* (Q9MIY0), *Strongylocentrotus purpuratus* (PI5552), *Drosophila melanogaster* (P3 8932), *Triticum aestivum* (Q37680), *Neurospora crassa* (P055I0), *Rhodobacter capsulatus* (RRC00609). Метод PHD був використаний для визначення вторинної структури (<http://www.predictprotein.org>).

Визначення PSI-BLAST ND5 області (домена) проводилося з використанням великої бази даних (nrdb90), включаючи послідовності з *P/am-A*, інформація про які доступна на сервері *The DomPred Protein Domain Prediction* ([http:// bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred/)) (Т. Шупп).

Більшість мутацій ND5 часто призводить до розвитку різних нейродегенеративних синдромів з варіабельністю клінічних ознак [172, 173], що вказує на залучення систем органів при наявності декількох генетичних дефектів. Коркова атрофія гемісфер, залучення базальних гангліїв, часте ушкодження стовбура мозку з відсутністю життєвих рефлексів, ділятаційна кардіоміопатія неодноразово спостерігалися при синдромі Лея [174] і з'явилися підставою для постановки діагнозу у випадку, описаному нами.

Початкова маніфестація синдрому Лея із симпатичним кризом впливає на ушкодження таламічних ядер і входить до списку патогенних форм «діенцефальної епілепсії», розширюючи клінічну гетерогенність цього синдрому. З іншого боку, спостережувана автономна відповідь може бути наслідком раніше існуючого гідроцефального стану. Синдроми серцевих аритмій досить часто спостерігаються серед пацієнтів з мітохондріальними порушеннями [Hinchliffe P., Sazanov A, 2005] і також часто відзначаються у пацієнтів, обтяжених мутацією ND5 мтДНК [176]. Ці спостереження припускають, що мутації мтДНК і порушений енергетичний метаболізм відіграють схильну роль у розвитку аритмій.

Генетичний і філогенетичний аналізи.

Секвенування регіону, що кодує, мтДНК пробанда Г. виявило 24 основні нуклеотидні заміни в порівнянні з CRS (табл. 4.27). МтДНК пробанда мала полі-

морфні сайти, які характерні для гаплогрупи Х2е. Ця лінія мтДНК бере початок у Південному Сибіру і також часто спостерігається у жителів Європи [177].

Таблиця 4.27

Нуклеотидні заміни в позитивних випадках з мутацією 12706С мтДНК у пробанда Г. і пробанда Ф. в порівнянні з CRS (Andrews і ін. 1999)

Сайт	Ген	Амінокислотна заміна	Випадки з мутацією 12706С		Коментарі
			Пр пробанд Г.	пробанд Ф.	
1	2	3	4	5	6
750G	12SrRNA	a	+	+	поліморфізм
1291C	12SrRNA	-	+	-	нова ^b
1438G	12SrRNA	-	+	+	поліморфізм
1719A	16SrRNA	-	+	-	поліморфізм
2706G	16SrRNA	-	+	-	поліморфізм
3381G	ND1	-	-	+	нова
4769G	ND2	-	+	+	поліморфізм
6221C	COI	-	+	-	поліморфізм
6267A	COI	i	+		поліморфізм
6371T	COI	-	+	-	поліморфізм
7028T	COI	-	+	-	поліморфізм
8260C	COII				поліморфізм
8860G	ATP6	T/A	+	+	поліморфізм
8888C	ATP6	I/T	-	+	нова
9966A	coin	WI	-	+	нова
11719A	ND4	-	+	-	поліморфізм
11932T	ND4	-	+	-	поліморфізм
12705T	ND5	-	+	-	поліморфізм
12706C	ND5	F/L	+ ^c	- ^c	делетована
13135A	ND5	A/T	+	-	поліморфізм

1	2	3	4	5	6
13966G	ND5	T/A	+	-	поліморфізм
14470C	ND6		+	-	поліморфізм
14470A	ND6	-	-	+	поліморфізм
14766T	CytB	I/T	+	-	поліморфізм
14890G	CytB	-	-	+	нова
15034G	CytB		+	-	поліморфізм
15310C	CytB		+	-	поліморфізм
15326C	CytB	T/A	+	+	поліморфізм
15397G	CytB	-	+	-	нова
15894A	tRNA ^{lhr}	-	+	-	поліморфізм

Тільки мутація мтДНК у пробанда Г. – транзиція Т-С у позиції 12706 призвела до заміни на рівні трансляції 124-ого ароматичного залишку фенілаланіну на аліфатичний лейцин, що розташований у трансмембранній спіралі, знайдені за допомогою методу RHD.

Поліморфні сайти були визначені щодо бази даних мітохондріального генома людини [<http://www.genpat.uu.se/mtDB/index.html>]!

Примітки: (а) = відсутність амінокислотної заміни; (Б) = нова мутація, характерна визначеній гаплогрупі мтДНК; (с) = стан гетероплазмії.

Філогенетичний аналіз поліпептидної послідовності ND5 різних зразків показав, що залишок фенілаланіну розташовувався в еволюційно консервативній області (рис. 4.17). Мутаційно-специфічний PCR-RFLP (ПЛР-ПДРФ) аналіз мутації 12706С і секвенування мітохондріального генома встановили, що ця мутація перебуває в стані гетероплазмії (мутаційний поріг - 50 %) у пробанда, але повністю відсутня в крові матері пробанда (рис. 4.18, лінії 1 і 2). Ці дані явилися свідченням на користь гіпотези про найбільш імовірно виникнення *de novo* мутації 12706С у зародкових клітинах матері пробанда.

	124	HELIX III	145
<i>Homo sapiens</i>	DPNINQFFKYLLIFLITMLILVTANNLPQLFIGWEGVGVGIMSPELLISWYYARAD		
<i>Bovine</i>	DPNINKFFKYLLLEFLITMLILVTANNLPQLFIGWEGVGVGIMSPELLIGWYYGRAD		
<i>Chicken</i>	EPFITKFFTYLLTFLIAMLTLTIANNMFLFVGVWEGVGVGIMSPELLIGWYQGRAE		
<i>Frog</i>	DPMISRFFKYLLTFLVAMVILVTANNFFQFFIGWEGVGVGIMSPELLIGWYYARAE		
<i>Salmon</i>	DPNMNRFFKYLLLEFLIAMIILVTANNMFLQLFIGWEGVGVGIMSPELLIGWYYGRAD		
<i>Zebrafish</i>	YPQKELFYKYLLLELMSMIILVTANNLPQLFIGWEGVGVGIMSPELLIGWYFGRTE		
<i>Sea urchin</i>	DPNSSAFFRLLTIFLLNMLILTCSNSLFLIFLWEGGGFLSPELLISWYTTTRND		
<i>Fruit fly</i>	DNHINRFIMLVLMFVLSMMLLISPNIISILGWGDLGLVSYCLVIYFQN- IK		
<i>Wheat</i>	DPHSRPFMCYLSIFTFMMLMLVTGDNFLQLFLGWEGVGLASYLLIHFWFTRLQ		
<i>N. crassa</i>	DPHNQRFFSYLSLFTFMMIILVTANNYLLMFFVGVWEGVGVCSYLLVSPWFTRIA		
<i>R. capsulatus</i>	EAYKARFFAYLSFETFAMLMLVTSNVLVQMFFGVWEGVGVASYLLIGFYKPKPS		
	xFF		GxxGxG

Рис. 4.18. Еволюційно консервативна ділянка трансмембранної спіралі III ND5, що має мутації синдрому Лея. (*) - вказує на сайти, відповідальні за виникнення синдрому Лея і хвороби Паркінсона. Функціонально важливі сайти заштриховані. Нуклеотидні послідовності *Homo sapiens* ND5 (NU5M_HUMAN; номер доступу P03915), *Bos taurus* ND5 (Bovine; номер доступу P03920), *Gallus gallus* ND5 (Chicken; номер доступу **PI8940**), *Xenopus laevis* ND5 (Frog; номер доступу P03922), *Salmo salar* ND5 (Salmon; номер доступу Q9ZZM3), *Brachydanio rerio* ND5 (Zebrafish; номер доступу Q9MIY0), *Strongylocentrotus purpuratus* ND5 (Sea urchin; номер доступу P15552), *Drosophila melanogaster* ND5 (Fruit fly; номер доступу PI8932), *Triticum aestivum* ND5 (Wheat; номер доступу Q37680), *Neurospora crassa* ND5 (N.crassa; номер доступу P05510), *hodobacter capsulatus* NuoL (R. capsulatus; номер доступу RRC00609), номер доступу для кожної певної послідовності білка представлений згідно з протоколом UniProtKB (<<http://www.ebi.uniprot.org>>').

У випадку синдрому Лея у пацієнта F. мтДНК також містила мутацію 12706C у стані гетероплазмії (рис. 4.18, лінія 3). Однак мтДНК цього пацієнта містила трансверсію в позиції 14470A, вказуючи на приналежність до Західноєвразійської гаплогрупи H10, і відрізнялася від послідовності мтДНК

пробанда Г. більш ніж на 22 SNP (табл. 4.21; рис. 4.17). На жаль, детальна генетична інформація не була доступна для першого описаного позитивного випадку мутації 12706 (випадок пробанда Е., [37]). Проте, європейське походження цього пацієнта і присутність цитозину в позиції 12705 дозволило зробити висновок, що мутація мтДНК у пробанда Е., ймовірно, належить Західноєвразійській гаплогрупі R [37] (рис. 4.19).

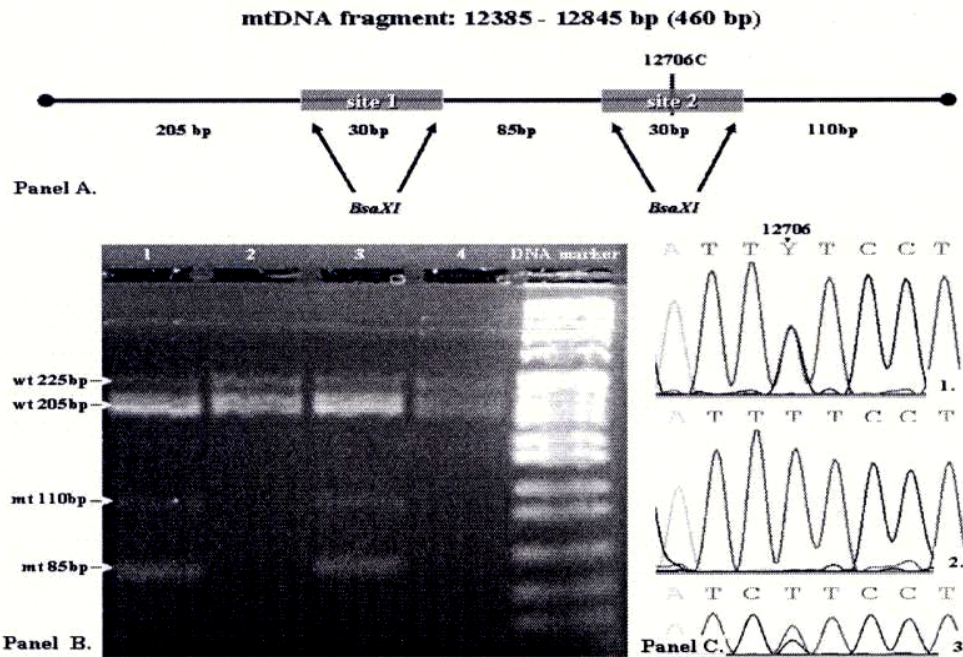


Рис. 4.19. Схематичний огляд методу PCR-RFLP (ПЛР-ПДРФ) з виявлення мутації 12706С. **Панель А.** Діаграма ампліфікованого фрагмента мтДНК із вказівкою положення сайту рестрикції *BsaXI*. У дикому типі мтДНК відсутній другий рестрикційний сайт *BsaXI*, що призводить до розподілу на 3 фрагменти по 225, 205, і 30 п.н. При наявності мутації 12706С в рестрикційному сайті *BsaXI* відбувається розділення на п'ять фрагментів по 205, 110, 85, 30, і 30 п.н. **Панель В.** Зображення ампліфікованого фрагмента гена ND5 з рестрикцією *BsaXI* в гелі. Пробанди Г. і Ф. (лінії 1 і 3) містять комбінацію молекул мутантного і дикого типів, у той час як у матері пробанда Г. (лінія 2), як і в негативному контролі (лінія 4), спостерігаються тільки смуги дикого типу з відсутністю мутації. **Панель С.** Представлена електрофореграма пробанда Г. (1), його матері (2), пробанда Ф. (3), з нумерацією ліній, що відповідає панелі В

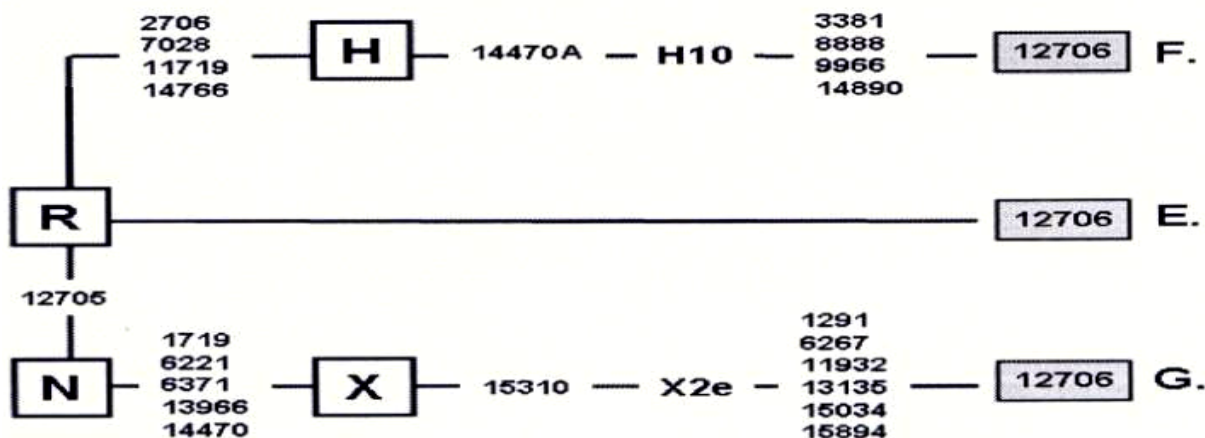


Рис. 4.20. Філогенетичні відносини між різними гаплотипами, що мають мутацію 12706С. Для побудови цієї мережі були використані тільки послідовності, що кодують. Гаплотипи мтДНК пробанда F., пробанда Г. і пробанда Е. представлені з мутацією 12706С. Основні філогенетичні галузі, яким належать ці гаплотипи мтДНК, позначені в квадратах

Патогенетичні механізми мутації ND5.

Хоча периферичний NADH- фрагмент комплексу I, що окисляє, був досить інтенсивно вивчений, роль мембранної області (домена), що кодує мтДНК, до кінця не з'ясована. Фізіологічна важливість субодиниці ND5 очевидна зі спостережень, що активність комплексу I повністю регулюється експресією гена ND5, а субодиниця ND5 відіграє істотну роль в активації комплексу I (Т. Шурр).

Огляд наявних даних свідчить про те, що ген ND5 мутує, в основному, з десятьма замінами в мтДНК, які описані в асоціації з мітохондріальними цитопатіями. Залучення периферичної і центральної нервової системи, яке часто спостерігається при синдромі Лея [178, 179, 180] і його сполученому варіанті синдрому Лея/MELAS [5] припускає існування загальних механізмів експресії дефектів ND5. Нещодавно область ND5 у межах спіралі III була описана як повна гетероплазмична мутація мтДНК у тканині мозку пацієнтів із хворобою Паркінсона, і є одним з можливих факторів, що впливає на патогенетичний механізм ідіопатичної хвороби Паркінсона [181]. Найбільш

специфічним є те, що мутації F124L і E145G при синдромі Лея найпоширеніші в таких тканинах, і, вочевидь, є причиною системного дефекту комплексу I у пацієнтів із хворобою Паркінсона [181, 182].

NARP – синдром (нейропатія, атаксія, пігментний ретиніт) був вперше описаний S.J.Holt et al. у 1990 році. Захворювання було обумовлено крапковою мутацією мтДНК. Аномальна мтДНК призводить до порушення активності АТФази, з'являється дефект окислюваного фосфорилування та зниження накопичення АТФ клітиною. Тип успадкування – материнський. Причиною виникнення синдрому є «точкова» мутація мтДНК в позиції 8993 мтДНК. Можливе існування в одній родині синдрому NARP і синдрому Лея. Критеріальними ознаками хвороби були: варіабельний початок маніфестації; нейрогенна м'язова слабкість; невропатія; атаксія; пігментний ретиніт; судоми; затримка психомоторного розвитку (деменція); еластичність; «рвані червоні волокна» при електронній мікроскопії (табл. 4.28).

Диференційний діагноз проводився із спадковими захворюваннями, які олівопонтocereбелярною дегенерацією, хворобою Рефсума .

Таблиця 4.28

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому NARP

Нервова система	Орган зору	М'язова система	Лабораторні та інструментальні дані
Затримка розвитку, деменція, судоми, атаксія, сенсорна нейропатія	Пігментна дистрофія	Проксімальна нейрогенна м'язова слабкість	Підвищений рівень лактата, пірувата, зниження толерантності до глюкози, некротизуюча енцефалопатія, фокальні некрози стовбура мозку, проліферація судин стовбура мозку, виявлення мутацій мтДНК в позиції 8993 АТР6

Пошук синдрому Пірсона проводився серед пацієнтів, у яких поєднувались клінічні ознаки із ураженням нирок, печінки і підшлункової залози. Клінічні і лабораторні ознаки цієї форми мітохондріальної дисфункції представлені в табл. 4.29.

Таблиця 4.29

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому Пірсона

Нервова система	Кров	Орган слуху	М'язова система	Нирки	ЖКТ	Печінка	Лабораторні та інструментальні дані
Затримка психосоматичного розвитку	Панцитопенія	Прогресуюча сенсоневральна приглухуватість	Мітохондріальна міопатія	Ниркова недостатність	Екзокринна недостатність підшлункової залози	Печінкова недостатність	Підвищений рівень лактата, перебудова мтДНК, функціональний дефект мітохондрій

Синдром, обумовлений делецією мтДНК.

Критеріями діагнозу були дебют захворювання з народження або в перші місяці життя; гіпопластична анемія; порушення екзокринної функції підшлункової залози; в окремих випадках - енцефаломіопатія, атаксія, деменція, прогресуюча зовнішня офтальмоплегія.

Синдром MELAS (Мітохондріальна енцефалопатія, лактат-ацидоз, інсультподібні епізоди) знайдений нами у 4-х хворих (табл. 4.30).

В основі патогенезу синдрому MELAS лежать «точкові» мутації мтДНК (в позиціях 3243, 3271 п.н.), причому описана кореляція між ступенем мутації і характером перебігу захворювання [183]. Передбачалося, що для прояву захворювання необхідне накопичення значної кількості мутантної мтДНК (56-95%), при цьому в одній родині рідко зустрічаються 2 дитини з класичним варіантом хвороби [77].

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому MELAS

Нервова система	Орган зору	М'язова система	Орган слуху	Серце	Ендокринна система	ЖКТ	Лабораторні та інструментальні дані
Мігрені, судоми (грандмал), геміпарези, інсульти, деменція енцефалопатія	Двусторонні катаракти, геміанопсія, коркова сліпота	Міопатія з синдромом RRF	Прогресуюча сенсоневральна приглухуватість	Гіпертрофічна або ділатативна кардіоміопатія, порушення ритму	СД, інші ендокринопатії	Епізоди блювоти	Підвищений рівень пірувата, лактата, кортикальні та субкортикальні інфаркти, мутації мтДНК, біохімічний дефект дихального ланцюга

Перші ознаки захворювання у наших пацієнтів з'являлись, як правило, у 6-10 років. До маніфестації хвороби 90-100% хворих розвивались нормально. Частими початковими клінічними симптомами були судоми, рецидивуючий головний біль, блювота, анорексія. Одним із важливих симптомів мітохондріальної патології була нетерпимість фізичних навантажень. Інсультоподібні епізоди виявлялись рецидивуючими приступами головного болю, запамороченням, розвитком осередкової неврологічної симптоматики, коматозними станами. Причиною таких «метаболічних інсультів» є гостра недостатність енергетичних субстратів у клітинах, а також висока чутливість судин мозку до токсичних впливів. Провокуючими факторами були інтеркурентні інфекції.

Судоми – також один із ведучих маніфестних симптомів синдрому MELAS, однак вони були варіабельними – фокальні пароксизми, генералізовані тоніко-клонічні приступи, міоклонії. Такі епілептичні приступи були резистентними до антиконвульсантної терапії.

З перебігом хвороби розвивалась деменція. Відмічалися низькорослість; порушення зору, атрофія зорових нервів; лихоманка; мозочковий синдром; синдром Вольфа-Паркінсона-Уайта, прогресуюча зовнішня офтальмоплегія; цукровий діабет.

Перебіг хвороби – плин частіше злякисний.

Критерії діагнозу були такі: материнський тип успадкування; вік маніфестації – до 40 років; мигренеподібний головний біль з нудотою і блювотою; інсультоподібні епізоди; судороги; в крові: лактат-ацидоз; в сечі: підвищення рівня органічних кислот; кальцифікація базальних гангліїв на КТ; «рвані червоні волокна» в біоптатах кістякових м'язів; прогресуючий перебіг (рис. 4.21, 4.22).

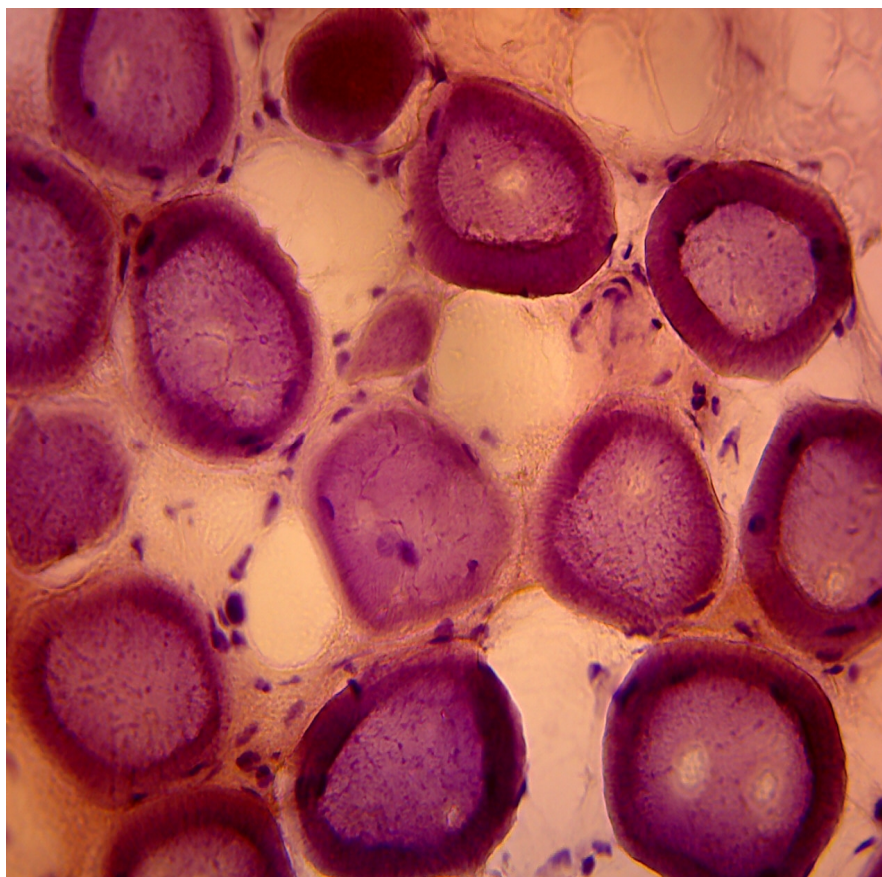


Рис 4.21. Хворий Г. (забарвлення гематоксилін-еозин) - волокно у правому нижньому куті з двома «очима». Феномен «target волокна» (волокна-мішені

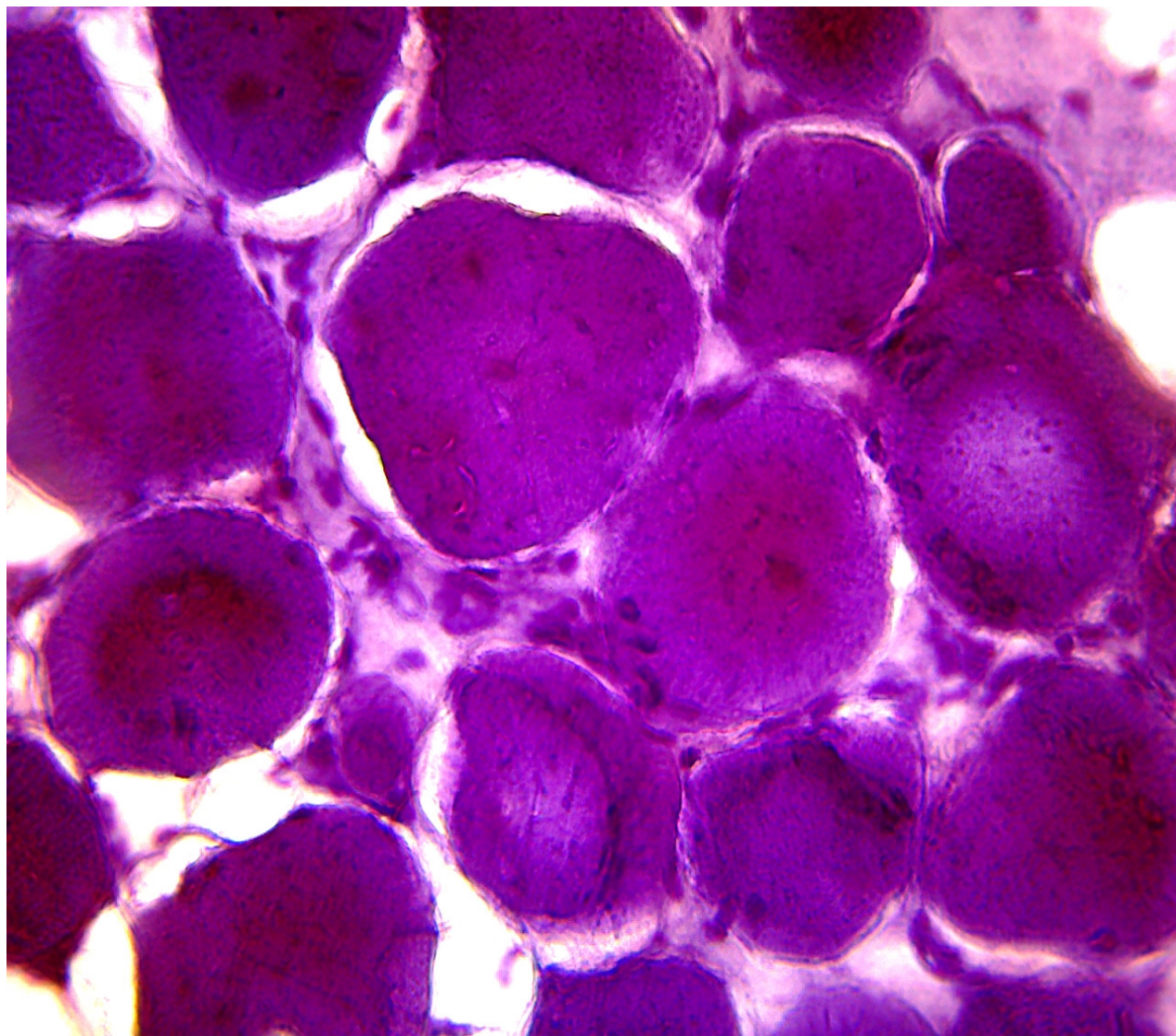


Рис 4.22. Хворий Гр. (Т40х1) (Гомори-трихром) – волокна на 4, 9 и 1 год- «червоні волокна»; волокно в центрі і під ним «рвані» - дрібні незафарбовані і темні «тріщинки»

Синдром MELAS диференціювали з іншими МТХД - синдромом Лея (підгостра некротизуюча енцефалопатія), органічними ацидеміями, гомоцистинуриєю, синдромом Фабрі, вродженими вадами серця, судинними аномаліями (рис. 4.23).

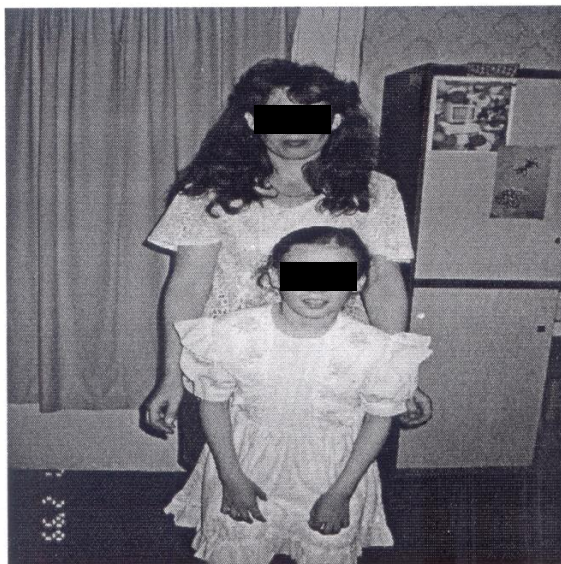


Рис. 4.23. Синдром MELAS

Результати молекулярно-генетичного дослідження мутації A3243G в гені тРНК^{Leu} на синдром MELAS представлені на рис. 4.24 та 4.25.

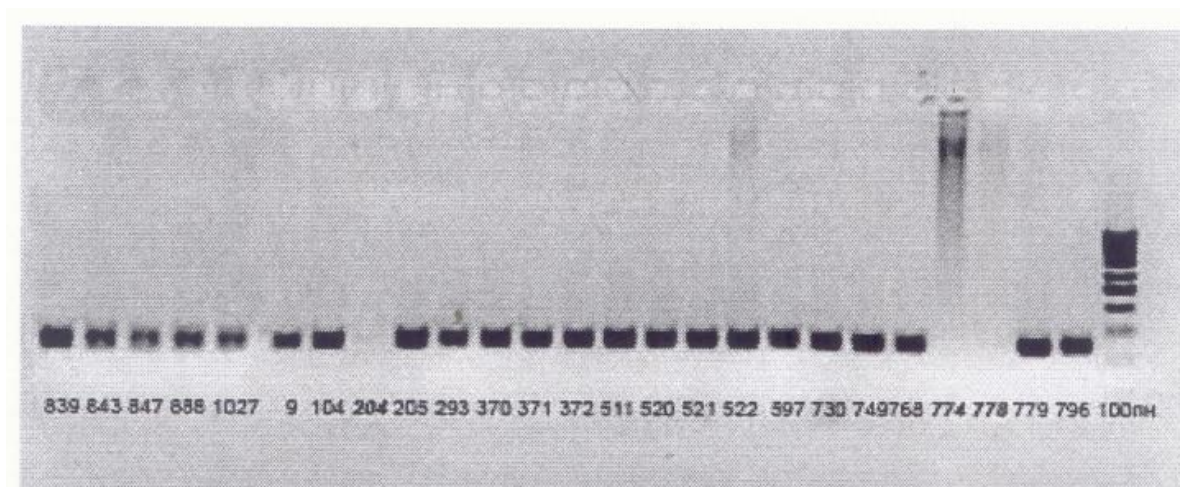


Рис. 4.24. Перевірка ампліфікації: 204, 774, 778 – ампліфікація не пройшла; 100 п.н. – маркер довжини фрагментів; 9, 104, 205, 293, 370, 371, 372, 511, 520, 521, 522, 597, 730, 749, 768, 779, 796, 839, 843, 847, 888, 1027 – ампліфікація пройшла успішно

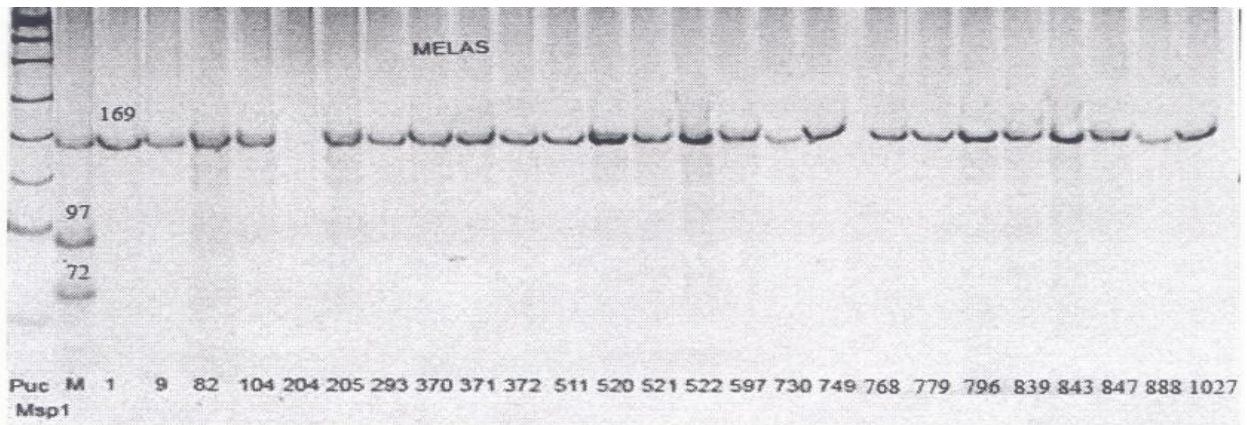


Рис. 4.25. Рестрикційні фрагменти в поліакріламідному гелі при дослідженні мутації A3243G в гені тРНК^{1^{си}} мтДНК: 169 – довжина фрагмента без мутації (п.н.); 97, 72 – довжини фрагментів, на які рестриктаза розрізає ген за наявності мутації (п.н.); М – контрольний зразок, узятий у гетероплазматичного носія мутації A3243G з переважанням копій мутантів тРНК^{L^{cu}}; 204 – зразок, ампліфікація якого не пройшла; 1, 9, 82, 104, 205, 293, 370, 371, 372, 511, 520, 521, 522, 597, 730, 749, 768, 779, 796, 839, 843, 847, 888, 1027 – досліджувані зразки без мутації; PUC MspI - маркер довжини фрагмента

Серед хворих, у яких спостерігалась міоклонус-епілепсія на тлі ураження зорових нервів прогресуюча деменція, ми підозрювали синдром MERRF, ознаки якого наведені в табл. 4.31.

Таблиця 4.31

Клінічні та біохімічні ознаки синдрому MERRF

Нервова система	М'язова система	Орган слуху	Ендокринна система	Серце	Лабораторні та інструментальні дані
Міоклонус-епілепсія, деменція, атаксія, спастичність	М'язова слабкість, міопатія	Сенсоневральна приглухуватість	ЦД	Кардіоміопатія	Підвищений рівень лактата, пірувата, синдром «червоних рваних волокон» (RRF), мутації мтДНК

Синдром MERRF обумовлений точковими мутаціями в гені лізінової тРНК у позиціях 8344 і 8356 мтДНК. Захворювання успадковується із внутрісімейним поліморфізмом, що може бути обумовлено різним співвідношенням між мутантними і нормальними мтДНК у різних ооцитах.

Вік хворих, яких ми обстежили, був варіабельним. Ранніми клінічними ознаками були: швидка стомлюваність при фізичних навантаженнях, болі у ікроніжних м'язах, зниження пам'яті, уваги. Найбільш типовим був симптомокомплекс: прогресуюча міоклонус-епілепсія, що включала міоклонус (раптове, швидке, короткочасне м'язове скорочення, яке обумовлене залученням у патологічний процес ЦНС), атаксія і деменція. Також у хворих спостерігались генералізовані тоніко-клоничні судороги, нейросенсорна глухота, атрофія зорових нервів, помірні ознаки міопатії, сенсорні порушення та інші неврологічні симптоми.

Критерії діагнозу були такі: материнський тип успадкування; дебют у віці 3-65 років; ураження ЦНС: міоклонус, атаксія, деменція у поєднанні з нейросенсорною глухотою, атрофією зорових нервів, порушення глибокої чутливості; лактат-ацидоз; недостатність 1, 3, 4 комплексів дихального ланцюга; ЕЕГ: генералізовані комплекси «спайк-хвиля»; ЕМГ: первинно-м'язовий тип ураження; КТ: атрофія мозку, лейкоенцефалопатія, іноді кальцифікація базальних гангліїв; «рвані червоні волокна» в біоптатах кістякових м'язів; прогресуючий перебіг (рис. 4.19, 4.20).

Диференційний діагноз проводився з хворобою Гоше, синдромом міоклонуса з нирковою недостатністю та інш.), хворобами із дизгенезіями мозку.

Результати дослідження міссенс-мутації A8344G в гені тРНК-лізін на синдром MERRF представлені на рис. 4.26 і 4.27.

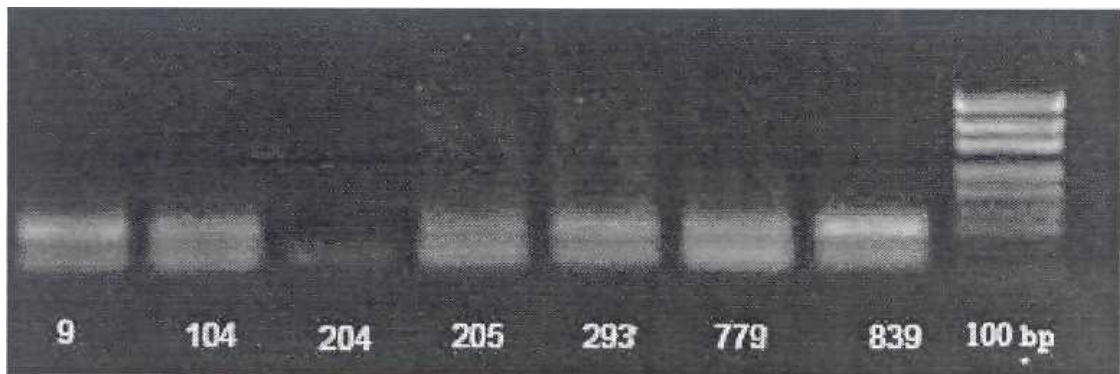


Рис. 4.26. Перевірка ампліфікації: 204 – ампліфікація не пройшла;
100 bp – маркер довжини фрагментів;
9, 104, 205, 293, 779, 839 – ампліфікація пройшла успішно

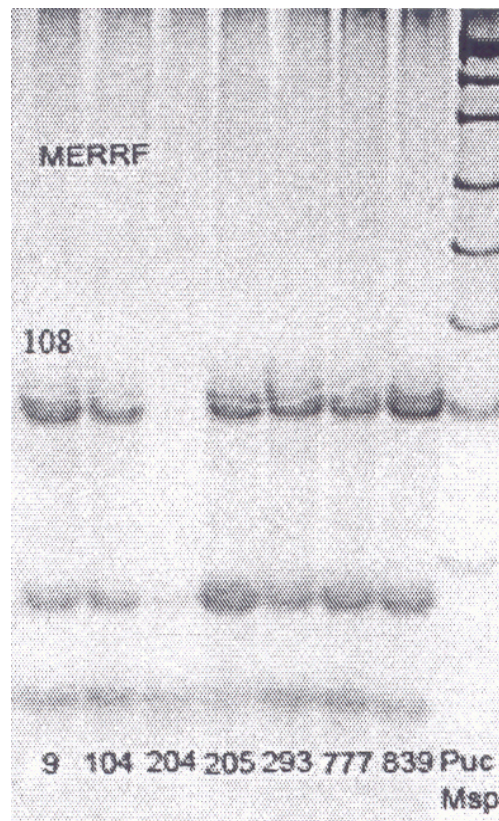


Рис. 4.27. Рестрикційні фрагменти в поліакриламідному гелі при дослідженні A8344G міссенс-мутації в гені тРНК^{lyl} мтДНК: 108 - довжина фрагмента без мутації (п.н.) (за наявності мутації рестриктаза розрізає ген на фрагменти з довжинами 73 і 35 п.н.); 204 - зразок, ампліфікація якого не пройшла; 9, 104, 205, 293, 777, 839 - досліджувані зразки без мутації; PUC MspI – маркер довжини фрагмента 100 – 1000 п.н.

Таким чином, на підставі пошуку точкових мутацій мтДНК у 49 пацієнтів із певними клінічно визначеними МТХД, показана складність уточнюючої молекулярної діагностики та її висока діагностична ефективність. Зусиллями колабораторного дослідження, в якому ми брали участь, вперше описана в Україні як мутація *de novo* 12706C ND5 мтДНК, асоційована із синдромом Лея (Leigh syndrome).

Проведене дослідження є унікальним прикладом співпраці декількох дослідників із різних країн, яке дозволило знайти фено- і генотипічні кореляції між клінічними ознаками та результатами молекулярно-генетичного дослідження. Встановлення таких кореляцій у кожному випадку хвороби є творчим процесом, який потребує дискусійного ставлення до отриманих результатів.

Виходячи із цього, було висунуто гіпотеза про те, що мутації F124L і E145G ND5 змінюють функціонально важливі сайти, які потенційно залучені в механізм переносу протонів, і це порушення являє собою первинний патогенетичний механізм експресії. Часте виникнення патологічних мутацій у трансмембранній петлі III підтримує ідею про те, що таке місце розташування впливає на функцію або структуру протонного каналу комплексу I. Таким чином, навіть малий мутаційний вантаж (менш 50% мутантної мтДНК при 12706C і 12770A) може значно впливати на його функцію і брати участь у створенні фенотипу синдрому Лея, що підтверджує теоретичне припущення про ймовірність виникнення нових мутацій у зародкових клітинах матерів пробандів із МТХД.

Отже, при синдромі Лея проводився пошук мутацій ND5^{snp}, TRNL1^{snp}, SURF1 і T8993G в гені АТР6. Знайдено мутації SURF1 (1 пацієнт) і ND5^{snp} 12706 (1 пацієнт). При мутації *de novo* 12706 знайдені також поліморфізми: нова мутація (тРНК-лейцин) 3624A/G, АК заміна (тРНК-лейцин) *syn*, поліморфізм (тРНК-лізин) 8860G, АК заміна (тРНК-лізин) *trh/ala*, нова мутація (тРНК-лізин) 9018T/C, АК заміна (тРНК-лізин) *syn* (1 пацієнт). При синдромі MELAS проводився пошук мутації A3243G в гені тРНК^{leu}. Зазначена мутація не

знайдена, знайдені поліморфізми: в гені тРНК^{lys} 8697G/A, АК заміна (тРНК-лізин) *syn*, тРНК-лізин 8860G, АК заміна (тРНК-лізин) *trh/ala*. При синдромі MERRF проводився пошук мутації A8344G в гені тРНК^{lys} (n=7). Мутація не знайдена, знайдені поліморфізми. При синдромі Кернса–Сейра у трьох пацієнтів знайдена делеція крупного фрагмента мтДНК. В інших випадках мутації не знайдені, що пояснюється пошуком розповсюджених мутацій. Отримані дані підкреслюють необхідність пошуку ядерних та рідкісних мітохондріальних мутацій при МТХД, бо саме на цих даних може бути вибудована в майбутньому персоналізована пренатальна діагностика і заходи предикативної медицини. Разом з тим, враховуючи значну генетичну гетерогенність кожної нозологічної форми МТХД, здатність порушень енергетичного обміну змінювати своє обличчя протягом життя пацієнта, переходячи із однієї нозологічної форми в іншу, залишають клінічну діагностику МТХД значущою задля своєчасної терапії і реабілітації. Подальше вивчення генно-фенотипових кореляцій у діагностиці МТХД буде поєднане із врахуванням важливості не тільки геномних, а і епігеномних, зовнішньо-середовищних факторів на тлі взаємодії генів у реалізації фенотипу тієї чи іншої «точкової» мутації МТХД.

4.3. Клінічні особливості хворих із МТХД, асоційованих із поліморфними варіантами генів мтДНК

Нині, завдяки успіху сучасної діагностики, з'являються «старі» захворювання, які класифікуються по-новому. Раніше основну частку спадкових хвороб складали хвороби, які були успадковані за типом мутації, що виникали в ядрі. Завдяки сучасним новим технологіям підтверджене існування материнського або цитоплазмичного (неменделівського) успадкування (С.Н. Иллариошкин, 2007, Patrick F Chinnery, 2006).

Відповідно і захворювання, які належать до такої категорії, мають власні відмінності. До них відносяться МТХД або порушення енергетичного обміну,

при яких наявні мутації в мітохондріальній ДНК (мтДНК). Але МТХД можуть бути підконтрольними не тільки мтДНК, але і ядерній ДНК, а також бути результатом дій внутрішніх або зовнішніх чинників. Встановлено, що відмінності в клінічних ознаках обумовлені відмінностями в коді (нуклеарному і мітохондріальному): в мітохондріях людини кодон AUA кодує амінокислоту метіонін замість ізолейцину в стандартному коді. Кодони AGA і AGG, в стандартному коді, що кодують аргінін, являються стопкодонами, а кодон UGA, в стандартному коді, який являється стоп-кодоном, в мтДНК кодує триптофан.

В мтДНК виявлені ділянки, за якими найчастіше спостерігаються відмінності в нуклеотидній послідовності (поліморфізм). Поліморфізм мтДНК широко використовується для встановлення ступеня дивергенції між різними популяціями людини. (Zhadanov S.I., et al 2007; Гусар В.А., 2007).

Формування поліморфізму здійснюється в мтДНК завдяки мутаційному процесу, оскільки рекомбінаційна мінливість відсутня. Мутації мітохондріального генома, що зберігаються і накопичуються, виявляються в еволюційній історії виду і окремої особи (Zhadanov S.I., et al; 2006). Незважаючи на те, що ДНК мітохондрій майже не змінюється з часом, в ній накопичується деяка кількість мутацій. Змінена мітохондріальна ДНК передається від матері усім дітям. На підставі таких мутацій, які називаються одонуклеотидними поліморфізмами, відбувається ділення усіх людей по відношенню до гаплогруп мітохондріальній ДНК. Одонуклеотидним поліморфізмом (single nucleotide polymorphism - SNP; або сніп) називають зміну в послідовності ДНК розміром в один нуклеотид, яка може статися в результаті заміни, вставки або випадіння нуклеотиду.

SNP можуть змінювати роботу генів, але у деяких випадках вони ніяк не позначаються на їх активності. У геномі людини близько 10 мільйонів одонуклеотидних поліморфізмів. Наявність у людини певного SNP збільшує для нього вірогідність розвитку тієї або іншої хвороби. (Жаданов С.І., Гречанина Ю.Б, Гусар В.А., 2009).

Мінливість мітохондріального генома вивчається на підставі оцінки аналізу одонуклеотидних замінів мтДНК, які виявляються класичним методом аналізу поліморфізму ДНК. Цей метод у поєднанні з вивченням нуклеотидної послідовності гіпермінливої області мтДНК дозволяє проводити комплексну оцінку поліморфізму мтДНК в популяціях людини. Такий підхід виявив важливу для вивчення молекулярної еволюції особливість мітохондріальної ДНК: певним расовим групам типів мтДНК, ключові мутації яких розташовані в різних ділянках молекули, відповідають певні типи нуклеотидних послідовностей гіперваріабельної ділянки мтДНК. Оскільки існує нерівновага по зчепленню між мутаціями в мітохондріальному геномі, молекулу мтДНК можна розглядати як один локус, представлений безліччю алелей, певні групи яких відповідають певним групам зчеплення між конкретними мутаціями. Ці два підходи покладені в основу класифікації і еволюції ліній усього мітохондріального генома сучасного людства (J. L. Elson et al, 2007).

Протягом останніх 15-ти років з'являється все більше свідчень про те, що поліморфні варіанти генів мтДНК асоціюють з багатьма поширеними захворюваннями центральної нервової системи та з окремими давно відомими спадковими синдромами.

М. Mancuso et al. (2009) висловили припущення, що до клінічних ознак і патогенез хвороби Альцгеймера залучені мітохондрії. Хвороба Альцгеймера належить до нейродегенеративних порушень, які призводять до незворотньої втрати кортикальних нейронів, особливо в неокортексі та гіпокампі. Хвороба Альцгеймера є найбільш поширеною формою розумової ретардації у похилих людей. Крім втрати нейронів, патологічними особливостями хвороби є позаклітинні сенильні бляшки, які містять бета-амілоїд і нейрофібрилярні сплетіння. Сімейна форма хвороби Альцгеймера асоційована з мутацією білка попередника амілоїда і генів пресеніліна. 95% пацієнтів відносяться до спорадичних випадків із пізньою маніфестацією, у яких етіологія хвороби пов'язана із взаємодією між умовами оточуючого середовища і генетичною схильністю. Автори знайшли морфологічні, біохімічні і генетичні порушення мітохондрій у багатьох тканинах при хворобі Альцгеймера. Порушення

респіраторного ланцюга спостерігалось у мозку, тромбоцитах і фібробластах пацієнтів.

Дослідження останнього десятиліття дозволили встановити наявність впливу генетичного фону людини на прояви МТХД (Kosinski, R. J., D. R. Weinbrenner, and M. G. Cross. 2008). Останні дослідники знайшли зв'язок між генетичним фоном і підвищеним ризиком клінічних проявів хвороби Альцгеймера і Паркінсона. Пізніше Michio Kaku (2012), підтвердили існування такого зв'язку. Ці факти підвищили інтерес учених до визначення ролі поліморфних варіантів генів, нейтральних і слабопатогенних мутацій мтДНК, які послідовно накопичуються в материнських організмах, у маніфестації МТХД.

На думку Volnick, DA, Fullwiley, D.2007, Гусар В.А., 2007 еволюційні процеси змінили роль поліморфізмів мтДНК: виникло припущення, що в минулому вони носили адаптивний характер (позитивні мутації), а з плином часу набули якості негативних мутацій і перетворились в гени схильності до мітохондріальних хвороб. Існує припущення (Никитина Л.П., и соавт.2011), що патогенні мутації мтДНК супроводжуються накопиченням вільних радикалів кисню та окислювальним стресом, внаслідок чого порушується проникливість внутрішньої мембрани мітохондрій і активуються фактори апоптозу клітин. Це пояснює вірогідний вплив слабопатогенних і нейтральних мутацій на клінічні прояви МТХД.

Це наукове підґрунтя дало нам підставу для вивчення ролі генетичної конституції, зокрема наявності впливу поліморфних варіантів генів мтДНК і фолатного циклу на формування клінічних ознак МТХД задля розробки як наукової гіпотези так і адекватної реабілітації хворих на МТХД.

Були висунуті гіпотези:

1. На характер клінічних проявів і маніфестацію МТХД впливають поліморфні варіанти генів мтДНК, які в процесі еволюції змінили свої функції і перейшли із розряду адаптивних (позитивних і нейтральних) мутацій в розряд негативних і сформували гени схильності.

2. Метіонін, який пройшов шлях еволюційного відбору і взяв участь у формуванні генетичного коду мітохондрій, впливає на клінічні ознаки МТХД як універсальний донор метильних груп – головних модифікаторів геному.

В Харківському спеціалізованому медико-генетичному центрі (ХСМГЦ) проблема МТХД вивчається з 1992 року, що створило основу для проведення першого дослідження мітохондріального геному в Україні. Визначення популяційних характеристик поліморфізму ГВС I (гіперваріабільний сегмент I) контрольного регіона мт ДНК у поєднанні із реєстраційним і філогенетичним аналізом індивідуальних геномів мт ДНК проведене групою авторів у складі Ю.Б. Гречанина, В.А. Гусар, С.М. Григоров, А.І. Мінков в 2003 р. «Мітохондріальні хвороби: проблеми діагностики, лікування і профілактики». Робота була удостоєна Державної премії в галузі науки і техніки України в 2002 році.

О.Я. Гречанина та В.А. Гусар (2007) вивчали генетичне розмаїття української популяції. В.А. Гусар провела порівняльний аналіз параметрів мтДНК у вибірках пацієнтів та контрольній групі і знайшла, що відсоток носіїв унікальних гаплотипів в українській популяції склав 56,6%, а найбільш частим був гаплотип CRS (11,0%) (8). Автор визначила індекси генетичного різноманіття, які склали $D = 0.990 \pm 0.004$ та $O_n = 5,18$ і підкреслила важливий факт – українській популяції, яка вивчалась, притаманний високий рівень генетичного різноманіття. Ці дані обумовили потребу у вивченні спектру поліморфізмів мтДНК, асоційованих із МТХД як для розуміння еволюційних процесів, які нині відбуваються, так і для своєчасної діагностики і адекватної терапії МТХД. Наведені результати досліджень підтвердили наявність впливу нейтральних нуклеотидних замін на характер клінічних ознак МТХД

Наше дослідження спрямоване на пошук впливу поліморфізмів мтДНК на клінічні ознаки МТХД, на встановлення епігенетичних механізмів, які формують гетерогенну групу захворювань із поліморфізмом клінічних проявів, об'єднати яку можливо лише на підставі єдності етіопатогенетичних факторів.

Об'єктом дослідження ролі поліморфізму індивідуальних геномів мт ДНК у формуванні ознак МТХД була клінічно гетерогенна група 37 пацієнтів із 203,

які спостерігаються з приводу МТХД. Діагноз був встановлений на підставі клініко-генетичних досліджень. Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних генів мтДНК проведене проф. Т. Шурром (лабораторія антропогенетики Пенсильванського університету м. Філадельфія, США) на підставі договору про колабораторне дослідження.

Клінічна, соматогенетична біохімічна оцінка пацієнтів із використанням сучасних візуальних методів дослідження дозволили визначити у носіїв поліморфних варіантів генів мтДНК характер фенотипічних проявів. Відмічені характерні для МТХД основні ознаки – прогресивний плин, множинність уражень, переважні зміни з боку енерготропних органів.

Про останнє свідчить графік на рис. 4.28, на якому відбиті значущі зміни в групі пацієнтів із поліморфними варіантами мтДНК.

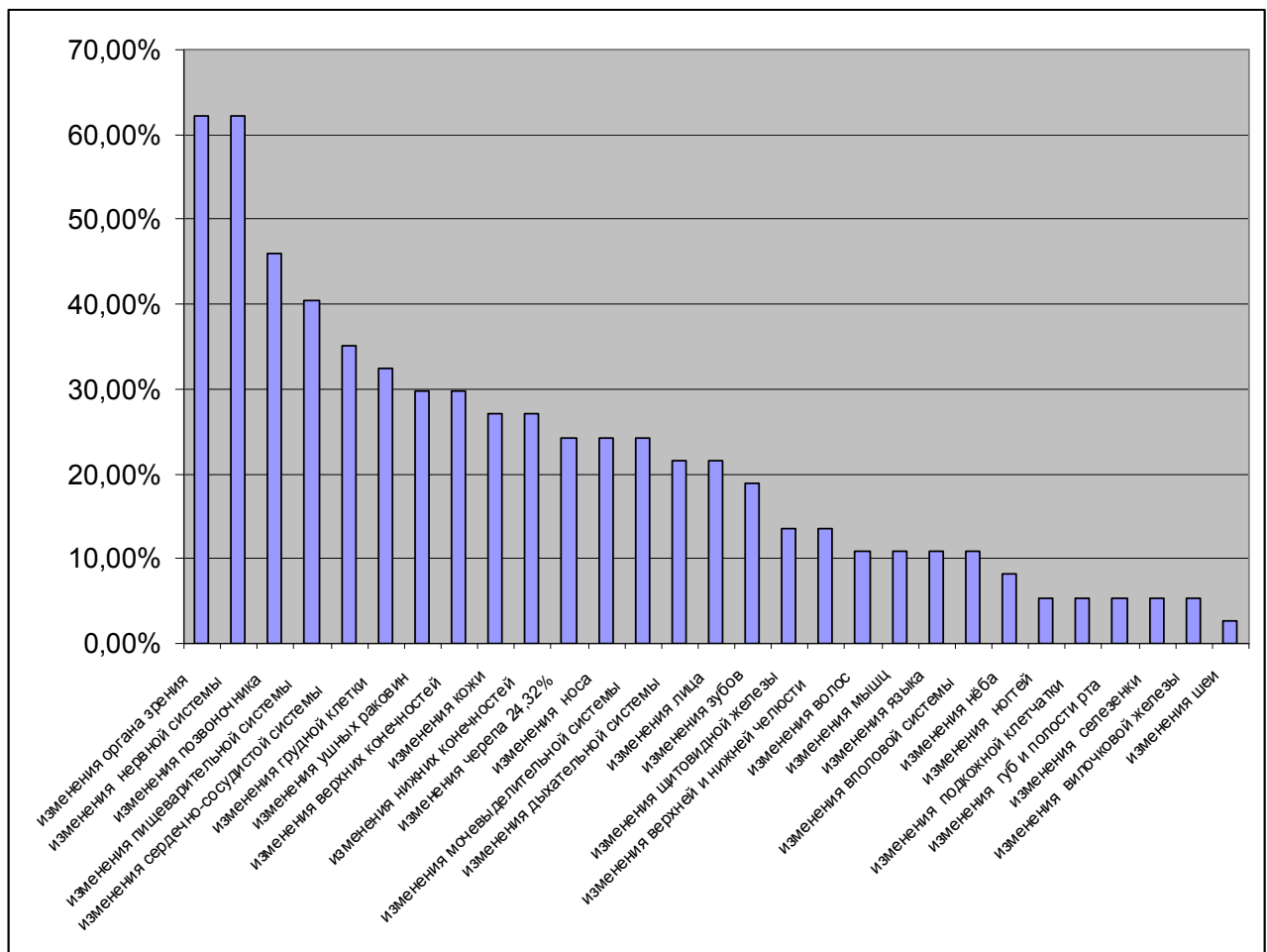


Рис. 4.28. Найбільш значні зміни в групі хворих з мітохондріальними поліморфізмами

В групі пацієнтів із поліморфізмів мтДНК найбільш значущі зміни виявлені з боку нервової системи (62,16%) та органів зору (62,16%), хребта (45,95%), системи травлення (40,54%), серцево-судинної системи (35,14%), скелетної системи (деформація грудної клітини 32,43%, верхніх кінцівок – 29,73%, нижніх кінцівок – 27,03%, черепа – 24,3%), сечовидільної системи (24,32%). Перелічені системи мали високу ступінь патологічних ознак. Разом з тим звертає увагу на те, що клінічний поліморфізм був притаманний цим пацієнтам: менш виражені ознаки були відмічені з боку м'язів (у 43,24%), грудної клітини (у 27,03%), сечовидільної системи – (у 21,62%), нервової системи – у (16,22%) і т.і.

Сумація різного ступеню уражень кожної системи свідчить про те, що більшість пацієнтів із поліморфізмами мтДНК мала поліорганні та множинні ураження.

Вивчення асоціації окремих уражених систем і органопатій із певними поліморфізмами мтДНК дозволило підтвердити переважне заволікання у фенотип МТХД енерготропних органів- нервової, м'язової, скелетної, ендокринної і серцево-судинної систем (табл. 4.32). Відмічене найбільше заволікання органів і систем в патологічний процес при поліморфізмах мтДНК (тРНК-лізин) (8697 G/A, 88606, 8701 G/A, 8856 G/A, 8860 A (CRS), 8251 G/A, 8472 C/T, 8448 T/C, 8994 G/A, 8337 T/C, 8794 C/T, 8584 G/A, 8701 A/G) та при амінокислотній заміні (тРНК-лізин) (syn, thr/ala, pro/leu2, met/val, met/thr, his/tyr, ala/thr) (табл. 4.32).

Отримані дані підтверджують клінічну значимість поліморфізмів у формуванні клінічних проявів, які притаманні мітохондріальним порушенням.

Аналіз наведених даних у табл. 4.33 вочевидь підтверджує, з одного боку, переважне ураження нервової системи при МТХД, яка асоційована із поліморфізмами мтДНК та інших енерготропних органів і систем, з другого – наявність феномену генетичної гетерогенності (однаковий клінічний профіль при різних поліморфізмах мтДНК і наявність різних клінічних ознак при однакових поліморфізмах мтДНК), притаманної негативним мутаціям. Загалом, отримані дані підтверджують клінічну значущість поліморфізмів мтДНК у формуванні клінічних ознак МТХД.

Таблиця 4.32

Уражені системи та органопатії, асоційовані із генами
тРНК-лейцин та тРНК-лізин

№ п\п	Органопатії уражені системи	Полі-морфізм (тРНК-лейцин)	Нова мутація (тРНК-лейцин)	АК заміна (тРНК-лейцин)	Полі-морфізм (тРНК-лізин)	Нова мутація (тРНК-лізин)	АК заміна (тРНК-лізин)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Енцефалопатія	3197Т/С 3336Т/С	3624А/Г 3594С/Т 3705Г/А 3505А/Г 3552Т/А	syn thr/ala	8697Г/А 8860Г 8856Г/А 8251Г/А 8701А/Г 8994Г/А 8337Т/С 8794С/Т 8584Г/А	8164С/Т 8610Т/С 8614Т/С	syn thr/ala pro/leu2 ala/thr his/tyr
2	М'язова система	3336Т/С 3197Т/С	3594С/Т 3624А/Г 3505А/Г 3552Т/А	syn thr/ala non coding	8697Г/А 8860Г 8701А/Г 8556Г/А 8337Т/С 8794С/Т 8584Г/А	9018С/Т 8164С/Т 8836А/Г 8865Г/А	syn thr/ala his/tyr ala/thr
3	Порушення ЖКТ	3197 Т/С			8697Г/А 8860Г		syn thr/ala
4	Скелетні порушення	3197Т/С			8697Г/А 8860Г 8860А (CRS)		syn thr/ala
5	Офтальмопатія	3336Т/С 3197Т/С	3705Г/А 3505А/Г	thr/ala	8860Г 8697Г/А 8448Т/С 8251Г/А		thr/ala syn
6	Кардіопатія	3197Т/С	3705Г/А 3505А/Г	syn thr/ala	8251Г/А 8994Г/А 8860Г 8337Т/С 8794С/Т	8610Т/С 8614Т/С 8865Г/А 8592Г/А	thr/ala syn his/tyr
7	Нейросенсорна приглухуватість				8448Т/С 8860Г		thr/ala
8	Ендокрінопатія				8860Г		thr/ala

Ранжирування ознак $x^{k,p}_i$ за значенням коефіцієнта Крамера для ОГ2 і КГ

Ознака	коефіцієнт Крамера V
Нервова система	0,463078418
Верхні кінцівки	0,459821837
Вушні раковини	0,431833869
Сечовидільна система	0,425828622
Ніс	0,423737755
М'язи	0,420822231
Область очей, очне яблуко	0,366829924
Лице	0,333039134
Травна система	0,332634975
Шия	0,302630663
Шкіра	0,287968456
Грудна клітка	0,270729769
ССС	0,269603397
Дихальна система	0,242179615
Череп	0,199761784
Живіт, таз	0,19415414
Ендокрінна система	0,17504203
Губи та порожнина рота	0,147720486
Нижні кінцівки	0
Зуби	0
Піднебіння	0
Хребет	0
Статева система	0
Волосся	0
Верня та нижня щелепа	0

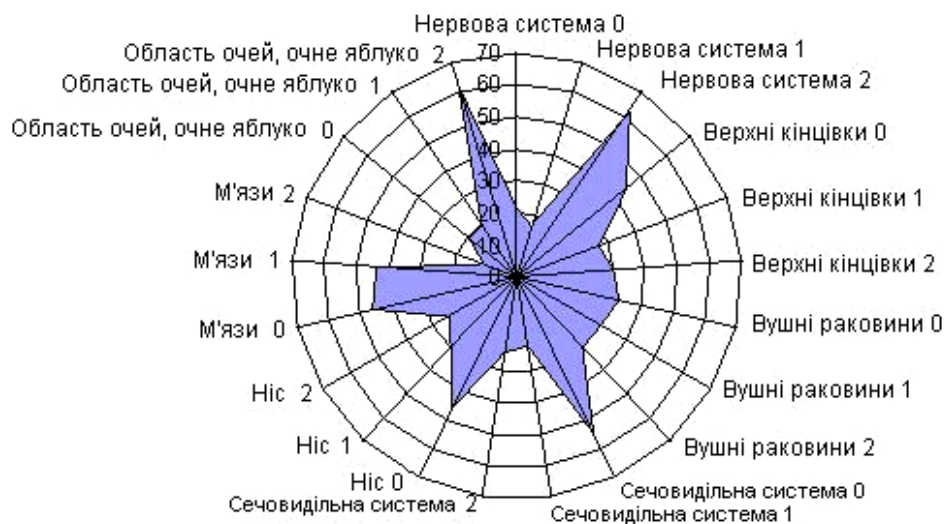
З метою визначення ступеня відмінності фенотипових ознак МТХД, асоційованої із поліморфізмів мтДНК (основна група 2 – ОГ2) від фенотипових ознак популяції проведений розрахунок коефіцієнту Крамера V по кожній із клінічних ознак, яка розглядалася.

Про високу вірогідність впливу еволюційно нейтральних нуклеотидних замін на пенетрантність патогенних мутацій і експресію мітохондріальних порушень вказували (Zhou S, 2006, Valko M, 2007).

Ураження нервової системи при МТХД, асоційованих із поліморфізмом мтДНК носили провідний характер. Основними симптомокомплексами були енцефалопатія і поразка периферичної нервової системи (до спектру симптомів входили вегето-судинна дистонія, епі-синдром, деменція, що пов'язано з порушенням дозрівання білої речовини-процесів мієлінізації, порушення чутливості і скороминущі парези).

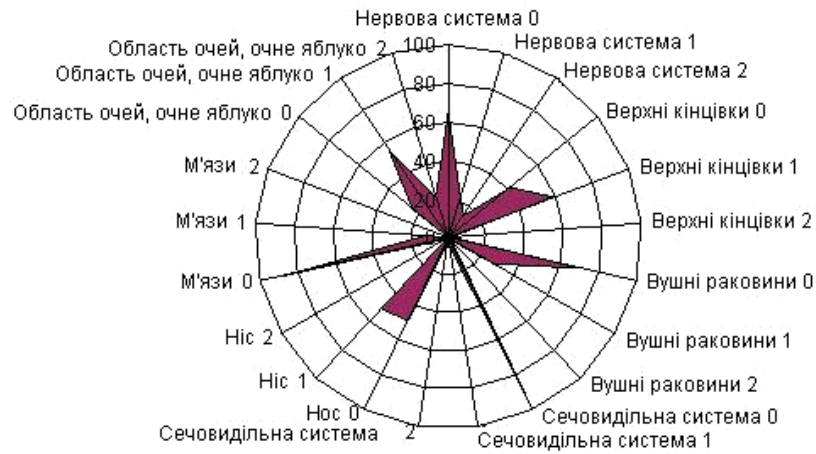
В групі хворих з поліморфізмом мтДНК зміни з боку центральної нервової системи зустрілися у 78,38%, що і дає змогу вважати їх найбільш значущими. У КГ зміни з боку ЦНС зустрілися лише у 8 (6,2%) пацієнтів, що підтверджує вплив поліморфізмів мтДНК на порушення такого високо енерготропного органу, як ЦНС (рис. 4.29 а, б, в, табл. 4.34–4.40).

Отримані результати були представлені в графічному вигляді (рис. 4.29).



а)

Рис. 4.29. Діаграми розподілу фенотипових ознак (нервова система, верхні кінцівки, вушні раковини, сечовидільна система, ніс, м'язи, область очей та очне яблуко) порівняльних груп ОГ2 та КГ: а) діаграма ОГ2



б)



в)

Рис. 4.29. Діаграми розподілу фенотипових ознак (нервова система, верхні кінцівки, вушні раковини, сечовидільна система, ніс, м'язи, область очей та очне яблуко) порівняльних груп ОГ2 та КГ:
б) діаграма КГ; в) діаграми ОГ2 та КГ

Таблиця 4.34

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,1}$ «нервова система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,1}$	0	8 (21,62%)	92 (64,79%)	100 (86,41%)	38,39	0,47
	1	6 (16,22%)	30 (21,13%)	36 (37,35%)		
	2	23 (62,16%)	20 (14,08%)	43 (76,24%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.35

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,20}$ «верхні кінцівки»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,20}$	0	16 (43,24%)	58 (40,84%)	74 (84,08%)	37,85	0,46
	1	10 (27,03%)	82 (57,75%)	92 (84,78%)		
	2	11 (29,73%)	2 (1,41%)	13 (31,14%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.36

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,8}$ «вушні раковини»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,8}$	0	12 (32,43%)	100 (70,42%)	112 (102,85%)	33,38	0,43
	1	14 (37,84%)	38 (26,76%)	52 (64,6%)		
	2	11 (29,73%)	4 (2,82%)	15 (32,55%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.37

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,5}$ «сечовидільна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,5}$	0	20 (54,05%)	131 (92,25%)	151 (146,3%)	32,46	0,426
	1, 2	17 (45,95%)	11 (7,75%)	28 (53,7%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.38

Таблиця сопряженности по признаку $x_0^{1,10}$ «ніс»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,10}$	0	17 (45,95%)	69 (48,59%)	86 (94,54%)	32,14	0,42
	1	11 (29,73%)	72 (50,71%)	83 (80,44%)		
	2	9 (24,32%)	1 (0,7%)	10 (25,02%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.39

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,5}$ «м'язи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,5}$	0	17 (45,95%)	125 (88,03%)	142 (133,98%)	31,7	0,42
	1, 2	20 (54,05%)	17 (11,97%)	37 (66,02%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.40

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,9}$ «область очей, очне яблуко»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,9}$	0	7 (18,92%)	33 (23,24%)	40 (42,16%)	24,09	0,37
	1	7 (18,92%)	78 (54,93%)	85 (73,85%)		
	2	23 (62,16%)	31 (21,83%)	54 (83,99%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Вказаний факт підтверджує клінічне спостереження.

Пацієнтка С. А.А. 5 років.

Діагноз при направленні: ДЦП, спастичний тетрапарез з переважною поразкою верхніх кінцівок у стадії патологічної ходи, дезорієнтація, затримка психомовного розвитку.

Скарги: різке погіршення ходи, порушення мови – змазанність, порушення звуковимови, рухова розгальмованість, емоційна нестійкість, капризність.

Анамнез життя: дівчинка від другої вагітності, яка проходила з загрозою переривання. Пологи в термін 40 тижнів, маса, 3,500, зріст 51 см. В ранньому дитинстві часті ОРЗ, бронхіти, краснуха, вітряна віспа.

Анамнез захворювання: мати звернула увагу на те, що в 8 місяців дівчинка самостійно не сидить, а коли почала ходити, то спинялася на носочки,

дуже часто спотикалася, падала. Після лікування у мануального терапевта в 3 роки хода покращалась, але після перенесеного в 1997 році грипу стан погіршився. Дитина консультована невропатологом, поставлений діагноз ДЦП.

Фенотип: гіперпігментація в області локтів, колін, гіпертрихоз, сухість шкіри, алергічний сип, «гусяча шкіра», надлишок підшкірножирової клітковини, широке обличчя, незвичайно довгі вії, птоз, очні щілини S<D, широка спинка носа, дрібні зуби, готичне піднебіння, коротка шия, гіпертелоризм, сакральний синус, сколіоз.

Неврологічний статус: м'язова гіпотонія, гіпомімія, контрактура голіностопних суглобів S>D. Сухожильні рефлексивні S=D з розширеними зонами. Хода паретична з вираженою тулубною атаксією.

Окуліст: патології не виявлено.

ЯМРТ – помірно розширені тіла бокових шлуночків.

Поліморфізм: поліморфізм тРНК лізин 8251 G\A, 8472C\T, нова мутація тРНК-лізин 8836A\G, АК заміна тРНК-лізин – syn, pro\1eu2, thr\ala, met\val.

Діагноз: МТХД, асоційована з поліморфізмом мтДНК. Спастичний тетрапарез. Затримка психомоторного розвитку.

При МТХД ураження органів зору є досить частим і зустрілося у вигляді різних симптомокомплексів – порушення гостроти зору, пігментного ретиніту, катаракти, порушення м'язів – окодвигунів, а також птозу. В групі пацієнтів з МТХД, асоційованої з поліморфізмами мтДНК офтальмопатія зустрілася з частотою, майже ідентичної частоті поразки ЦНС – 81,08 %, що узгоджується з частим поєднанням ураження цих двох систем. У КГ частота офтальмопатій склала 78,3% (101 людина), що пояснюється як дією негенетичних чинників і високою частотою в популяції сполучнотканинної дисплазії, що супроводжується порушенням гостроти зору і патології кристалика, як у вигляді вивиху (підвивиха), так і катаракти, у тому числі і віковій.

При МТХД зустрілися ураження скелета у вигляді остеопорозу, остеопенії, зниження росту, кіфозу, сколіозу, лордозу, арахнодактилії, дисплазії тазостегнових суглобів, спондилоепіфізарної дисплазії.

Значна вираженість ураження хребта відмічена у 45,95%, слабка у 2,7%, загальний відсоток ураженості склав 48,65%, були відсутні зміни у 51,35%. В КГ зміни були присутніми у 53,49% (69 чоловік). Подібні, приблизно однакові, зміни характеризували як вторинну залученість скелетної тканини при МТХД, так і первинну – при ознаках сполучно-тканинних порушень в КГ (рис. 4.30, табл. 4.31–4.48).

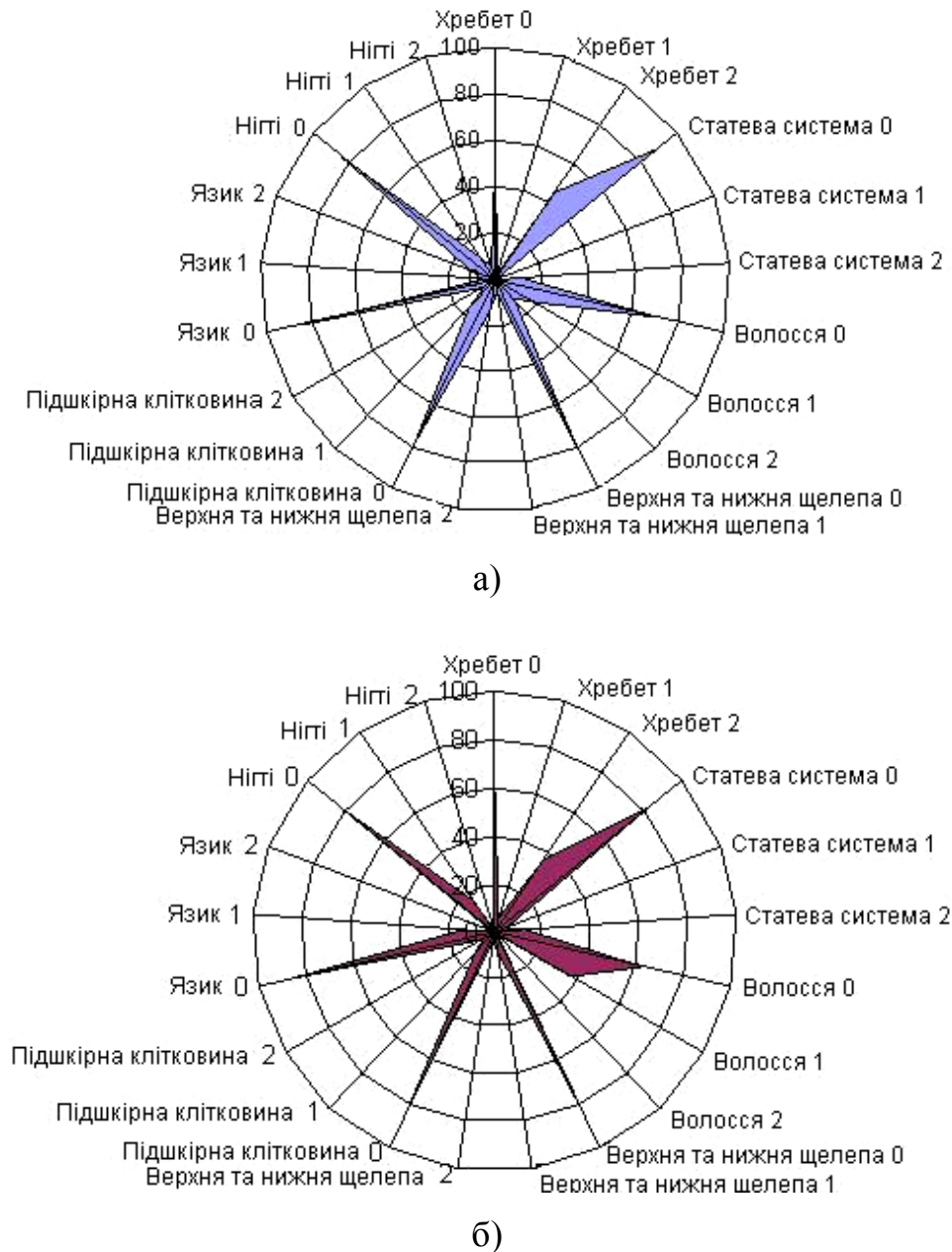
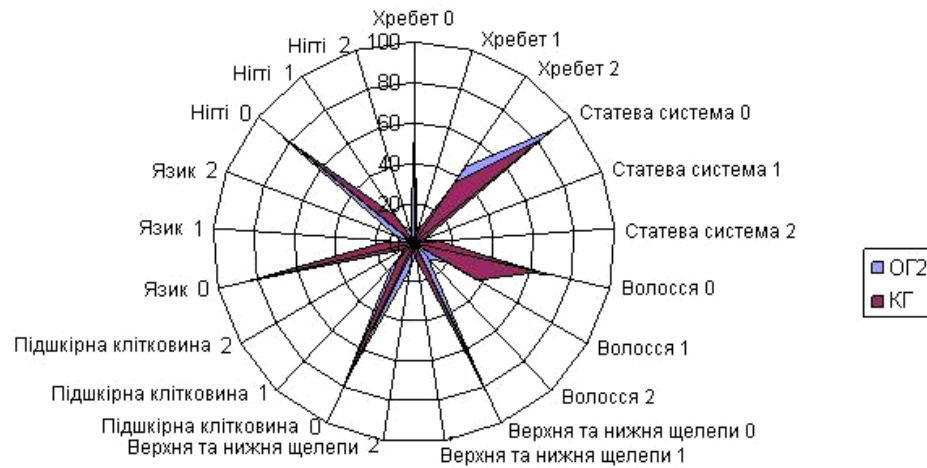


Рис. 4.30. Діаграми розподілу фенотипових ознак (верхня та нижня щелепи, нігті, статева система, хребет, підшкірна клітковина, язик, волосся) порівнянних груп ОГ2 та КГ: а) діаграма ОГ2; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.30. Діаграми розподілу фенотипових ознак (верхня та нижня щелепи, нігті, статева система, хребет, підшкірна клітковина, язык, волосся) порівнянних груп ОГ2 та КГ: в) діаграма ОГ2 и КГ

Таблиця 4.41

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,15}$ «піднебіння»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,15}$	0	18 (48,65%)	85 (59,86%)	103 (108,51%)	1,51	0
	1, 2	19 (51,35%)	57 (40,14%)	76 (91,49%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.42

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,18}$ «хребет»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,18}$	0	19 (51,35%)	82 (57,75%)	101 (109,1%)	1,38	0
	1	1 (2,7%)	8 (5,63%)	9 (8,33%)		
	2	17 (45,95%)	52 (36,62%)	69 (82,57%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.43

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,6}$ «статева система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,6}$	0	33 (89,19%)	117 (82,39%)	150 (171,58%)	0,998	0
	1, 2	4 (10,81%)	25 (17,61%)	29 (28,42%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.44

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,3}$ «волосся»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,3}$	0	26 (70,27%)	89 (62,68%)	115 (132,95%)	0,74	0
	1, 2	11 (29,73%)	53 (37,32%)	64 (67,05%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.45

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,12}$ «верхня та нижня щелепи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,12}$	0	30 (81,08%)	123 (86,62%)	153 (167,7%)	0,73	0
	1, 2	7 (18,92%)	19 (13,38%)	26 (32,3%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.46

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,4}$ «підшкірна клітковина»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,4}$	0	29 (78,38%)	117 (82,39%)	146 (160,77%)	0,31	0
	1, 2	8 (21,62%)	25 (17,61%)	33 (39,23%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,14}$ «язик»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,14}$	0	31 (83,78%)	123 (86,62%)	154 (170,4%)	0,2	0
	1, 2	6 (16,22%)	19 (13,38%)	25 (29,6%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.48

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,2}$ «нігті»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,2}$	0	31 (83,78%)	117 (82,39%)	148 (166,17%)	0,04	0
	1, 2	6 (16,22%)	25 (17,61%)	31 (33,83%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Пацієнтка М., 3 роки 9 місяців.

Діагноз при направленні: природжений сколіоз.

Скарги: скривлення хребта.

Анамнез хвороби: хвора з 3 місяців – дисплазія тазостегнових суглобів, перенесла гнійний отит, з 3-х років сколіоз.

Осбливості перебігу вагітності у матері: від першої нормальної вагітності, кесаревою розтину (асфіксія плода, слабкість пологої діяльності).

Родовід: рак легенів, псоріаз, сколіоз.

Фенотип: тонке волосся, дизморфічні вушні роковини, епікант, блакитні склери, високе піднебіння, гіпотелоризм сосків, «чітки» на реберцях, сколіоз, варусна деформація гомілки, систолічний шум у серці, дифузні зміни печінки, ДЖВП, панкреатопатія, гідрокалікоз.

Поліморфізм: поліморфізм (тРНК-лейцин) 3197T\C, поліморфізм (тРНК-лізин) 8860G, АК заміна (тРНК-лізин), thr/ala.

Діагноз: Гіперпролінемія, МТХД.

Зміни травної системи при клінічному обстеженні у хворих з МТХД носили різноманітний характер, що було обумовлено, найчастіше, слабкістю гладкої мускулатури, і, у разі поєднання МТХД з дефіцитом фолатного циклу, з ендотеліальною дисфункцією. Відмічались гастропатії, порушення функції підшлункової залози у вигляді проносів, блювоти, зміни в печінці у вигляді порушення її функції (підвищення амінотрансфераз) і структури – гепатомегалії, гепатозу. У хворих з МТХД, асоційованою із поліморфізмами мтДНК частота поразки травної системи склала 40,54% – сильно виражені зміни, слабо були виражені у 10, 81% (всього були наявні у 51,35%). В контрольній групі зміни були присутніми у 20,93% рис. 4.31, табл. 4.49–4.55.

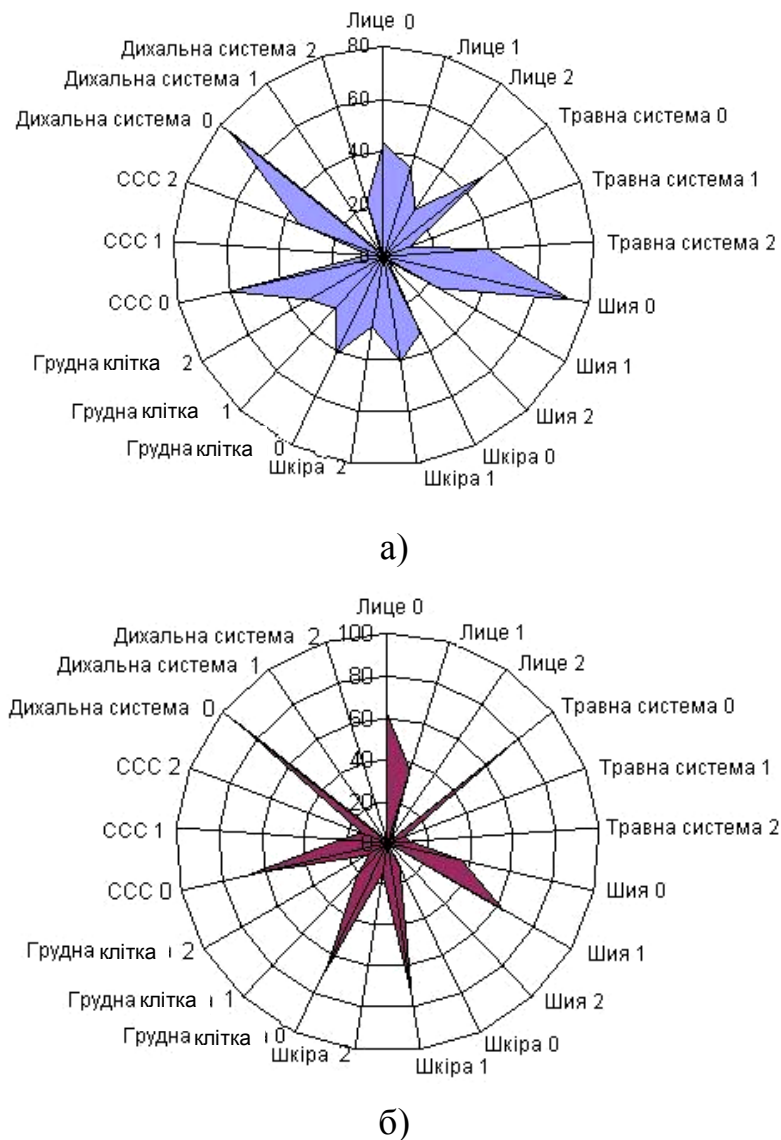
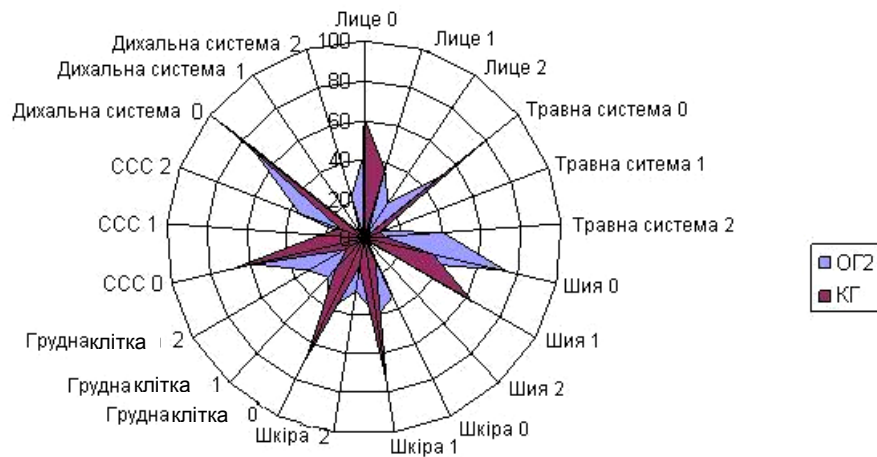


Рис. 4.31. Діаграми розподілу фенотипових ознак (лице, травна система, шия, шкіра, грудна клітка, ССС, дихальна система) порівняльних груп ОГ2 та КГ: а) діаграма ОГ2; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.31. Діаграми розподілу фенотипових ознак (лице, травна система, шия, шкіра, грудна клітка, ССС, дихальна система) порівняльних груп ОГ2 та КГ: а) діаграма ОГ2; б) діаграма КГ; в) діаграми ОГ2 и КГ

Таблиця 4.49

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,7}$ «лице»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,7}$	0	16 (43,24%)	87 (61,27%)	103 (104,51%)	19,85	0,333
	1	13 (35,14%)	52 (36,62%)	65 (71,76%)		
	2	8 (21,62%)	3 (2,11%)	11 (23,73%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.50

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,4}$ «травна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,4}$	0	18 (48,65%)	114 (80,28%)	132 (128,93%)	19,81	0,332
	1	4 (10,81%)	13 (9,16%)	17 (19,97%)		
	2	15 (40,54%)	15 (10,56%)	30 (51,1%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.51

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,16}$ «шия»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,16}$	0	27 (72,97%)	51 (35,92%)	78 (108,89%)	16,39	0,30
	1, 2	10 (27,03%)	91 (64,08%)	101 (91,11%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.52

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,1}$ «шкіра»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,1}$	0	12 (32,43%)	17 (11,97%)	29 (44,4%)	14,84	0,29
	1	15 (40,54%)	104 (73,24%)	119 (113,78%)		
	2	10 (27,03%)	21 (14,79%)	31 (41,82%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.53

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,17}$ «грудная клітка»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,17}$	0	15 (40,54%)	96 (67,61%)	111 (108,15%)	13,12	0,271
	1	10 (27,03%)	31 (21,83%)	41 (48,86%)		
	2	12 (32,43%)	15 (10,56%)	27 (42,99%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.54

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,2}$ «ССС»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,2}$	0	22 (59,46%)	93 (65,49%)	115 (124,95%)	13,01	0,27
	1	2 (5,4%)	31 (21,83%)	33 (27,23%)		
	2	13 (35,14%)	18 (12,68%)	31 (47,82%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,3}$ «дихальна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,3}$	0	28 (75,68%)	133 (93,66%)	161 (169,34%)	10,5	0,24
	1, 2	9 (24,32%)	9 (6,34%)	18 (30,66%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Пацієнтка В. 11 років.

Діагноз при направленні: пренатальна енцефалопатія, лікворно-гіпертензійний синдром.

Скарги: знижений апетит, розлади травлення, приступ задухи, неспокійна поведінка, неуважність, порушення нічного сну, швидка стомлюваність, емоційна лабільність, кашель, загальна слабкість, різкий запах сечі.

Анамнез життя: дівчинка від першої вагітності, яка протікала з загрозою переривання з 30 тижня на фоні пієлонефрита та анемії у матері. Пологи – кесаревий розтин у зв'язку з гострою гіпоксією плода. Вага 3,000 кг, зріст 50 см.

Анамнез хвороби: у зв'язку із скаргами в 6 місяців проведена нейросонографія: ознаки внутрішньочерепової гіпертензії. В той же період у дитини виявлена гіперфенілаламінемія (7-8 мг%), підвищення рівня аланіна, серина, проліна, гліцина. В 9 місяців – фенілаланін у нормі, значне збільшення аланіна, серина, гліцина. В подальшому у дитини періодично відмічалась генералізована гіпераміноацидемія, не зважаючи на діету. Періодично ДЖВП, реактивні зміни паренхіми печінки, двохстороння пієлектазія.

Фенотип: зниження харчування, діастема, неправильний ріст зубів, множинний карієс.

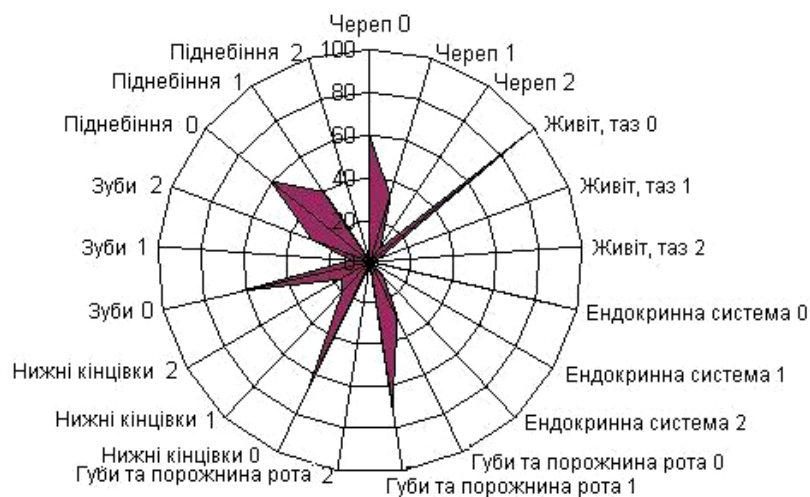
Поліморфізм: нова мутація тРНК-лейцин 3594C\T, АК заміна тРНК-лейцин syn, поліморфізм тРНК-лізин 8701A\G, 8860G, АК заміна тРНК-лізин thr/ala.

Діагноз: МТХД, асоційована із поліморфізмом мтДНК, порушення проміжного обміну.

У хворих з МТХД частіше зустрічались як структурні аномалії серця у вигляді кардіоміопатій, пролапсу клапанів, додаткових хорд серця, так і функціональні аномалії у вигляді порушень ритму серця і блокад. У досліджуваній групі сильні зміни зустрілися у 35,14%, слабкі у 5,41% (всього 40,55%), що підтверджується і іншими дослідниками (Zhou S at al, 2006, Klemenska и др., 2008, Patrick F Chinnery et al, 2010). 31,01% відсотків пацієнтів КГ мали порушення в цій системі (рис. 4.32, табл. 4.56–4.61).

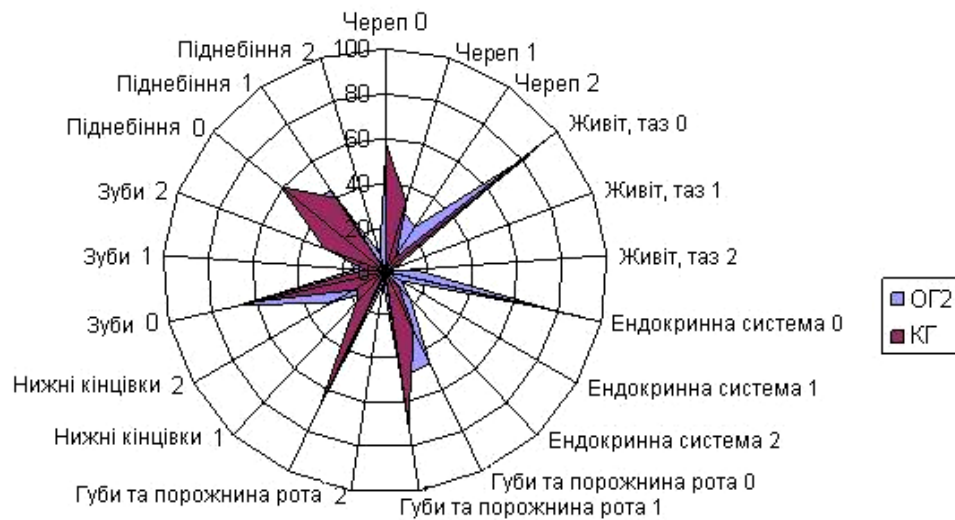


а)



б)

Рис. 4.32. Діаграми розподілу фенотипових ознак (череп, живіт і таз, ендокринна система, губи та порожнина рота, нижні кінцівки, зуби, піднебіння) порівняльних груп ОГ2 і КГ: а) діаграма ОГ2; б) діаграма КГ



в)

Рис. 4.32. Діаграми розподілу фенотипових ознак (череп, живіт і таз, ендокринна система, губи та порожнина рота, нижні кінцівки, зуби, піднебіння) порівняльних груп ОГ2 і КГ: в) діаграми ОГ2 та КГ

Таблиця 4.56

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,6}$ «череп»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,6}$	0	18 (48,65%)	84 (59,16%)	102 (107,81%)	7,14	0,2
	1	10 (27,03%)	46 (32,39%)	56 (59,42%)		
	2	9 (24,32%)	12 (8,45%)	21 (32,77%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.57

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,19}$ «живіт, таз та сідниці»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,19}$	0	31 (83,78%)	136 (95,77%)	167 (179,55%)	6,75	0,19
	1, 2	6 (16,22%)	6 (4,23%)	12 (20,45%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.58

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,7}$ «ендокрина система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{2,7}$	0	28 (75,68%)	128 (90,14%)	156 (165,82%)	5,48	0,18
	1, 2	9 (24,32%)	14 (9,86%)	23 (34,18%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.59

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,11}$ «губи та порожнина рота»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,11}$	0	17 (45,95%)	41 (28,87%)	58 (74,82%)	3,9	0,15
	1, 2	20 (54,05%)	101 (71,13%)	121 (125,18%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.60

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,21}$ «ніжні кінцівки»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,21}$	0	22 (59,46%)	94 (66,2%)	116 (125,66%)	2,78	0
	1	5 (13,51%)	26 (18,31%)	31 (31,82%)		
	2	10 (27,03%)	22 (15,49%)	32 (42,52%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

Таблиця 4.61

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,13}$ «зуби»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	КГ			
$x_0^{1,13}$	0	25 (67,57%)	88 (61,97%)	113 (129,54%)	1,78	0
	1	5 (13,51%)	13 (9,16%)	18 (22,67%)		
	2	7 (18,92%)	41 (28,87%)	48 (47,79%)		
Σ		37 (100%)	142 (100%)	179 (200%)		

При МТХД часто відзначались деформації грудної клітки, що пов'язано із слабким м'язовим каркасом і вторинною сполучно-тканинною дисплазією. При обстеженні хворих з Пмтх було виявлено наступне співвідношення: сильні зміни в 32,42%, слабкі – в 27,03 (всього - 59,45%), в КГ – 31,78%.

Зміни шкіри при МТХД були пріоритетними і обумовленими зв'язком мітохондрій з процесами старіння клітин організму. Сильні зміни шкіри в групі хворих з Пмтх склали 27,03%, слабкі 40,54% (всього 67,57%). У КГ частота склали 86,05%, що пов'язано як з можливими негенетичними причинами, так і з проявами STD.

Таким чином, оцінка отриманих даних дає можливість вважати, що знайдені клінічні ознаки у хворих з МТХД, асоційованої з поліморфізмом мтДНК за своєю сукупністю уражень відповідають спектру ознак, притаманних порушенням енергетичного обміну, є клінічно поліморфними, мультисистемними і генетично гетерогенними. І клінічний поліморфізм, і генетична гетерогенність МТХД, асоційованої з поліморфізмом мтДНК, зумовлюються етіопатогенетичними механізмами. Так, можливо припустити, що порушення мітохондріальної рівноваги формується за допомогою декількох шляхів. Перш за все, на формування фенотипу МТХД впливає наслідок дії патологічної мутації в мітохондріальній ДНК або порушення подвійного контролю (ядерно-мітохондріального). Характер фенотипу залежить від нозологічної форми, а ступінь залучення різних органів і систем не тільки від типу мутацій, але і від відсотка мтДНК, яка має мутації (феномен гетероплазмі).

Вважаючи, що популяції, яка вивчалась, притаманна значна частота поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу як генетичної основи порушень біогенезу метіоніну, ми вважали за доцільне вивчити особливості клінічного фенотипу МТХД, асоційованого із такою генетичною конституцією населення, маючи на увазі значну участь метіоніну в реалізації програми онтогенезу і в фізіології людини (в тому числі і патологічної). Отримані дані свідчать про наявність клінічних ознак порушеного енергетичного обміну у носіїв поліморфізмів мтДНК. Проведений аналіз, на нашу думку, підтримує висловлену гіпотезу: поліморфізми мтДНК, які в процесі еволюції змінили свої функції і перейшли із розряду адаптивних мутацій в разряд негативних, набули якості генів схильності і впливають на клінічні прояви МТХД.

**Розділ V КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ХВОРИХ НОСІЇВ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ
ГЕНІВ C677T MTHFR ТА A66G MTRR**

5.1. Характер клінічних ознак пробандів-носіїв поліморфних варіантів генів C677T MTHFR та A66G MTRR

Повне секвенування геному людини було початком вивчення геномного різноманіття в усьому світі, воно дозволило вирішувати як еволюційно – генетичні проблеми, так і розвинути дослідження молекулярної епідеміології спадкових, в тому числі і мультифакторіальних хвороб [36, 184].

В останні три десятиліття порушення в системі фолатного циклу широко обговорюються як можлива причина маніфестації розповсюджених захворювань, про що свідчить більше тисячі статей, опублікованих у світі, які присвячені проблемі порушення обміну метіоніну і поліморфним варіантам генів ферментів фолатного циклу [180, 185, 187, 188, 189, 190, 191].

З метою вивчення впливу поліморфних варіантів генів на клінічні прояви МТХД проведене молекулярно-генетичне та клінічне дослідження 200 новонароджених і 1938 хворих із різними спадковими порушеннями в поєднанні з дефіцитом ферментів фолатного циклу. Розраховані частоти відповідних алелей.

Вивчені поліморфізми генів C677T MTHFR та A66G MTRR вибрані із числа інших поліморфних варіантів тому, що вони найбільш розповсюджені в Україні, про що свідчить молекулярно-генетичне дослідження, а MTHFR є ключевим ферментом фолатного циклу.

При виборі поліморфізму враховували, що найбільш вивченим поліморфізмом є C677T: точкова заміна (місенс-мутація) цитозину (C) на тимін (T) в позиції 677, що призводить до заміни амінокислотного залишка аланіну на

валін (Ala222Val) у сайті зв'язування фолата. У осіб, гетерозиготних по даній мутації, відмічається термолабільність ферменту та зниження його активності приблизно на 35%, у гомозигот – на 70%. Наявність цієї мутації найчастіше супроводжується підвищенням рівня гомоцистеїну в крові.

В роботі фолатного циклу бере участь фермент метіонін-синтаза-редуктаза (MTRR, MIM 6022568), який відновлює активність фермента MTR (метіонін-синтази (MIM 156570)). Останній безпосередньо здійснює метилування гомоцистеїну, підтримує потрібні рівні метілкобаламіну і активує кофактор синтезу метіоніна.

Поліморфізм A66G в 4 рази знижує активність ферменту MTRR. [2, 192] Гомозиготність поліморфізму A66G призводить до помірного підвищення гомоцистеїна в плазмі, яке не залежить від рівнів фолатів, кобаламіну та піридоксину.

Поліморфні варіанти генів MTHFR та MTRR, обумовлюючи різну функціональну значущість білкових продуктів, впливають на широкий спектр біохімічних реакцій в ході фолатного циклу, та, на думку ряду авторів, можуть розглядатись як фактор ризику більш ніж тисячі захворювань. Однак роль їх в етіопатогенезі різної патології остаточно не встановлена, хоча багатьма дослідниками доведена клінічна значущість асоціації поліморфних варіантів генів фолатного циклу із серцево-судинними, неврологічними, психічними захворюваннями, патологією опорно-рухового апарату, офтальмологічними порушеннями (Гречаніна О.Я., 2008-2012) [193, 194, 195, 196, 197].

Дослідження останніх років свідчать про важливість процесу метилування в етіології та патогенезі багатьох спадкових хвороб. [104,218,219, 220].

Власне, метилування і є основним епігенетичним модифікатором генома, оскільки залучено в такі фундаментальні процеси життєдіяльності клітини, як регуляція експресії генів і підтримки стабільності генома. Це заключення підтвердило доцільність вивчення впливу порушення метилування на клінічні ознаки МТХД, оскільки метіонін виконує функцію універсального донора метильних груп.

З функцією енергетичного обміну фолатний цикл тісно пов'язаний, про що свідчить взаємодія метіоніну із АТФ, в результаті чого виникає S-аденозилметіонін (SAM). Останній у якості донора метильних груп метилює ДНК, ліпіди і білки. Знижена концентрація SAM або підвищена інгібіція метилтрансферази може призвести до порушень регуляції генної експресії, білкової функції та метаболізму ліпідів і нейротрансмітерів. Таким чином, порушення метаболізму фолатів можуть суттєво порушувати функцію клітин і брати участь у формуванні МТХД.

Ці сучасні наукові висновки дозволили підійти до вивчення вказаних поліморфізмів як до глобальної проблеми сучасної медицини і визначити їх роль у формуванні МТХД.

При поліморфізмі MTHFR спостерігався нормальний або низький рівень фолієвої кислоти в крові, у той час як при недостатності MTRR нормальний або високий рівень. Оскільки фолієва кислота і вітамін B12 є синергістами, а дефіцит MTRR сприяє недостатності ціанокобаламіну, то підвищення рівня фолієвої кислоти у носіїв A66G MTRR розцінювали як захисну реакцією організму, яка з вигодою використовується в компаунді C677Thtzg/A66GHmzg, можливо тому, що фолати впливають на термолабільний фермент MTHFR і нейтралізують дію мутації C677T MTHFR.

Компаунди поліморфних варіантів генів MTHFR і MTRR характеризувались певним набором біохімічних реакцій, що зачіпають як фолатний цикл, так і асоційовані з ним інші сторони метаболізму, обумовлюючи різну функціональну активність білкових продуктів (ліпідного, енергетичного, амінокислотного та ін.).

Ми зробили спробу згрупувати у відповідності з характером поліморфних варіантів клінічні особливості носіїв таких варіантів. З обстежених 652 пацієнтів, у 581 пацієнта (89,1%) були виявлені поліморфні варіанти. Сім'ї, які мають гомозиготних і гетерозиготних носіїв C677T MTHFR і A66G MTRR, мали свої клінічні особливості (табл. 5.1 і 5.2).

Таблиця 5.1

Основні клінічні ознаки сімей носіїв гомозиготних компаундів

C677T MTHFR/ A66G MTRR

Основні клінічні прояви	Частота, (%)
Безпліддя	18.2
Аневризма аорти	9.1
Варикозне розширення вен нижніх кінцівок	27.3
Порушення енергетичного обміну	36.4
Вроджена катаракта у дитини	9.1
Затримка психомоторного розвитку	18.2

Таблиця 5.2

Основні клінічні ознаки сімей носіїв гетерозиготних компаундів

C677T MTHFR/ A66G MTRR

Основні клінічні прояви	Частота, (%)
Ілеофemorальний тромбоз	3,3
Тромбоемболія легенів	3,3
Інсульт	4,9
Енцефалопатія	3,3
Затримка психо-моторного розвитку	8,2
Варикозне розширення вен нижніх кінцівок	26,2
Невиношування вагітності	11,5
Смерть дитини в неонатальному періоді	6,6
Синдром Дауна	4,9
Вроджений порок серця у дитини	6,6
Нейрофіброматоз, I тип	4,9
Порушення обміну жирних кислот	4,9
Органічна ацидурія	3,3

Ці особливості багато в чому виявилися схожими тому, що їх поєднувала загальна патогенетична ознака – гіпергомоцистеїнемія та порушення обміну сірковмісних амінокислот (СВА).

Клінічні особливості сімей таких носіїв представлені в табл. 5.1–5.3. Звертає на себе увагу висока питома вага асоціації поліморфізмів цих генів із порушенням енергетичного обміну (36,4 %), і в тому немає випадковості: фермент МТНFR бере участь у синтезі коензима Q. Ураження судин сумарно складає таку ж питому вагу-36,4%. Безпліддя та психічні ураження також можуть бути віднесені до значущих патологічних станів, притаманних асоціації із означеними поліморфізмами.

Гетерозиготному компаунду вказаних поліморфізмів притаманний більш широкий спектр клінічних проявів (табл. 5.2): ураження судин передує, але інші прояви свідчать про поліорганність уражень.

У пацієнтів із таким генотипом (поєднання С677Т МТНFR в гомозиготному стані і А66G МТRР у гетерозиготному стані) відзначалося значне ураження вен нижніх кінцівок, внутрішніх органів (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Основні клінічні ознаки сімей носіїв С677Т МТНFR
у гомозиготному стані і А66G МТRР у гетерозиготному стані

Основні клінічні прояви	Частота, (%)
Варикозне розширення вен нижніх кінцівок	33.3
Розширення вен внутрішніх органів	11.1
Раптова смерть родичів I ст. спорідненості	11.1
Безпліддя	16.7
Синдром Дауна у дитини	16.7
Порушення енергетичного обміну	11.1
Епілепсія	5.6
Гіпотиреоз	5.6

Найчастішими фенотиповими ознаками таких хворих були такі: астенічний тип статури, темне волосся, «гострі» риси обличчя, порушення зору, довгі пальці, сколіоз, «мармуровість» шкіри – особливо долоней, нормальний інтелект, наявність творчих здібностей (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Фенотип хворих з м'якою гомоцистеїнурією (компаунд 677 С/Т MTHFR у гомозиготному стані і 66А/Г MTRR у гетерозиготному стані)

У 3-х пацієнтів знайдені дані про психічні порушення, які маніфестують прогредієнтно. Клінічні ознаки психічних порушень входили до одного із 3-х відомих груп захворювань: гострого психозу, який потребує невідкладної допомоги, хвороби з хронічними психічними симптомами; захворювання з легкою розумовою відсталістю і девіантними формами поведінки, змінами особистості при пізньому дебюті. Суїцидальні спроби здійснювалися при хронічних психічних синдромах (1 пацієнт).

Характер психічних уражень у обстежених пацієнтів відображений у табл. 5.4.

Психіатричні порушення, асоційовані із дефіцитом фолатного циклу

Характер порушення	Вік маніфестації	Психіатричні симптоми	Неврологічні симптоми	Системні порушення
Мутація 677С/Т MTHFR (A222V)	15 років	Легка розумова ретардація, психоз, депресія, суїцид	Периферична нейропатія, лейкоенцефалопатія	МТХД, синдром MNGIE
Порушення метаболізму кобаламіну (мутація MTRR A66G)	19 років	Легка розумова ретардація, психоз, наркоманія	Лейкоенцефалопатія	Емболія легеневої артерії
Недостатність ферменту CBS	11 років	Розумова ретардація, девіантна поведінка, немотивована усмішка	Дистонія	Епізоди тромбоемболії

Аналіз власних спостережень показав, що психічні порушення передували метаболічним, а розпочате патогенетичне лікування легко коригувало метаболічну декомпенсацію. На «психічній» стадії хвороби до розвитку неврологічних порушень лікування було ефективним, але ускладнювалося, якщо йому передували лейкоенцефалопатія і периферична нейропатія.

При тривалому спостереженні за хворими із спадковою патологією, асоційованою з дефіцитом ферментів фолатного циклу, відзначена хвилеподібна маніфестація клінічних ознак конкретного спадкового захворювання і порушення обміну, що змушує припустити фено- і генотипові прояви синтропії.

Значущі відмінності клінічних проявів у носіїв різних варіантів генотипів
MTHFR, MTRR (n = 652)

Клінічні ознаки	Кількість	%	Генотипи MTHFR C677T / MTRR A66G							
			Hmzg / Htzg	Htzg / Htzg	Htzg / Hmzg	Hmzg / Hmzg	N / Htzg	N / Hmzg	Htzg / N	Hmzg / N
Нервові і психічні захворювання	225	34,5	18	42	55	15	37	33	15	10
Серцево-судинні захворювання	189	28,98	24	20	61	10	38	36	19	8
Захворювання скелету	122	18,71		22	34	5	27	21	5	8
ЖКТ	60	9,20	4	11	16	1	10	13	3	2
Патологія зору	55	8,43		7	16	3	9	14	1	5
Ураження сечовидільної системи	50	7,66	1	8	11	2	5	21	2	2
Зміни шкіри та її придатків	31	4,75		7	10	1	3	8	1	1
Репродуктивні втрати	56	8,58	1	7	15	3	9	13	4	2
Зміни м'язів	15	2,30		2	3	1	3	4	1	1
Ендокринна патологія	16	2,45		4	4	2	3	3		
Хромосомна патологія	9	1,38	2		1	1	1	1	2	1
НБО	2	0,30					2			
Ревматоїдний артрит	3	0,46	1			1		1		
Захворювання крові	2	0,30					1		1	
Онкопатологія	2	0,30			1		1			
Хронічні бронхо-легеневі захворювання	4	0,61			2		1	1		
Спленомегалія	1	0,15			1					

У дослідженій вибірці пацієнтів найчастіше зустрічався генетичний компаунд С677Т МТНFR у гомозиготному стані і 66А/Г МTRR у гетерозиготному стані, який мав характерний фенотип, що відрізняється від класичної гомоцистинурії. Біохімічно ця форма відповідала критеріям м'якої гомоцистинурії. Аналіз загальних характеристик носіїв поліморфізмів, які вивчались, свідчить про поліорганність порушень та переважне ураження нервової, серцево-судинної, скелетної, шлунково-кишкової систем.

При уточнюючій діагностиці звертало на себе увагу поєднання у одного пацієнта клінічних ознак, які свідчили не тільки про поліорганність уражень, а і про наявність ознак різних захворювань (клінічні спостереження табл. 5.6.)

Таблиця 5.6.

Клінічне спостереження 5.1 Пробанд К., 60 років, MNGIE-синдром (мітохондріальне захворювання) Htzg 677 СТ МТНFR, Hmzg 66G MTRR

Діагноз при направленні:	Хронічний панкреатит
Скарги	Втрата у вазі – на 7 кг протягом 1 року Метаболичні кризи Енцефалопатія
Родовід	Гіпертонічна хвороба Ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда Онкологічні захворювання (рак шлунка, рак кишковника)
Результати ендоскопії ШКТ	Помірно виражений дистальний езофагіт. Ерозивний гастрит. Дуоденіт. Коліт. Внутрішній геморой
Абдомінальна ехографія	Периваскулярна інфільтрація в печінці. Аномальний хід судини в області тіла підшлункової залози. Ознаки панкреатиту. Непрямі ознаки гастриту. В нирках - венозне повнокров'я синуса зліва. Сечокам'яна хвороба.
Результати молекулярної діагностики	Поліморфізм 677 СТ МТНFR в гетерозиготному стані і поліморфізм 66G MTRR в гомозиготному стані eNOS 4a/4b hmzg
Уточнений діагноз	MNGIE-синдром. Порушення фолатного циклу. ендотеліальна дисфункція

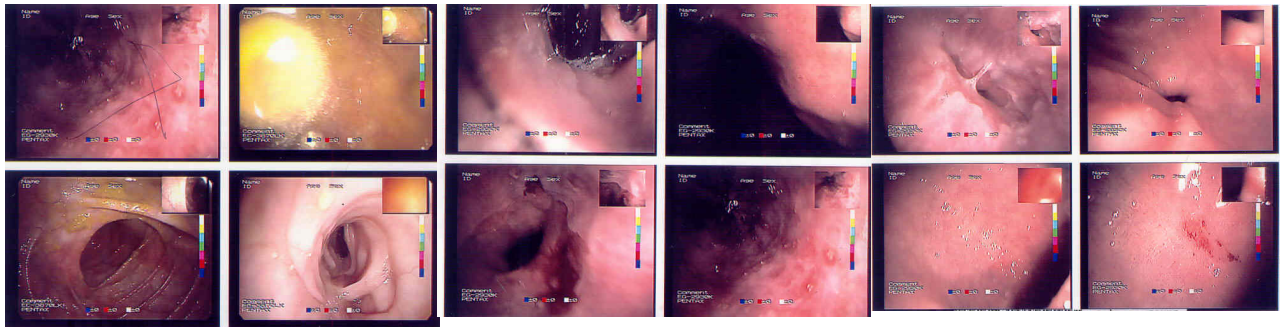


Рис. 5.2. Бронхоскопічна картина ендотеліальної дисфункції
у пробанда К., 60 років

Проведений аналіз значущих клінічних ознак у носіїв поліморфних генів MTHFR та MTRR яскраво демонструє ураження ЦНС, як одної із систем, яка стабільно залучається до маніфестації спадкових хвороб різної етіології. У випадках асоціації із поліморфізмами генів фолатного циклу ця переважність уражень не тільки залишається, але й стає більш значущою. Зміни з боку серцево-судинної системи у обстежених хворих належать також до пріоритетних ознак, про що свідчать наведені в табл. 5.5 дані. Захворювання скелету посідають третє місце в питомій вазі ознак, притаманних носіям дефіциту фолатного циклу. Вказані три системи відображують фенотип хворих із порушенням обміну метіоніну, що підкреслює клінічну значущість порушень фолатного циклу у формуванні клінічного фенотипу. З метою вивчення клінічних ознак носіїв поліморфізмів мтДНК у поєднанні із поліморфними варіантами генів С677Т MTHFR та А66G MTRR був обстежений 91 пацієнт. У табл. 5.7–5.8 наведено результати розрахунків коефіцієнта Крамера V для визначення ступеня відмінності ОГЗ і КГ по кожному з розглянутих ознак $x_i^{k,p}$.

Як свідчать наведені дані в табл. 5.9-5.18 та рис. 5.3-5.5, «пріоритетними» системами і органами ураження в таких асоціаціях були нервова – 72,53% проти 35,21% у контролі, шлунково-кишкова у 62,64% проти 19,72% в контролі, сечовидільна 50,55% проти 7,75% в КГ. Найявність морфогенетичних змін у вигляді черепно – лицьових аномалій була значною. Так, аномалії носа зустрілись у 73,63% проти 50-78% в КГ, хребта (у 48,35% проти 42,25%), зубів (у 54,94% проти 38,03% в КГ), обличчя (у 61,54% проти 38,73% в КГ), волосся (у 46,15% проти 37,32% в КГ), очей (у 91,21% проти 76% в КГ), піднебіння (у 61,54% проти 40,14% в КГ).

Таблиця 5.7

Відмінності між ОГЗ і КГ за ознаками $x_i^{k,p}$

Града- ции	Признак	Група		$\chi^2_{кр}$	V	Признак	Група		$\chi^2_{кр}$	V	
		ОГЗ	КГ				ОГЗ	КГ			
0	$x_0^{2,5}$ (сечовидільна система)	45	131	176	0,51	$x_0^{1,1}$ (шкіра)	10	17	27	50,67	0,47
1		8	7	15			28	104	132		
2		38	4	42			53	21	74		
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233		
0	$x_0^{2,4}$ (травна система)	34	114	148	0,44	$x_0^{1,10}$ (ніс)	24	69	93	37,83	0,40
1		24	13	37			45	72	117		
2		33	15	48			22	1	23		
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233		
0	$x_0^{2,1}$ (нервова система)	25	92	117	0,397	$x_0^{1,13}$ (зуби)	41	88	129	24,10	0,32
1		25	30	55			32	13	45		
2		41	20	61			18	41	59		
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233		

Града- ции	Признак	Група		$\chi^2_{кр}$	V	Признак	Група		$\chi^2_{кр}$	V	Σ	$\chi^2_{кр}$	V
		ОГЗ	КГ				ОГЗ	КГ					
0	$x_0^{1,7}$ (обличчя)	35	87	122	0,29	$x_0^{1,3}$ (волосяя)	49	89	138	18,65	0,28	18,65	0,28
1		42	52	94			27	51	78				
2		14	3	17			15	2	17				
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233				
0	$x_0^{2,7}$ (ендокринная система)	74	128	202	0,27	$x_0^{1,20}$ (верхні кінцівки)	44	58	102	15,67	0,26	15,67	0,26
1		10	0	10			36	82	118				
2		7	14	21			11	2	13				
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233				
0	$x_0^{1,9}$ (область очей, очне яблуко)	8	33	41	0,248	$x_0^{1,18}$ (хребет)	47	82	129	11,39	0,22	11,39	0,22
1		45	78	123			18	8	26				
2		38	31	69			26	52	78				
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233				
0	$x_0^{1,2}$ (нігті)	68	117	185	0,21	$x_0^{1,5}$ (М'язи)	62	125	187	8,44	0,19	8,44	0,19
1		15	24	39			29	17	46				
2		8	1	9			91	142	233				
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233				

Града- ции	Признак	Группа		χ^2	V	Признак	Группа		χ^2	V	Σ	$\chi^2_{кр}$	V	
		ОГЗ	КГ				ОГЗ	КГ						
0	$x_0^{1,8}$ (вупні раковини)	52	100	6,34	0,165	$x_0^{1,15}$ (піднебіння)	35	85	120	120	120	6,2	0,163	
1		31	38				56	57						113
2		8	4				91	142						233
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233					
0	$x_0^{1,4}$ (підшкірна клітковина)	62	117	3,86	0,13	$x_0^{2,6}$ (статева система)	70	117	187	187	187	5,22	0	
1		29	25				91	142						233
2		91	142				233							
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233					
0	$x_0^{1,21}$ (нижні кінцівки)	48	94	4,6	0	$x_0^{1,6}$ (череп)	52	84	136	136	136	3,8	0	
1		26	26				24	46						70
2		17	22				91	142						233
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233					
0	$x_0^{1,14}$ (язик)	68	123	3,24	0	$x_0^{2,3}$ (дихальна система)	79	133	212	212	212	3,17	0	
1 и 2		23	19				12	9						21
		91	142				233							
	Σ	91	142	233		Σ	91	142	233					

Града- ции	Признак	Група		χ^2	V	Признак	Група		χ^2	V
		ОГЗ	КГ				ОГЗ	КГ		
0 1 и 2	$x_0^{1,16}$ (шия) Σ	42	51	93	0	$x_0^{1,19}$ (живіт, газ та сідниці) Σ	83	136	219	2,05
		49	91				14			
		91	142				233			
0 1 2	$x_0^{2,2}$ (ССС) Σ	60	93	153	0	$x_0^{1,12}$ (верхня і нижня щелепи) Σ	76	123	199	0,26
		16	31				47			
		15	18				33			
0 1 2	$x_0^{1,11}$ (губи і попорожнина рота) Σ	23	41	64	0	$x_0^{1,17}$ (грудна клітина) Σ	60	96	156	0,18
		68	101				169			
		91	142				233			

Ранжування ознак $x_i^{k,p}$ за значенням коефіцієнта Крамера для ОГЗ і КГ

Ознака	коефіцієнт Крамера V
Сечовидільна система	0,513305332
Кожа	0,466357404
Травна система	0,435638574
Ніс	0,402929944
Нервова система	0,396573921
Зуби	0,321638098
Обличчя	0,294058458
Волосся	0,282922005
Ендокрина система	0,265232856
Верхні кінцівки	0,259351418
Область очей, очне яблуко	0,248006893
Хребет	0,221113359
Нігті	0,205153424
М'язи	0,190372275
Вушні раковини	0,164983238
Небо	0,163067208
Підшкірна клітковина	0,12873697
Статева система	0
Нижні кінцівки	0
Череп	0
Дихальна система	0
Живіт, таз і сідниці	0
Верхня і нижня щелепи	0
ССС	0
губи і порожнина рота	0
Язик	0
Грудная клітка	0
Шея	0

Ці дані візуально підтверджують наведені потрійні рис. 5.3, табл. 5.9–5.14, рис. 5.4, табл. 5.15–5.18. Вочевидь генна синтропія – поєднання поліморфних варіантів генів C667T MTHFR та A66G MTRR із поліморфізмами мтДНК – створює конгломерат хвороб, уточнююча діагностика яких ускладнюється за рахунок сполучень. Діаграми чітко вказують на доказовість наявності патологічних змін, поліорганність уражень, але акценти уражених систем відрізняються від випадків, коли існує лише один тип поліморфізмів.

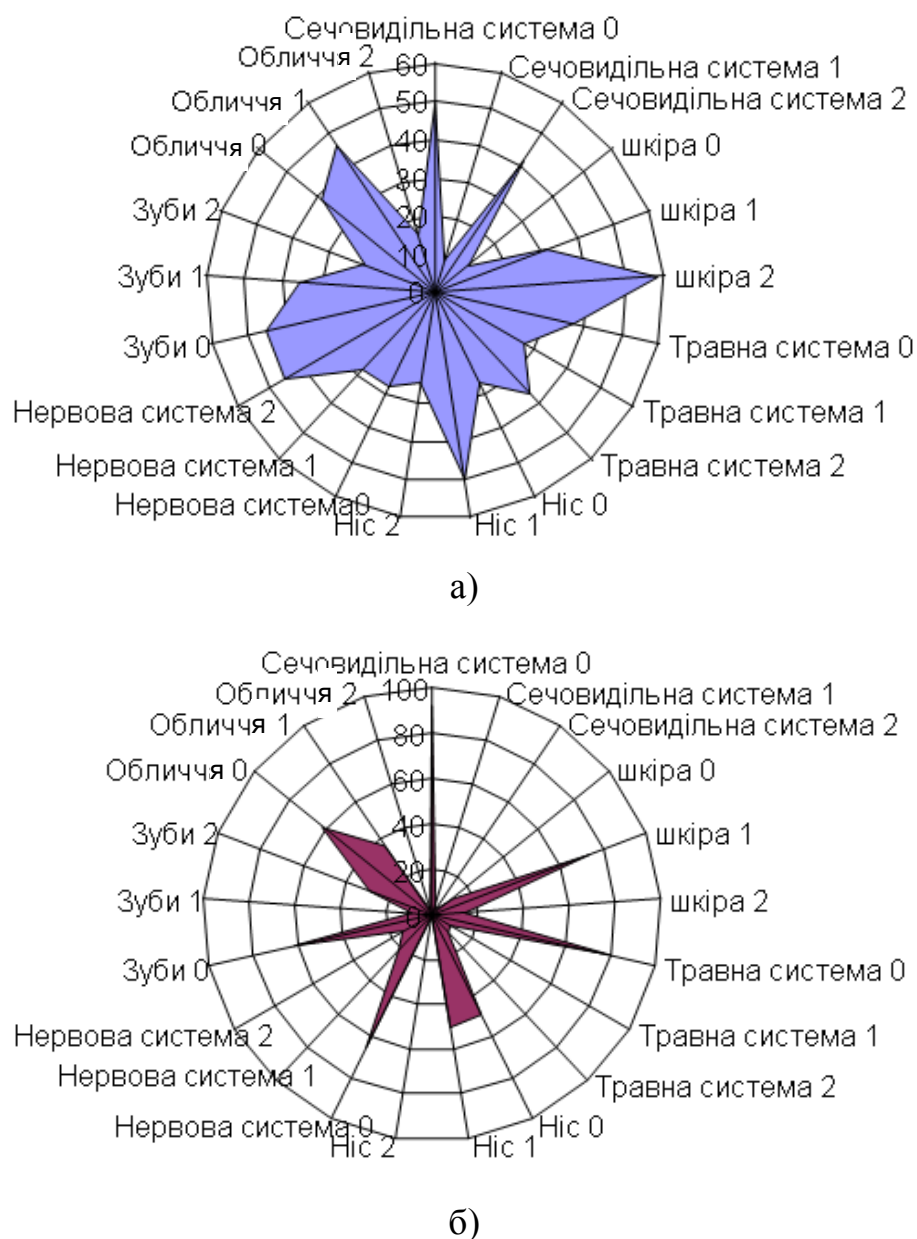


Рис. 5.3. Діаграми розподілу фенотипових ознак (сечовидільна система, шкіра, травна система, ніс, нервна система, зуби, лице) порівнюваних груп ОГЗ і КГ:

а) діаграма ОГЗ; б) діаграма КГ



в)

Рис. 5.3. Діаграми розподілу фенотипових ознак (сечовидільна система, шкіра, травна система, ніс, нервова система, зуби, обличчя) порівнювальних груп ОГЗ і КГ:

в) діаграми ОГЗ і КГ

Таблиця 5.9

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,4}$ «травна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{2,4}$	0	34 (37,36%)	114 (80,28%)	148 (117,64%)	44,22	0,44
	1	24 (26,37%)	13 (9,16%)	37 (35,53%)		
	2	33 (36,27%)	15 (10,56%)	48 (46,83%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.10

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,1}$ «нервова система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{2,1}$	0	25 (27,47%)	92 (64,79%)	117 (92,26%)	36,64	0,397
	1	25 (27,47%)	30 (21,13%)	55 (48,6%)		
	2	41 (45,06%)	20 (14,08%)	61 (59,14%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.11

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,5}$ «м'язи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{1,5}$	0	62 (68,13%)	125 (88,03%)	187 (156,16%)	8,44	0,19
	1, 2	29 (31,87%)	17 (11,97%)	46 (43,84%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.12

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,1}$ «шкіра»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{1,1}$	0	10 (10,99%)	17 (11,97%)	27 (22,96%)	50,67	0,47
	1	28 (30,77%)	104 (73,24%)	132 (104,01%)		
	2	53 (58,24%)	21 (14,79%)	74 (73,03%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.13

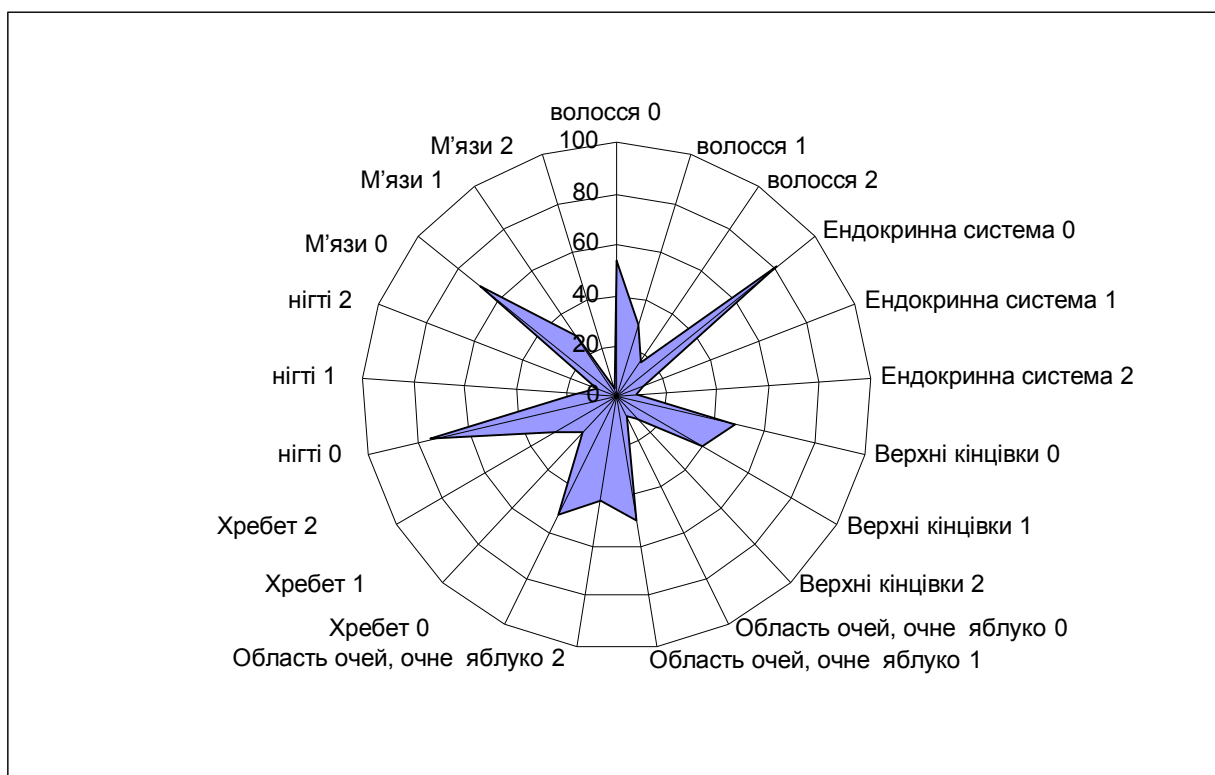
Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,3}$ «волосся»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{1,3}$	0	49 (53,85%)	89 (62,68%)	138 (116,53%)	18,65	0,28
	1	27 (29,67%)	51 (35,91%)	78 (65,58%)		
	2	15 (16,48%)	2 (1,41%)	17 (17,89%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

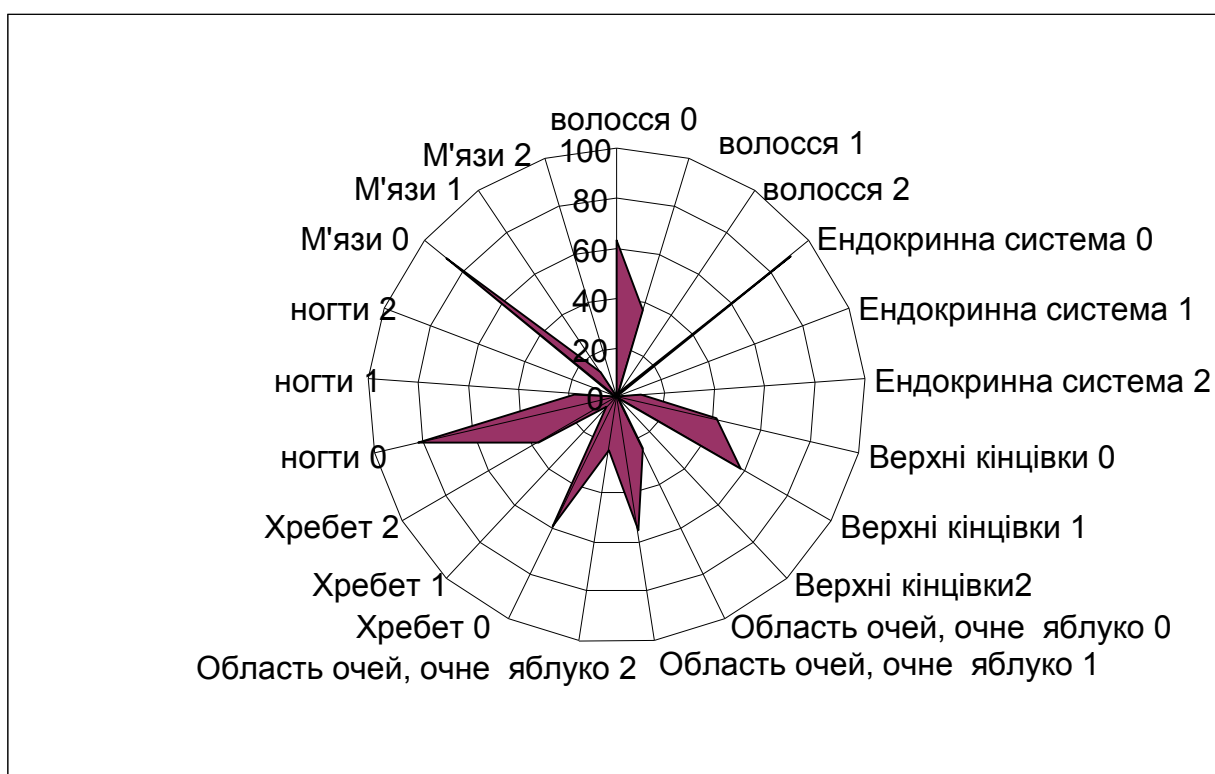
Таблиця 5.14

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,4}$ «підшкірна клітковина»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{1,4}$	0	62 (68,13%)	117 (82,39%)	179 (150,52%)	3,86	0,13
	1, 2	29 (31,87%)	25 (17,61%)	54 (49,48%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

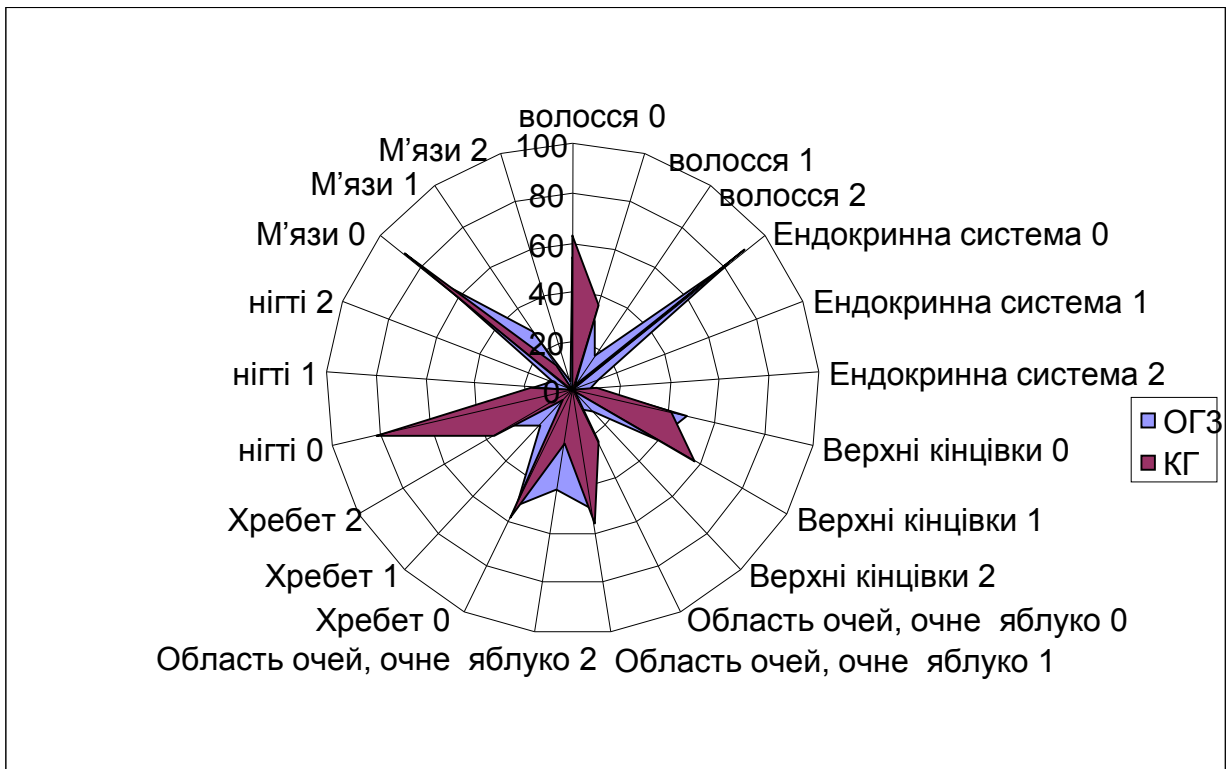


а)



б)

Рис. 5.4. Діаграми розподілу фенотипових ознак (волосся, ендокринна система, верхні кінцівки, область очей, очне яблуко, хребет, нігті, м'язи) порівнювальних груп ОГЗ и КГ: а) діаграма ОГЗ; б) діаграма КГ



в)

Рис. 5.4. Діаграми розподілу фенотипічних ознак (волосся, ендокринна система, верхні кінцівки, область очей и очне яблуко, хребет, нігті, м'язи) порівняних груп ОГЗ і КГ:

в) діаграми ОГЗ і КГ

Таблиця 5.15

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,18}$ «хребет»

Градації ознак	Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V	
	ОГЗ	КГ				
$x_0^{1,18}$	0	47 (51,65%)	82 (57,75%)	129 (109,4%)	11,39	0,22
	1	18 (19,78%)	8 (5,63%)	26 (25,41%)		
	2	26 (28,57%)	52 (36,62%)	78 (65,19%)		
Σ	91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)			

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,21}$ «нижні кінцівки»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{1,21}$	0	48 (52,75%)	94 (66,2%)	142 (118,95%)	4,6	0
	1	26 (28,57%)	26 (18,31%)	52 (46,88%)		
	2	17 (18,68%)	22 (15,49%)	39 (34,17%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.17

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,5}$ «сечовидільна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{2,5}$	0	45 (49,45%)	131 (92,25%)	176 (141,7%)	61,39	0,51
	1	8 (8,79%)	7 (4,93%)	15 (13,72%)		
	2	38 (41,76%)	4 (2,82%)	42 (44,58%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Таблиця 5.18

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,7}$ «ендокринна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГЗ	КГ			
$x_0^{2,7}$	0	74 (81,32%)	128 (90,14%)	202 (171,46%)	16,39	0,27
	1	10 (10,99%)	0 (0%)	10 (10,99%)		
	2	7 (7,69%)	14 (9,86%)	21 (17,55%)		
Σ		91 (100%)	142 (100%)	233 (200%)		

Недостатність метильних груп, внаслідок дефіциту ферментів фолатного циклу, може впливати на епігенетичний статус, призводячи до запуску епігенетичних порушень. У складному механізмі регуляції активності геному значну роль відіграють епігенетичні модифікатори. Дефіцит ферментів фолатного циклу супроводжується порушенням метилювання, і ми припустили, що дефект роботи донора метильних груп, яким є метіонін, тягне за собою довгий ланцюг генетичних подій, до яких залучені поліморфні алелі та гени, що регулюють метаболізм фолатів і впливають на фенотипові прояви мутацій.

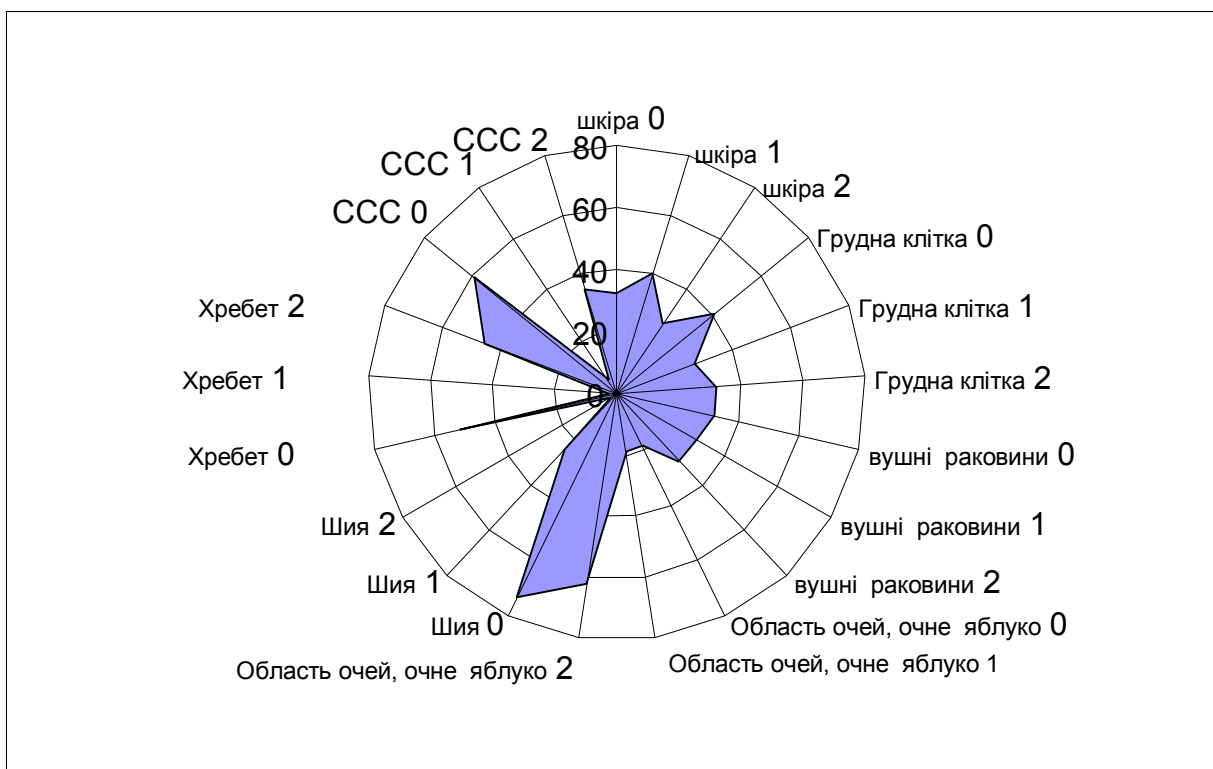
Асоціації порушень енергетичного обміну і фолатного циклу знайдені у 36,4% носіїв гомозиготних компаундів 677 ТТ МТНFR та у 11,1% носіїв поліморфних варіантів 677СТ МТНFR і 66А6 МТRR, свідчать про не випадковість дослідження ролі поліморфних варіантів генів ферментів МТНFR та МТRR у формуванні клінічних ознак МТХД.

Щоб перевірити не випадковість отриманих даних, ми порівняли між собою клінічні ознаки носіїв поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR і А66G МТRR та носіїв поліморфізмів мтДНК.

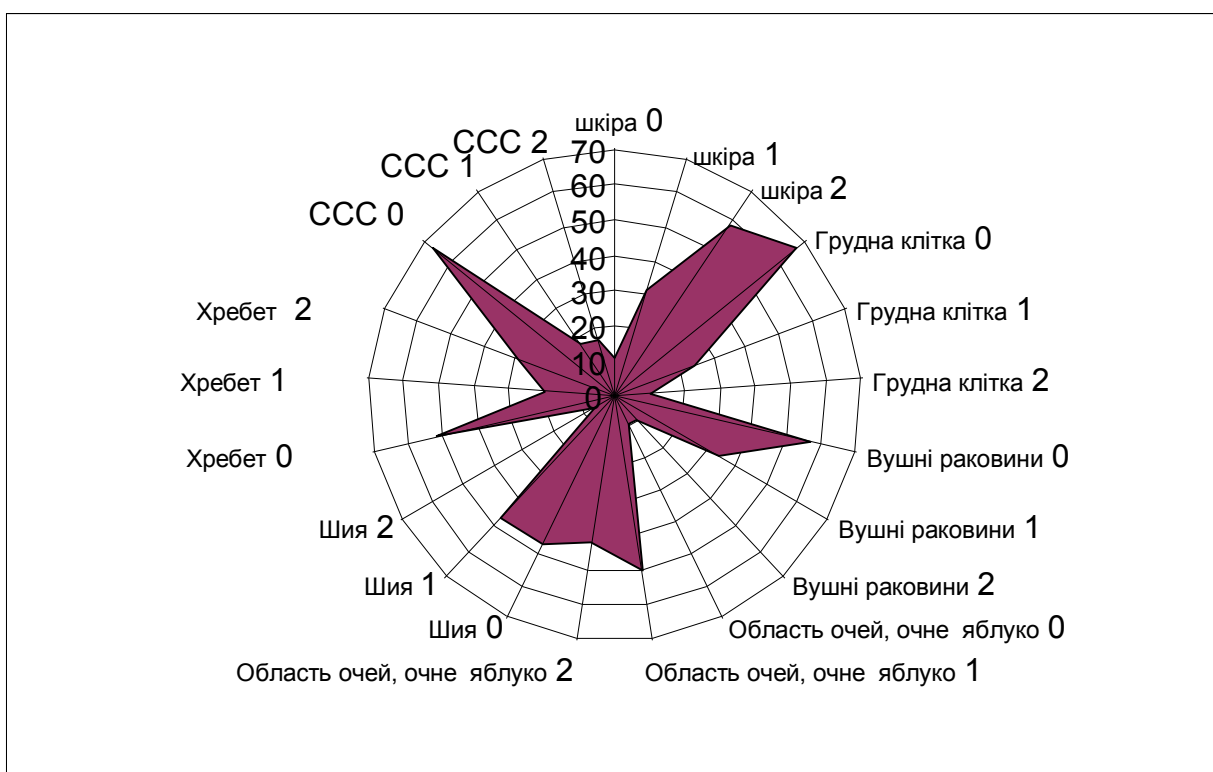
5.2. Феномен синтропії при мітохондріальній дисфункції

Феномен фенотипової і генотипової синтропії був вивчений на підставі оцінки клінічних ознак 91 пробанда із МТХД та поліморфними варіантами генів ферментів фолатного циклу (ОГЗ) та співставлення клінічних ознак 37 пацієнтів із МТХД та поліморфізмами мтДНК.

Отримані результати були представлені в графічному вигляді (рис. 5.5, табл. 5.20–5.26, рис. 5.6, табл. 5. 27–5.28, рис. 5.7, табл. 5.29–5. 33).

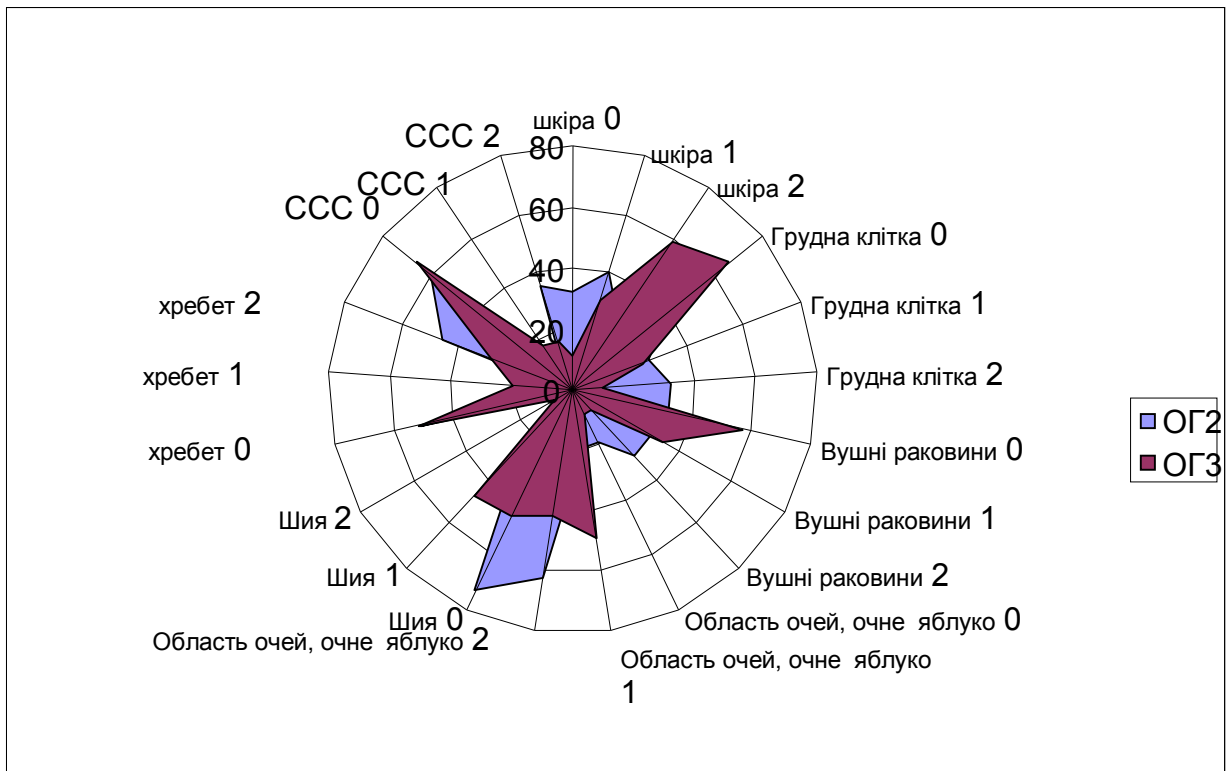


а)



б)

Рис. 5.5. Діаграма розподілу фенотипових ознак (шкіра, грудна клітка, вушні раковини, область очей і очне яблуко, шия, хребет, CCC) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: а) діаграма ОГ2; б) діаграма ОГ3



в)

Рис. 5.5. Діаграма розподілу фенотипових ознак (шкіра, грудна клітка, вушні раковини, область очей і очне яблуко, шия, хребет, CCC) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: в) діаграми ОГ2 і ОГ3

Як видно із представлених даних, зміни з боку різних органів і систем при наявності фенотипічної і генотипічної синтропії не поєднуються за своїми якостями, а зберігають певну самостійність, додаючи свої ознаки до фенотипу.

У пацієнтів ОГ2 та ОГ3 була уражена шкіра (67,97% та 89,76% відповідно). На тлі зміненого метилування частішими і більш виразними були пігментні плями, телеангієктазії, базально-клітинні невуси. Тобто притаманні дефіциту фолатного циклу мезодермальні дисплазії проявили себе незалежно, не зважаючи на синтропію. Як видно із представлених даних (рис. 5.8, табл.5.20), зміни з боку різних органів не зливаються за своїми якостями і зберігають певну самостійність, додаючи свої ознаки до фенотипу МТХД.

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,1}$ «шкіра»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,1}$	0	12 (32,43%)	10 (10,99%)	22 (43,42%)	12,99	0,32
	1	15 (40,54%)	28 (30,77%)	43 (71,31%)		
	2	10 (27,03%)	53 (58,24%)	63 (85,27%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.21

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,17}$ «грудна клітка»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,17}$	0	15 (40,54%)	60 (65,93%)	75 (106,47%)	11,13	0,295
	1	10 (27,03%)	22 (24,18%)	32 (51,21%)		
	2	12 (32,43%)	9 (9,89%)	21 (42,32%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Зміни скелету: деформація грудної клітки (59,46% проти 35,07%), хребта (49,12% проти 48,35%) – підкреслює високу частоту порушень скелету в обох групах із незначною перевагою у пацієнтів із МТХД, асоційованих із поліморфізмами мтДНК. Щодо хребта, то він частіше уражений в ОГ3 (71,43% проти 48,65%), що підкреслює певну специфічність цієї зміни для порушень сірковмісних амінокислот. Зміни з боку шиї притаманні майже в рівній мірі обом групам пацієнтів.

Таблиця 5.22

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,8}$ «вушні раковини»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,8}$	0	12 (32,43%)	52 (57,14%)	64 (89,57%)	11,09	0,294
	1	14 (37,84%)	31 (34,07%)	45 (71,91%)		
	2	11 (29,73%)	8 (8,79%)	19 (38,52%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.23

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,9}$ «область очей, очне яблуко»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,9}$	0	7 (18,92%)	8 (8,79%)	15 (27,71%)	10,64	0,288
	1	7 (18,92%)	45 (49,45%)	52 (68,37%)		
	2	23 (62,16%)	38 (41,76%)	61 (103,92%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Зміни з боку очей визначені у переважній кількості пацієнтів обох груп з невеликою перевагою в ОГ3 (табл. 5.23). Ця перевага логічна, бо ураження очей при одній і при другій патології є ведучою ознакою, і саме тому сумується в ОГ3, групі, яка поєднує різні поліморфізми.

Таблиця 5.24

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,16}$ «шия»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,16}$	0	27 (72,97%)	42 (46,15%)	69 (119,12%)	7,61	0,244
	1, 2	10 (27,03%)	49 (53,85%)	59 (80,88%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.25

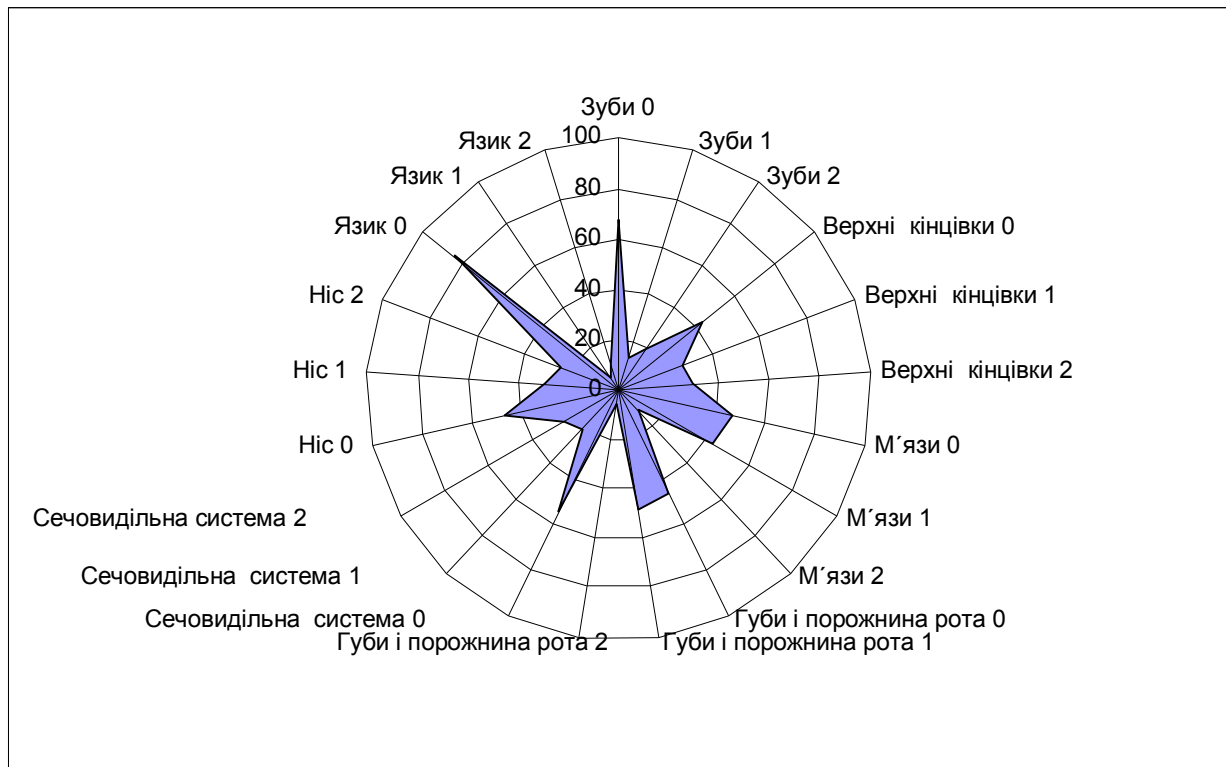
Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,18}$ «хребет»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,18}$	0	19 (51,35%)	47 (51,65%)	66 (103%)	7,53	0,243
	1	1 (2,7%)	18 (19,78%)	19 (22,48%)		
	2	17 (45,95%)	26 (28,57%)	43 (74,52%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця спряженості за ознакою $\chi_0^{2,2}$ «ССС»

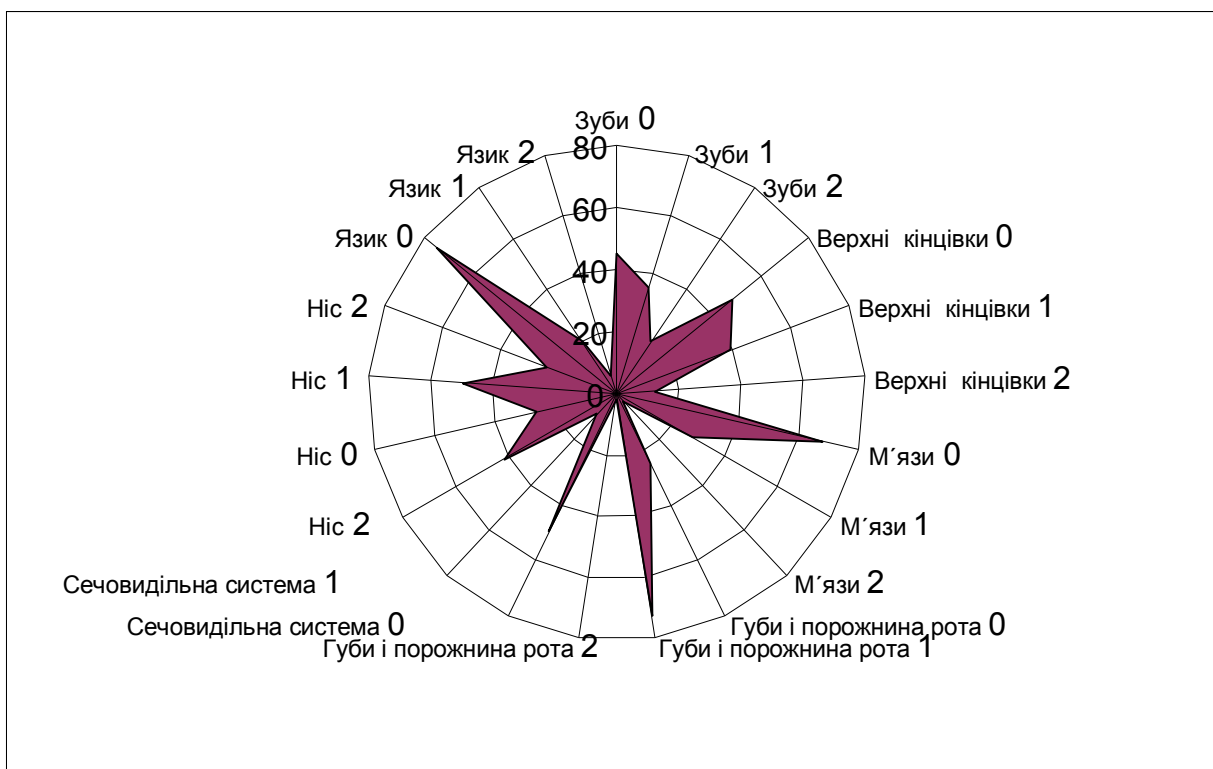
Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$\chi_0^{2,2}$	0	22 (59,46%)	60 (65,94%)	82 (125,39%)	7,13	0,236
	1	2 (5,4%)	16 (17,58%)	18 (22,99%)		
	2	13 (35,14%)	15 (16,48%)	28 (51,62%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Порушення серцево-судинної системи відмічені більш ніж у третини пацієнтів обох груп з невеликою перевагою в ОГ2 (табл. 5.26).

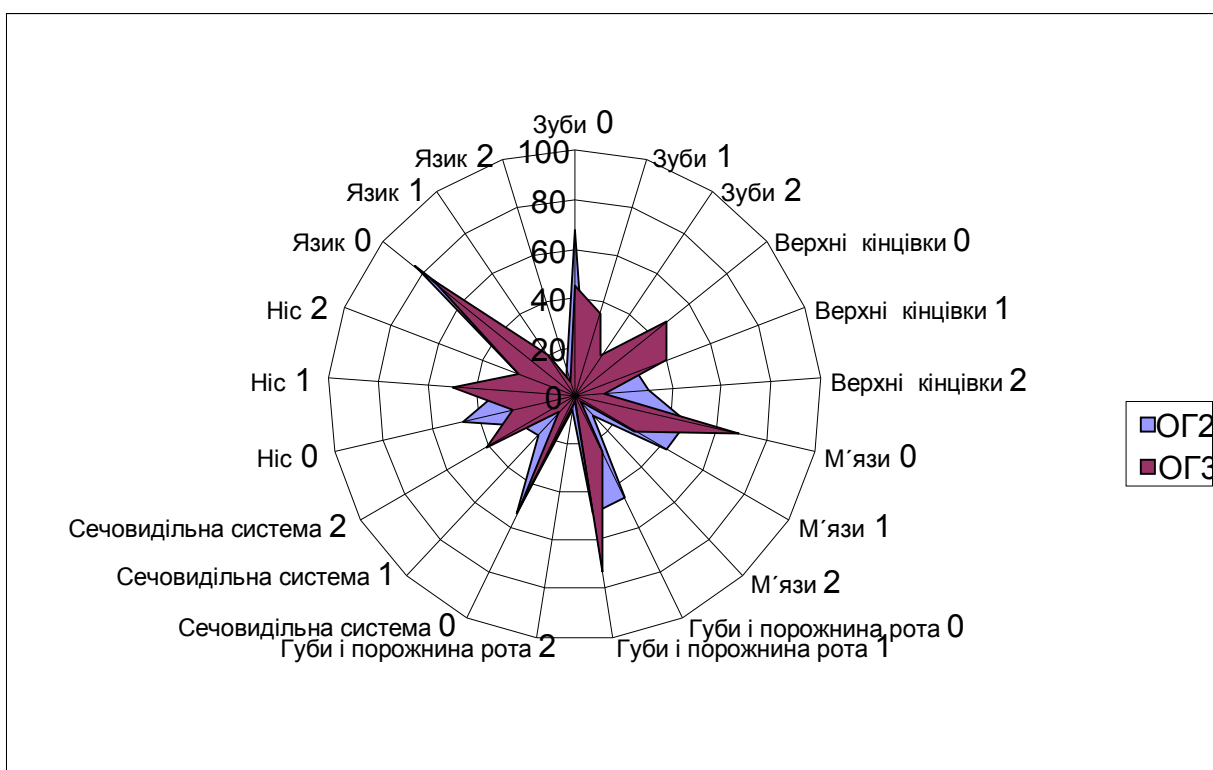


а)

Рис. 5.6. Діаграма розподілу фенотипових ознак (зуби, верхні кінцівки, м'язи, губи і порожнина рота, сечовидільна система, ніс, язик) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: а) діаграма ОГ2



б)



в)

Рис. 5.6. Діаграма розподілу фенотипових ознак (зуби, верхні кінцівки, мязи, губи і порожнина рота, сечовидільна система, ніс, язик) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: б) діаграма ОГ3; в) діаграми ОГ2 і ОГ3

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,5}$ «м'язи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,5}$	0	17 (45,95%)	62 (68,13%)	79 (114,08%)	5,48	0,207
	1, 2	20 (54,05%)	29 (31,87%)	49 (85,92%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Ураження м'язів відмічено у 54,05% ОГ2 і у 31,87% ОГ3, що можливо пов'язане з адаптивною роллю сполучених поліморфізмів та вірогідним зниженням ступеня гетероплазмії.

Таблиця 5.28

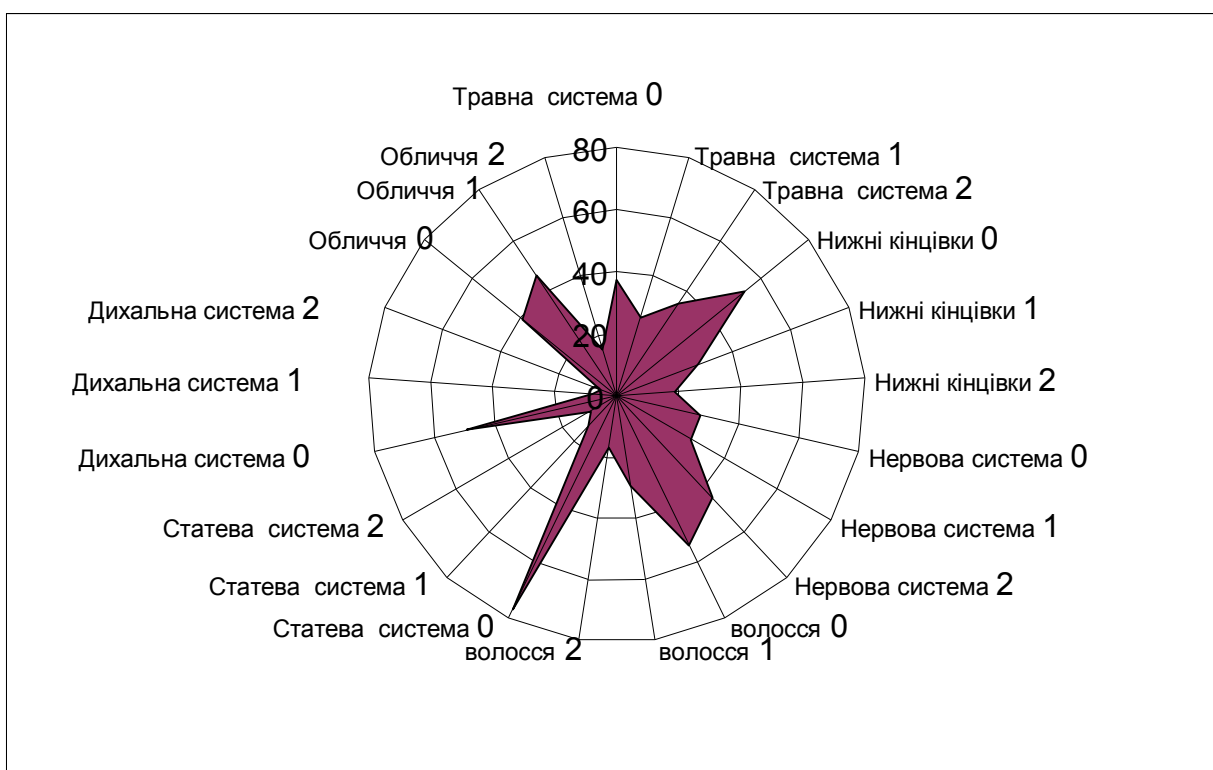
Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,5}$ «сечовидільна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{2,5}$	0	20 (54,06%)	45 (49,45%)	65 (103,51%)	5,75	0
	1	8 (21,62%)	8 (8,79%)	16 (30,41%)		
	2	9 (24,32%)	38 (41,76%)	47 (66,08%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Ураження сечовидільної системи було притаманне пацієнтам обох груп з незначною перевагою в ОГ3.

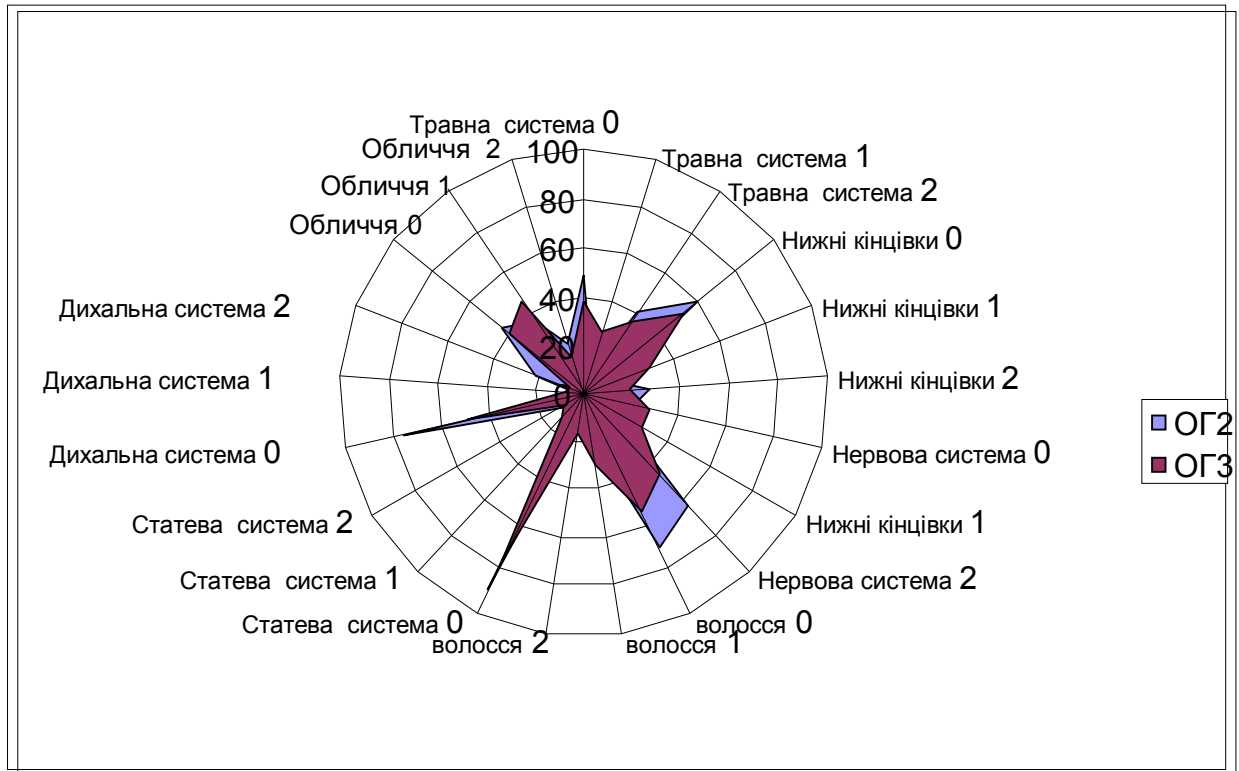


а)



б)

Рис. 5.7. Діаграма розподілу фенотипових ознак (травна система, нижні кінцівки, нервова система, волосся, статевая система, дихальна система, обличчя) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: а) діаграма ОГ2; б) діаграма ОГ3



в)

Рис. 5.7. Диаграма розподілу фенотипових ознак (травна система, нижні кінцівки, нервова система, волосся, статева система, дихальна система, обличчя) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: в) діаграми ОГ2 і ОГ3

Як видно з рис. 5.7, по показникам змін з боку нервової, травної і дихальної систем відмічається майже повне співпадіння частоти клінічних ознак ураження ведучих систем організму. Знайдене тісне співпадіння може відбивати встановлену на початку століття важливу роль метіоніну у мітохондріальній функції і високу взаємозалежність двох циклів – цикла Кребса і фолатного цикла.(А. Bender, 2010).

Таблиця 5.29

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,4}$ «травна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{2,4}$	0	18 (48,65%)	34 (37,36%)	52 (86,01%)	3,87	0
	1	4 (10,81%)	24 (26,37%)	28 (37,18%)		
	2	15 (40,54%)	33 (36,27%)	48 (76,81%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.30

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,1}$ «нервова система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{2,1}$	0	8 (21,62%)	25 (27,47%)	33 (49,09%)	3,27	0
	1	6 (16,22%)	25 (27,47%)	31 (43,69%)		
	2	23 (62,16%)	41 (45,06%)	64 (107,22%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.31

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,3}$ «волосся»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,3}$	0	26 (70,27%)	49 (53,85%)	75 (124,12%)	2,93	0
	1	7 (18,92%)	27 (29,67%)	34 (48,59%)		
	2	4 (10,81%)	15 (16,48%)	19 (27,29%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таблиця 5.32

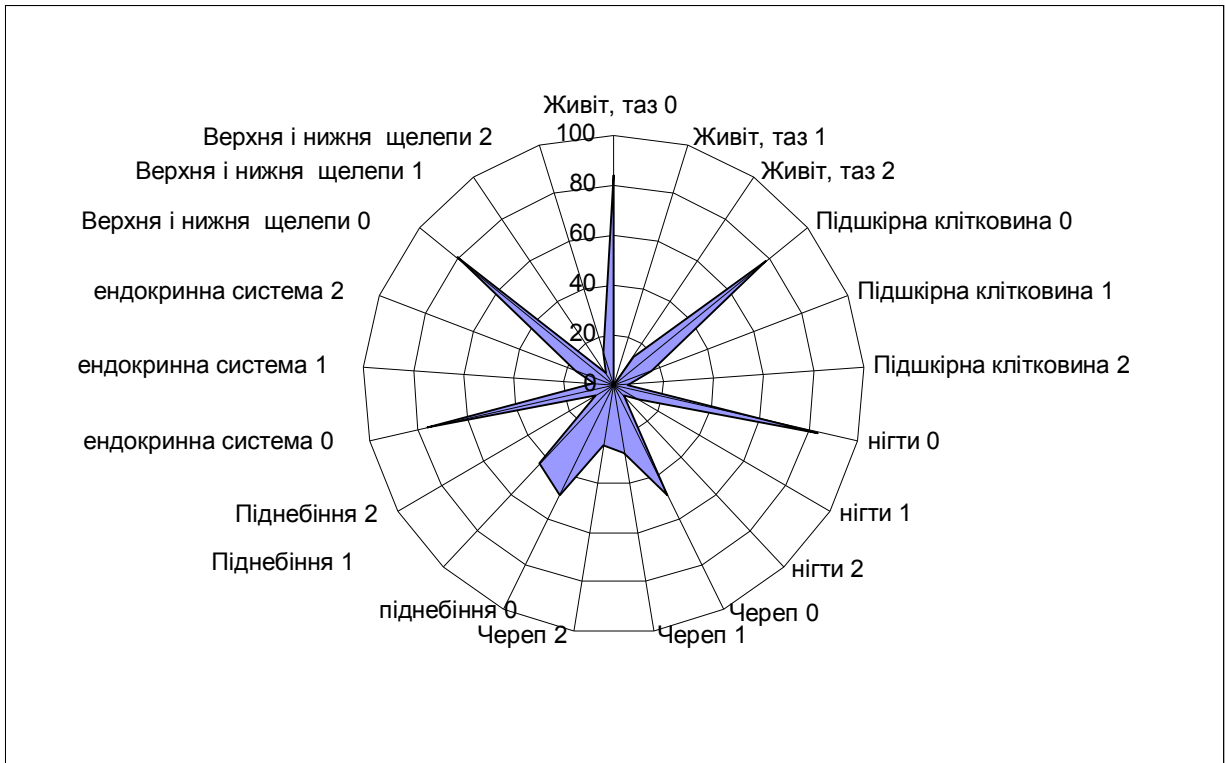
Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,3}$ «дихальна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{2,3}$	0	28 (75,68%)	79 (86,81%)	107 (162,49%)	2,38	0
	1, 2	9 (24,32%)	12 (13,19%)	21 (37,51%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

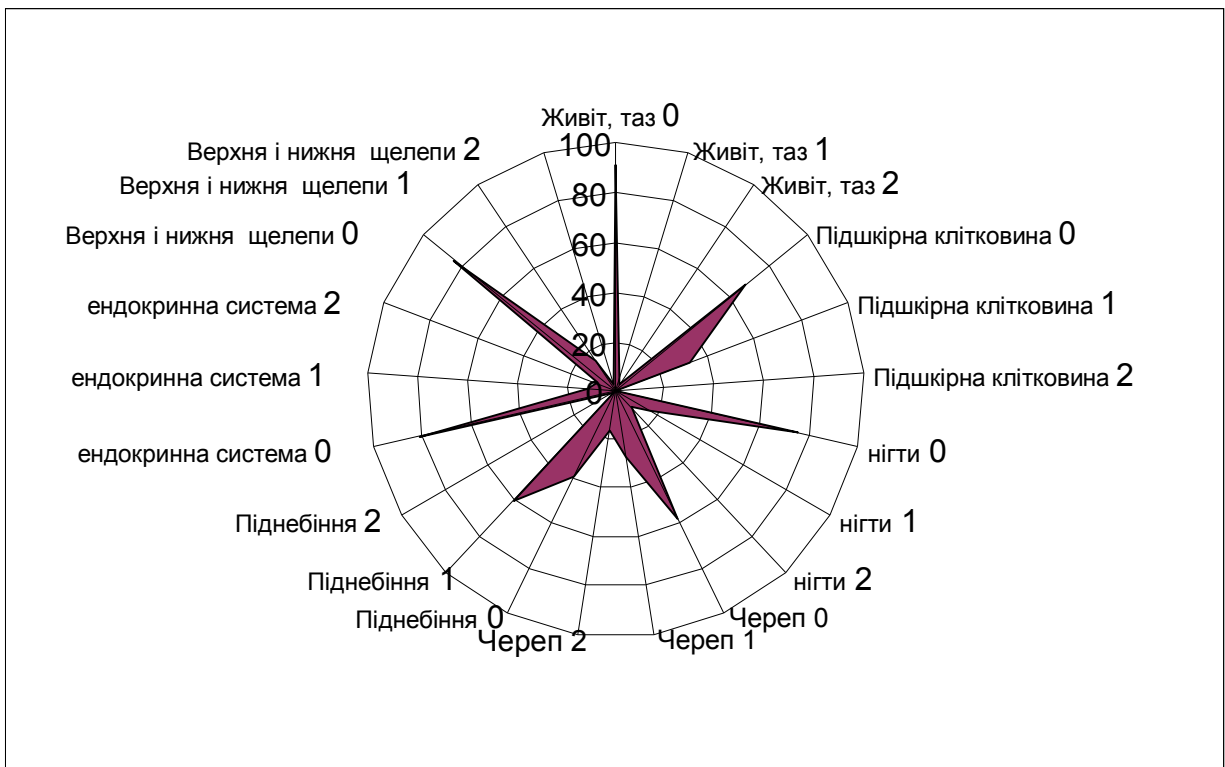
Таблиця 5.33

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,7}$ «обличчя»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,7}$	0	16 (43,24%)	35 (38,46%)	51 (81,7%)	1,49	0
	1	13 (35,14%)	42 (46,15%)	55 (81,29%)		
	2	8 (21,62%)	14 (15,39%)	22 (37,01%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

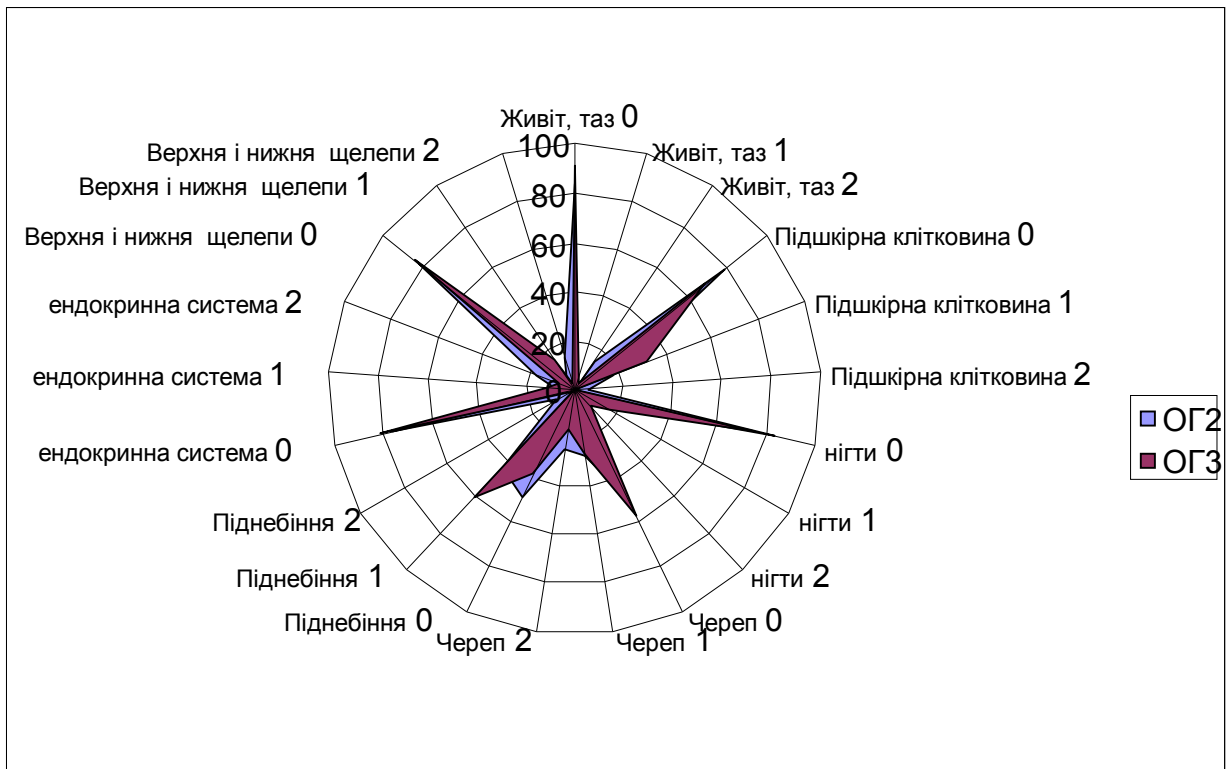


а)



б)

Рис. 5.8. Діаграма розподілу фенотипових ознак (живіт і таз, підшкірна клітковина, нігти, череп, піднебіння, ендокринна система, верхня і нижня щелепи) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: а) діаграма ОГ2; б) діаграма ОГ3



в)

Рис. 5.8. Діаграма розподілу фенотипових ознак (живіт і таз, підшкірна клітковина, нігти, череп, піднебіння, ендокринна система, верхня і нижня щелепи) порівнюваних груп ОГ2 і ОГ3: в) діаграми ОГ2 і ОГ3

Наведені в рис. 5.8 клінічні ознаки у двох групах майже співпадають.

Таблиця 5.34

Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{2,7}$ «ендокринна система»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{2,7}$	0	28 (75,68%)	76 (83,52%)	104 (159,2%)	1,06	0
	1, 2	9 (24,32%)	15 (16,48%)	24 (40,8%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

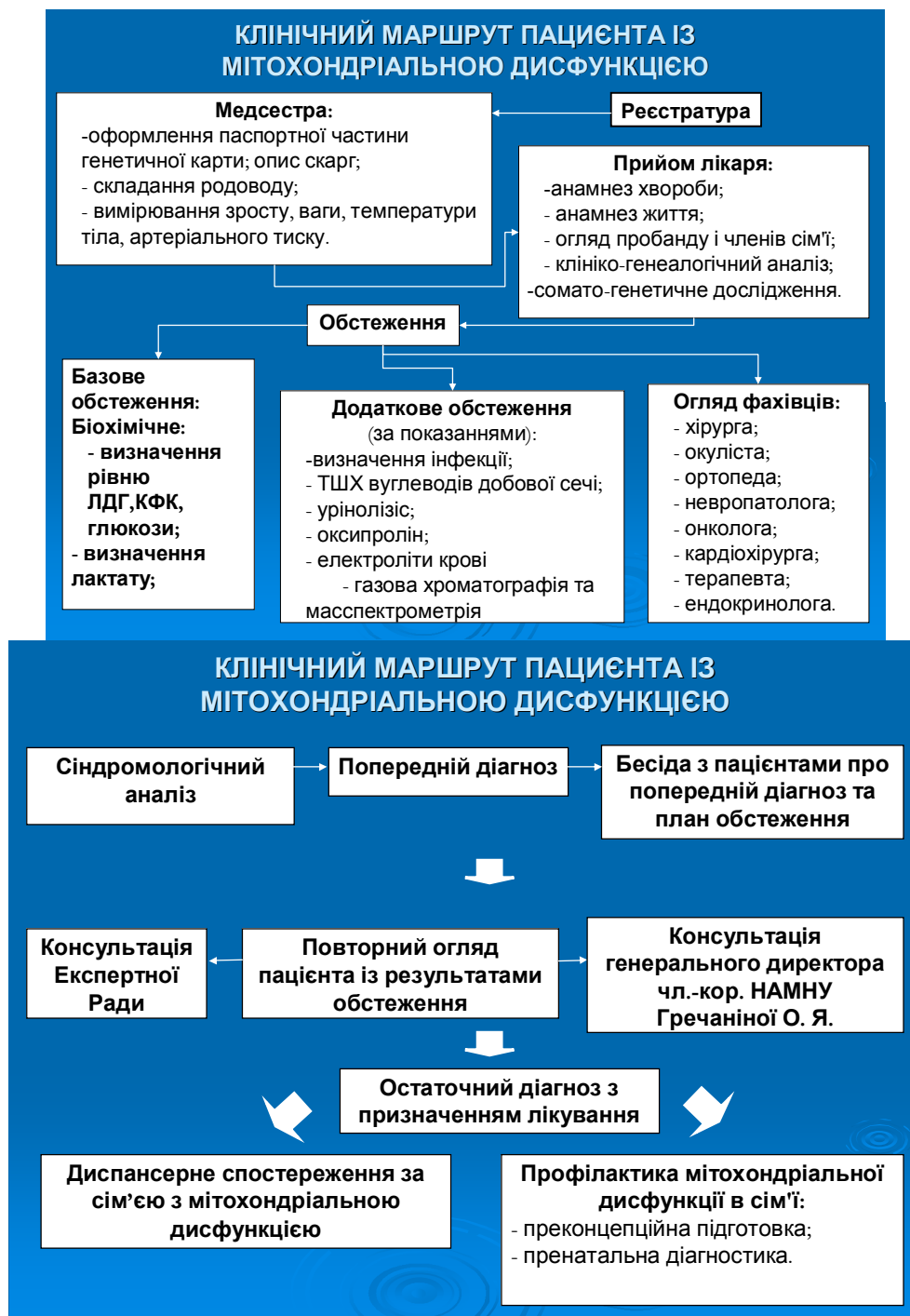
Таблиця спряженості за ознакою $x_0^{1,12}$ «верхня та нижня щелепи»

Градації ознак		Група		Σ	$\chi_{кр}^2$	V
		ОГ2	ОГ3			
$x_0^{1,12}$	0	30 (81,08%)	76 (83,52%)	106 (164,6%)	0,11	0
	1, 2	7 (18,92%)	15 (16,48%)	22 (35,4%)		
Σ		37 (100%)	91 (100%)	128 (200%)		

Таким чином, аналізуючи отримані дані, зазначимо існування феномену синтропії у пацієнтів із МТХД. Перша хвороба (МТХД) – спадкове порушення енергетичного обміну, якій притаманне поліорганне ураження, перш за все енерготропних органів, перебігає на тлі генетичних особливостей популяції – високій частоті поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR та А66G МTRR (друга хвороба). При цьому, перша хвороба перебігає по власним патогенетичним закономірностям і залишає характер самостійної нозологічної одиниці. Друга хвороба також залишає за собою власні патогенетичні закономірності. Враховуючи тісну взаємодію каскадних процесів фолатного циклу і циклу Кребса, існуючу взаємодію генів, клінічні ознаки поєднання двох порушень посилюються, що має велике значення для діагностики і патогенетичної корекції.

Розділ 6 УТОЧНЮЮЧА БІОХІМІЧНА ДІАГНОСТИКА МТХД

Уточнююча біохімічна діагностика МТХД – складний і багатоступеневий процес, який потребує участі лікаря-генетика, лікаря-спеціаліста, молекулярного генетика, клінічного біохіміка. Саме таким чином були відпрацьовані навігатор та алгоритм уточнюючої діагностики МТХД.





Інформаційна значущість клініко-генетичного обстеження майже абсолютна. Глибоке знайомство із анамнезом хвороби і життя було використано як основа для всіх етапів діагностики. Звернула на себе увагу наявність факторів, які виступали у ролі провокаторів, і серед них передували інфекції, характер харчування, травми, стреси, які могли діяти на різних етапах онтогенезу, починаючи із проембріонального. Фактори діяли короткочасно і запускали процес порушення злагодженої діяльності організму.

Відмічено, що індивідуальні тригери діяли на різних етапах життя. Звернула на себе короткочасність дії вірусних інфекцій під час вагітності: гіпертермія, легкі ознаки ГРВІ, на які лише 57% вагітних звертали увагу. Але ці епізоди, на нашу думку, були початком запуску дії медіаторів, у ролі яких виступав генетичний популяційний і індивідуальний фон, який означає наявність поліморфних генів схильності.

Запущений процес гіперметилування задля «зупинки» дії вірусу забезпечував, скоріше за все, дію «паразитичних мутацій», змінення первинного генного продукту і морфологічних та біохімічних порушень в організмі.

Такі схематичні ланцюги змін були побудовані нами на підставі літературних даних та спостережень за обстеженими хворими.

У відповідності до наведеного побудованого діагностичного алгоритму уточнюючої діагностики, всі етапи якого виконувались лікарем-генетиком, спеціалістом, біохіміком, цитогенетиком (за показаннями), молекулярним генетиком, що забезпечувало індивідуальність діагностики. Схема «всі (спеціалісти)-для одного (хворого)», яка запроваджена в діяльності ХСМГЦ, використана в дисертаційному дослідженні як лейтмотив. Біохімічним дослідженням надавався індивідуальний характер і для груп хворих, і для кожного окремо. Саме тому вивчення окремих біохімічних змін розцінювалось у співставленні ознак.

Біохімічні дослідження виконувались у біохімічній лабораторії ХСМГЦ (зав. І.В. Новікова, А.Л. Фадєєва), співпраця з якими дозволила здобувачеві у великій кількості випадків знайти «мішень» ураження і вибудувати адекватну терапію.

6.1. Визначення рівню лактату, пірувату, біохімічних показників, амінокислот крові

У 203 (ОГ1) пацієнтів з клінічними ознаками МТХД були проведені аналізи лактату крові, біохімічних показників крові і органічних кислот сечі як базові дослідження. Були оцінені зв'язки між зміною рівня лактату і зміною біохімічних показників крові та органічних кислот сечі. Лактат був підвищений у 29,9 % обстежених.

З метою перевірки наявності зв'язків між зміною лактату і біохімічних показників крові та органічних кислот сечі був використаний коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Вибір цього коефіцієнта зв'язку був обумовлений тим, що початкові змінні виміряні в ординальній шкалі. Оскільки норми аналізованих показників залежать від статі і віку, то початкове значення, виміряне в кількісній шкалі, було виражене в ординальній шкалі.

В табл. 6.1. приведені результати розрахунку коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена між лактатом і показниками ФП. Для перевірки значущості значень коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена була прийнята вірогідність помилки 1-го роду $\alpha = 0.05$, тобто якщо $p < 0.05$, тоді зв'язок між змінними присутній.

Таблиця 6.1

Результати аналізу наявності зв'язків між лактатом і показниками ФП за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена

Показник ФП	Коефіцієнт Спірмена $\tau_{kj}^{(s)}$	Значення p	Об'єм вибірки, N	Наявність зв'язку
Тригліцеріди	0.241	0.001	190	так
Аспаратамінотрансфераза	0.161	0.027	189	так
Сечова кислота	0.158	0.030	189	так
Білірубін	-0.149	0.045	183	так
Аланінамінотрансфераза	0.146	0.046	188	так

Таблиця 6.2

Результати аналізу наявності зв'язків між лактатом і показниками органічних кислот за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена

Показник ОК	Коефіцієнт Спірмена $\tau_{kj}^{(s)}$	Значення p	Наявність зв'язку
Кількісні			
shicimic_acid	Немає даних		
acid_3methyladipic	-0,201	0,007	так
N_acetyltirosine	0,174	0,019	так
citric_acid	-0,146	0,050	так
Якісні			
dehydroabietic	Немає даних		
Palmitic	-0,198	0,008	так
value_5_Hydroxyindoleacetic	0,151	0,042	так

З аналізу табл. 6.1. видно, що зі зміною рівня лактату пов'язані зміни таких показників ФП як тригліцериди, аспартатамінтрансферази, UA, BIL та ALT (показники ФП вказані по мірі зменшення тісноти зв'язку з лактатом).

У пацієнтів з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції також були оцінені частоти підвищень і понижень біохімічних показників крові, амінокислот крові, органічних кислот сечі і лактату крові.

Таблиця 6.3

Частота змін біохімічних показників крові у пацієнтів
з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції

Показник	Всього досліджено	Підвищення, шт.	Підвищення %	Зниження, шт.	Зниження %
ALP	134,00	20,00	14,93	5,00	3,73
CHOL	105,00	15,00	14,29	6,00	5,71
GLU	111,00	12,00	10,81	4,00	3,60
AST	128,00	10,00	7,81	10,00	0,00
ALT	125,00	10,00	8,00	0,00	0,00
TG	102,00	8,00	7,84	3,00	2,94
UR	133,00	13,00	9,77	2,00	1,50
UA	136,00	12,00	8,82	19,00	13,97
CA	136,00	10,00	7,35	22,00	16,18
P	132,00	17,00	12,88	20,00	15,15
CRE	125,00	9,00	7,20	5,00	4,00
CREC	95,00	12,00	12,63	0,00	0,00
LDG	118,00	28,00	23,73	0,00	0,00
BIL	76,00	6,00	7,89	0,00	0,00
GGT	118,00	10,00	8,47	0,00	0,00
TSP	128,00	12,00	9,38	6,00	4,69
ALB	124,00	9,00	7,26	3,00	2,42

Частота змін амінокислот крові у пацієнтів з клінічними ознаками
мітохондріальної дисфункції

Показник	Підвищення	Зниження	Підвищення %	Зниження %
1	2	3	4	5
PSER	0	0	0	0
ASP	4	0	6,896551724	0
GLU	7	0	12,06896552	0
AAD	0	0	0	0
HYPRO	1	0	1,724137931	0
PEA	1	0	1,724137931	0
SERIN	0	5	0	8,620689655
ASN	1	2	1,724137931	3,448275862
GLY	0	7	0	12,06896552
GLN	3	11	5,172413793	18,96551724
B-ALA	0	0	0	0
TAU	1	0	1,724137931	0
HIS	0	4	0	6,896551724
GABA	0	0	0	0
CIT	1	1	1,724137931	1,724137931
THR	1	6	1,724137931	10,34482759
ALA	0	3	0	5,172413793
ARG	1	0	1,724137931	0
PRO	3	1	5,172413793	1,724137931
AAB	1	0	1,724137931	0
TYR	0	3	0	5,172413793
VAL	1	7	1,724137931	12,06896552
MET	4	6	6,896551724	10,34482759
CYS	3	7	5,172413793	12,06896552
ILE	2	0	3,448275862	0
LEU	2	3	3,448275862	5,172413793
PHE	0	6	0	10,34482759
TRP	0	1	0	1,724137931
ORN	3	0	5,172413793	0
LYS	2	4	3,448275862	6,896551724

З метою білкового метаболізму була проведена оцінка рівня вільних АК крові у пацієнтів з поліморфізмами в генах фолатного циклу.

Основні фактори, які впливають на рівень АК, – характер і ефективність харчування; поглинання клітинами печінки та здатність скелетних м'язів підтримувати достатню швидкість трансамінування (рис. 6.1)

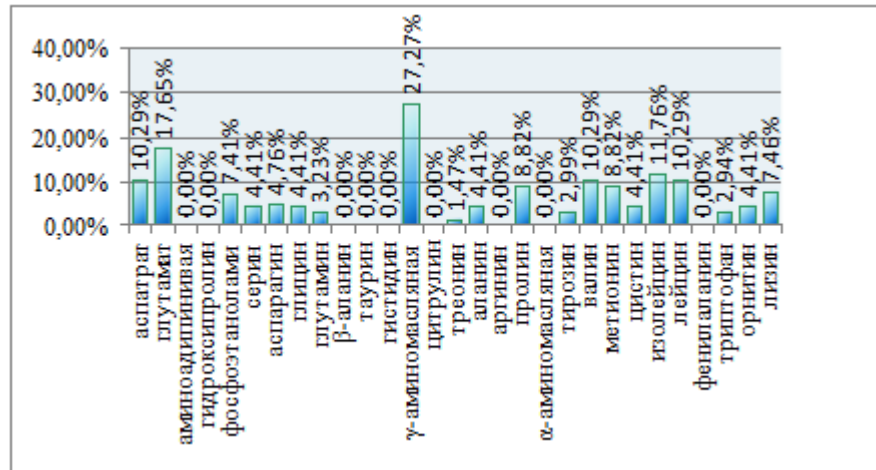


Рис.6.1. Підвищення рівня вільних амінокислот крові у пацієнтів з поліморфізмом в генах фолатного циклу

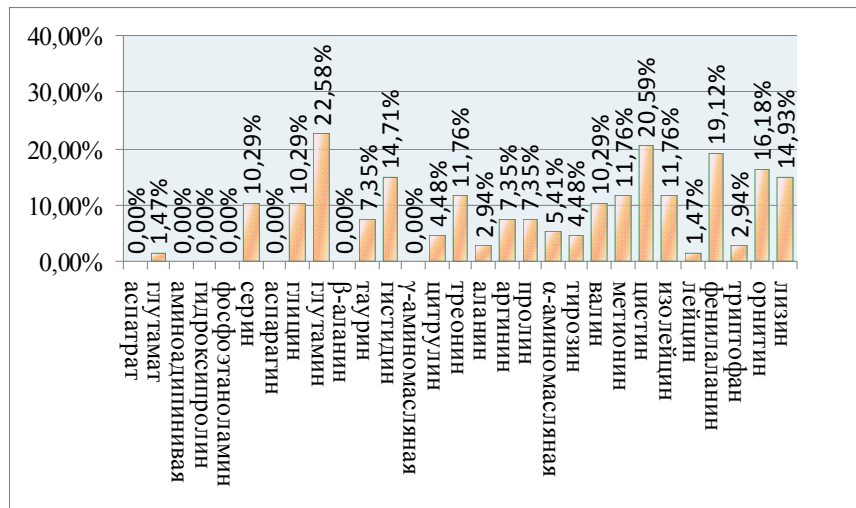


Рис. 6.2. Зниження рівня вільних амінокислот крові у пацієнтів з поліморфізмом в генах фолатного циклу

Збільшення рівня замічних АК ми розцінювали як рівень зниженого споживання білка.

Відмічено підвищення рівня глутаміну (ГЛУ). Оскільки ГЛУ включений до більшості шляхів метаболізму людини і переносить азот із працюючих м'язів, зміна його рівня свідчить про значні розлади в роботі життєво важливих органів і систем. ГЛУ являється збуджуючим нейротрансмітером в мозку, тому при підвищенні його рівня розвиваються нейродегенеративні процеси. Разом з тим він контролює шлункову функцію, а високий рівень ГЛУ викликає пригнічення її.

Підвищення рівня ГЛУ відмічають у результаті зниження каталітичної активності глутаматдегідрогенази. ГЛУ бере участь у реакціях детоксикації аміаку в мозку, де він, з'єднуючись з аміаком, формує глутамат. Помірні зміни плазмового глутамату впливають на імунну систему, а його високий рівень може бути причинно-обумовленим показником імунопатології при різних захворюваннях.

Гамааміномасляна кислота (ГАМК) є важливим інгібіторним нейротрансмітером в ЦНС. Концентрація в плазмі відображає рівні ГАМК в спинно-мозковій рідині. Високі рівні ГАМК крові розцінювались як потенційно неадекватне утворення енергії в м'язовій та інших тканинах.

Враховуючи підвищення глутамату у значної кількості обстежених, особливу увагу привертають отримані дані про зниження глутаміну також у досить великої групи пацієнтів (22% обстежених).

Зниження рівня ГЛУ в крові може відображати хронічний дефіцит потрапляння з їжею незамінних АК, що може призводити до порушень детоксикації аміаку, особливо у поєднанні з порушеннями функції циклу сечовини.

У обстежених пацієнтів відмічено зниження рівня цистину (20%), фенілаланіну (19%), орнітину (16%), лізину (15%), гістидину (15%). Зниження рівнів інших амінокислот виявлялося не більше ніж у 12% обстежених. На наш погляд, їх оцінка і зіставлення можуть носити виключно індивідуальний характер.

Зниження рівню цистину (ЦИС) може бути пов'язане з дефіцитом піридоксину, що саме по собі призводить до ланцюга порушень, таких як синтез глютаміону, утворення таурину, глікозаміногліканів, що сульфатуються.

Фенілаланін (ФА) являється незамінною АК і попередником тирозину, дофаміну, і катехоламінів (адреналіну і норепінефріна). Зниження рівня ФА може відображати потенційно хронічний його дефіцит, що спричиняє за собою дефіцит біогенних амінів. У обстежених пацієнтів спостерігались симптоми хронічної втоми, проблеми з навчанням, пам'яттю, поведінкові порушення, депресія і дисфункція вегетативної нервової системи, що підтверджує висловлене припущення.

Зниження рівня гістидину, в біогенезі якого приймає участь метіонін, розцінювались як наслідок дефіциту фолієвої кислоти, що призводить до підвищення його катаболізму, і до появи продуктів його деградації в сечі. Це можна розцінювати як функціональний маркер статусу фолатів.

При дослідженні рівня гомоцистеїну крові було відмічено підвищення його концентрації у 28% випадків, зниження – 4,5%. Високий рівень гомоцистеїну розглядався як чинник ризику кардіоваскулярної патології, проте, пацієнти зі зниженням рівня гомоцистеїну також віднесені до групи ризику. Гомоцистеїн - нормальний проміжний продукт на шляху метаболізму метіоніну в таурин, з подальшим утворенням глутатіона, таурину і сульфатів. У пацієнтів з низьким рівнем гомоцистеїну відмічена обмежена здатність до відповіді на окислювальний стрес і певні види токсинів.

Згідно з існуючими даними, гіпергомоцистеїнемія – патофізіологічний чинник багатьох кардіоваскулярних захворювань. А підвищення його рівню коригується призначенням вітамінів В₁₂ і фолату, які включаються в реакцію трансметилування метіоніну. Чутливий механізм регуляції ферментів, контролюючих утворення гомоцистеїну в реакціях трансметилування і транссульфатування дозволяє швидко реагувати на окислювальний стрес шляхом збільшення утворення глутатіону, що підкреслює тісний зв'язок між енергетичним обміном і обміном метіоніну.

До гіпергомоцистеїнемії призводить також дефіцит фолієвої кислоти, яка бере участь в перенесенні метильних груп в процесі реметилування гомоцистеїну з утворенням метіоніну.

Зв'язок гіпергомоцистеїнемії з атеро- і тромбогенезом вперше був виявлений у хворих з гомоцистеїнурією. Підвищення рівня гомоцистеїну в

крові натщесерце на кожні 5 мкмоль/л збільшувало ризик розвитку ішемічної хвороби серця в 1,6-1,8 разу. Проте, на відміну від даних, отриманих в ході одноразових досліджень, результати проспективних досліджень були не однозначні. Прямий зв'язок між рівнем гомоцистеїну і розвитком ішемічної хвороби серця був виявлений лише в двох з п'яти проспективних досліджень. На нашу думку різні результати були пов'язані із характером обміну метоніну, який треба оцінювати в «реальному масштабі часу».

На основі отриманих даних можна припустити про участь фолієвої кислоти у вуглеводному і ліпідному обміні. Виявлені зміни ймовірно обумовлені порушенням метилювання в результаті порушень у фолатному циклі.

6.2. Оцінка частот і характеру змін органічних кислот у пацієнтів із МТХД

Аналіз отриманих результатів проведений на підсаві синтезу даних із використаних у роботі каталогів Merk та програмного забезпечення AMDIS v.2,65 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System); MSD Productivity ChemStation Software G1701EA, бібліотека спектрів NIST\EPA\NIH Mass Spectral Library (NIST05) NIST Mass Spectral Search Program (Version 2.0d).

У пацієнтів всіх досліджених груп з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції були досліджені 421 зразок сечі на органічні кислоти методом газової хроматографії мас-спектрометрії. В результаті аналізу отриманих даних була виявлена група органічних кислот, підвищення або зниження яких найчастіше виявлялися у цієї групи пацієнтів. Частина органічних кислот визначалася кількісно, частина – напівкількісно, а з'єднання, що найрідше зустрічалися – якісно. У групі органічних кислот, які визначалися кількісно, в підвищеній концентрації найчастіше зустрічалися наступні сполучення.

Підвищення концентрації в сечі 2-гідроксимасляної кислоти було виявлене в 35 досліджених зразків.

Підвищення цього з'єднання у високому ступені асоційований із станами з дефіцитом енергії (наприклад, при асфіксії плоду при народженні), а також при порушеннях обміну, в патологічний перебіг яких на етапі неонатального розвитку залучається центральна нервова система (наприклад, при «церебральному» лактат-ацидозі, глутаровій ацидурії 2-го типу, дефіциті дигідроліполдегідрогенази, пропіонової ацидемії. Було також відмічено, що збільшення відношення $NADH_2/NAD$ є найбільш важливим чинником для посилення вироблення 2-гідроксимасляної кислоти.

У 35 % зразків сечі пацієнтів було виявлено підвищення концентрації гліцерину, який є важливим компонентом тригліцеридів та фосфоліпідів. Гліцерин є трьохвуглецевим ланцюгом, який є основою для розміщення жирних кислот у жирах. Якщо організм використовує збережені жири в якості енергії, то гліцерин і жирні кислоти вивільнюються в кров. Гліцерин може перетворюватися в клітинах печінки на глюкозу, яка потім метаболізується, забезпечуючи організм енергією.

Гліцерин в організмі людини може метаболізуватися шляхом гліколізу, а також включатися до синтезу складних ліпідів.

При надходженні до організму тригліцериди гідролізуються групою ферментів - ліпаз, внаслідок чого спочатку утворюються діацилгліцериди, потім моноацилгліцериди і, на завершення – гліцерин.

Гліцерин далі, в результаті двох реакцій, каталізованих гліцеринкіназою і гліцеринфосфатдегідрогеназою, метаболізуються в проміжний метаболіт – дигідроацетонфосфат, який може далі метаболізуватися шляхом гліколізу.

Ряд ферментів, як необхідних для катаболізму гліцерину, так і для його нормального включення в процес гліколізу і синтезу складних ліпідів, мають як цитозольні, так і мітохондріальні ізоформи, або взаємодіють із зовнішньою мембраною мітохондрій (наприклад, гліцеролкінази, гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа) і залежать як від потенціалу на мітохондріальній мембрані, так і від нормального функціонування інших компонентів мітохондрій. Таким чином, підвищення рівня гліцерина було розцінено як важлива біохімічна ознака не тільки функціональних, але і морфологічних змін мітохондрій.

При дефіциті ферментів, залучених в метаболізм гліцерину, при мікроскопічному дослідженні часто спостерігаються морфологічні зміни мітохондрій (наприклад при дефіциті триозофосфат ізомерази).

Моноаміноксидаза (МАО) - оксидоредуктаза, що дезамінує моноаміни. Вона виявлена у багатьох тканинах, але в найбільших концентраціях - в печінці, шлунку, нирках. МАО міститься в мітохондріях більшості клітин, і у тому числі - в нервових шляхах.

Той факт, що деякі види вищих рослин здатні забезпечувати клітини додатковою енергією шляхом переробки гліколевої кислоти в спеціальних органелах – гліюксисомах, є добре відомим. Нині існують свідчення про можливу наявність таких механізмів в мітохондріях клітин еукаріот, тому діагностичне значення змін рівня гліколевої кислоти, безумовно, значне і є діагностично доказовим.

У 23% зразків спостерігалось підвищення рівня метилмалонової кислоти. Метилмалонова кислота є дикарбоксиловою кислотою - С-метильованим похідним малонової кислоти.

З'єднання метилмалонової кислоти з коензимом А - метилмалоніл-КоА, метаболізується в сукциніл КоА під впливом метилмалоніл-КоА-мутази. У цій реакції в якості кофактора потрібний вітамін В12. По цьому шляху метилмалонова кислота залучається до циклу Кребса.

Метилмалоніл-КоА-мутаза каталізує ізомеризацію метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА і залучена у безліч життєво важливих метаболічних шляхів. Субстрат реакції - метилмалоніл-КоА утворюється з пропіоніл-КоА, який є продуктом катаболізму ізолейцину, валіну, треоніну, метіоніну, тиміну, холестеролу, метилмалонової кислоти і жирних кислот. Продукт реакції - сукциніл-КоА є ключовою молекулою в циклі Кребса.

Метилмалоніл-КоА-мутаза локалізована в мітохондріях, де вона бере участь в метаболізмі вищезгаданих з'єднань, метаболізуючи їх до одного загального метаболіта - метилмалоніл-КоА.

Метілмалонова кислота є критично важливою проміжною метаболітів жирів і білків. Аномалії в обміні цієї кислоти призводять до розвитку метілмалонової ацидурії, яка викликається блокуванням реакції перетворення метілмалоніл-КоА в сукциніл-КоА.

Окрім цього класичного порушення обміну речовин, описаний ще ряд мітохондріальних дисфункцій, при яких підвищується рівень метілмалонової кислоти, і які підкоряються законам Менделя. Зокрема - синдроми деплеції мітохондріальної ДНК. На відміну від інших дефектів мітохондріальної ДНК, деплеція ДНК - це кількісна аномалія - присутня мітохондріальна ДНК з нормальною послідовністю нуклеотидів, проте в невеликій кількості.

Відповідно до різних фенотипів деплеція мітохондріальної ДНК може спостерігатися в тій або іншій тканині (найчастіше в м'язах, печінці і мозку) або у багатьох органах, включаючи серце, мозок і нирки. Було описано декілька клінічних форм синдрому деплеції мітохондріальної ДНК - міопатична, енцефалопатична і гепатоцеребральна. Підвищення рівня метілмалонової кислоти спостерігається в групі енцефалопатичних форм синдрому деплеції мітохондріальної ДНК, до якої віднесено два синдроми.

Перший характеризується високим рівнем лактату в крові, важкою затримкою психомоторного розвитку з м'язовою гіпотонією, порушенням слуху, генералізованими судомами з контрактурами коліна і стегна, дистонією пальців і незначним птозом. За результатами МРТ мозку в таких випадках зазвичай припускають синдром Лея. У скелетних м'язах спостерігається деплеція мітохондріальної ДНК середнього рівня (близько 32). За розвиток цього синдрому відповідальна мутація в гені, що кодує фермент АТФ-залежну сукциніл-КоА ліазу, *SUCLA2*.

Другий синдром з дуже важкою клінічною картиною викликає мутація в *SUCLG1* - гені, кодуєчому GTP- залежну ізоформу *SUCLG1*. Синдром, асоційований з комбінованою деплецією мітохондріальної ДНК в печінці і м'язах, дизморфіями, лактат-ацидозом з народження і завершується летальним результатом в перші дні життя.

Обидва синдроми супроводжуються метілмалоною ацидурією, яка виникає внаслідок накопичення метилмалонової кислоти через порушення перетворення пропіоніл-КоА, утвореного при бета-окисленні жирних кислот з непарною кількістю вуглецевих атомів, в сукциніл-КоА.

Окрім цього, підвищення метилмалонової кислоти в сечі асоційоване з таким захворюванням, як шизофренія. Отримані дані яскраво підкреслюють механізм виникнення багатьох клінічних ознак мітохондріальних дисфункцій.

Янтарна кислота була змінена в 19% зразків. Янтарна кислота є компонентом циклу Кребса. Її концентрація може підвищуватися внаслідок дефіциту рибофлавіну, коензиму Q10, надмірного перетворення глютаміну у бурштинову кислоти мікроорганізмами ШКТ, а також природжених порушень обміну речовин. Янтарна кислота - це дикарбоксилова кислота. Її аніон сукцинат, який і входить в цикл Кребса, може віддавати електрони в дихальний ланцюг мітохондрій. Одним з найважливіших ферментів, що забезпечують метаболізм янтарної кислоти, є сукцинат дегідрогеназа.

Цей фермент відіграє важливу роль в обмінних шляхах в мітохондріях, беручи участь і в дихальному ланцюзі і в циклі Кребса. Сукцинат дегідрогеназа в комплексі з простетичною групою FAD зв'язує субстрати - сукцинат і фумарат, і фізіологічні регулятори реакції - оксалоацетат і АТФ. Сукцинат легко переноситься в матрикс мітохондрій н-бутилмалонат (чи фенілсукцинат) чутливим транспортером дикарбоксилічних кислот в обмін на неорганічний фосфат або іншу органічну кислоту, наприклад, малат. Мутації в чотирьох генах, що кодують субодиниці сукцинат дегідрогенази мітохондріального дихального ланцюга асоційовані з широким спектром клінічних ознак.

Сукцинат дегідрогеназа або сукцинат-коензім-(2-редуктаза (SQR) або Комплекс II є ферментом, розташованим на внутрішній стороні мітохондріальної мембрани клітин людини і багатьох бактеріальних клітин. Цей фермент бере участь у циклі Кребса, і в ланцюзі перенесення електронів. На 8 етапі циклу Кребса, SQR каталізує окислення бурштинової кислоти у фумарову, що супроводжується відновленням убіхінона до убіхінола. Процес відбувається в мембрані, шляхом одночасного протікання обох реакцій.

Фермент складається з чотирьох субодиниць, зміни структури яких можуть призводити до наступних захворювань:

- Sdh субодиниця А - синдром Лея, мітохондріальна енцефалопатія, атрофія зору.

- Sdh субодиниця В - утворення пухлин в хромафинних клітинах, яке призводить до розвитку спадкової форми парагангліоми і спадкової феохромоцитоми. Частіше пухлини зустрічаються в злоякісній формі. Зміни структури ферменту в цій ділянці також можуть призводити до зменшення терміну життя і посилення вироблення супероксидних іонів.

- Sdh субодиниця С - зменшення тривалості життя, посилення вироблення супероксидних іонів, розвитку спадкової форми парагангліоми і спадкової феохромоцитоми. Частіше пухлини зустрічаються в доброякісній формі. Ця мутація мало поширена.

- Sdh субодиниця D - розвиток спадкової форми парагангліоми і спадковою феохромоцитом. Частіше пухлини зустрічаються в доброякісній формі і з'являються в області голови і шиї. Ця мутація також може призводити до зменшення строку життя і посилення вироблення супер оксидних іонів.

У людини сукцинат дегідрогеназа не лише відіграє роль в генерації енергії в мітохондріях, а також в сприйнятті кисню і пригніченні розвитку пухлин (244). Дефіцит фумарази клінічно проявляється багатоводдям і аномаліями мозку у плода. У періоді новонародженості проявляються сильні неврологічні розлади, відмова від їжі, відсутність розвитку і гіпотонія. На дефіцит фумарази у немовлят може вказувати наявність множинних важких неврологічних порушень на тлі відсутності метаболічного кризу. Причинами можуть бути зміни в активності як цитоплазматичної так і мітохондріальної фумарази. Окреме підвищення фумарової кислоти при аналізі органічних кислот сечі є чинником, який може свідчити про дефіцит фумарази.

У 19% випадках виявлено підвищення малонової кислоти. Це з'єднання є компонентом циклу Кребса. Основним ферментом, що забезпечує його метаболізм, являється малат-дегідрогеназа, яка каталізує перетворення малонової кислоти в оксалоацетат з використанням NAD, а також каталізує

зворотню реакцію (ця реакція є оборотною). Малат-дегідрогеназу не слід плутати з malic enzyme, який перетворює малонову кислоту в піровиноградну з утворенням NADPH.

Малат-дегідрогеназа також залучена в глюконеогенез - синтез глюкози з малих молекул. У мітохондріях піровиноградна кислота під дією пируваткарбоксилази перетворюється на оксалоацетат, який включається в цикл Кребса. Для виведення оксалоацетату з мітохондрії малатдегідрогеназа відновлює його до малата, який виходить з мітохондрії через її мембрану в цитозоль. Одразу після виходу в цитозоль малат окислюється назад в оксалоацетат цитозольної малатдегідрогеназою до оксалоацетату. На завершення фосфоенолпируваткарбоксилаза перетворює оксалоацетат на фосфоенолпируват.

З речовин, які аналізували напівкількісно, найчастіше підвищувалися 3-гідроксіізомаляна і 3,4-дигідроксімаляна кислота. Підвищення цих двох з'єднань було зафіксоване в 54 зразків сечі пацієнтів з ознаками мітохондріальної дисфункції.

3-гідроксіізомаляна кислота є метаболітом валіну. Після деамінування валіну утворюється його проміжний метаболіт 3-гідроксибутирил-КоА. 3-гідроксибутирил-КоА гідролізується до 3-гідроксіізомаляної кислоти під впливом ферменту 3-гідроксіізобутирил-КоА гідролази.

Ген 3-гідроксіізобутирил-КоА гідролази розташований на хромосомі 2q32.2. Фермент знаходиться в мітохондріях і значно поширений в органах і тканинах. Високий рівень експресії цього білка спостерігається в нирках, серці і легенях. 3-гідроксіізомаляна кислота метаболізується шляхом оборотної НАД-залежної реакції окислення, яку каталізує фермент 3-гідроксіізобутиратдегідрогеназа, який також розташований в мітохондріях. Той факт, що два ключові ферменти, що забезпечують метаболізм 3-гідроксіізомаляної кислоти, знаходяться в мітохондріях свідчить про важливу роль цієї органели в метаболізмі валіну і може пояснити отриману високу частоту підвищення екскреції цього метаболіта з сечею у пацієнтів з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції.

3,4 дигідроксималяна кислота є нормальним метаболітом, який виявляється в сечі у людини. Метаболічні шляхи синтезу подальшого обміну цього з'єднання до кінця не вивчені, проте підвищена екскреція 3,4-дигідроксималяної кислоти асоційована з порушенням обміну, викликаним дефіцитом сукцинат-семіальдегід дегідрогенази - 4-гідроксималяної ацидурії (MIM: 271980), а також з такими клінічними станами як хронічна прогресуюча офтальмоплегія і синдром Кернса-Сейра (MIM: 530000), синдром деплеції мітохондріальної ДНК (MIM:251880), синдром MITOCHONDRIAL-ENCEPHALOPATHY-LACTIC ACIDOSIS-STROKE (MELAS) (MIM:540000).

Він є одним з трьох ферментів, що забезпечують катаболізм гамма-аміномасляної кислоти (глутамат декарбоксилази, гамма-амінобутират амінотрансферази і сукцинат семіальдегід дегідрогенази).

Цей метаболічний шлях забезпечує вступ глутамату в цикл трикарбонових кислот, минуючий два етапи цього циклу.

Фермент сукцинат-семіальдегід дегідрогеназа виявлений у організмів в діапазоні еволюційного дерева від бактерій до людини. Він дуже важливий для розпаду гамма-аміномасляної кислоти в клітинах людини, а його дефіцит призводить до розвитку важкої клінічної картини. До недостатності цього ферменту призводить дефект гена ALDH5A1. Фермент локалізований в мітохондрії, і, відповідно, найбільше його міститься в таких тканинах, як мозок, підшлункова залоза, печінка, скелетні м'язи і нирки. Низькі рівні виявлені в плаценті.

Частота змін органічних кислот сечі (напівкількісна оцінка) у пацієнтів з клінічними ознаками мітохондріальної дисфункції наведена в додатку.

Проведене вивчення біохімічних показників у пацієнтів з наявністю поліморфізмів C677T MTHFR та A66G MTRR як таких, що відбивають стан багатьох функцій організму (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Зміна біохімічних показників у пацієнтів з наявністю
поліморфізмів в генах фолатного цикла (MTHFR, MTRR)

№ п/п	Біохімічний показник	Зниження рівня	Підвищення рівня
1.	Лужна фосфатаза	0,78	43,41
2.	Холестерин	10,38	10,38
3.	Глюкоза	3,70	68,52
4.	Аспаратамінотрансфераза	0,00	34,56
5.	Аланінамінотрансфераза	0,00	16,91
6.	Триглицериди	4,55	42,21
7.	Сечовина	3,05	1,53
8.	Сечова кислота	3,62	12,32
9.	Кальцій	45,52	14,93
10.	Фосфор	21,48	20,00
11.	Креатинин	13,33	27,50
12.	Креатікиназа	0,00	23,16
13.	Лактатдегідрогеназа	0,00	20,62
14.	Білірубін	0,00	11,54
15.	Гама-глутаматдегідрогеназа	0,00	8,403
16.	Загальний білок	8,55	15,38
17.	Альбумін	3,48	3,48

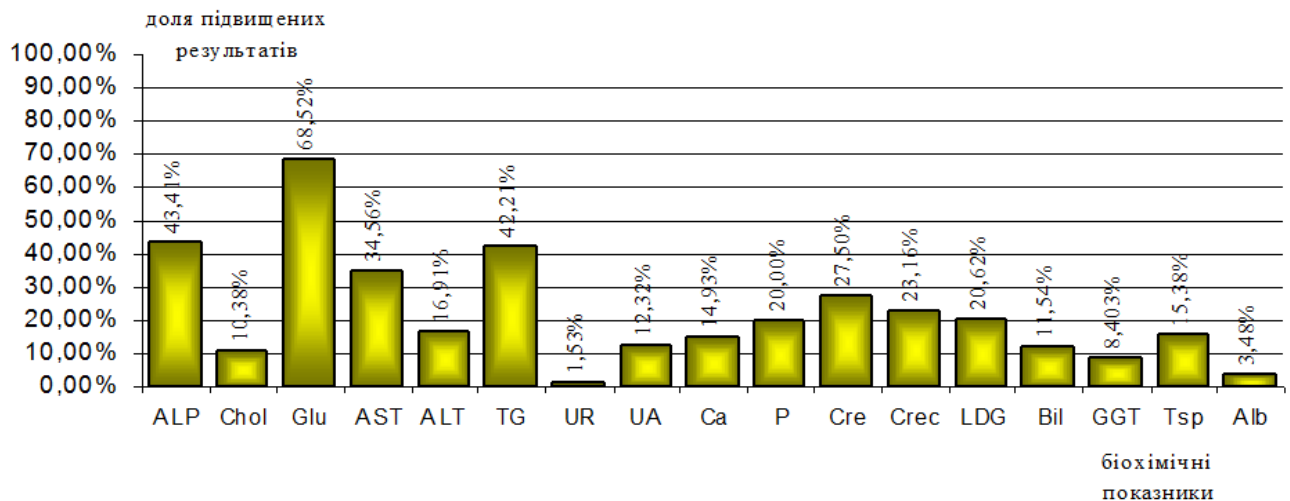


Рис. 6.3. Підвищення рівнів біохімічних показників крові у пацієнтів з
поліморфізмом в системі генів фолатного цикла

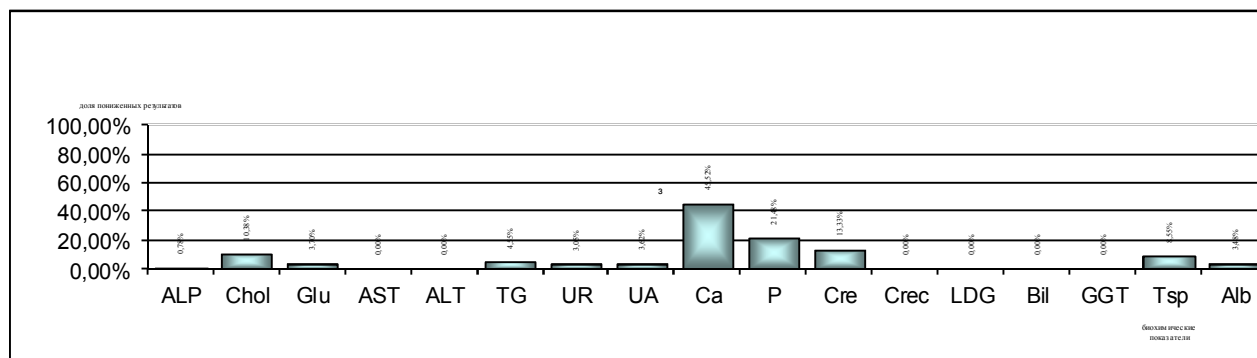


Рис. 6.4. Зниження рівня біохімічних показників крові у пацієнтів з поліморфізмом в системі генів фолатного цикла

доля підвищених результатів

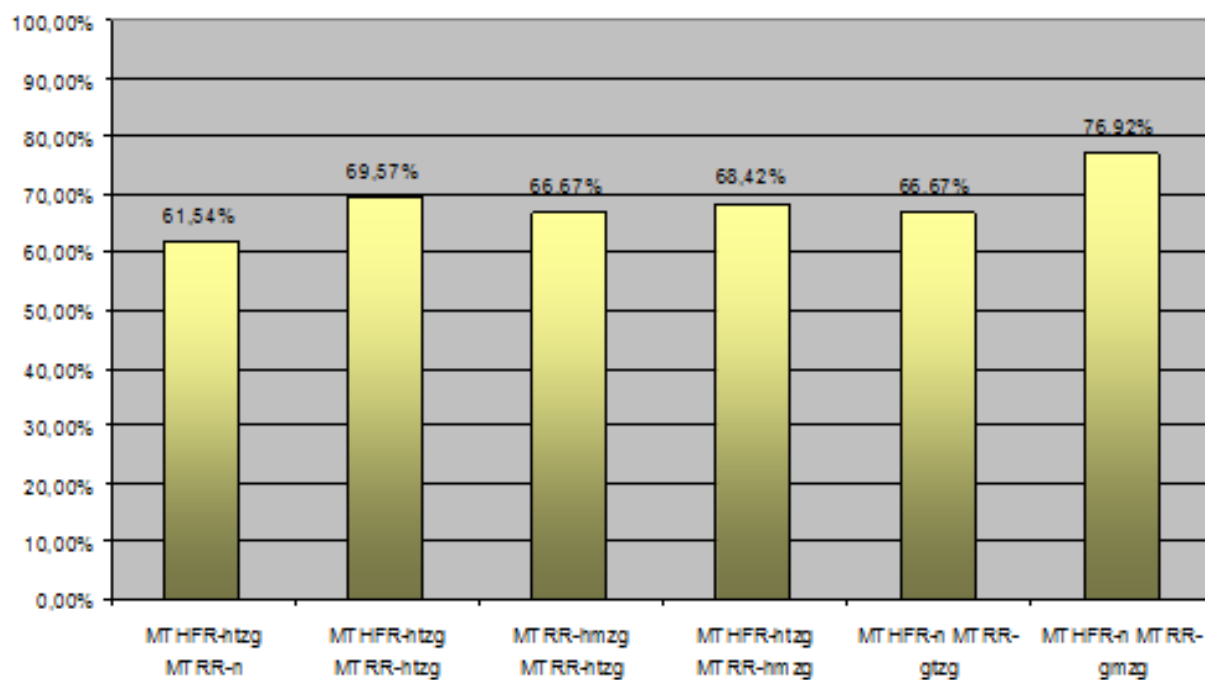


Рис. 6.5. Підвищення рівнів біохімічних показників у пацієнтів з наявністю поліморфізмів C677T MTHFR та A66G MTRR

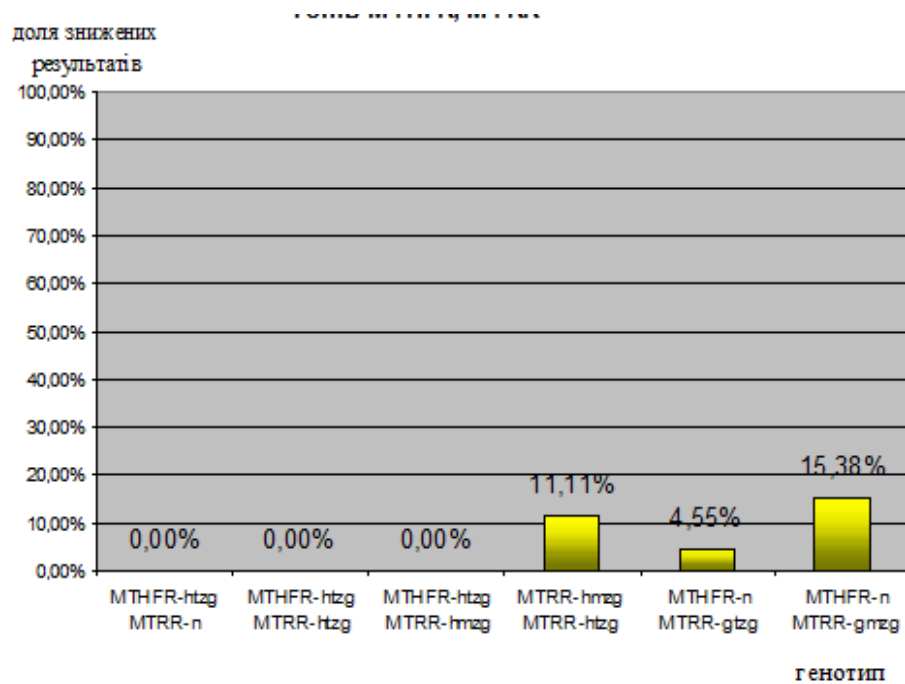


Рис. 6.6. Процент випадків зі зміненою глюкозою крові для різних поєднань поліморфізмів (MTHFR/MTRR) генів системи фолатного циклу

Глюкоза є основним вуглеводом крові і універсальним джерелом енергії для всього організму. Проте, причини зміни рівня глюкози і інших біохімічних показників для розуміння деяких порушень метаболізму залишаються недостатньо вивченими. Можна припустити, що за наявності поліморфізмів в генах фолатного циклу деякі похідні гомоцистеїну можуть інгібувати активність інсуліну. Відомий той факт, що глутатіон, який утворюється в результаті метаболізму гомоцистеїну, інгібує активність інсуліну, руйнуючи дисульфідні зв'язки в молекулі інсуліну.

При дослідженні рівня біохімічних показників, що характеризують функцію внутрішніх органів людини, виявлені: підвищення рівнів аспартатамінотрансферази (АСТ) і лужної фосфатази (ЛФ). У 17,65 % відмічено підвищення рівня глутамінової кислоти.

АСТ в клітинах представлена двома ізоферментами - мітохондріальним і цитоплазматичним, близько 1/3 загальних внутрішньоклітинних активності АСТ локалізується в цитоплазмі клітин, 2/3 - в мітохондріях. Враховуючи, що АСТ міститься в тканинах серця, печінки, скелетних м'язів, нервової тканини і

нирок, у меншій мірі - в підшлунковій залозі, селезінці і легенях, збільшення активності ферменту в динаміці може свідчити про залучення до патологічного процесу різних органів і тканин у пацієнтів з поліморфізмами в генах фолатного циклу та при МТХД.

Фосфор (P) - внутрішньоклітинний елемент, його з'єднання є присутніми в кожній клітині організму і беруть участь практично в усіх фізіологічних хімічних реакціях. P входить до складу ДНК і РНК, його з'єднання беруть участь в енергетичному обміні: у вигляді залишків фосфорної кислоти у складі нуклеотидів, коферментів НАД і НАДФ, багатьох ферментів і фосфоліпідів. Отримані дані дають основу для припущення про порушення енергетичного обміну у пацієнтів з поліморфізмами генів фолатного циклу. Одним з регуляторів як обміну кальцію, так і обміну фосфору є лужна фосфатаза. Зміна рівнів вказаних показників може бути пов'язана зі зміною активності лужної фосфатази.

6.3. Проведення дослідження активності цитрат-синтази та I, II/III, IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій

Для проведення дослідження активності цитрат-синтази та I, II/III та IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій використовувався біоптат м'язів, який зберігався при t не більш $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, зберігання зразків проводилось в низькотемпературних морозильних камерах. Гомогенат готувався за класичною методиці з використанням ізоляційного буферу (сахароза, ЕДТА, Тризма-основа, $\text{pH}=7,4$).

Активність цитрат-синтази вимірювалась шляхом оцінки концентрації оптично активного комплексу, що утворювався в результаті реакції 5,5-дитиобіс-2-нітробензойної кислоти з наопрцьованими вільними КоА, спектрофотометричним методом на довжині хвилі 412 нм. Активність комплексу I оцінювалась за рівнем зниження концентрації NADH з використанням ротенона з метою затримки реакції. Вимірювання концентрації NADH виконувалась спектрофотометричним методом на довжині хвилі 340 нм.

Активність сукцинатдегідрогенази (комплекс II) оцінювалась за рівнем підвищення концентрації цитохрому С при його відновленні, яке забезпечується комплексами II/III та залежить від концентрації субстрата реакції – янтарної кислоти. З метою зупинки реакції по витіканню заданого періоду часу використовувався антимицин А, для вимірювання – спектрофотометричний метод на довжині хвилі 550 нм.

Активність ферментів розраховувалась по закону Ламберта-Бера.

Комплекс 1

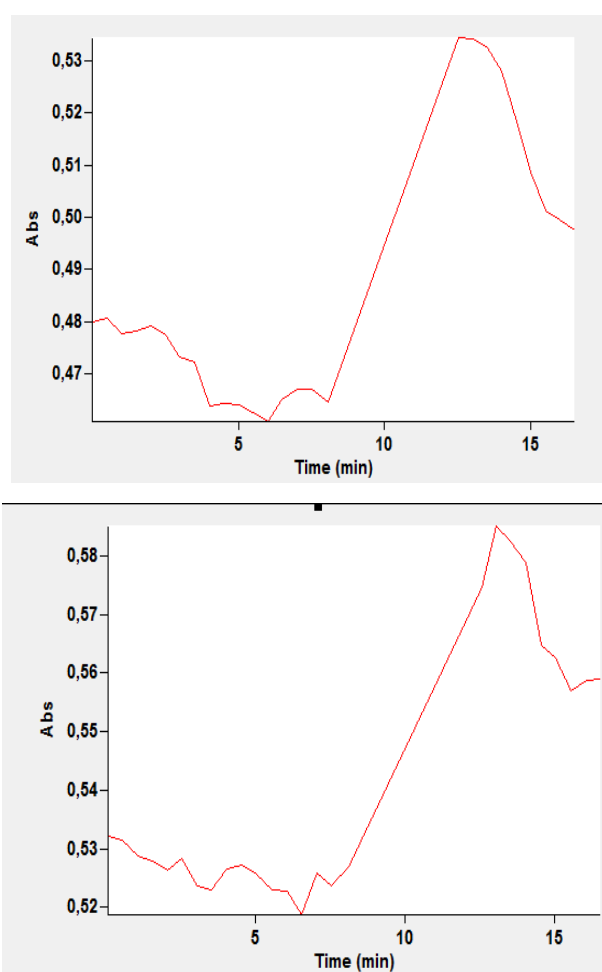


Рис. 6.7. Вимір активності першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій в зразку біопсії, яка зберігалася в парах рідкого азота протягом 11 місяців

Результат незадовільний. Внаслідок тривалого зберігання фермент зруйнувався.

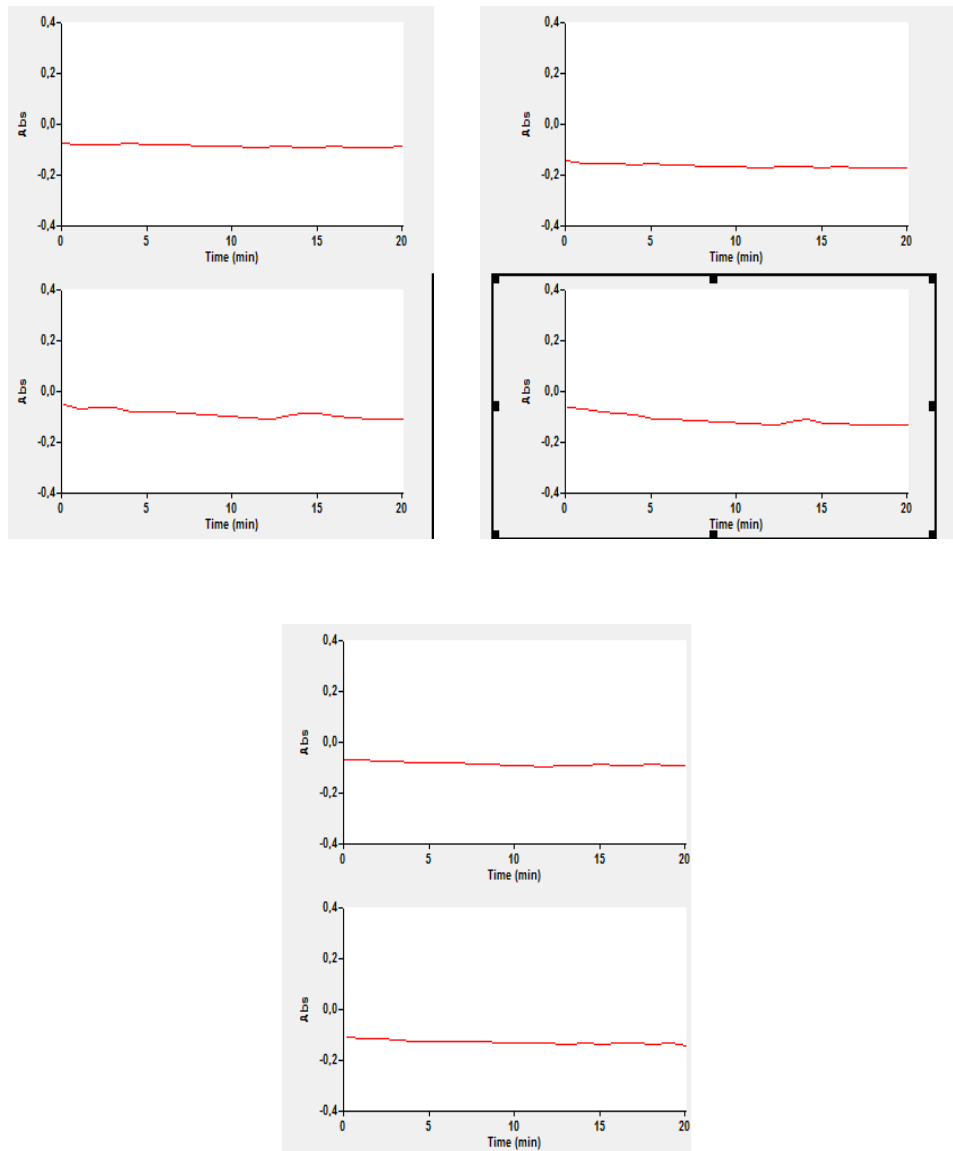


Рис. 6.8. - Вимір активності першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій в зразку Д з різними коефіцієнтами розведення. Зразок після розморожування зберігався на льду протягом 30 хвилин.

Отримані результати: присутня певна активність ферменту, але вона недостатня для отримання точних результатів, що відбиває вплив позитивної температури на активність ферменту. Для виключення цього фактору був проведений вимір активності 1 комплексу дихального ланцюга мітохондрій із різними коефіцієнтами розведення в зразках Д, які використовувалися одразу після розмороження.

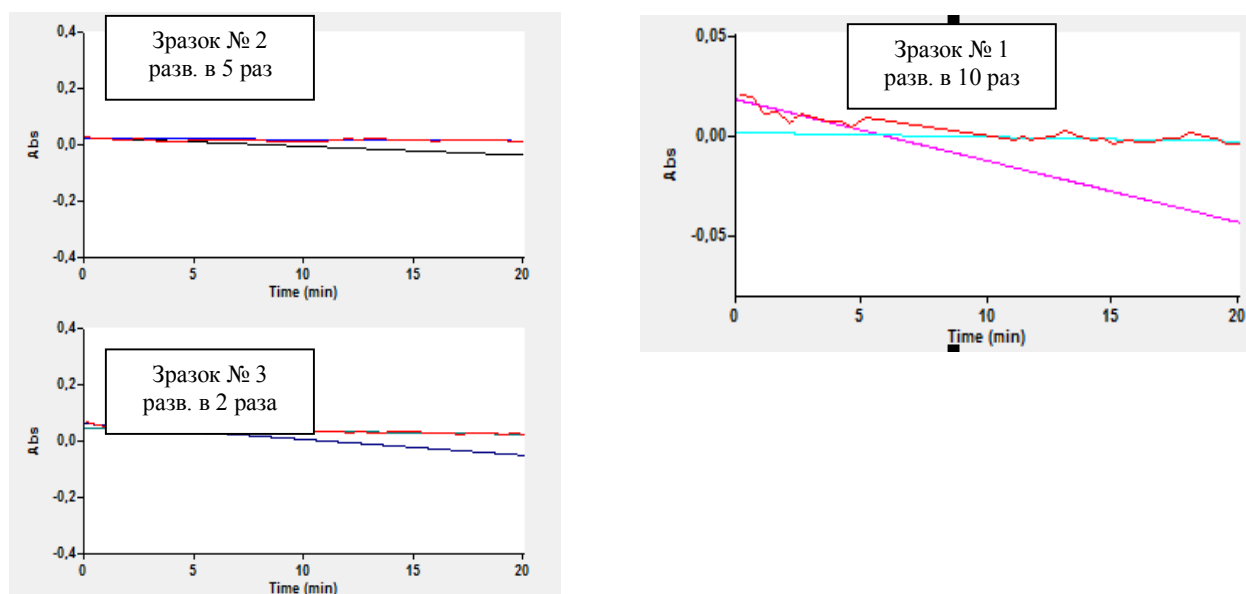


Рис. 6.9. Вимір активності 1 комплексу дихального ланцюга мітохондрій із різними коефіцієнтами розведення в зразках Д, які використовувалися одразу після розмороження

Вимір активності першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій з різними коефіцієнтами розведення в зразках М та Х, з використанням зразка Д в якості контролю.

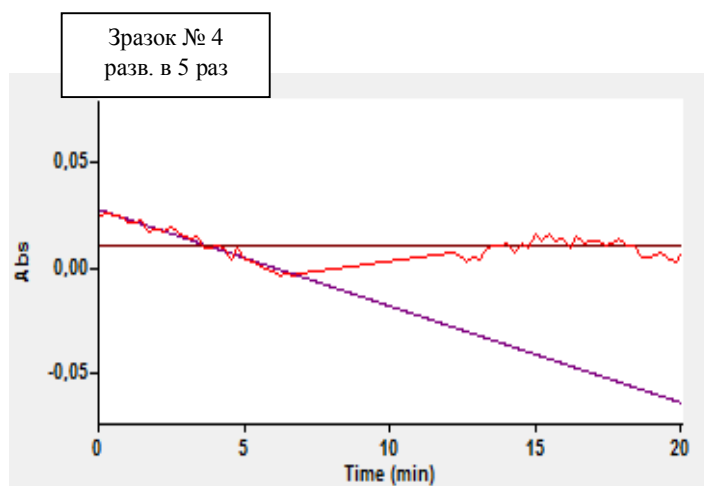


Рис. 6.10. Вимір активності першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій з різними коефіцієнтами розведення в зразках М та Х, з використанням зразка Д в якості контролю

Активність зразка Д декількох знизилась в результаті зберігання, однак все одно є близькою до отримання в попередньому вимірі.

Комплекс 2+3

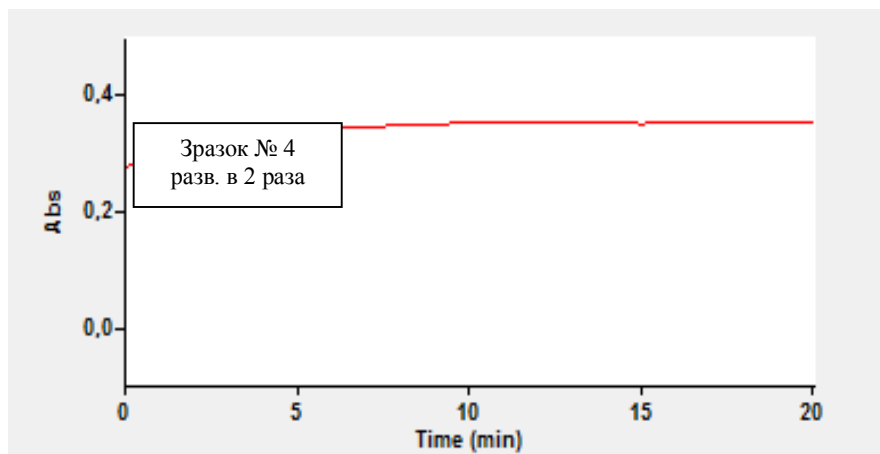


Рис. 6.11. Вимір сумарної активності другого і третього комплексів дихального ланцюга мітохондрій з різними коефіцієнтами розведення в зразку Д

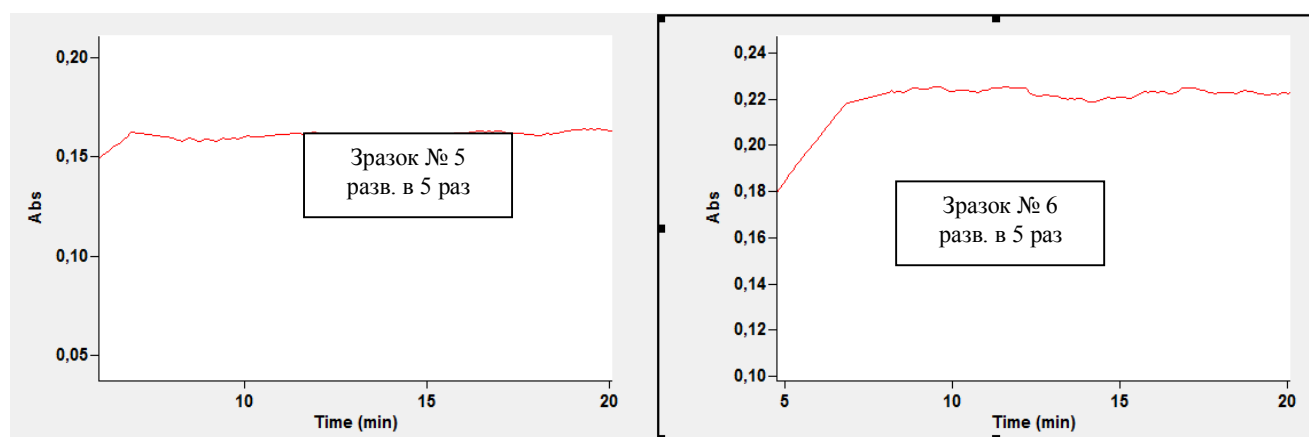


Рис. 6.12. Вимір сумарної активності другого і третього комплексів дихального ланцюга мітохондрій з різними коефіцієнтами розведення в зразках Х та М

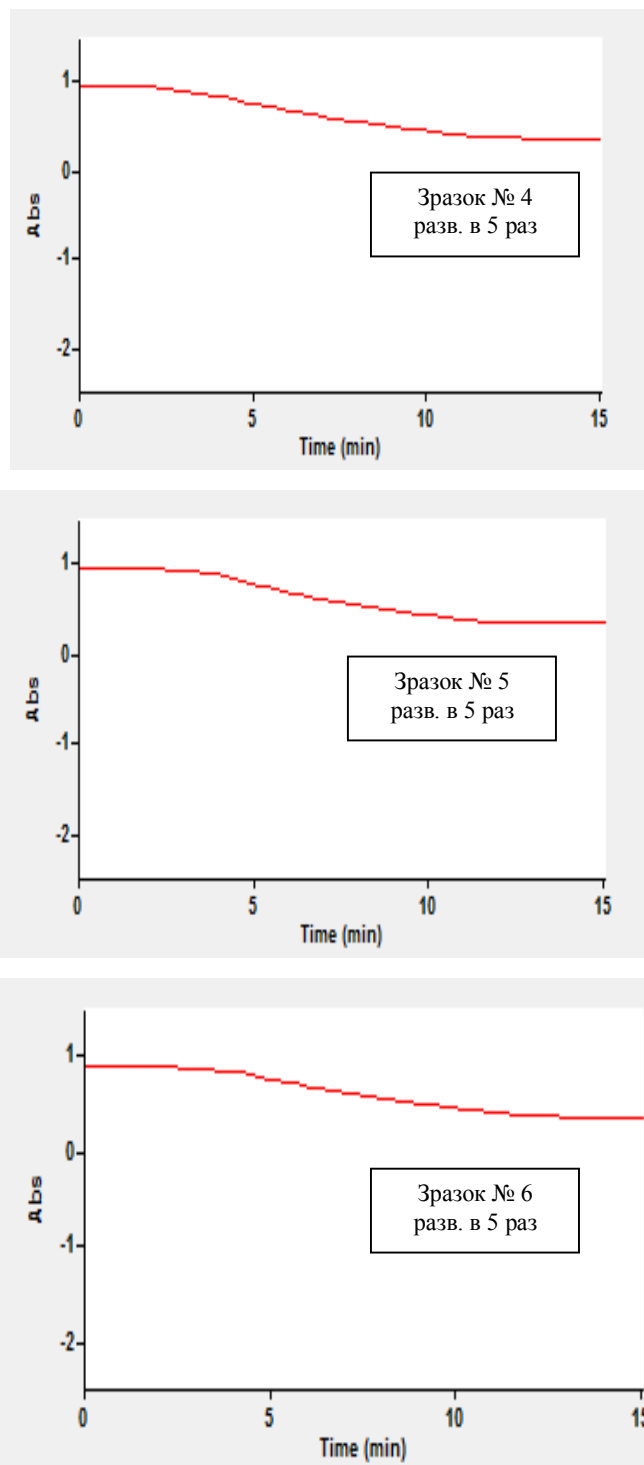
Комплекс 4

Рис. 6.13. Підвищення активності комплексу 4 знайдено в зразках № 1, 2

Звертає на себе увагу зразок Д. Низька активність цитрат-синтази свідчить про малу кількість мітохондрій або ферментів дихального ланцюга в

тканинах. В даному випадку можливий кількісний дефіцит відповідних ферментів при збереженні їх функціональності.

Отримані дані відбиті на наведених електронно-мікроскопічних препаратах, досліджених в морфологічній лабораторії Харківського інституту неврології та психіатрії (А.В. Шатіло).

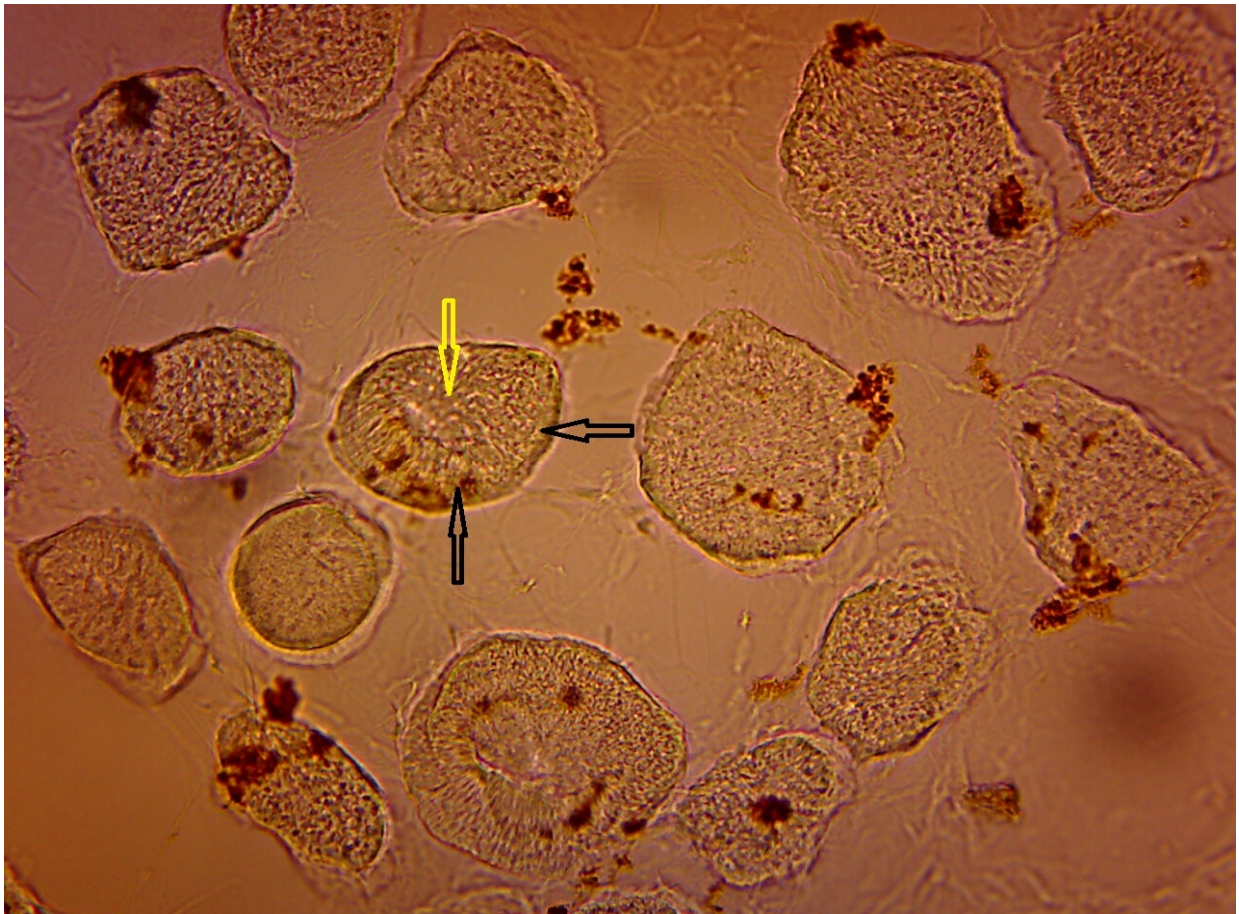


Рис 6.14. Морфологічний феномен «кільцеобразні волокна»
(ring or ringed fibers) в біоптаті м'язів

В цілому всі фото демонструють морфологічний феномен «кільцеобразні волокна» (ring or ringed fibers). Це неспецифічний феномен, який знаходять при різних міопатіях в т.ч. міотонії, запальних та мітохондріальних. Оскільки фарбування виявляють активність мітохондріальних ферментів, кільце свідчить про аномальний розподіл мітохондрій в волокні.

Хворий Г. цитохром40х ed - в центральній частині волокна, яка явно відрізняється від фарбування по колу волокна (чорні стрілки).

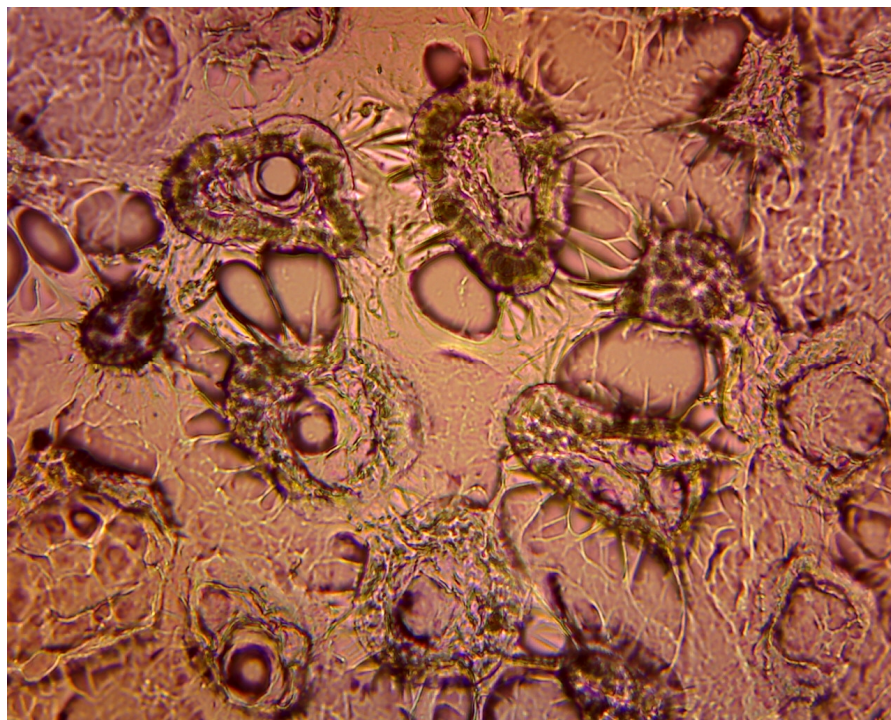


Рис 6.15. Хворий Г. цитохром40х ед зниження активності мітохондріальних ферментів

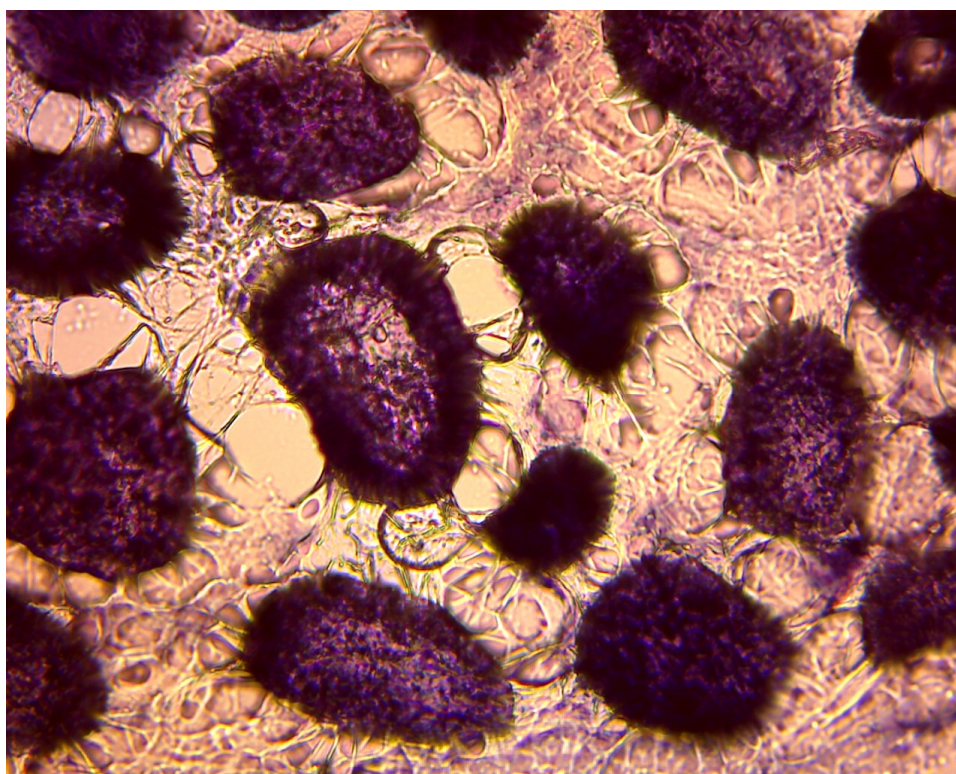


Рис 6.16. Хворий Г. цитохром40х ед зниження активності мітохондріальних ферментів

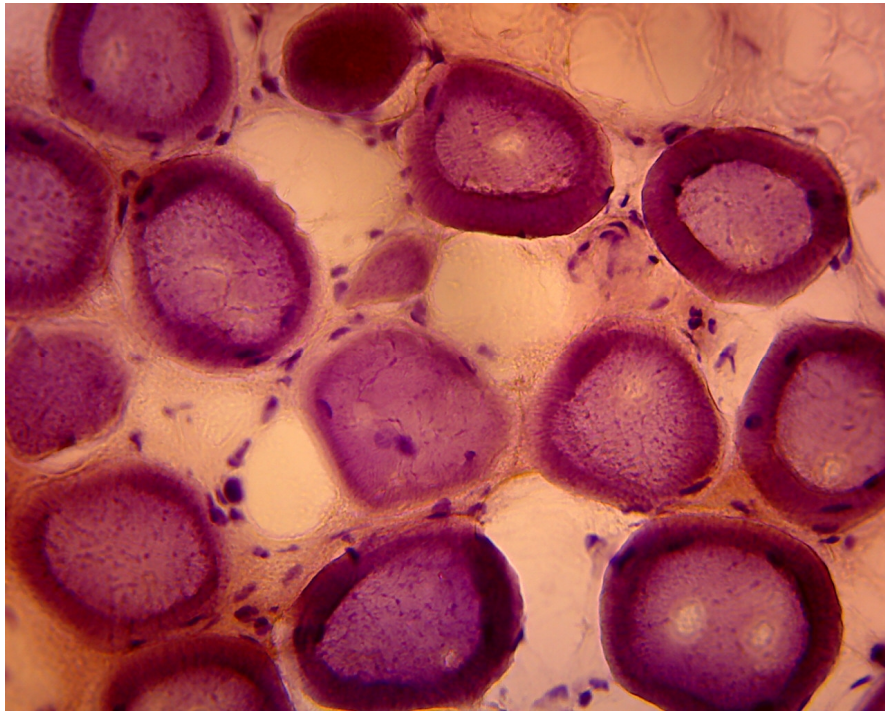


Рис 6.17. Хворий Г. НАД40х - теж, кільцеподібне волокно, в центрі.
І на всіх фото з НАД є феномен диспропорції типів волокон - маленькі
волокна пофарбовані інтенсивніше великих (тобто в них більше
активність або кількість мітохондрій або ферменту)

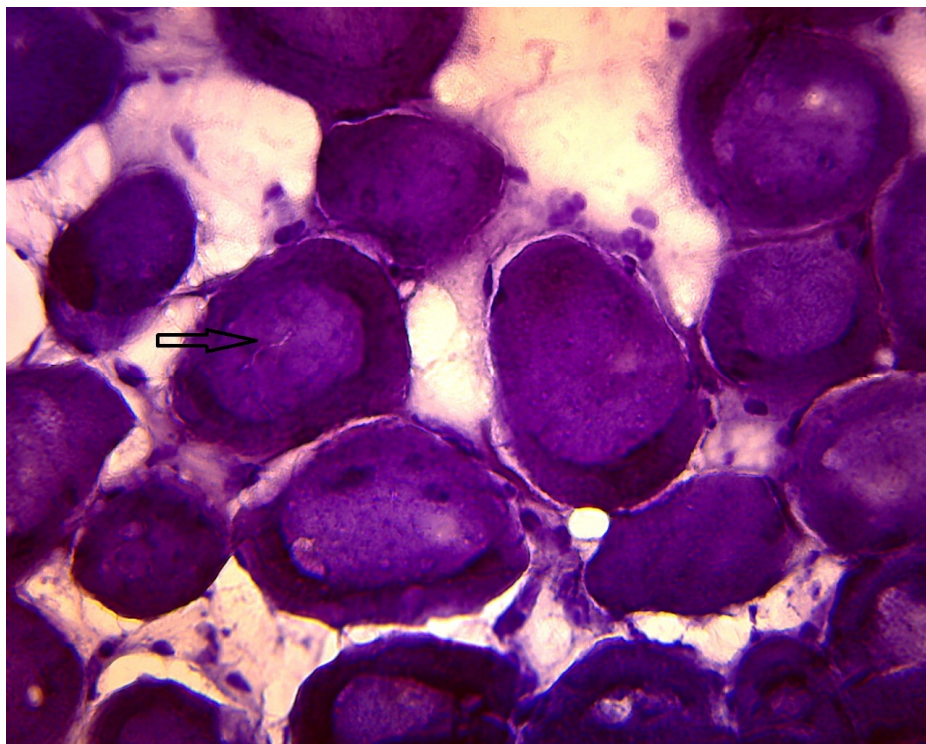


Рис 6.18. Хворий Г. ГТед – "рваність" м'язів. (Чорна стрілка).
Хворий Гр. (Т40х1) (Гомори-трихром) – волокна на 4, 9 і 1 год-
«червоні волокна»; волокно в центрі і під ним «рвані» -
дрібні непрокрашені і темні «тріщинки»

Біоптат м'язів хворого Г. демонструє кільце активності сукцинатдегідрогенази, що в нормі більш-менш рівномірно розподілена по волокну, частина волокон взагалі не мають активності. Інтенсивне забарвлення НАД при зниженому фарбуванні вказує на сукцинатдегідрогеназну недостатність характерну для мітохондріальної дисфункції при структурних міопатіях.

Наведені дані дозволили дійти до висновку, що найбільш ефективними біохімічними методами уточнюючої діагностики МТХД потрібно вважати визначення рівня лактату, пірувату, біохімічного профілю як базових досліджень та рівня органічних кислот і дослідження активності цитратсинтази та I, II/III та IV комплексів дихального ланцюга мітохондрій, які забезпечили адекватну діагностику МТХД у 93% обстежених хворих.

Розділ VII АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Аналіз світової наукової літератури показав, що сьогоденню притаманні епідемії неінфекційного характеру – серцево-судинні, психоневрологічні, метаболічні, онкологічні – як ознака еволюційних перебудов, які все частіше відносяться до наслідків дезадаптації і зміни епігенетичного статусу. Пошук причин маніфестації таких хвороб призводить до появи нових класів – мітохондріальних, епігенетичних, гетерохроматинових, які стають поширеними і недіагностованими, “перебіжчиками”, бо з’являються в різних рубриках, відображаючи процес патогенетичного пошуку. Серед таких хвороб мітохондріальні дисфункції займають пріоритетне місце.

Особливістю усіх мітохондріальних геномів є максимальна структурна компактність при максимальній інформаційній завантаженості. Ця особливість сформувалась за рахунок зміни мітохондріального коду, пов’язаної з тим, що амінокислота метіонін в процесі еволюції накопичилась в білках дихального ланцюга мітохондрій і виступила в ролі природнього антиоксиданту і цим самим пов’язала два види обміну в організмі людини – енергетичного і обміну метіоніну.

Вітчизняні дослідження із цієї проблеми поодинокі і торкаються окремих сторін одного із спадкових порушень обміну сірковмісних амінокислот чи енергетичного обміну.

Разом с тим відмічається чітка тенденція до значного зростання кількості хворих із мітохондріальною дисфункцією, діагноз якої не встановлюється. Щодо порушення обміну метіоніну, то він стає глобальною проблемою сучасної медицини як такий, що пов’язаний із еволюційними перебудовами. Поліморфізм клінічних проявів мітохондріальних захворювань залежить від ураження органотропних органів і тканин, зумовлених порушенням системи

синтезу АТФ, що значно ускладнює діагностику цих станів. Можливості молекулярно-генетичної верифікації клінічного діагнозу МТХД залишаються обмеженими, що в певній мірі залежить від наявності стертих форм захворювання, феномену синтропії, нових, раніше невідомих форм захворювання, від типу мутації, генної взаємодії, які визначають варіанти клінічних проявів.

Концепція дослідження, яка підлягала доказу: вплив поліморфізмів мтДНК на вираженість МТХД відбувається внаслідок патологічного трансформування поліморфізмів мтДНК на тлі зміненого статусу метилування як головного модифікатора генома та наявності тригерів.

Робота носить системний характер і спрямована на вивчення фундаментальних і прикладних особливостей клінічного і генетичного різноманіття мітохондріальної дисфункції, пов'язаної із складною взаємодією популяційно-генетичних маркерів, які здатні сформувати схильність до порушень енергетичного обміну на тлі зміненого епігенетичного статусу задля ранньої діагностики та адекватної терапії. Для досягнення мети і вирішення завдань дисертаційного дослідження проведено вивчення даних генетичного моніторингу природжених вад розвитку в регіоні дослідження за 2000-2010 рік; проведений комплексний аналіз генетичних карт сімей, у яких в процесі селективного скринінгу знайдені поліморфні варіанти генів фолатного циклу; проаналізовані результати молекулярно-генетичного неонатального скринінгу для визначення гаплогруп мтДНК в популяції та у пацієнтів з підозрою на МТХД; проведений пілотний молекулярно-генетичний неонатальний скринінг на поліморфізми С677Т МТНFR, А66G МTRR, RFC-1 G80A; обстежені пацієнти з різними формами спадкової патології та пацієнти з клінічно установленим діагнозом МТХД, особи без ознак МТХД; проаналізовані молекулярно-генетичні дослідження поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу та 49 «точкових» мутацій. Всі обстежені знаходяться на диспансерному нагляді у дисертанта, який особисто

здійснює діагностику, лікування і реабілітацію. Такий дизайн дослідження був спрямований на вивчення всіх етапів онтогенезу і рівнів життя пацієнтів із МТХД. Системний підхід до вивчення проблеми став методологічною основою дисертаційного обстеження, тому на першому етапі дослідження були вивчені популяційні особливості поліморфізмів мтДНК як еволюційно сформованих факторів адаптації та поліморфних варіантів генів ключових ферментів фолатного циклу за допомогою молекулярно-генетичного дослідження.

Розрахунок частот гаплотипів у популяційній вибірці показав наявність вираженого європеїдного компонента, представленого відповідними гаплогрупами (H, U, J, T, V, HV, pre-V, I, W, X, N) сумарна частота яких склала 95, 6% з розподілом на групи H-33,5%, U-20,9%, J-11,7%, T-6,7%, V-5,4%, HV-3,7%, pre-V-2,9%, I-2,1%, W-2,1%, X-2,5%, N-1,2%. Найбільша поширеність доводиться на гаплогрупи H, U, J, T (72,8%). Також виявлена монголоїдна домішка (гаплогрупи A, B, C, D і Z) із частотою 2,0%. Встановлені 55 поліморфних позицій із найбільш варіабельними 16189 і 16204, визначений поліморфізм в генах тРНК^{les} та тРНК^{leu} кодуючого регіону, знайдені мутації у пацієнтів із типами ГВС1 мтДНК, які визначають гаплогрупи H та X, дозволили запідозрити вплив генетичного фону українців на клінічні прояви мтДНК.

Разрахунок частот гаплотипів мтДНК у вибірці 57 пацієнтів із клінічно встановленим діагнозом мітохондріальної патології, 83 контрольної групи і 200 осіб із популяції українців в трьох поколіннях продемонстрував наявність євроспецифічних гаплогруп мтДНК: H, pre-v, V, J, T, U, I, W, X, N, частота яких 24,0%, 2,0%, 2,0%, 12,0%, 16,0%, 18,0%, 2,0%, 2,0% і 8,0% відповідно, сумарна частота складає 84, 0%. Азійські гаплогрупи C, A виявлені із частотою 4,0%. Висока частота гаплогруп T (16,0%), U(14,0%), X(8,0%) і N(10,0%) у досліджуваній вибірці, у порівнянні з контрольною, ймовірно обумовлене нестабільністю позицій 16189 (тип мутації T→C, групи типів мтДНК U, T, X) і

16294 (тип мутації T→C, групи типів мтДНК U, T, X), що втримуються в основних нуклеотидних мотивах даних гаплогруп.

Встановлені 55 поліморфних позицій із найбільш варіабельними 16189 і 16204, визначений поліморфізм в генах тРНК^{lys} та тРНК^{leu} кодуючого регіону. Поліморфізми в гені тРНК^{leu} знайдені в типах ГВСІ, які визначають гаплогрупи 3705G/A – H; 3624 A/G – J; 3594 C/T – X; 3336 T/C – N1a; 3552 T/A – C. Відмічена в окремих випадках наявність широкого спектру поліморфізмів, які характеризували гаплогрупу T (1888G/A, 8697 G/A, 8860G, 11251 A/G, 11719 G/A, 11812 A/G, 14766 C/T, 14905 G/A, 15326 A/G, 15452 C/A, 15607 A/G, 15928 G/A) у пацієнтів із м'язовою гіпотонією, яка перебігає прогресивно. Знайдені поліморфізми у пацієнтів із типами ГВС I мтДНК, які визначають гаплогрупи H (8860G, 15326A/G, 14553 C/T (Val→ile)) та X (14470 T/C, 17196 G/A), мутація комплексу ND5 12706 C (Phe→leu) дозволили припустити вплив генетичного фону як одного із додаткових механізмів мутаційного процесу.

Взаємовідносини між геномом і епігеномом поширили коло явищ, які викликають захворювання людини, які можуть бути успадкованими, виникати *de novo*, бути генетичними або епігенетичними. На їх прояви впливає оточуюче середовище (режим харчування), яке може змінювати епігеном (зокрема, метилування ДНК), що просліджується на частоті неврологічних, психічних, онкологічних захворюваннях.

Оскільки одним із біологічних маркерів зміненого епігенетичного статусу визнане метилування ДНК, пов'язане із функцією фолатного циклу, проведене молекулярно-генетичне дослідження генетичної епідеміології поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу для вивчення впливу генетичного фону на формування клінічних ознак МТХД.

Були вивчені генотипи та частоти алелів MTHFR C677T, A1298C, G1793A, MTRR A66G, RFC-1 G80A у 200 новонароджених із популяції. Отримані дані свідчать про те, що населенню України в порівнянні із іншими популяціями притаманна більш низька поширеність індивідів гомозиготних по

гену C677T MTHFR (7,04%) у порівнянні із євреями Ашкеназі (26,5%, $p < 0,0001$) і латиноамериканцями (26,0%, $p < 0,0001$) і вища, ніж у афроамериканців (1,0%, $p < 0,0001$).

Поширеність гомозиготності по алелю MTRR A66G є в Україні самою високою і складає 35,5%, як і частота алелі MTRR A66G, яка склала 57,0%. Гомозиготність по алелю RFC-1 G80A (GG) в дослідженій групі склала 38,42% і була вищою у порівнювальній групі, частота алеля RFC-1 G80A для української популяції була нижчою (38,4%).

Вивчення розподілу складу гетерозигот по поліморфізмам, які вивчались, дозволило отримати нові дані. Відомо, що взаємодія між двома і більше генами, які кодують білки, котрі приймають участь в метаболізмі гомоцистеїну, формує негативні ефекти поліморфізму. Був зареєстрований розподіл структури гетерозигот, двох, трьох, чотирьох та п'яти алелей MTHFR, MTRR, RFC-1 і знайдені всі можливі комбінації складної гетерозиготності. Подвійна гомозиготність по MTHFR C677T/ MTRR A66G та MTHFR C677T /RFC-1 G80A (GG) зустрілась із частотою 3,5% та 2,1% відповідно. Подвійна гомозиготність по MTRR A66G і RFC-1 G80A (GG) зустрілась із частотою 12,1%.

В даному аналізі 7,0% української популяції ($n=199$) було гомозиготним по MTHFR, тоді як 35,5% було гомозиготним по RFC-1 G80A. Крім того, 3,5% ($n=199$) и 3,2% ($n=190$) мало важку гомозиготність по MTHFR C677T/ MTRR A66G і MTHFR A1298C /RFC-1 G80A (GG), відповідно, 12,6% (23/190) випадків мала важку гетерозиготність по поліморфним сайтам MTHFR C677T /A/298C.

Аналіз отриманих даних підкреслив, що населення України має високий дефіцит фолатів, і відповідно, високий ризик ураження нервової системи, що підтверджується результатами генетичного моніторингу, який проводиться в регіоні дослідження.

Знайдена висока частота MTRR A66G та RFC-1 G80A поліморфних варіантів свідчить про високий рівень ризику в українській популяції уражень центральної нервової системи та вроджених вад розвитку.

Ключовим ферментом фолатного циклу є фермент MTHFR. В досліджуваній вибірці частота його гетерозиготного алеля 677CT склала 43,3%, що означає зниження активності фермента на 35% у великій кількості обстежених. Гомозиготний алель 677CT відмічено у 8,7%, що знижує на 70% активність ферменту у значній кількості населення. Враховуючи, що цей фермент тісно пов'язаний із енергетичним обміном, вочевидь існує вплив цього поліморфізму на поширення мітохондріальної дисфункції.

Існують припущення, що носії алеля 677T могли мати селективну перевагу у природному відборі, оскільки під час голоду зниження активності MTHFR призвело до зниження реметилування гомоцистеїну, і, таким чином, тетрагідрофолат зберігався для життєво важливого синтезу ДНК та РНК.

Поліморфізм MTRR A66G, поширений в інших популяціях, серед обстежених проявився високою частотою алеля. В українській популяції спостерігається 35,5% гомозиготних носіїв A66G (в Європі – 29,6%). У вибірці пацієнтів відсоток гомозиготних носіїв складає 37,0%, а частота мутантного алеля - 58,0%. Це означає, що така кількість населення має ризик ураження нервової системи і судин, незалежно від прийому фолієвої кислоти, бо йдеться про порушення біогенезу кобаламіну.

Вдалось відмітити у обстежених хворих, що приєднання поліморфізму A66G MTRR Hmzgt до C677T MTHFR Htzg підвищує пристосованість особини з довірчою вірогідністю 95%. Внаслідок взаємної компенсації мутантних алелів компаунд MTHFR Htzg/ A66G MTHFR Hmzgt підтримується природним відбором.

Поєднання поліморфізмів C677T MTHFR та A66G MTRR може виявлятися інакше, ніж сума ефектів кожного з них. Їх спільний вплив

призводить до посилення, або, навпаки, до компенсації фенотипічних проявів кожного окремо і, таким чином, впливати на виживаність осіб із різноманітними компаундними генотипами.

Вивчення фенотипу пацієнтів із МТХД виявило значущі зміни, перш за все, з боку високоенергетотропних органів – нервової і м'язової систем. Морфологічно ці клінічні ознаки характеризувались симптомами “червоних рваних волокон”, при визначенні ферментної активності комплексів I, II, III, IV дихального ланцюга в таких випадках відмічалось зниження ферментної активності, при електронній мікроскопії – структурні і кількісні зміни мітохондрій, які клінічно супроводжувались м'язовою слабкістю, підвищеною стомлюваністю, дифузними м'язовими болями, атрофією і гіпотрофією м'язів. Знайдені зміни підтверджені математико-статистичними розрахунками і різницею фенотипових ознак між основною і контрольною групами.

Поглиблене вивчення стану центральної нервової системи у обстежених пацієнтів дозволило визначити її порушення у 66,5% хворих і знайти широкий діапазон змін, який свідчить, з одного боку, про діагностичну значущість клінічних ознак ураження ЦНС для діагностики МТХД, з другого – про певну специфічність, притаманну МТХД. Судоми, представлені поліморфними приступами, відмічені у 22,66% хворих, затримка психомоторного розвитку – у 23,15%, зниження гостроти зору – у 17, 24% (35 осіб).

З високою частотою у хворих на МТХД виявлені тонусні порушення, які мали місце у 121 (59,6%) пацієнта і були пов'язані із м'язовою гіпотонією. Парези мали місце у 16 (7,88%) пацієнтів, пірамідна симптоматика – у 57 (28,07%) осіб.

Порушення емоційно-вольової сфери та розлади поведінки відмічені у 67 (33%). Прогредієнтний перебіг захворювання відмічений у 89% хворих, у 9% мав місце кризовий перебіг хвороби з розвитком метаболічної кризи. Міопатичний симптомокомплекс та його прояви зареєстровані у 80 (39,4%) хворих.

Генералізоване порушення травлення пов'язане з мітохондріальною дисфункцією – нейро-шлунково-кишковою енцефалопатією (MNGIE-синдром). При цьому захворюванні дебют кишкових симптомів спостерігався у дитячому або у постпубертатному періоді і виявлявся у вигляді хронічної діареї, стазу, нудоти і блювання, що призводило до виснаження і кахексії. За даними J. Shoffner (2010 р.) при цьому спостерігається втрата подовжнього шару м'язової оболонки, утворення і розриви дивертикулу, кишкова склеродерма і випадки псевдонепрохідності. Електрофізіологічні дослідження виявляли захворювання нервової системи і внутрішніх органів поряд з порушенням серцевої провідності; біохімічно мав місце лактат-ацидоз.

Позакишкові симптоми відзначались різноманітністю, однак усі вони були характерними для МТХД. Цей факт підтверджує і J. Finsterer (2010 р.). При цьому синдромі, крім ураження ШКТ, відзначалась затримка росту; з боку головного мозку – лейкоцистозія, клінічно – атаксія, офтальмоплегія, птоз, нейросенсорна глухота. У процес залучались черепно-мозкові нерви, їхнє ураження супроводжувалось дизартрією, дисфонією, прозопоплегією, нерідко розвивалась блокада серця. У хворих спостерігалась нестерпність фізичних навантажень, слабкість і «рвані червоні волокна», виявлені при біопсії м'язів. Перебіг синдрому MNGIE у всіх спостереженнях (12 пацієнтів) в процесі лікування змінився із прогресивного на стан тривалої ремісії.

Наступною фенотиповою ознакою, яка притаманна МТХД, були зміни з боку скелету. Так, грудна клітка була зміненою у 109 пацієнтів ОГ1 (53,69 %), проти 46 осіб КГ (32,39 %) Ці дані свідчать про те, що при МТХД слабкість м'язового каркасу і вторинна сполучнотканинна дисплазія стають причинами скелетних порушень.

Аналіз ведучих клінічних ознак поліорганного ураження при МТХД дозволив сформувати клінічний континуум ознак МТХД. Створені діаграми розподілу фенотипічних ознак можуть бути використані в якості матрикса задля диференційної діагностики МТХД первинного і вторинного походження.

Підтверджуюча молекулярно-генетична діагностика МТХД, що кодуються «точковими» мутаціями проведена у 49 пацієнтів із 75 основної групи (ОГ4), у яких встановлені певні нозологічні одиниці. Так, при синдромі Лея проводився пошук мутацій ND5^{snp}, TRNL1^{snp}, SURF1 і T8993G в гені АТР6 (n=9). Знайдено мутації SURF1 (1 пацієнт) і ND5^{snp} 12706 (1 пацієнт). При мутації de novo 12706 знайдені також поліморфізми: нова мутація (тРНК-лейцин) 3624A/G, АК заміна (тРНК-лейцин) syn, поліморфізм (тРНК-лізин) 8860G, АК заміна (тРНК-лізин) trh/ala, нова мутація (тРНК-лізин) 9018T/C, АК заміна (тРНК-лізин) syn (1 пацієнт). При синдромі MELAS проводився пошук мутації A3243G в гені тРНК^{leu} (n=27). Означена мутація не знайдена, знайдені поліморфізми: в гені тРНК^{lys} 8697G/A, АК заміна (тРНК-лізин) syn, тРНК-лізин 8860G, АК заміна (тРНК-лізин) trh/ala. При синдромі MERRF проводився пошук мутації A8344G в гені тРНК^{lys} (n=7). Мутація не знайдена, знайдені поліморфізми.

При синдромі Кернса–Сейра у трьох пацієнтів знайдена делеція крупного фрагмента мтДНК (n=6). В інших випадках мутації не знайдені, що пояснюється пошуком розповсюджених мутацій.

Проведене в рамках спільного проекту із колегами США і Росії вивчення механізмів експресії мітохондріальних хвороб у слов'янських популяціях Східної України показало складність пошуку мітохондріальних мутацій тим більше, що при більшості мітохондріальних синдромів зустрічаються різні ядерні генні дефекти і мутації мтДНК. Тільки колабораторне дослідження дозволило вперше знайти, підтвердити і описати мутацію мтДНК, яка виникла в гені ND5, в так званій «гарячій точці». Дана мутація є частою генетичною причиною нейро-дегенеративних розладів з пізньою маніфестацією, таких як хвороба Паркінсона, і, поряд з цим, асоціюється з важкими неврологічними станами у немовлят та дітей грудного віку, які клінічно частіш за все проявляється у вигляді синдрому Лея.

Виникнення синдрому Лея супроводжується додатковими механізмами, які визначають фенотипічну експресію, такими можуть бути генетичний фон і екологічний фактор.

При проведенні уточнюючої діагностики МТХД, було доведене припущення: у хворої з підозрою на мітохондріальну енцефаломіопатію, знайдена гетероплазмична мутація 12706С ND₅, яка асоційована з клінічною маніфестацією фатального синдрому Лея з незвичайним ушкодженням мозку, є новою, такою, що виникла в статевих клітинах матері.

Проведений філогенетичний аналіз позитивних випадків з мутацією 12706С продемонстрував, що всі мутації відбулися при різних гаплогрупах мтДНК шляхом незалежних мутаційних подій. Даний аспект мутації 12706С підтвердив її патогенетичне значення в розвитку синдрому.

Для того, щоб підтвердити фено- та генотипічну кореляцію в даному випадку проведене багатопараметричне дослідження у співпраці із декількома світовими молекулярно-генетичними лабораторіями. Наявність 12706С підтверджена використанням мутаційно-специфічної рестрикції, крім того був проведений скринінг на мутацію ND5 серед 187 здорових осіб і пацієнтів з МТХД, що підходили по гаплогрупам, обраних серед учасників з інших біомедичних проектів.

Секвенування регіону мтДНК, що кодує, у пробанда Г. (G) виявило 24 основні нуклеотидні заміни порівняно з CRS. МтДНК мала поліморфні сайти, які характерні для гаплогрупи Х2е. Ця лінія мтДНК бере початок у Південному Сибіру і часто спостерігається у жителів Кавказу (Lebon S. 2003). Мутаційно-специфічний PCR-RFLP (ПЛР-ПДРФ) аналіз мутації 12706С і секвенування мітохондріального генома встановили, що ця мутація перебуває в стані гетероплазмії (мутаційний поріг – 50%) у пробанда, але повністю відсутня в крові матері пробанда. Ці данні явились свідченням на користь гіпотези про найбільш імовірне виникнення *de novo* мутації 12706 С у зародкових клітинах матері пробанда.

Вивчення поліморфізмів мтДНК продемонструвало можливість їх патогенетичної дії, впливу на прояви ознак спадкової патології. З метою визначення вірогідності такого впливу на прояви МТХД були досліджені клінічні особливості хворих із ознаками порушень енергетичного обміну.

Висунута гіпотеза: на характер клінічних проявів і маніфестацію МТХД впливають поліморфізми мтДНК, які в процесі еволюції змінили свої функції і перейшли із розряду адаптивних мутацій в розряд негативних і сформулювали схильність до розвитку патології.

Обстежені 37 пацієнтів із поліморфізмами мтДНК. Вивчення асоціації окремих уражених систем і органопатій із певними поліморфізмами мтДНК дозволило підтвердити переважне залучення їх у фенотип енерготропних органів – нервової системи (78,38% пацієнтів), системи травлення (40,54%), серцево-судинної системи (35,14%), скелетної (89,16%), м'язів (43,24%).

Найбільш виражена поліорганність ураження знайдена при поліморфізмах мтДНК тРНК-лізин 8697 G/A; 8860G; 8701 G/A; 8856 G/A; 8860A(CRS); 8251 G/A; 8472 C/T; 8448 T/C; 8994 G/A 8337 T/C, 8794 C/T; 8584 G/A; 8701 A/G та з відповідними амінокислотними замінами (syn, thr/ala, pro/leu2, met/val, met/thr, his/tyr, ala/thr).

Відмічена значна генетична гетерогенність уражень, що, безумовно, потребує досліджувати весь набір поліморфізмів з метою уточнюючої діагностики, виходячи із популяційної характеристики гаплогруп мтДНК.

Так при енцефалопатіях знайдені певні поліморфізми тРНК-лейцин мтДНК: 3197 T/C та 3336 T/C; нові мутації 3624 A/G; 3594 C/T; 3705 G/A; 3505 A/G; 3552 T/A; а також поліморфізми тРНК-лізин: 8697 G/A; 8860G; 8856 G/A; 8251 G/A; 8701 A/G; і нові мутації – 8164 C/T; 8610T/C; 8614 T/C; з відповідними амінокислотними змінами (syn, thr/ala, pro/leu, ala/thr).

Майже така ступінь генетичної гетерогенності притаманна і порушенням м'язової системи, шлунково-кишкового тракту, скелетним ураженням, офтальмопатії, кардіопатії, нейросенсорній глухоті.

Аналіз наведених даних вочевидь підтверджує, з одного боку, переважне ураження нервової системи та інших енерготропних органів і систем при МТХД, з другого – наявність феномену генетичної гетерогенності (однаковий клінічний профіль при різних поліморфізмах мтДНК), притаманної негативним мутаціям. Загалом, отримані дані підтверджують значущість поліморфізмів мтДНК у формуванні клінічних ознак МТХД, наявність впливу нейтральних нуклеотидних замінів на характер клінічних ознак МТХД.

Оцінка отриманих даних дає можливість вважати, що знайдені клінічні ознаки у хворих із МТХД, асоційованої із поліморфізмами мтДНК за своєю сукупністю уражень, відповідають спектру ознак, притаманних порушенням енергетичного обміну: вони є клінічно поліморфними, мультисистемними і генетично гетерогенними, що зумовлюється етіопатогенетичними механізмами і формують поліорганний континуум МТХД.

Можливо припустити, що порушення мітохондріальної рівноваги формується за допомогою декількох шляхів – впливу патологічної мутації в мітохондріальній ДНК або в ядерному геномі, тому характер фенотипу залежить від нозологічної форми, а ступінь залучення різних органів і систем не тільки від типу мутацій, але і від відсотка мутантної мтДНК (феномен гетероплазмії).

Все означене підтримує висловлену гіпотезу: поліморфізми мтДНК, які в процесі еволюції змінили свої функції і перейшли із розряду адаптивних мутацій в розряд негативних, набули якості генів схильності і впливають на клінічні прояви МТХД.

Значна поширеність поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу в Україні, що доведено молекулярно-генетичними дослідженнями, привела до припущення про причетність цих варіантів до загально-біологічних еволюційних явищ, які впливають на стан здоров'я сучасної людини. Підкріпила цю позицію поява інформації про роль фолатного циклу, його ключового ферменту МТНFR і метіоніну як універсального донора метильних груп в регуляції генної експресії.

Були визначені частоти поліморфних варіантів C677T MTHFR / A66G MTRR у вибірці пацієнтів. З обстежених особисто 652 пацієнтів у 581 (89,1%) знайдені поліморфні варіанти.

На нашу думку, в тому немає випадковості: фермент MTHFR бере участь у синтезі коензима Q. Основні клінічні ознаки гомозиготних компаундів були також представлені серцево-судинною патологією, затримкою психомоторного розвитку, порушенням репродуктивної функції сімей. Гетерозиготним компаундам вказаних поліморфізмів був притаманний більш широкий спектр клінічних проявів, що свідчить про поліорганність уражень. У пацієнтів із компаундним генотипом 677T MTHFR / 66AG MTRR відзначалось значне ураження вен різноманітної локалізації.

Основні клінічні ознаки гомозиготних носіїв 677T MTHFR і гетерозиготних носіїв A66G MTRR характеризувались астеничним типом статури, темним волоссям, «гострими» рисами обличчя, порушенням зору, довгими пальцями, сколіозом, «мармуровістю» шкіри, нормальним інтелектом, наявністю творчих здібностей.

Саме тому змінюється парадигма медицини і індивідуальний підхід до хворого на тлі генетичної унікальності, передбачувальний (предиктивний) характер стає потребою при уточнюючій діагностиці спадкової патології. Необхідне відродження поняття фено- та генотипової синтропії, під якою розуміються конгломерати хвороб, меганозології, сімейство хвороб, поєднання двох або більш патологічних станів хвороб, синдромів у одного індивідуума. Синтропія – невідповідне природно-видове явище, яке має еволюційно-генетичну основу. Гени, що становлять основу синтропії називаються синтропними.

Спостереження за хворими із різними видами спадкової патології і, перш за все, із порушеннями енергетичного обміну, показало наявність ознак різних спадкових порушень у 91 пробанда. Поглиблене вивчення історії хвороби, анамнезу життя і родоводу таких хворих дозволило знайти декілька складових,

які формували клінічні прояви захворювання. Автор звернула увагу на існування у кожному випадку факторів, які носили характер тригерів (провокаторів), медіаторів (посередників) і мутації, які були асоційовані із основним захворюванням. Такий розподіл екзо- і ендогенних факторів у формуванні захворювання спонукав на пошук механізмів розвитку патологічних станів і вивчення проблеми генного поліморфізму на визначення ролі порушення метилування у маніфестації хвороби.

Унікальні функції метіоніну полягають в тому, що він бере участь у реакціях трансметилування; служить донором метильних груп; бере участь у синтезі біологічно активних речовин; у синтезі нуклеїнових кислот; являється акцептором метильної групи для 5-метиленгідрофолат-гомоцистеїн-метилтрансферази (метіонін-синтази). Біологічна функція метіоніну полягає в тому, що він – незамінна амінокислота, компонент аміноацил тРНК біосинтези; компонент метаболізму гліцину, серину та треоніну; гістидинового обміну, метіонінового метаболізму; селеноамінокислотного та тирозинового метаболізму.

Порушення процесів реметилування (утворення метіоніну із гомоцистеїну), що відбувається через дефіцит ферменту МТНFR, призводить до розвитку ряду патологічних станів, таких як: атеросклероз; атеротромбози; дефекти закриття невральної трубки; інфаркти; порушення розбіжності хромосом в оогенезі та ризик народження дітей з хромосомними хворобами.

Вивчення гено- та фенотипових асоціацій було проведено на підставі аналізу даних селективного скринінгу генів ферментів С677Т МТНFR та А66G МТRR у 1938 пацієнтів з різними формами спадкової патології. В проведенні цього дослідження автором обстежено 652 пацієнта з підозрою на порушення обміну метіоніну.

Були визначені клінічно значущі розбіжності у носіїв варіантів генотипів МТНFR та МТRR серед хворих з різними спадковими порушеннями. Звертає на

себе увагу, що найбільша частота уражень центральної нервової системи та серцево-судинні захворювання супроводжувала компаунд-генотипи C677T MTHFR / 66GG MTRR, C677T MTHFR / A66G MTRR та 677CC MTHFR / A66G MTRR. Це підтверджує той факт, що означені генотипи впливають на формування патології ведучих систем організму у якості патогенних поліморфізмів.

У пацієнтів ОГ2 та ОГ3 була уражена шкіра (67,97% та 89,76% відповідно). На тлі зміненого метилування частішими і більш виразними були пігментні плями, телеангієктазії, базально-клітинні невуси, тобто притаманні дефіциту фолатного циклу мезодермальні дисплазії проявили себе незалежно, незважаючи на синтропію. Як видно із представлених даних, зміни з боку різних органів не зливаються за своїми якостями і зберігають певну самостійність, додаючи свої ознаки до фенотипу МТХД.

Порушення серцево-судинної системи відмічені більш ніж у третини пацієнтів обох груп з невеликою перевагою в ОГ2.

Отримані дані підкреслюють високу частоту порушень скелету в обох групах. Зміни з боку очей визначені у переважній кількості пацієнтів обох груп, що відповідає клінічним ознакам.

Зміни з боку шиї та хребта частіше зустрілись в ОГ3. Ураження м'язів відмічено у 54,05% ОГ2 і у 31,87% ОГ3, що, можливо, пов'язане з адаптивною роллю сполучених поліморфізмів та вірогідним зниженням ступеня гетероплазмії. Ураження сечовидільної системи було притаманне пацієнтам обох груп з незначною перевагою в ОГ3.

Таким чином, отримані дані свідчать, що друга хвороба перебігає у відриві від першої хвороби, за власними патогенетичними закономірностями, та має характер самостійної нозологічної одиниці, яка потребує особливих терапевтичних дій (А.В. Смоляніков).

Приведені дані дозволили довести концепцію – вплив поліморфізмів мтДНК на клінічні прояви МТХД відбувається внаслідок патологічного трансформування поліморфізмів мтДНК на тлі зміненого статусу метилування як головного модифікатору геному та наявності тригерів.

ВИСНОВКИ

Розроблений оригінальний комплексний підхід до уточнюючої діагностики МТХД, який включає: оцінку популяційно-генетичних особливостей населення; визначення генетичної епідеміології поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів ферментів фолатного циклу; оцінку клінічних особливостей носіїв «точкових» мутацій і поліморфізмів і дає можливість підтвердити розроблену концепцію при вплив поліморфізмів на клінічні прояви МТХД.

1. За допомогою молекулярно-генетичного дослідження складено характеристики основних гаплогруп мтДНК, розрахунок частот гаплотипів у вибірці в популяційній вибірці показав наявність євроспецифічних гаплогруп: H (33,5%), V (5,4%), J (11,7%), T (6,7%), U (20,9%), Y (2,1%), W (2,1%), X (2,5%), N (1,2%), сумарна поширеність HUIJ визначена найбільшою – 72,8%. Євроспецифічний компонент склав 95,6%, монголоїдний – 2,0%.

2. Генетична епідеміологія гаплотипів в вибірці пацієнтів із клінічно встановленим діагнозом МТХД характеризувалась наявністю меншої питомої ваги євроспецифічних гаплотипів (84%) – H pre-V, V, J, T, U, I, X, N, W, частота яких була відповідно 24 %, 2,0 %, 2,0 %, 12,0 %, 16,0 %, 18,0 %, 2,0 %, 2,0 % і 8,0 %. Знайдені азійські гаплогрупи C і A мали частоту 4,0 %. Більш висока частота гаплогруп T, U, X, N ймовірно обумовлено нестабільністю позицій 16189 та 16294, яка має пряме відношення до формування генетичного фону.

3. Клініко-генетичні особливості носіїв поліморфізмів мтДНК характеризувались поліорганістю, прогредієнтним плином, клінічним поліморфізмом, генетичною гетерогенністю і переважним залученням енерготропних органів і систем нервової (у 62,16 % пацієнтів), м'язової (у 43,24 %), офтальмологічної (у 62,16 %), серцево-судинної (у 35,14%), скелетної (у 38,0%), травної (у 40,54%). У 75 пацієнтів (36,5 %) клінічні ознаки були притаманні класичним мітохондріальним синдромам MERRF, MELAS, NARP, Leigh, Кернса-Сейра, Лебера. У 91 пацієнта (45,31%) знайдено елемент синтропії, при якому кожна із «конгломерату хвороб» зберігала свою специфічність.

4. Відмічене найчастіше включення в патологічний процес органів і систем при поліморфізмах мтДНК тРНК – лізін: 8697G/A; 8860G; 8701G/A; 8856G/A; 8860A (CRS); 8251G/A; 8472C/T; 8448T/C; 8994G/A; 8337T/C; 8794C/T; 8584G/A; 8701A/G та при амінокислотній заміні тРНК-лізін (syn, thr/ala, pro/leu, met/val, met/thr, his/tyr, ala/thr) при цьому енцефалопатії частіше були асоційовані із поліморфізмом тРНК-лізін та новими мутаціями (тРНК-лейцин) (3624 A/G; 3594C/T; 3705G/A; 3505A/G; 3552T/A). Ураження м'язової, травної, офтальмологічної, серцево-судинної, ендокринної системи частіше було асоційовано з поліморфізмами тРНК-лізін. Ці данні доводять клінічну значущість поліморфізмів мтДНК, як негативних мутацій у формуванні клінічних ознак МТХД.

5. Клініко-генетичний, молекулярно-генетичний, математико-статистичний аналіз пацієнтів із МТХД, асоційованих із точковими мутаціями мтДНК і певними синдромами встановив (у 82,67%) хворих важке ураження ЦНС, сечовидільної системи (у 76,0 %), травної (у 84,0%), нервової (у 88,0%), підшкірної клітковини (у 53,33%), хребта (у 52,0 %), обличчя (гіпомімія) (у 64,0%), що свідчить про достовірність діагностики, з одного боку, а з другого, про ймовірність заволокання в патогенез МТХД не тільки специфічних для синдрому мутації, а і генетичного оточення: при знайденій новій мутації 12706C гена ND5 в тканині мозку присутні мутації F124L і E145G ND5, які змінили, скоріш за все, функціонально важливі сайти, які залучені в перенос протонів, і привели до зміни протонного каналу і значно вплинули на фенотип синдрому Лея, і ймовірно, стали причиною мутацій в зародкових клітинах матері.

6. Визначені основні клінічні ознаки носіїв поліморфних варіантів генів C677T MTHFR та A66G MTRR, і побудовані реальні та віртуальні (узагальнені) фенотипи, які відрізняються в залежності від характеру поліморфізму, що відображає різний напрямок дії мутацій. Так, фенотип носіїв C677T MTHFR характеризувався доліхостеномелією, скелетними аномаліями, високим інтелектом, ризиком тромбофілій у 87,5% пацієнтів, тоді як поліморфізм A66G MTRR у 85,3% пацієнтів мав якості, притаманні ендокринопатіям –

переважність гіперстенічності з короткою шиєю, поширеною пігментацією шкіри, порушеннями психічної сфери.

7. Розподіл фенотипових ознак у пацієнтів-носіїв поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів фолатного циклу визначив найвищий коефіцієнт Крамера при ураженні шкіри, частота якої склала 88,01%, тоді як серед пацієнтів-носіїв тільки поліморфізма мтДНК – 67,57 %. Ураження м'язів було притаманно пацієнтам обох груп в 99,5%, що свідчить про зберігання нозологічної самостійності і водночас подвоєння іншого клінічного прояву при синтропії.

8. Розроблений на підставі отриманих даних континуум клінічних ознак МТХД, клінічний маршрут пацієнта з МТХД, алгоритм діагностики МТХД та схема комплексного лікування дозволили підвищити ефективність діагностики до 93% і отримати стабільну ремісію у значної кількості пацієнтів із МТХД.

9. Проведене дослідження довело вплив поліморфізмів мтДНК на експресію МТХД, які відбуваються внаслідок заміни їхньої адаптивної ролі на патогенну на тлі зміненого метилювання як основного модифікатора геному внаслідок порушення функції фолатного циклу та наявності певних тригерів, що вказує шлях до ранньої діагностики і адекватної корекції МТХД.

10. Вивчення популяційних характеристик поліморфізмів мтДНК, аналіз індивідуальних геномів мтДНК, оцінка епігенетичного статусу на підставі вивчення фолатного циклу є обґрунтованим підходом для уточнюючої діагностики МТХД.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Иллариошкин С. Н. Алгоритм диагностики митохондриальных энцефалопатий / С. Н. Иллариошкин // Атмосфера. Нервные болезни. – 2007. – № 3. – С. 23–27.
2. Клініка та генетика спадкових захворювань, що супроводжуються шлунково-кишковими та загальними абдомінальними симптомами : монографія / О. Я. Гречаніна, Р. В. Богатирьова, О. М. Біловол, О. В. Бугайова, А. А. Булавина, О. В. Васильєва, Ю. Б. Гречаніна, В. А. Гусар, А. О. Глухова, О. П. Здибська, Т. А. Майборода, Л. В. Молодан, І. В. Новікова, Л. С. Озерова. – Тернопіль : ТДМУ, 2008. – 216 с.
3. Wallace D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer : a dawn for evolutionary medicine / D. C. Wallace // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 39. – P. 359–407.
4. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations / P. F. Chinnery, M. A. Johnson, T. M. Wardell [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2000. – Vol. 48, № 2. – P. 188–193.
5. Chinnery P. F. Mitochondrial otology / P. F. Chinnery, T. D. Griffiths // *Mitochondrial Medicine* / eds. : S. DiMauro, M. Hirano, E. A. Schon. – London : Informa Healthcare, 2006. – P. 161–177.
6. DiMauro S. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases / S. DiMauro, M. Hirano, E. A. Schon // *Muscle Nerve.* – 2006. – Vol. 34, № 3. – P. 265–283.
7. Лукьянова Л. Д. Фармакология митохондриальных дисфункций : материалы симпозиума «Новые возможности коррекции митохондриальной дисфункции в лечении неврологических заболеваний» / Л. Д. Лукьянова // *Consilium Medicum.* – 2007. – Т. 9, № 8. – Режим доступа : <http://consilium-medicum.com/magazines/cm/medicum/article/6495>.
8. Wallace D. C. The epigenome and the mitochondrion : bioenergetics and the environment / D. C. Wallace // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24. – P. 1571–1573.
9. Analysis of the assembly profiles for mitochondrial and nuclear DNA encoded subunits into complex I / M. Lazarou, M. McKenzie, A. Ohtake [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 12. – P. 4228–4237.

10. Scheffler I. E. *Mitochondria* / I. E. Scheffler. – 2nd ed. – New Jersey : John Wiley & Sons Inc., 2008. – 472 p.
11. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44–84.
12. Андреев А. Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А. Ю. Андреев, Ю. Е. Кушнарера, А. А. Старков // *Биохимия.* – 2005. – № 70. – С. 246–264.
13. Боринская С. А. История человечества, записанная в генах / С. А. Боринская, Н. К. Янковский // *Рабочие тетради по биоэтике. Вып. 3. Биоэтические проблемы генетики и этногенетики* / под ред. Б. Г. Юдина. – М. : Изд. Моск. гуманитарного ун-та, 2006. – С. 14–52.
14. Kmiec B. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals / B. Kmiec, M. Woloszynska, H. Janska // *Curr. Genet.* – 2006. – Vol. 50, № 3. – P. 149–159.
15. Bender A. Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria / A. Bender, P. Hajieva, B. Moosmann // *PNAS.* – 2008. – Vol. 105, № 43. – P. 16496–16501.
16. Swire J. Mitochondrial genetic codes evolve to match amino acid requirements of proteins / J. Swire, O. P. Judson, A. Burt // *J. Mol. Evol.* – 2005. – Vol. 60, № 1. – P. 128–139.
17. Sengupta S. The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes / S. Sengupta, X. Yang, P. G. Higgs // *J. Mol. Evol.* – 2007. – Vol. 64, № 6. – P. 662–688.
18. Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells / M. A. Marchetti, W. Lee, T. Cowell [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2006. – Vol. 83, № 5. – P. 1281–1286.
19. Moosmann B. Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan / B. Moosmann, C. Behl // *Aging Cell.* – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 32–46.

20. Hydrogen peroxide : a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? / M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, P. G. Pelicci // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 722–728.

21. Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone : protective effect of coenzyme Q10 / Y. Moon, K. H. Lee, J. H. Park [et al.] // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 93, № 5. – P. 1199–1208.

22. Rodenburg R. J. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders / R. J. Rodenburg // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2011. – Vol. 34, № 2. – P. 283–292.

23. Mitochondrial respiratory chain deficiencies expressing the enzymatic deficiency in the hepatic tissue : a study of 31 patients / A. Garcia-Cazorla, P. Lonlay, P. Rustin [et al.] // *J. Pediatr.* – 2006. – Vol. 149, № 3. – P. 401–405.

24. Даниленко Н. Г. Митохондриальные болезни : клиническое разнообразие, особенности наследования и генетическое консультирование / Н. Г. Даниленко, О. Г. Давыденко // *Здравоохранение.* – 2010. – № 7. – С. 32–39.

25. Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing / H. E. White, V. J. Durston, A. Seller [et al.] // *Genetic Testing.* – 2005. – Vol. 9, № 3. – P. 190–199.

26. Calcium and apoptosis : ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis / P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero [et al.] // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 6407–6418.

27. Rasbach K. A. Signaling of mitochondrial biogenesis following oxidant injury / K. A. Rasbach, R. G. Schnellmann // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 4. – P. 2355–2362.

28. Yu T. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology / T. Yu, J. L. Robotham, Y. Yoon // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103, № 8. – P. 2653–2658.

29. Mattson M. P. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity / M. P. Mattson // *Neurochem. Res.* – 2007. – Vol. 32, № 4–5. – P. 707–715.

30. Normal biochemical analysis of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system in a child with POLG mutations : a cautionary note / M. C. Vries,

R. J. Rodenburg, E. Morava [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2008. – Suppl. 2. – P. 299–302.

31. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics / S. Campello, R. A. Lacalle, M. Bettella [et al.] // *JEM.* – 2006. – Vol. 203, № 13. – P. 2879–2886.

32. The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP / C. L. Brooks, M. Li, M. Hu [et al.] // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26, № 51. – P. 7262–7266.

33. Suen D. F. Mitochondrial dynamics and apoptosis / D. F. Suen, K. L. Norris, R. J. Youle // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22, № 12. – P. 1577–1590.

34. Copeland W. C. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication / W. C. Copeland // *Annu. Rev. Med.* – 2008. – Vol. 59. – P. 131–146.

35. Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations / M. C. Vries, R. J. Rodenburg, E. Morava [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2007. – Vol. 166, № 3. – P. 229–234.

36. Изучение митохондриальных заболеваний в Украине : случай мутации ND5 de novo, значение патогенетических механизмов генных дефектов мтДНК ND5 / С. И. Жаданов, Е. Я. Гречанина, Ю. Б. Гречанина [и др.] // *Журнал АМН України.* – 2006. – Т. 2, № 3. – С. 443–456.

37. Fatal manifestation of a de novo ND5 mutation : implication for the pathogenetic mechanisms of ND5 gene defects / S. I. Zhadanov, E. Ya. Grechanina, Yu. B. Grechanina [et al.] // *Mitochondrion.* – 2007. – Vol. 7, № 4. – P. 260–266.

38. Huynen M. A. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease / M. A. Huynen, M. de Hollander, R. Szklarczyk // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1792, № 12. – P. 1122–1129.

39. Kasiviswanathan R. Ribonucleotide discrimination and reverse transcription by the human mitochondrial DNA polymerase / R. Kasiviswanathan, W. C. Copeland // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 36. – P. 31490–31500.

40. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population / H. R. Elliott, D. C. Samuels, J. A. Eden [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 83, № 2. – P. 254–260.

41. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders / J. Finsterer, H. F. Harbo, J. Baets [et al.] // *Eur. J. Neurol.* – 2009. – Vol. 16, № 12. – P. 1255–1264.
42. The science and business of genetic ancestry testing / D. A. Bolnick, D. Fullwiley, T. Duster [et al.] // *Science.* – 2007. – Vol. 318, № 5849. – P. 399–400.
43. Разнообразие митохондриальной ДНК современных белорусов / Е. И. Кушнеревич, Л. Н. Сивицкая, Н. Г. Даниленко [и др.] // *Доклады Академии наук Беларуси.* – 2007. – Т. 51, № 1. – С. 79–83.
44. Лисицын Ю. П. *Общественное здоровье и здравоохранение : учебник* / Ю. П. Лисицын. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 544 с.
45. Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia / M. Pala, A. Olivieri, A. Achilli [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 90, № 5. – P. 915–924.
46. Thauer R. K. Hydrogenases and the global H₂ cycle / R. K. Thauer // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2011. – Vol. 2011, № 7. – P. 919–921.
47. Ray L. B. Induction of apoptosis requires dephosphorylation of a regulatory protein in the mitochondrial outer membrane / L. B. Ray // *Sci. Signal.* – 2010. – Vol. 3, № 150. – P. 364.
48. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease / R. H. Haas, S. Parikh, M. J. Falk [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2008. – Vol. 94, № 1. – P. 16–37.
49. Activities of respiratory chain complexes and pyruvate dehydrogenase in isolated muscle mitochondria in premature neonates / T. Honzik, L. Wenchich, M. Bohm [et al.] // *Early Hum. Dev.* – 2008. – Vol. 84, № 4. – P. 269–276.
50. Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples / P. Benit, S. Goncalves, D. E. Philippe [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 374, № 1–2. – P. 81–86.
51. Biochemical assays of respiratory chain complex activity / D. M. Kirby, D. R. Thorburn, D. M. Turnbull, R. W. Taylor // *Methods Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 80. – P. 93–119.

52. Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses / A. F. MacAskill, J. E. Rinholm, A. E. Twelvetrees [et al.] // *Neuron*. – 2009. – Vol. 61, № 4. – P. 541–555.

53. MacAskill A. F. Control of mitochondrial transport and localization in neurons / A. F. MacAskill, J. T. Kittler // *Trends Cell. Biol.* – 2009. – Vol. 20, № 2. – P. 102–112.

54. Wang X. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility / X. Wang, T. L. Schwarz // *Cell*. – 2009. – Vol. 136, № 1. – P. 163–174.

55. Vockley J. Clinical trials : curing a critical deficiency in metabolic medicine / J. Vockley, C. M. Vockley // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – Vol. 99, № 3. – P. 244–245.

56. Mitochondrial phosphate-carrier deficiency : a novel disorder of oxidative phosphorylation / J. A. Mayr, O. Merkel, S. D. Kohlwein [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 80, № 3. – P. 478–484.

57. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis / F. Medja, S. Allouche, P. Frachon [et al.] // *Mitochondrion*. – 2009. – Vol. 9, № 5. – P. 331–339.

58. Reisch A. S. Biochemical assays for mitochondrial activity : assays of TCA cycle enzymes and PDHc / A. S. Reisch, O. Elpeleg // *Methods Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 80. – P. 199–222.

59. Caspase-independent cell death and mitochondrial disruptions observed in the apaf1-deficient cells / K. Miyazaki, H. Yoshida, M. Sasaki [et al.] // *J. Biochem.* – 2001. – Vol. 129, № 6. – P. 963–969.

60. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др.]. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. – 262 с.

61. Sunderhaus S. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system : mitochondrial supercomplexes / S. Sunderhaus, E. J. Boekema, H.-P. Braun // *J. Bioenerg. Biomemb.* – 2008. – Vol. 40, № 5. – P. 419–424.

62. Telford J. E. Decylubiquinone increases mitochondrial function in synaptosomes / J. E. Telford, S. M. Kilbride, G. P. Davey // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 2. – P. 8639–8645.

63. Сухоруков В. С. К разработке рациональных основ энерготропной терапии / В. С. Сухоруков // *Рациональная фармакотерапия.* – 2007. – № 2. – С. 40–47.

64. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus / E. Rybnikova, T. Glushchenko, E. Tyulkova [et al.] // *Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 65, № 4. – P. 360–366.

65. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse / P. McGowan, A. Sasaki, A. C. D'Alessio [et al.] // *Nat. Neurosc.* – 2009. – Vol. 12. – P. 342–348.

66. Yee Koh M. HIF-1 regulation : not so easy come, easy go / M. Yee Koh, T. R. Spivak-Kroizman, G. Powis // *Trends Biochem. Sci.* – 2008. – Vol. 33, № 11. – P. 526–534.

67. Vaseva A. The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells / A. Vaseva, N. D. Marchenko, U. M. Moll // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8, № 11. – P. 1711–1719.

68. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death / J. J. Lemasters, T. P. Theruvath, Z. Zhong, A. L. Nieminen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787, № 11. – P. 1395–1401.

69. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death / C. P. Baines, R. A. Kaiser, T. Sheiko [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9, № 5. – P. 550–555.

70. Rosuvastatin-induced neuroprotection in cortical neurons exposed to OGD/reoxygenation is due to nitric oxide inhibition and ERK1/2 pathway activation / C. Savoia, M. J. Sisalli, G. di Renzo [et al.] // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 57–64.

71. Micronutrient (Zn, Cu, Fe)–gene interactions in ageing and inflammatory age-related diseases : implications for treatments / E. Mocchegiani, L. Costarelli, R. Giacconi [et al.] // *Ageing Res. Rev.* – 2012. – Vol. 11, № 2. – P. 297–319.

72. Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of *Listeria* actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1 / W. M. Briehar, H. Y. Kueh, B. A. Ballif, T. J. Mitchison // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 175, № 2. – P. 315–324.

73. Odorizzi G. The multiple personalities of Alix / G. Odorizzi // *J. Cell. Sci.* – 2006. – Vol. 119, Pt. 15. – P. 3025–3032.

74. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes / A. Cabezas, K. G. Bache, A. Brech, H. J. Stenmark // *Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118, № 12. – P. 2625–2635.

75. Selective modification of the N-terminal structure of polytheonamide B significantly changes its cytotoxicity and activity as an ion channel / N. Shinohara, H. Itoh, S. Matsuoka, M. Inoue // *ChemMedChem.* – 2012. – Available at : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201200142/abstract>

76. Neuronal localization of the mitochondrial protein NIPSNAP1 in rat nervous system / M. Nautiyal, A. J. Sweatt, J. A. MacKenzie [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32, № 4. – P. 560–569.

77. Леонтьева И. В. Значение метаболических нарушений в генезе кардиомиопатий и возможности применения L-карнитина для терапевтической коррекции / И. В. Леонтьева, В. С. Сухоруков // *Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии.* – 2006. – № 2. – С. 52–61.

78. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency : successful anaplerotic diet therapy / C. R. Roe, B. Z. Yang, H. Brunengraber [et al.] // *Neurology.* – 2008. – Vol. 71, № 4. – P. 260–264.

79. Benit P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency / P. Benit, S. Lebon, P. Rustin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 793, № 1. – P. 181–185.

80. The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this / L. J. Jacobs, G. de Wert, J. P. Geraedts [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 119–136.

81. Nakamoto R. K. The rotary mechanism of the ATP synthase / R. K. Nakamoto, J. A. Scanlon, M. K. Al-Shawi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 476, № 1. – P. 43–80.

82. Subcomplexes of mitochondrial complex V reveal mutations in mitochondrial DNA / J. Smet, S. Seneca, B. de Paepe [et al.] // *Electrophoresis*. – 2009. – Vol. 30, № 20. – P. 3565–3572.

83. DiMauro S. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases / S. DiMauro, M. Hirano, E. Schon // *Muscle Nerve*. – 2006. – Vol. 4, № 3. – P. 265–283.

84. Митохондриальный синдром MELAS : клиническое разнообразие, генетическая причина и диагностика / Н. Г. Даниленко, И. В. Наумчик, Н. Б. Гусина [и др.] // *Медицинская панорама*. – 2008. – № 9. – С. 32–34.

85. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene / R. Horvath, G. Hudson, G. Ferrari [et al.] // *Brain*. – 2006. – Vol. 129, № 7. – P. 1674–1684.

86. A patient with typical clinical features of mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) but without an obvious genetic cause : a case report / K. K. Abu-Amero, H. Al-Dhalaan, S. Bohlega [et al.] // *J. Med. Case Rep*. – 2009. – Vol. 3. – P. 77.

87. Sanz A. The mitochondrial free radical theory of aging : a critical view / A. Sanz, R. K. Stefanatos // *Curr. Aging Sci*. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 10–21.

88. Rezaie A. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease : an epiphenomenon or the cause? / A. Rezaie, R. D. Parker, M. Abdollahi // *Dig. Dis. Sci*. – 2007. – Vol. 52, № 9. – P. 2015–2021.

89. Abnormal growth in mitochondrial disease / S. Wolny, R. McFarland, P. Chinnery, T. Cheetham // *Acta Paediatrica*. – 2009. – Vol. 98, № 3. – P. 553–554.

90. Белоусова Е. Д. Дифференциальный диагноз эпилепсии / Е. Д. Белоусова, А. Ю. Ермаков // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2008. – Т. 53, № 3. – С. 103.

91. Human CoQ₁₀ deficiencies / C. M. Quinzii, L. C. Lopez, A. Naini [et al.] // *Biofactors*. – 2008. – Vol. 32, № 1–4. – P. 113–118.

92. Otolaryngologic manifestations of mitochondrial cytopathies / A. Jeyakumar, M. E. Williamson, T. M. Brickman [et al.] // *Am. J. Otolaryngol*. – 2009. – Vol. 30, № 3. – P. 162–165.

93. Эффективность коррекции митохондриальных нарушений при врожденных миопатиях у детей / Д. В. Влодавец, В. С. Сухоруков, Д. А. Харламов, Е. Д. Белоусова // Медицинский совет. – 2008. – Т. 1. – С. 76.

94. Metabolic profiling of CSF : evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia / E. Holmes, T. M. Tsang, J. Huang [et al.] // PLoS Med. – 2006. – Vol. 8. – P. 327.

95. Gas chromatography mass spectrometry with supersonic molecular beams / A. Amirav, A. Gordin, A. Poliak [et al.] // J. Mass Spectrom. – 2008. – Vol. 43, № 2. – P. 141–163.

96. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria / E. Y. Plotnikov, A. A. Chupyrkina, I. B. Pevzner [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1792, № 8. – P. 796–803.

97. Эффективность метаболической коррекции ацетонемического синдрома у детей / В. В. Бережной, Л. В. Курило, Т. В. Марушко, М. А. Капичена // Современная педиатрия. – 2009. – № 5. – С. 89–92.

98. Сенаторова А. С. Болезни энергетического обмена в педиатрической практике : взгляд из будущего / А. С. Сенаторова, И. Ю. Кондратова // Современная педиатрия. – 2009. – № 1. – С. 25–30.

99. Lactate on by MRS in mitochondrial encephalopathy : optimization of technical parameters / J. A. da Rocha, T. F. Braga, C. M. A. Maia [et al.] // J. Neuroimaging. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 1–8.

100. Saneto R. P. Neuroimaging of mitochondrial disease / R. P. Saneto, S. D. Friedman, D. W. Shaw // Mitochondrion. – 2008. – Vol. 8, № 5–6. – P. 396–413.

101. Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders : ethical guidance for clinical practice. / A. Bredenoord, W. Dondorp, G. Pennings [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2009. – Vol. 17, № 12. – P. 1550–1559.

102. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика / Б. Ф. Ванюшин // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1186–1199.

103. Коваленко Т. Ф. Метилирование генома млекопитающих / Т. Ф. Коваленко // Молекулярная медицина. – 2010. – № 6. – С. 7–18.
104. Эпигенетика / под ред. С. Д. Эллиса, Т. Дженювейна, Д. Рейнберга. – М. : Техносфера, 2010. – 496 с.
105. Гречанина Е. Я. Сравнительная характеристика частот аллелей C677T MTHFR, A66G MTRR генов системы фолатного цикла и ВПР ЦНС / Е. Я. Гречанина, В. А. Гусар, Ю. Б. Гречанина // Ультразвукова перинатальна діагностика. – 2009. – № 27/28. – С. 4.
106. Клініка та генетика спадкових захворювань, що супроводжуються шлунково-кишковими та загальними абдомінальними симптомами : монографія / О. Я. Гречаніна, Р. В. Богатирьова, О. М. Біловол, О. В. Бугайова, А. А. Булавіна, О. В. Васильєва, Ю. Б. Гречаніна, В. А. Гусар, А. О. Глухова, О. П. Здибська, Т. А. Майборода, Л. В. Молодан, І. В. Новікова, Л. С. Озерова. – Тернопіль : ТДМУ, 2008. – 216 с.
107. Наследственные нарушения обмена серосодержащих аминокислот / Е. Я. Гречанина, Р. Маталон, Ю. Б. Гречанина [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 57–65.
108. Коряков Д. Е. Модификации гистонов и регуляция работы хроматина / Д. Е. Коряков // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1170–1185.
109. Holliday R. Epigenetics : a historical overview / R. Holliday // Epigenetics. – 2006. – Vol. 1, № 2. – P. 76–80.
110. Никитина Т. В. Роль экспрессии мобильных элементов класса SINE и генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, в регуляции внутриклеточных процессов / Т. В. Никитина, Л. И. Тищенко // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 4. – С. 547–558.
111. Шидловский Ю. В. Влияние ремоделирования и модификаций хроматина на процесс инициации транскрипции РНК-полимеразой II / Ю. В. Шидловский, Е. Н. Набирочкина // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 7. – С. 884–893.
112. Ballestar E. The human DNA methylome in health and disease / E. Ballestar, M. Esteller // Cell. – 2008. – Vol. 135, № 6. – P. 1144.
113. DNA demethylation induced by the methyl-CpG-binding domain protein MBD3 / S. E. Brown, M. J. Suderman, M. Halett [et al.] // Gene. – 2008. – Vol. 420, № 2. – P. 99–106.

114. Лебедев И. Н. Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий / И. Н. Лебедев, В. П. Пузырёв // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 9. – С. 1157–1171.
115. Day J. J. Epigenetic mechanisms in cognition / J. J. Day, D. Sweatt // *Neuron*. – 2011. – Vol. 70, № 5. – P. 813–829.
116. Edwards C. A. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters / C. A. Edwards, A. C. Ferguson-Smith // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 19, № 3. – P. 281–289.
117. Gehring M. DNA demethylation by DNA repair / M. Gehring, W. Reik, S. Henikoff // *Trends Genet.* – 2009. – Vol. 25, № 2. – P. 82–90.
118. Inheritance of an epigenetic mark : the CpG DNA-methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation / V. Grandjean, R. Yaman, F. Cusin [et al.] // *PLoS One*. – 2007. – Vol. 2, № 11. – P. 1–5.
119. Шевченко О. П. Гомоцистеин / О. П. Шевченко. – М.: РЕАФАРМ, 2005. – 85 с.
120. Шидловский Ю. В. Влияние ремоделирования и модификаций хроматина на процесс инициации транскрипции РНК-полимеразой II / Ю. В. Шидловский, Е. Н. Набирочкина // *Генетика*. – 2005. – Т. 41, № 7. – С. 884–893.
121. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height / H. L. Allen, K. Estrada, G. Lettre [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 467, № 7317. – P. 832–838.
122. Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment / J. A. Arai, S. Li, D. M. Hartley, L. A. Feig // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, № 5. – P. 1496–1502.
123. SWI/SNF chromatin-remodeling factors induce changes in DNA methylation to promote transcriptional activation / F. Banine, C. Bartlett, R. Gunawardena [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 9. – P. 3542–3547.
124. Exploring candidate genes for human brain diseases from a brain-specific gene network / B. Liu, T. Jiang, S. Ma [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 349, № 4. – P. 1308–1314.

125. Sex differences in brain volume are related to specific skills, not to general intelligence / M. Burgaleta, K. Head, J. Alvarez-Linera [et al.] // *Intelligence*. – 2012. – Vol. 40, № 1. – P. 60–68.

126. Genome-wide quantitative trait locus association scan of general cognitive ability using pooled DNA and 500K single nucleotide polymorphism microarrays / L. M. Butcher, O. S. Davis, I. W. Craig, R. Plomin // *Genes Brain Behav.* – 2008. – Vol. 7, № 4. – P. 435–446.

127. Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity / R. D. Emes, A. J. Pocklington, C. N. Anderson [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2008. – Vol. 11, № 7. – P. 799–806.

128. Promoter methylation and differential expression of π -class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma / Q. K. Y. Chan, U. Khoo, K. Y. K. Chan [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 8–16.

129. Costa L. F. Communication structure of cortical networks / L. F. Costa, J. L. Batista, J. A. Ascoli // *Front. Comp. Neurosci.* – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 1–15.

130. DNA damage, homology-directed repair and DNA methylation / C. Cuzzo, A. Porcellini, T. Angrisano [et al.] // *PLoS Genet.* – 2007. – Vol. 3, № 7. – P. 1144–1162.

131. Gluckman P. D. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk / P. D. Gluckman, M. A. Hanson, A. S. Beedle // *Bioessays*. – 2007. – Vol. 29, № 2. – P. 145–154.

132. Патология : учебник : в 2 т. / под ред. В. В. Новицкого, Е. Д. Гольдберга, О. И. Уразовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – Т. 1. – 848 с. – Т. 2. – 640 с.

133. Hutter B. Tandem repeats in the CpG islands of imprinted genes / B. Hutter, T. Helms, M. Paulsen // *Genomics*. – 2006. – Vol. 88, № 3. – P. 323–332.

134. Genetic and epigenetic regulation in nuclear microenvironments for biological control of cancer / G. Stein, K. Zaidi, J. Stein [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 2016–2026.

135. Анализ синтропных генов бронхиальной астмы, атопического дерматита и псориаза / Е. Я. Гречанина, А. И. Безродная, Э. М. Ходош,

И. А. Моштакoва // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Т. 3, вип. 3. – С. 15–18.

136. Analysis of Mitochondrial DNA Point Mutation Heteroplasmy by ARMS Quantitative PCR / J. Wang, V. Venegas, F. Li [et al.] // *Curr. Protoc. Hum. Genet.* – 2011. – Chapter 19, unit 19.6.

137. PGD and heteroplasmic mitochondrial DNA point mutations : a systematic review estimating the chance of healthy offspring / D. M. Hellebrekers, R. Wolfe, A. T. Hendrickx [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2012. – Available at : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456975>.

138. Mitochondrial DNA and Y-chromosome variation provides evidence for a recent common ancestry between Native Americans and Indigenous Altaians / M. C. Dulik, S. I. Zhadanov, L. P. Osipova [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 90, № 2. – P. 229–246.

139. Baughman J. M. Buffering mitochondrial DNA variation / J. M. Baughman, V. K. Mootha // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, № 11. – P. 1261–1268.

140. Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease / C. J. R. Dunning, M. McKenzie, C. Sugiana [et al.] // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26, № 13. – P. 3227–3237.

141. Amrani N. Early nonsense : mRNA decay solves a translational problem / N. Amrani, M. S. Sachs, A. Jacobson // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 7, № 6. – P. 415–425.

142. Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a ‘differential multiple cleavage-site’ model / S. R. Bacman, S. L. Williams, D. Hernandez, C. T. Moraes // *Gene Ther.* – 2007. – Vol. 14, № 18. – P. 1309–1318.

143. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand / T. Yasukawa, A. Reyes, T. J. Cluett [et al.] // *EMBO J.* – 2006. – Vol. 25, № 22. – P. 5358 – 5371.

144. Pamplona R. Mitochondrial DNA damage and animal longevity : insights from comparative studies / R. Pamplona // *J. Aging Res.* – 2011. – Vol. 2011. – Available at : <http://www.hindawi.com/journals/jar/2011/807108/>

145. Mitochondrial genome sequences illuminate maternal lineages of conservation concern in a rare carnivore / J. B. Knaus, R. Cronn, A. Liston [et al.] // *BMC Ecology*. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 10.

146. Eurasian and African mitochondrial DNA influences in the Saudi Arabian population / K. K. Abu-Amero, A. M. Gonzalez, J. M. Larruga // *BMC Evol. Biol.* – 2007. – Vol. 7. – Available at :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1810519/>

147. Phylogeography of mitochondrial DNA in Western Europe / M. B. Richards, V. A. Macaulay, H. J. Bandelt, B. C. Sykes // *Ann. Hum. Genet.* – 1998. – Vol. 61, № 2. – P. 251–254.

148. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool / M. B. Richards, V. A. Macaulay, E. Hickey [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 67, № 5. – P. 1251–1276.

149. Zoghbi H. Y. A mixed epigenetic and genetic and mixed de novo and inherited model for autism / H. Y. Zoghbi, A. L. Beaudet // *Understanding Autism : From Basic Neuroscience to Treatment* / ed. by S. O. Moldin, J. L. R. Rubenstein. – Boca Raton : CRC Press, 2006. – P. 95–111.

150. Feinberg A. P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease / A. P. Feinberg // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – P. 433–444.

151. Wong A. H. Phenotypic differences in genetically identical organisms : the epigenetic perspective / A. H. Wong, I. I. Gottesman, A. Petronis // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol. 14, Suppl. 1. – P. R11–R18.

152. Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation / G. Vogt, M. Huber, M. Thiemann [et al.] // *J. Exp. Biol.* – 2008. – Vol. 211. – P. 510–523.

153. Thomsen P. D. Genomic imprinting - an epigenetic regulation of fetal development and loss / P. D. Thomsen // *Acta Vet. Scand.* – 2007. – Vol. 49, Suppl. 1. – P. S7.

154. Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects / F. Stam, Y. M. Smulders, C. van Guldener [et al.] // *Clin. Sci.* – 2005. – Vol. 108, № 5. – P. 449–456.

155. Chiang E. P. Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts / E. P. Chiang, Y. C. Wang, F.Y. Tang // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21, № 4. – P. 651–658.

156. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика / Б. Ф. Ванюшин // *Генетика*. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1186–1199.

157. Роль метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов в организации и поддержании структуры гетерохроматиновых доменов (хромоцентров) / С. А. Голышев, П. Н. Вихрева, Е. В. Шеваль [и др.] // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 11. – С. 972–982.

158. Shoffner J. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Disease / J. Shoffner // *GeneReviews at GeneTests : Medical Genetics Information Resource (Updated 2010)* / eds. : R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan [et al.]. – Seattle : University of Washington, 1997–2011. – Available at : <http://www.genetests.org>.

159. Cardiac findings in congenital muscular dystrophies / J. Finsterer, C. Ramaciotti, C. H. Wang [et al.] // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 126, № 3. – P. 538–545.

160. DiMauro S. Historical perspective on mitochondrial medicine / S. DiMauro, C. Garone // *Develop. Disabil. Res. Rev.* – 2010. – Vol. 16, № 2. – P. 106–113.

161. Verkoelen C. F. Crystal retention in renal stone disease : a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan? // C. F. Verkoelen // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 1673–1687.

162. Pachman L. M. Clinical manifestations and pathogenesis of hydroxyapatite crystal deposition in juvenile dermatomyositis / L. M. Pachman, A. L. Boske // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2006. – Vol. 8, № 3. – P. 236–243.

163. Юрьева Э. А. Диагностический справочник нефролога / Э. А. Юрьева, В. В. Длин. – М. : Оверлей, 2007. – 352 с. : ил.

164. Ершова А. К. О применении препарата Ксидифон при нарушениях кальциевого обмена / А. К. Ершова // *Русский медицинский журнал*. – 2010. – № 14. – С. 884–886.

165. Леонтьева И. В. Значение метаболических нарушений в генезе кардиомиопатий и возможности применения L-карнитина для терапевтической коррекции / И. В. Леонтьева, В. С. Сухоруков // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии. – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 52–61.

166. Emerging therapeutic approaches to mitochondrial diseases / T. Wenz, S. L. Williams, S. R. Bacman, C. T. Moraes // Dev. Disabil. Res. Rev. – 2010. – Vol. 16, № 2. – P. 219–229.

167. Евтушенко С. К. Синдром мышечной гипотонии у новорожденных и детей раннего возраста / С. К. Евтушенко, Т. М. Морозова, М. Р. Шаймурзин // Международный неврологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 124–148.

168. Опыт реабилитации детей с различными органическими заболеваниями нервной системы в Донецком областном детском клиническом центре нейрореабилитации / О. С. Евтушенко, Н. В. Яновская, С. П. Дубина [и др.] // Международный неврологический журнал. – 2010. – № 7. – С. 11–20.

169. Корниенко И. В. Анализ механизмов возникновения мутаций в митохондриальной ДНК человека / И. В. Корниенко, Б. А. Малярчук // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39, № 5. – С. 869–877.

170. Wallace D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine / D. C. Wallace // Annu. Rev. Biochem. – 2007. – Vol. 76. – P. 781–821.

171. New phenotypic diversity associated with the mitochondrial tRNA(SerUCN) gene mutation / T. Pulkes, D. Liolitsa, L. H. Eunson [et al.] // Neuromuscul Disord. – 2005. – Vol. 15, № 5. – P. 364–371.

172. Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I / M. Lazarou, M. McKenzie, A. Ohtake [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 27, № 12. – P. 4228–4237.

173. Natural variation in life history and aging phenotypes is associated with mitochondrial DNA deletion frequency in *Caenorhabditis briggsae* / S. Estes, A. L. Coleman-Hulbert, K. A. Hicks // BMC Evol. Biol. – 2011. – Vol. 12, № 11. – P. 11.

174. Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis / J. He, H. M. Cooper, A. Reyes [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Available at : <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2012/03/26/nar.gks266.long/>

175. Hinchliffe P. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I / P. Hinchliffe, L. A. Sazanov // *Science.* – 2005. – Vol. 309, № 5735. – P. 771–774.

176. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption / M. McKenzie, D. Liolitsa, N. Akinshina N [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 51. – P. 36845–36852.

177. Bénit P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency / P. Bénit, S. Lebon, P. Rustin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1793, № 1. – P. 181–185.

178. LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency / F. G. Debray, C. Morin, A. Janvier [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2011. – Vol. 48, № 3. – P. 183–189.

179. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease / M. J. Blok, L. Spruijt, I. F. de Coo [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2007. – Vol. 44, № 4. – P. 74.

180. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome : evidence from 12 cases / S. Shanske, J. Coku, J. Lu [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2008. – Vol. 65, № 3. – P. 368–372.

181. Neuroprotection by a mitochondria-targeted drug in a Parkinson's disease model / A. Ghosh, K. Chandran, S. V. Kalivendi [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 49, № 11. – P. 1674–1684.

182. Parker W. D. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex / W. D. Parker, J. K. Parks, R. H. Swerdlow // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1189. – P. 215–218.

183. Болотова Н. В. Особенности формирования метаболического синдрома у детей и подростков / Н. В. Болотова, А. П. Аверьянов, С. В. Лазебникова // *Педиатрия.* – 2007. – № 3. – С. 35–39

184. Генетическая медицина / В. Н. Запорожан, В. А. Кордюм, Ю. И. Бажора [и др.]. – Одесса : Одес. гос. мед. ун-т, 2008. – 432 с.

185. Епігенетичні аспекти біології та медицини / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, Н. А. Левицька // Інтегративна антропологія. – 2009. – № 2. – С. 4–11.

186. Vasylieva O. The case of diagnosis 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in a child with deficiency of folate cycle enzyme / O. Vasylieva, O. Grechanina, O. Zdybskaya // Clin. Biochem. – 2011. – Vol. 44, № 7. – P. 546–547.

187. Homocysteine and its relationship to deep venous thrombosis in patients undergoing total knee or hip arthroplasty / H. Mouravas, D. Verettas, K. Kazakos [et al.] // Hippokratia. – 2010. – Vol. 14, № 3. – P. 185–188.

188. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and concentrations of methylmalonic acid and folate on plasma homocysteine and risk of coronary artery disease / M. Biselli, A. R. Guerzoni, M. F. de Godoy [et al.] // J. Thromb. Thrombolysis. – 2010. – Vol. 29, № 1. – P. 32–40.

189. MTHFR genetic variability on coronary artery disease development / P. M. Biselli, A. R. Guerzoni, E. M. Goloni-Bertollo [et al.] // Rev. Assoc. Méd. Bras. – 2009. – Vol. 55, № 3. – P. 274–278.

190. Three genetic polymorphisms of homocysteine-metabolizing enzymes and risk of coronary heart disease : a meta-analysis based on 23 case-control studies / L. Chen, L. Liu, K. Hong [et al.] // DNA Cell Biol. – 2012. – Vol. 31, № 2. – P. 238–249.

191. Фетисова И. Н. Полиморфизм генов фолатного цикла и болезни человека_ / И. Н. Фетисова // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2006. – № 1. – С. 77–82.

192. Allelic polymorphisms in the MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers / L. B. Chorna, H. R. Akopyan, H. V. Makukh, I. M. Fedoryk // Tsitol. Genet. – 2011. – Vol. 45, № 3. – P. 177–181.

193. Serum concentrations of sertraline and N-desmethyl sertraline in relation to CYP2C19 genotype in psychiatric patients / I. Rudberg, M. Hermann, H. Refsum, E. Molden // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2008. – Vol. 64, № 12. – P. 1181–1188.

194. Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients / I. Rudberg, B. Mohebi, M. Hermann [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 83, № 2. – P. 322–327.

195. Clinical significance of selected endothelial activation markers in patients with systemic lupus erythematosus / A. Kuryliszyn-Moskal, P. A. Klimiuk, M. Ciolkiewicz, S. Sierakowski // *J. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35, № 7. – P. 1307–1313.

196. Drug-metabolizing enzyme genotypes and aggressive behavior treatment response in hospitalized pediatric psychiatric patients / C. A. Prows, T. G. Nick, S. N. Saldaña [et al.] // *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* – 2009. – Vol. 19, № 4. – P. 385–394.

197. Неиспользованные возможности пренатальной эхографии : дефекты закрытия невральнoй трубки как маркер эпигенетических нарушений / Е. Я. Гречанина, Р. Маталон, Г. Р. Акопян [и др.] // *Ультразвукова перинатальна діагностика.* – 2006. – № 22. – С. 26–51.

198. The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), and methionine synthase reductase (MTRR) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women / S. Y. Tong, J. M. Lee, E. S. Song [et al.] // *Cancer Causes Control.* – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 23–30.

199. Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma / L. Bethke, E. Webb, A. Murray [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 1195–1202.

200. Gene polymorphisms involved in folate and methionine metabolism and increased risk of sporadic colorectal adenocarcinoma / L. Guimarães, M. L. Ayrizono, C. S. Coy, C. S. Lima // *Tumour Biol.* – 2011. – Vol. 32, № 5. – P. 853–861.

201. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer / T. Suzuki, K. Matsuo, K. Hirose [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2008. – Vol. 29, № 2. – P. 356–362.

202. Polymorphisms in folate-related enzyme genes in idiopathic infertile Brazilian men / M. M. Gava, E. A. Kayaki, B. Bianco [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 18, № 12. – P. 1267–1272.

203. Folate gene polymorphism and the risk of Down syndrome pregnancies in young Chinese women / Y. P. Liao, M. S. Bao, C. Q. Liu [et al.] // *Yi Chuan.* – 2010. – Vol. 32, № 5. – P. 461–466.

204 Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women / P. R. Barbosa, S. P. Stabler, A. L. Machado [et al.] // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2008. – Vol. 62, № 8. – P. 1010–1021.

205. Are genetic variants of the methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity? / I. Terruzzi, P. Senesi, I. Fermo [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2007. – Vol. 30, № 9. – P. 747–753.

205. Relationship between methionine synthase, methionine synthase reductase genetic polymorphisms and deep vein thrombosis among South Indians / S. M. Naushad, M. N. Jain Jamal, C. K. Prasad, A. R. Rama Devi // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – Vol. 46, № 1. – P. 73–79.

206. Association of MTHFR, MTR, MTRR, RFC1, and DHFR gene polymorphisms with susceptibility to sporadic colon cancer / M. Jokić, K. Brčić-Kostić, J. Stefulj [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2011. – Vol. 30, № 10. – P. 771–776.

207. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome / P. Bosco, R. M. Guéant-Rodriguez, G. Anello [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2003. – Vol. 121A, № 3. – P. 219–224.

208. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase (MTRR), and thymidylate synthase (TYMS) in multiple myeloma risk / C. S. Lima, M. M. Ortega, M. C. Ozelo [et al.] // *Leuk. Res.* – 2008. – Vol. 32, № 3. – P. 401–405.

209. The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), and methionine synthase reductase (MTRR) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women / S. Y. Tong, J. M. Lee, E. S. Song [et al.] // *Cancer Causes Control*. – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 23–30.

210. Three genetic polymorphisms of homocysteine-metabolizing enzymes and risk of coronary heart disease : a meta-analysis based on 23 case-control studies / L. Chen, L. Liu, K. Hong [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2012. – Vol. 31, № 2. – P. 238–249.

211. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults / D. Gemmati, A. Ongaro, G. L. Scapoli [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2004. – Vol. 13, № 5. – P. 787–794.

212. Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and risk of prostate cancer / C. Marchal, M. Redondo, A. Reyes-Engel [et al.] // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2008. – Vol. 34, № 7. – P. 805–810.

213. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma : case-control study / T. Suzuki, K. Matsuo, Y. Hasegawa [et al.] // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98, № 9. – P. 1439–1446.

214. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer / Ł. Kruszyna, M. Lianeri, M. Rydzanicz [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2010. – Vol. 37, № 1. – P. 241–247.

215. Alcohol drinking and one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on pancreatic cancer risk / T. Suzuki, K. Matsuo, A. Sawaki [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2008. – Vol. 17, № 10. – P. 2742–2747.

216. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRR2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population / R. M. Guéant-Rodriguez, Y. Juillié, M. Candito [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 94, № 3. – P. 510–515.

217. Sharp L. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia : a HuGE review / L. Sharp, J. Little // *Am. J. Epidemiol.* – 2004. – Vol. 159, № 5. – P. 423–443.

218. Роль метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов в организации и поддержании структуры гетерохроматиновых доменов (хромоцентров) / С. А. Голышев, П. Н. Вихрева, Е. В. Шеваль [и др.] // *Цитология.* – 2008. – Т. 50, № 11. – С. 972–982.

219. Hawley R. S. Molecular biology. Hitting a tiny target in the dark / R. S. Hawley // *Science.* – 2011. – Vol. 331, № 6019. – P. 870–871.

220. Felsenfeld G. Genome architecture and expression / G. Felsenfeld, J. Dekker // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 59–61.

221. Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry / O. Y. Al-Dirbashi, S. Kölker, D. Ng [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2011. – Vol. 34, № 1. – P. 173–180.

222. Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome / S. Kriaucionis, A. Paterson, J. Curtis [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 26, № 13. – P. 5033–5042.

223. Rossignol D. A. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders : a systematic review and meta-analysis / D. A. Rossignol, R. E. Frye // *Mol. Psychiatry.* – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 290–314.

224. Rett syndrome mutation MeCP2 T158A disrupts DNA binding, protein stability and ERP responses / D. Goffin, M. Allen, L. Zhang [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2011. – Vol. 15, № 2. – P. 274–283.

225. Rett syndrome : clinical review and genetic update / L. S. Weaving, C. J. Ellaway, J. Gécz, J. Christodoulou // *J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 42, № 1. – P. 1–7.

226. Chahrour M. The story of Rett syndrome : from clinic to neurobiology / M. Chahrour, H. Y. Zoghbi // *Neuron.* – 2007. – Vol. 56, № 3. – P. 422–437.

227. X-chromosome inactivation in Rett syndrome human induced pluripotent stem cells / A. Y. L. Cheung, L. M. Horvath, L. Carrel, J. Ellis // *Front Psychiatry.* – 2012. – Vol. 3. – P. 24.

228. The pluripotency factor, Oct4, interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting / M. E. Donohoe, S. S. Silva, S. F. Pinter [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 460, № 7251. – P. 128–132.

229. X-chromosome inactivation in Rett syndrome human induced pluripotent stem cells // A. Y. L. Cheung, L. M. Horvath, L. Carrel, J. Ellis // Front Psychiatry. – 2012. – Vol. 3. – Available at : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470355>

230. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics : biomarker discovery for diabetes mellitus / X. Li, Z. Xu, X. Lu [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2009 – Vol. 633, № 2. – P. 257–262.

231. Landaas S. Clinical conditions associated with urinary excretion of 2-hydroxybutyric acid / S. Landaas, J. E. Pettersen // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1975. – Vol. 35, № 3. – P. 259–266.

232. Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients / G. Blomqvist, M. Alvarsson, V. Grill [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 283, № 1. – P. E20–28.

233. Glycerol kinase deficiency : residual activity explained by reduced transcription and enzyme conformation / D. R. Sjarif, C. Hellerud, J. K. van Amstel [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2004. – Vol. 12, № 6. – P. 424–432.

235. Comparison of triglyceride concentration with lipemic index in disorders of triglyceride and glycerol metabolism / H. de Haene, Y. Taes, A. Christophe, J. Delanghe // Clin. Chem. Lab. Med. – 2006. – Vol. 44, № 2. – P. 220–222.

236. A multicompartmental model of in vivo adipose tissue glycerol kinetics and capillary permeability in lean and obese humans / S. W. Coppack, D. L. Chinkes, J. M. Miles [et al.] // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, № 7. – P. 1934–1941.

237. Луцкий И. С. Болезнь Паркинсона (клиника, диагностика, принципы терапии) / И. С. Луцкий, С. К. Евтушенко, В. А. Симонян // Международный неврологический журнал. – 2011. – № 5. – С. 159–174.

238. Identification of a panel of sensitive and spicce DNA methylation markers for squamous cell lung cancer / P. P. Anglim, J. S. Galler, M. N. Koss [et al.] // Mol. Cancer. – 2008. – Vol. 7. – P. 62.

239. Baylin S. B. Epigenetic determinants of cancer / S. B. Baylin, P. A. Jones // *Epigenetics* / ed. by D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg. – New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 2007. – P. 457–476.

240. Imhof A. Epigenetics regulators and histone modification / A. Imhof // *Brief. Func. Genom. Proteom.* – 2006. – Vol. 5. – P. 222–227.

241. Li E. DNA methylation in mammals / E. Li, A. Bird // *Epigenetics* / ed. by D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg. – New York. : Cold Spring Harbor Lab. Press. – 2007. – P. 341–356.

242. Goto S. Molecular mechanisms of aging and anti-aging / S. Goto // *Rinsho Ketsueki.* – 2008. – Vol. 49, № 6. – P. 367–372.

243. Daxinger L. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals / L. Daxinger, E. Whitelaw // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – Vol. 13, № 3. – P. 153–162.

244. Bernal A. J. Epigenomic disruption : the effects of early developmental exposures / A. J. Bernal, R. L. Jirtle // *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* – 2010. – Vol. 88, № 10. – P. 938–944.

245. Карпов Р. С. Диагностика и лечение болезней сердца и сосудов : от научных исследований к клинической практике медицины XXI века / Р. С. Карпов, Ю. Б. Лишманов, В. И. Чернов // *Бюллетень СО РАМН.* – 2005. – № 2. – С. 22–26.

246. Mitochondria, Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease/ M. Mancuso, V. Calsolaro, D. Orsucci [et al.] // *International Journal of Alzheimer's Disease.* – 2009. – Vol. 7. – P. 62.