

УДК: 575:113.1:577.213/.215:577.164.17

ЗАКОНОМЕРНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ РАЗВИТИЕМ НЕКОТОРЫХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ И НАРУШЕНИЕМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ВСЛЕДСТВИЕ ДЕФИЦИТА ФЕРМЕНТОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА

Гречанина Е.Я., Лесовой В.Н., Мясоедов В.В., Гречанина Ю.Б., Гусар В.А.

Украинский институт клинической генетики ХНМУ

61022, Харьков, пр. Правды, 13, тел.700-32-17; 705-16-74, e-mail: mgc@ukr.net

Исследования последних лет свидетельствуют о важности процесса метилирования в этиологии и патогенезе многих наследственных заболеваний, что открывает новые возможности их лечения.

Метионин – незаменимая аминокислота, входит в состав белков. Служит в организме донором метильных групп (в составе S-аденозил-метионина) при биосинтезе холина, адреналина и др.; источником серы при биосинтезе цистеина. Имеет 52 биохимических синонима. Химическое наименование метионина – (2S)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoic acid. Химическая формула - C₅H₁₁NO₂S.

Уникальные функции метионина:

- Участвует в реакциях трансметилювания;
- Служит донором метильных групп;
- Участвует в синтезе биологически активных веществ;
- Принимает участие в синтезе нуклеиновых кислот;
- Является акцептором метила для 5-метилентетрагидрофолат-гомоцистеин-метилтрансферазы (метионин-синтазы).

Биологическая функция метионина:

- Незаменимая аминокислота

- Компонент аминоксил-тРНК биосинтазы
- Компонент метаболизма глицина, серина и трианина
- Компонент гистидинового обмена
- Компонент метионинового метаболизма
- Компонент селеноаминокислотного метаболизма
- Компонент тирозинового метаболизма

Ферменты метаболизма метионина представлены:

- Метионин синтазой
- Тирозин аминотрансферазой
- S-аденозилметионин синтазой изоформой 2 типа
- Арсенит метилтрансферазой
- Индометиламин N-метилтрансферазой
- S-аденозилметионин синтазой изоформой 1 типа
- Бетаин-гомоцистеин S-метилтрансферазой 1.
- Метионил-тРНК синтазой, цитоплазматической
- Метионин аденозилтрансферазой 2 субчастицей бета.



Рис. 1. Фолатный цикл и цикл метионина

Нарушение процессов реметилирования (образования метионина из гомоцистеина), происходящее из-за дефицита ферментов MTHFR и MTRR приводит к развитию ряда патологических состояний, таких как: атеросклерозы; атеротромбозы; дефект незаращения невральнй трубки; инфаркты; нарушение расхождения хромосом в

оогенезе и повышает риск рождения детей с синдромом Дауна.

Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца.

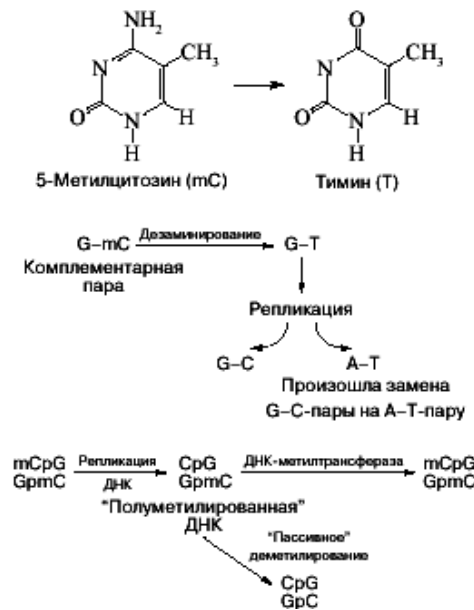
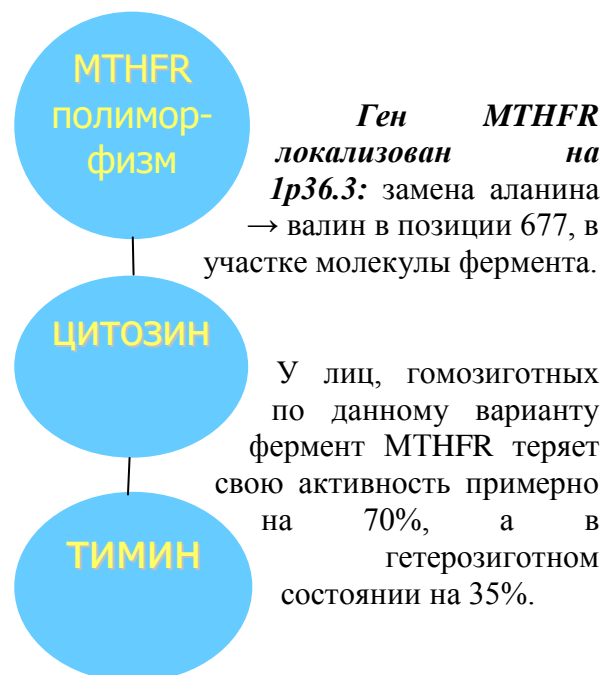


Рис. 2. Метилирование ДНК

Полиморфизм ДНК — это наличие различий последовательности ДНК в конкретном локусе.

Фермент MTHFR: Дефицит фермента MTHFR → снижение метилирования ДНК → избыточное накопление гомоцистеина и метионина.

В случае сниженной активности фермента MTHFR во время беременности усиливается влияние тератогенных и мутагенных факторов внешней среды.



Снижение активности MTHFR по материнской линии приводит к увеличению рождения детей с трисомией хромосомы 21 в 1,9 раза.

Фермент MTRR. Ген MTRR кодирует аминокислотную последовательность фермента метионин синтазы редуктазы. Одной из функций фермента MTRR является обратное превращение гомоцистеина в метионин.



Метилирование белков определяет их функциональную активность, метилирование фосфолипидов – структуру мембран и обеспеченность организма незаменимыми жирными кислотами. Метилирование ДНК играет ведущую роль в формировании и поддержании эпигенетической изменчивости – наследственного динамического процесса, определяющего степень активности генов. Профиль метилирования значительно влияет на функциональное состояние генов и стабильно передается в ряду клеточных поколений. Исходя из этого обстоятельства для организмов с большой продолжительностью жизни и интенсивной тканевой регенерацией необходима надежная система эпигенетической наследственности. Дестабилизация генома наступает в случае изменения эпистатуса. Известен тот факт, что вирусные последовательности, попав в человеческие клетки, могут подвергаться метилированию, которое приводит к блокировке транскрипции и дальнейшей элиминации вируса. Возникают предположения, что роль

метилирования ДНК как компонента клеточной системы, предназначенной для уничтожения чужой или излишней ДНК (или подавления ее функции) сохраняется, по-видимому, на протяжении всей жизни [32].

На примере фолатного цикла можно увидеть механизм запуска дестабилизации генома. Фолатный цикл является сложным каскадным процессом. В нем задействовано большое количество ферментов, для успешной работы которых необходимо наличие фолиевой кислоты в достаточном количестве и витаминов группы В. В этом цикле происходит перенос метильных групп, осуществляется метаболизм гомоцистеина, избыток которого превращается в незаменимую аминокислоту метионин [15]. В свою очередь, метионин превращается в S-аденозилметионин (SAM), который является в клетке основным донором метильных групп, необходимых для синтеза и метилирования ДНК, РНК, белков и фосфолипидов. Дефицит фолиевой кислоты и витаминов группы В, связанный с особенностями диеты, а также мутации в генах фолатного обмена, обуславливающие снижение активности ферментов, приводят к избыточному накоплению гомоцистеина в крови и, как следствие, нарушению процессов метилирования в клетках.

В работе обсуждается гипотеза – дефицит ферментов генов фолатного цикла сопровождается, в частности, недостатком метильных групп, что в свою очередь, оказывает влияние на эпигенетический статус, приводя к запуску эпимутаций и как следствие – манифестации некоторых эпигенетических и онкогенетических синдромов.

На большом клиническом материале с использованием методов клинической протеогеномики показана роль дефицита ферментов фолатного цикла и гипометилирования в манифестации некоторых форм моногенной и хромосомной патологии.

Вступление. Поступающие в организм химические вещества, как известно, преобразуются в циклах, которые содержат определенное количество ступеней

превращения. Каждая ступень превращения продукта требует участия определенного фермента, с помощью которого образуется новый продукт. Для нормального биосинтеза белка, таким образом, требуется, чтобы гены, которые кодируют ферменты, не имели мутаций, а кофакторы поступали в организм в достаточном количестве и адекватно им усваивались. В противном случае нарушение работы фолатного цикла сказывается на жизнедеятельности клетки, органа, организма и популяции.

В последние три десятилетия нарушение фолатного цикла широко обсуждается как возможная причина манифестации распространенных заболеваний, о чем свидетельствуют более тысячи статей, опубликованных в мировой печати, посвященных проблеме нарушения обмена метионина и полиморфным генам фолатного цикла.

Установлено, что метилирование ДНК определяет взаимодействие между ДНК и белками, распознающими модифицированные основания, регулирует генную экспрессию через механизм компактизации-декомпактизации хроматина, являясь основным модификатором генома [5,9,13]. Гипометилирование может приводить к нестабильности хромосом, потере защиты от вредных рецессивных мутаций и, возможно, к глобальному снижению активности генома, что сказывается на клинической манифестации наблюдаемых больных.

При длительном наблюдении за больными с наследственной патологией, ассоциированной с дефицитом ферментов фолатного цикла, нами отмечена волнообразная манифестация клинических признаков конкретного наследственного заболевания и нарушения обмена метионина, что заставляет говорить о фенотипическом проявлении синтропии.

Медицина стоит на пороге перемен в понимании болезней человека: ближайшее будущее медицины – редкие наследственные болезни. На смену симптоматическому лечению наследственной патологии приходит патогенетическое как переходной этап к

этиологическому. Такой подход приобретает реальные черты в связи с бурным развитием молекулярной генетики, которая все чаще позволяет найти «мишени болезни» – точечные мутации или полиморфные гены предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям. Это и есть зарождение персонализированной (индивидуальной) медицины.

Наиболее распространенные минимальные отличия генетических характеристик людей получили название однонуклеотидного полиморфизма – однообразные вариации среди разных людей. Генный полиморфизм – это изменения в последовательностях структуры генов, встречающихся с различной частотой и имеющих влияние на функцию белков. Индивидуальность полиморфизмов может приводить к самым разным фенотипическим последствиям. Те замены, которые радикально меняют функции биохимического продукта гена, относятся к классическим «точечным» мононуклеотидным мутациям и являются причиной наследственных болезней в семье.

Те замены, которые не приводят к значительному изменению первичного генетического продукта, вызывают предрасположенность к болезням вместе с факторами внешней среды и общим генетическим фоном. Это – полиморфные гены, предназначение которых в норме позитивное, направленное на адаптацию нашего вида к условиям среды всей популяции. Любые изменения в геноме, в том числе и полиморфных генах, связаны с соматическим, психическим и репродуктивным здоровьем.

Это обстоятельство заставило нас подойти с позиций новой генетики (геномики) к изучению роли полиморфных генов фолатного цикла в возникновении и исходах наследственных заболеваний человека – сосудистых, неврологических, хромосомных, скелетных.

В течение 40 лет с момента описания гомоцистинурии считалась очень серьезным и даже угрожающим жизни состоянием, но редким по частоте. В последние годы стало очевидным существование «мягких» форм болезни, при которых поражается один

орган или система, но от этого его опасность не становится меньше.

Официально признанной в Европе стала частота классической ГЦУ 1:20000. В последние годы появились данные о причастности к развитию гомоцистинурии не только дефицита фермента CBS, для которого кофактором является витамин В6 (80% больных имеют эту форму патологии), но и недостаточности метилентетрагидрофолатредуктазы, которая нарушает реметилирование гомоцистеина в метионин (15% больных с ГЦУ) и дефицит метилкобаламина (витамина В12), нарушающий тот же процесс (5% пациентов). Фолатный цикл стал в центре проблемы.

Человек получает с пищей восстановленные полиглутаматы, которые гидролизуются до моноглутамата. В тонком кишечнике фолат-моноглутамат всасывается и восстанавливается до тетрагидрофолата, становясь биологически активным. Происходит их метилирование и в крови тетрагидрофолат метилирует до 5'-метилтетрагидрофолата (5'-МТНФ). Источником 5'-МТНФ является и пища, и кишечно-печеночный цикл: птерил-моноглутамат всасывается из кишечника, поступает в печень, здесь метилируется до 5'-МТНФ, который затем выделяется с желчью в кишечник, всасывается в нем и распространяется с кровотоком. Поступление 5'-МТНФ в ткани осуществляется с помощью эндоцитоза при участии 3-х форм специфических фолатных рецепторов. Внутри клетки 5'-МТНФ служит донором метильных групп и основным источником тетрагидрофолата. Тетрагидрофолат является акцептором большого числа моноуглеродных групп, превращается в разные виды фолатов – специфических коферментов для многих клеточных реакций – 5-формилтетрагидрофолат (фолиевая кислота, лейковорин), 10-формилтетрагидрофолат и 5,10-метилентетрагидрофолат.

Частота полиморфизмов, связанных с метаболизмом фолатов и гомоцистеина, значительно варьирует среди различных этнических групп, что в настоящее время

может быть подтверждено популяционным скринингом с помощью генотипирования. До настоящего времени не был проведен анализ, который бы оценил частоты полиморфных генов, вовлеченных в метаболизм фолатов и гомоцистеина в украинской популяции.

Настоящее исследование представляет собой попытку оценить частоту полиморфных генов MTHFR, MTRR, RFC-1 в украинской популяции, произвести уникальную оценку фено- и генотипических ассоциаций при распространенных полиморфных генах, выяснить существование закономерной связи между развитием некоторых эпигенетических болезней и нарушением метилирования ДНК вследствие дефицита ферментов фолатного цикла.

Стремление охватить одновременно в условиях комплексного изучения патологических процессов все уровни жизни может быть реализовано лишь при многопараметрическом, пролонгированном во времени, многоэтапном исследовании.

Такое исследование проводилось в соответствии с 10-ю проектами в 2 этапа:

I этап имел цель накопить информацию о характере наследственной патологии в популяции (1996-2006).

- Проведен анализ 151076 здоровых и 3544 случаев ВПР на момент рождения новорожденных в процессе генетического мониторинга (2000-2006гг.);
- проведено ультразвуковое соматогенетическое обследование с синдромологическим анализом 68302 плодов (1996 - 2006гг.);
- постанатальная верификация диагноза у 700 плодов с МВПР, среди которых с хромосомными синдромами МВПР оказалось 352 и нехромосомными - 348.

II этап оценки частоты полиморфных генов митохондриальной ДНК, генов предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, ВИЧ-протективным генам и генам фолатного цикла.

- проведено пренатальное слежение в рамках проекта «Плод как часть

семьи» за развитием 3127 плодов и клинико-генетическая оценка их родителей из группы высокого генетического риска;

- проведено молекулярно-генетическое безвыборочное изучение 200 образцов крови новорожденных, 135 больных с различными заболеваниями сосудов и 1938 больных с различными наследственными нарушениями.

Полученные данные I-го этапа представлены в предыдущих публикациях.

Настоящая публикация посвящена результатам II этапа.

Популяционные частоты полиморфных вариантов C677T, A66G изучены в колабораторном исследовании с R. Matalon (США) [27]. Последующие исследования выполнялись в Харьковском специализированном медико-генетическом центре.

Таблица 1.

Популяционные частоты полиморфных вариантов C677T и A66G

Polymorphisms	Ukrainians N=200 (neonatal screening)	Caucasians N=159	Hispanic N=96	Afro- Americans N=97	Ashkenazi Jews N=155
C677T MTHFR					
Heterozygotes	40.7%	42.8%	43.8%	21.6%	42.6%
Homozygotes	7.04%	11.3%	26.0%	1.0%	26.5%
Norm	52.26%	45.9%	30.2%	77.3%	31.0%
Allelic frequency	27.39%	32.7%	47.9%	11.9%	47.7%
A66G MTRR					
Heterozygotes	43.0%	49.7%	42.7%	47.4%	47.2%
Homozygotes	35.5%	29.6%	7.3%	10.3%	19.5%
Norm	21.5%	20.8%	50.0%	42.3%	33.3%
Allelic frequency	57.0%	54.4%	28.6%	34.0%	43.1%

В процессе неонатального скрининга выявлено 40,7% гетерозиготных носителей C677T MTHFR, гомозиготных носителей 677T - 7,04%. А частота мутантного аллеля MTHFR составила 27,39% (табл.1).

Частота гетерозиготных и гомозиготных носителей A66G MTRR оказалась выше (43,0% и 35,5%, соответственно). А частота мутантного аллеля MTRR составила 57%.

По результатам скрининга полиморфизмов в генах системы фолатного цикла (MTHFR, MTRR), который проводился с 2008г. в Харьковском специализированном медико-генетическом центре, обследовано 1938 пациентов с дефицитом ферментов фолатного цикла. Рассчитаны частоты соответствующих аллелей (табл.2).

Таблица 2.

**Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов
C677T MTHFR и A66G MTRR в выборке пациентов**

Полиморфизмы	Генотипы и аллели	Выборка пациентов n=1938, %	Ожидаемая частота генотипов, %
C677T MTHFR	CT	839/ 43.3	814.0/ 42.0
	TT	168/ 8.7	174.4/ 8.9
	CC	931/ 48.0	949.6/ 48.9
	T	30.0	
A66G MTRR	AG	811/ 41.8	944.2/ 48.7
	GG	715/ 37.0	652.0/ 33.6
	AA	412/ 21.2	341.8/ 17.6
	G	58.0	

По данным многих исследователей, в частности [51], полиморфизм MTHFR C677T в гомозиготном состоянии является высоким показателем риска развития дефекта незарращения невральнoй трубки (ДНТ) (у матерей, имеющих данный вариант полиморфизма, риск рождения детей с таким пороком возрастает на 60%). В нашей выборке процент гомозиготных носителей C677T составил 7.0%. Данный показатель ниже по сравнению с аналогичным в европейской популяции (11.3%) [31].

Существуют различные гипотезы, одна из которых предполагает, что носители высокой частоты аллеля 677T могли иметь селективные преимущества в естественном отборе, поскольку во время голода снижение активности MTHFR приводит к снижению реметилирования гомоцистеина, и таким образом, тетрагидрофолат сохраняется для жизненно важного синтеза ДНК и РНК.

Полиморфизм MTRR A66G является распространенным для большинства популяций. Тем не менее, и в исследовании, которое было проведено ранее Matalon R., Grechanina E. et al. [31] и в проведенном нами исследовании была обнаружена высокая частота данного аллеля, по

сравнению с частотами других популяций (табл.1). Кроме того, в украинском населении наблюдался высокий процент (35.5%) гомозиготных носителей A66G (в европейской популяции 29.6%) по данным [27]. В выборке пациентов процент гомозиготных носителей составил 37.0%. Для гомозиготного генотипа MTRR A66G риск развития ДНТ более высок, даже вне зависимости от приема фолиевой кислоты [41].

По данным [21] наличие компаунда гомозиготных генотипов MTHFR C677T и MTRR A66G связано с 3-х и 4-х кратным риском развития ДНТ. Также гомозиготный генотип A66G может сопровождаться низкими уровнями кобаламина, в связи с чем, для матерей риск повышается почти в 5 раз. Таким образом, полиморфизм MTRR A66G может увеличивать риск развития ДНТ в популяции украинцев как независимо, так и в сочетании с другими мутациями и внешними факторами.

Учитывая полученные данные по полиморфизмам MTHFR C677T и MTRR A66G, мы исследовали частоты их компаундов (табл.3).

Таблица 3.

**Частоты распределения компаундов полиморфизмов
C677T MTHFR / A66G MTRR в выборке пациентов**

Компаунды C677T/A66G	Количество индивидов	Частота, %
C677T Htzg/ A66G Htzg	355	18.3
C677T Htzg/ A66G Hmzg	316	16.3
C677T Hmzg/ A66G Htzg	64	3.3

C677T Hmzg/ A66G Hmzg	67	3.4
N/N	207	10.7
C677T N/ A66G Htzg	392	20.3
C677T N/ A66G Hmzg	332	17.1
C677T Htzg/ A66G N	168	8.7
C677T Hmzg/ A66G N	37	1.9

Сочетание полиморфных вариантов генов MTHFR и MTRR, обуславливая различную функциональную активность белковых продуктов, характеризовалось определенным спектром биохимических реакций, затрагивающих как фолатный цикл, так и ассоциированные с ними другие стороны метаболизма. Эти данные станут предметом нашего последующего сообщения.

Нами установлены определенные фено- и генотипические ассоциации при

изученных генетических компаундах. Отмечено наибольшее разнообразие нозологических форм при гетерозиготном компаунде C677T Htzg/A66G Htzg (167 пациентов) и при сочетании C677T Htzg/A66G Hmzg (159 пациентов): в частности, при репродуктивной патологии Htzg/Htzg – 3, Htzg/Hmzg – 10, Hmzg/Hmzg – 1; при сосудистой патологии Htzg/Htzg – 30, Htzg/Hmzg – 24; Hmzg/Hmzg – 4; при хромосомной патологии - Htzg/Htzg – 15, Htzg/Hmzg – 9.

Таблица 4.

**Спектр нозологий при сочетании полиморфизмов
C677T MTHFR / A66G MTRR в выборке пациентов (n - 1938)**

Спектр нозологий	C677T MTHFR / A66G MTRR							
	Hmzg/ Hmzg	Hmzg/ Htzg	Htzg/ Htzg	Htzg/ Hmzg	N/ Hmzg	N/ Htzg	Hmzg/N	Htzg/N
Дефицит ферментов фолатного цикла (16%)	6	11	36	37	69	99	5	36
Дефицит ферментов фолатного цикла	3	3	11	13	37	51	1	15
Нарушение реметилирования гомоцистеина			1	1	3	3		
Spina bifida					1	2		
ГЦУ	1	3	7	10	8	19	2	8
ГЦУ (у родственников)				1		1		
Тромбоэмболии / тромбозы	1	1	4	2	3	7		6
Тромбоэмболии / тромбозы (у родственников)		1	3	1	2	1		
Варикозное расширение вен		1	6	6	11	11	1	5
Варикозное расширение вен (у родственников)	1	2	4	3	4	4	1	2
НБО (7.8%)	9	10	71	64	71	124	10	44
НБО		2	10	11	13	23	4	13
НБО (у родственников)			2		2	2		1
НБО аминокислот	1	1	2	1	2	2		3
НБО серосодержащих аминокислот	4		8	5	9	17	1	3
НБО серосодержащих аминокислот (у родственников)				2		1		1
НБО ЖК			3	1	2	4		
НБО метионина		2	7	8	8	3	1	
СТД	1	3	21	19	13	33	2	11
СТД (у родственников)								
МДД			1	1	3			1
Нарушение обмена триптофана	1							
Дисахаридозная недостаточность			1					
Дефицит сульфитоксидазы			2		1	3		
Нарушение обмена в цикле мочевины				1				
Болезнь кленового сиропа				1				
Гиперпролинемия			2		1	1		
Аминоацидурия			1					

Ацидурия				2	2	4		1
Гипотиреоз				1				
Аутизм						2		
Митохондриальные болезни	1	1	8	9	10	19	1	7
Митохондриальные болезни (у родственников)								1
С-м Кернса-Сейра				1				
Эпилепсия	1	1	3	1	5	10	1	2
Сосудистая патология (8%)	2	5	13	13	46	43	2	22
Врожденный порок сердца			2		1	5		1
Врожденный порок сердца (у родственников)			1		3			
Кардиопатия				1			1	2
Инфаркт миокарда				1	1	1		
Инфаркт миокарда (у родственников)		1	1	2	2	3		
Ишемическая болезнь сердца				1			1	
Ишемическая болезнь сердца (у родственников)		1	1			1		1
Сосудистая патология			1		11	8		8
Сосудистая патология (у родственников)				1	9	6		2
Инсульты			2	1		3		
Инсульты (у родственников)		2	3	4	13	7		4
Аневризма сосудов	1				1			
Аневризма сосудов (у родственников)				1				
Гипертоническая болезнь		1	1	1	2	8		3
Гипертоническая болезнь (у родственников)	1		1		3	1		1
Моногенная патология (5%)	2	4	11	11	20	21	4	8
С-м Элерса-Данлоса	1	2	1	4	5	6		2
С-м Прадера-Вилли	1				1	1	1	
С-м Луи-Бар						1	1	
С-м Клиппеля-Треноне					1	1		
Туберрозный склероз					2	2	1	
С-м Рендю-Ослера		1						1
С-м Рассела-Сильвера						1		
С-м Рубинштейна-Тейби					1			
С-м гипервозбудимости			1			2		1
С-м Арнольда-Киари			1					

Синдром IDD			1					
Адреногенитальный синдром			1					
С-м Анонихии-Эктродактилии			1					
С-м Мак Кьюна-Олбрайта			1					
С-м Леша-Нихана			1					
Геморрагический с-м			1					
Миопатия Эрба-Ротта			1					
Миопатический с-м		1			1			
Миодистрофия Дюшена мышечн					2			
ФКУ			1		1	1		
Муковисцидоз					3	2	1	2
С-м Рейтера				1				
С-м Марфана				1	1	2		
С-м Денди-Уокера						1		
Атаксия Фридрейха				1				
Полинейропатия				1	1			
Б-нь Пертеса				1				
С-м Жильбера				1				2
DHD-синдром				1				
Гипофизарный нанизм						1		
Хромосомная патология (6%)		2	16	10	29	27	2	14
С-м Дауна		1	5	1	5	14	1	2
С-м Дауна (у родственников)			6	3	14	6	1	6
С-м Шерешевского-Тернера			2		5	4		4
Различная хромосомная патология/полиморфизм		1	3	6	5	3		2

Таблица 5.

Значимые различия клинических признаков у носителей различных вариантов генотипов MTHFR, MTRR

Клинический признак (значение ср. ±)	Кол-во	%	Генотипы MTHFR C677T / MTRR A66G (n 470)							
			Hmzg / Htzg	Htzg / Htzg	Htzg / Hmzg	Hmzg / Hmzg	N / Htzg	N / Hmzg	Htzg / N	Hmzg / N
Сердечно-сосудистые заболевания	77	16,38	7	10	25	3	13	11	5	3
Пороки и заболевания ЦНС	121	25,75	10	20	28	9	21	20	8	5
ИНСД	3	0,64		1			1	1		
ХПН	6	1,27		1			2	2		1
Артроз, артрит	27	5,75		9	5	1	8	4		
Остеопороз	16	3,40		7	1		2	2	3	1
Нервно-психические расстройства	60	12,77	6	9	18	2	8	10	4	3
Варикозное расширение вен	37	7,87	4	1	10	2	6	9	4	1
Алкоголизм	0	0								
Болезнь Альцгеймера	1	0,21							1	
Снижение когнитивных функций	39	8,30	2	13	6	3	7	3	3	2
ИБС	7	1,49	1	1	2	1	1			1
Тромбоз глубоких вен	9	1,91	1	1	3	1	1		1	1
Депрессия	3	0,64			2		1			
Диабетическая нефропатия	1	0,21					1			
Диабетическая ретинопатия	2	0,42			1		1			
Перемежающаяся хромота	1	0,21	1							
Рассеянный склероз	0	0								
Инфаркт миокарда	1	0,21						1		
Болезнь Паркинсона	0	0								
Болезнь периферических сосудов	54	11,49	7	5	13	1	12	9	5	2
Окклюзия сосудов клетчатки	3	0,64		2		1				
Ревматоидный артрит	3	0,64	1			1		1		
Самопроизвольный выкидыш	28	5,96	1	4	6	1	4	9	3	
Инсульт	2	0,42			1	1				
Отслойка плаценты	2	0,42			2					
Хромосомная патология	9	1,91	2		1	1	1	1	2	1
ЖКТ	60	12,77	4	11	16	1	10	13	3	2
Патология зрения	55	11,70		7	16	3	9	14	1	5
НБО	2	0,42					2			

Скелетные (костные) деформации	37	7,87		3	10	1	11	5	1	6
Изменение со стороны конечностей	15	3,19		1	7		3	4		
Изменение со стороны грудной клетки	11	2,34			5	1	2	2		1
Изменение со стороны позвоночника	16	3,40		2	6	2	1	4	1	
МВПР	16	3,40		2	3	2	4	3		2
Заболевание крови	2	0,42					1		1	
Онкопатология	2	0,42			1		1			
Несахарный диабет	2	0,42							1	1
ИЗСД	2	0,42		1				1		
Репродуктивные потери	3	0,64		2			1			
Бесплодие	8	1,70		1	4		1	1	1	
Хронические бронхо-легочные заболевания	4	0,85			2		1	1		
Изменение со стороны мочевыделительной системы	43	9,15	1	7	11	2	7	12	2	1
Изменение со стороны селезенки	1	0,21			1					
Изменение со стороны эндокринной системы	5	1,06			2	2		1		
Изменение со стороны половой системы	3	0,64		1	1		1			
Изменение мышц	15	3,19		2	3	1	3	4	1	1
Изменение кожи и ее придатков	30	6,38		7	10	1	3	7	1	1
Диабетическая полинейропатия	1	0,21				1				
СКВ	1	0,21						1		

Далее мы попытались составить фенотипические портреты, соответствующие определенным полиморфизмам и их компаундам.

Нами отмечены и редкие осложнения, ассоциируемые с классической гомоцистинурией: фатальная церебро-

васкулярная окклюзия, хронический (подострый) панкреатит, экстрапирамидные симптомы (дистония, миоклонус, оромандибулярная дистония).

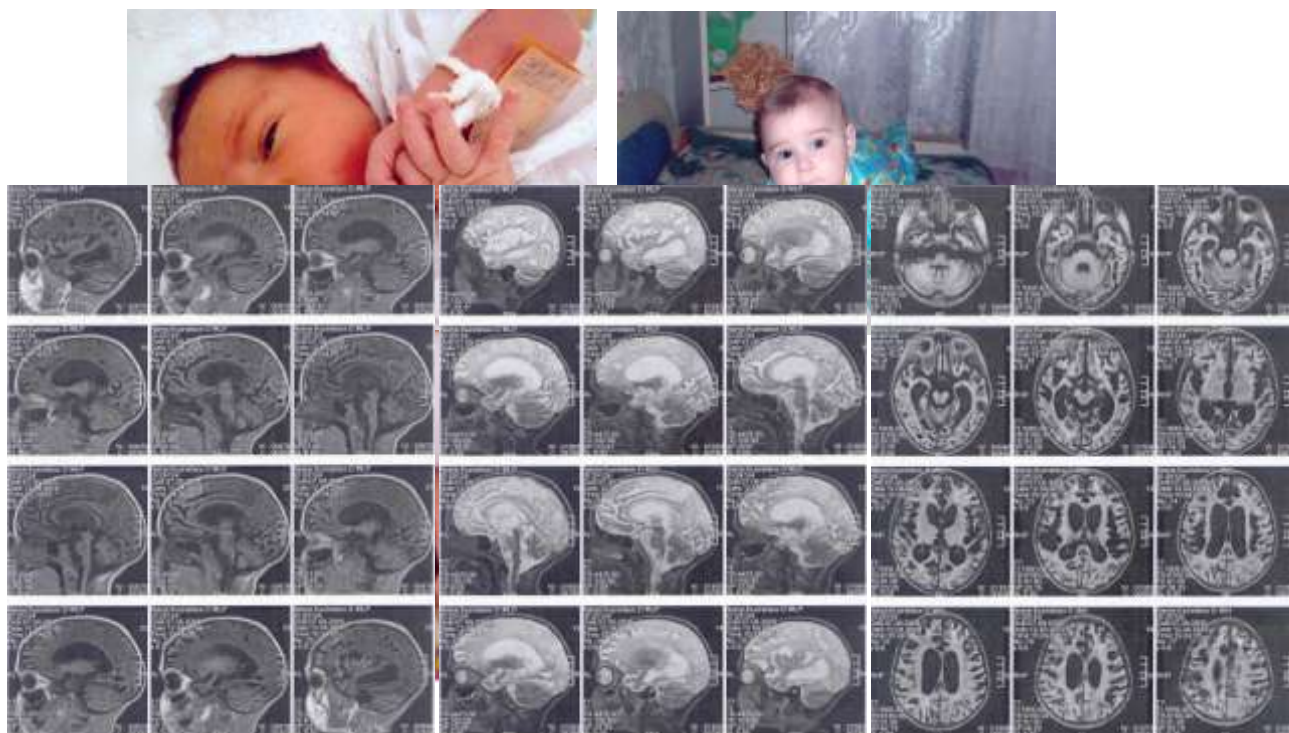


Рис. 1. Диагноз при поступлении: нейрональный цероидный липофусциноз ? Исключен Окончательный диагноз: Банкетная перегрузка. Коровой энцефалит. Дефицит фермента трипептидил-пептидазы 1. Гетерозиготный компаунд 677 C/T MTHFR/ 66A/G MTRR . Фатальная церебральная окклюзия.

Вначале мы попытались сгруппировать в соответствии с характером полиморфизма фенотипические признаки и

получили в обобщенном виде такие данные. Для этого обследовано 652 пациента. У 71 (10.9 %) пациента полиморфизмы не

выявлены. У 581 (89.1 %) выявлены полиморфизмы, характеризующиеся следующими клиническими проявлениями. Гомозиготные и гетерозиготные носители MTHFR C677T и MTRR A66G во многом оказались сходными потому, что их объединял общий патогенетический признак – гипергомоцистеинемия.

У 17 (2.71 %) пациентов обнаружен гомозиготный компаунд 677T MTHFR и 66G MTRR.

Фенотипы гомозиготных компаундов были малочисленны и не позволили сделать определенных выводов, хотя четко прослеживалась их связь с дефицитом ВНМТ.

У 22 (3.5 %) пациентов обнаружено сочетание 677T MTHFR в гомозиготном состоянии и 66A/G MTRR в гетерозиготном состоянии. Гомозиготные компаунды 677T MTHFR и гетерозиготные 66A/G MTRR отмечались значительным поражением вен – нижних конечностей, внутренних органов, ягодиц, нижней части тела.

Компаунды htrz C677T MTHFR и hmzg A66G MTRR сопровождалась сочетанием разных фенотипов, хотя регулирующая роль фолатного цикла прослеживалась.

Нарушение репродуктивной функции семьи, отягощенной носительством полиморфных генов сопутствовало 7.8% обследованных.

У 109 (17,38 %) пациента обнаружен гетерозиготный компаунд 677 C/T MTHFR и 66A/G MTRR. При нем прослеживают ассоциации, свойственные мягкой гомотестинурии с самостоятельными нозологическими формами болезни (нарушением жирных кислот, органические ацидурии, трисомии 21).

При двух гетерозиготах фенотипические проявления оказались наиболее разнообразными и чаще сочетались с клиническими проявлениями

других точечных мутаций (с-м Цельвегера, с-м Ретта).

Учитывая тот факт, что дефицит ферментов фолатного цикла приводит к снижению метилирования ДНК и как следствие, к нарушению расхождения хромосом и риску рождения ребенка с синдромом Дауна, мы детектировали полиморфизмы генов системы фолатного цикла и проанализировали частоты генотипов и аллелей полиморфизмов C677T и A66G в выборке пациентов с синдромом Дауна.

Общая выборка составила 93 пациента, среди которых 48 матерей, имеющих детей с синдромом Дауна и 45 детей с синдромом Дауна.

В выборке матерей, имеющих детей с синдромом Дауна частота гетерозиготных носителей СТ MTHFR составила 43.7%, гомозиготных ТТ – 4.2%, с генотипом СС – 52.1%. Частота гомозиготного аллеля Т – 26.0%.

Распределение частот полиморфизма A66G гена MTRR соответствовало следующим значениям: индивиды с гетерозиготным генотипом АG – 31.2%, с гомозиготным генотипом GG – 45.8%, с нормальным генотипом АА – 23.0%. Частота гомозиготного аллеля G – 61.4%.

В выборке детей с синдромом Дауна доля индивидов с гетерозиготным генотипом C677T MTHFR составила 37.8%, с гомозиготным ТТ – 6.7%, с генотипом СС – 55.5%. Частота гомозиготного аллеля 677T MTHFR – 25.5%.

При расчете частот полиморфизма A66G MTRR получены следующие значения: индивиды с гетерозиготным генотипом АG – 55.6%, с гомозиготным генотипом GG – 24.4%, с нормальным генотипом АА – 20.0%. Частота гомозиготного аллеля G – 52.2%.



Рис. 2. Взаимоотношение генетики и эпигенетики (по С.А. Назаренко, 2004)

Таблица 6.

Классификация эпигенетических болезней человека (по С.А. Назаренко, 2004)

Нарушение эпигенетического статуса отдельных участков генома (локальный эффект)	Нарушение эпигенетического статуса всего генома (глобальный эффект)
1. Болезни, обусловленные унаследованными мутациями, нарушающими моноаллельную экспрессию генов — болезни геномного импринтинга (синдромы Видемана—Беквита, Прадера—Вилли, Энгельмана)	1. Болезни, обусловленные унаследованными мутациями генов, продукты которых вовлечены в поддержание уровня метилирования ДНК или модификацию структуры хроматина — Синдромы ICF, Ретта, ATR-X, Рубинштейна—Тейби, Коффина—Лаури

<p>2. Болезни, обусловленные нарушенным статусом метилирования отдельных генов в результате de novo возникших мутаций в соматических клетках — а) раковые болезни, связанные с потерей импринтинга, приводящей к активации неактивных генов или подавлению экспрессии активного гена;</p> <p>б) раковые болезни, обусловленные гиперметилированием промоторов генов опухолевых супрессоров и их инактивацией</p>	<p>2. Болезни, обусловленные глобальным нарушением метилирования генома в результате de novo возникших мутаций в соматических клетках— Раковые болезни, связанные с глобальным гипометилированием генома, приводящим к активации онкогенов, ретротранспозонов и хромосомной нестабильности</p>
--	--

Эпигенетическая регуляция активности генов:

Эпигенетическая изменчивость — изменение генной экспрессии без изменения первичной последовательности нуклеотидов. Эпигенетика — модификация генной экспрессии, обусловленная наследственными, но потенциально обратимыми изменениями в структуре хроматина и/или в результате метилирования ДНК.

Фенотипический эффект генов может изменяться в зависимости от расположения соседних с ним генов (эффект положения). Эухроматиновый ген при перемещении в гетерохроматиновую область генома изменяет свою экспрессию (А. Стертевант).

Важный эпигенетический феномен — взаимодействие аллельных генов, находящихся в гетерозиготном состоянии, которое приводит к наследуемому изменению экспрессии одного из аллелей и называется парамутацией. Парамутация — это явление, при котором генетические факторы сегрегируют в неизменном виде от гетерозиготных носителей. Парамутация связана с наследственными изменениями структуры хроматина, которые проявляются через дистантные цис- и транс-взаимодействия генов.

Эпигенетическая регуляция генной экспрессии связана с повторяющимися

последовательностями ДНК: мини-, микро- и макросателлитами, которые локализованы в гетерохроматиновых областях генома. Гетерохроматин включает как простые повторы, так и мобильные генетические элементы — транспозоны (число транспозонов 106, удельный вес в геноме 40% (Смит А.Ф.)).

Транспозоны дестабилизируют геном путем инсерционного мутагенеза и приводят к хромосомным перестройкам через рекомбинацию между неаллельными повторами.

Гипотеза: эпигенетическая супрессия транспозонов в геноме млекопитающих состоит в защите хозяина от паразитических последовательностей ДНК.

Если метилирование ДНК — это защитный механизм, который обеспечивает инактивацию паразитических последовательностей ДНК (транспозоны и провирусные ДНК), то его нарушение может приводить к потере защиты от вредных рецессивных мутаций.

Наше предположение: дефект работы донора метильных групп — метионина несет за собой длинную цепь генетических событий, которые приводят к многочисленным нарушениям в организме человека.



Рис. 3. Эпигенетическая болезнь (гипометилирование, хромосомный (46,ХУ, 9 рhqh) и генный (мутация 677 С-Т в гетерозиготном состоянии) полиморфизм)). Мягкая гомоцистеинурия. Синдромальная эпилепсия.



Рис. 4. Синдром Элерса-Данлоса с нарушением обмена серосодержащих аминокислот и мукополисахаридозов. Обнаружен полиморфизм MTHFR G1793A, MTRR A66G в гетерозиготном состоянии. Эпикант, гипертелоризм, нистагм, экзофтальм, инъекция сосудов склер



Рис. 5. Гомоцистинурия



Рис. 6. Эпигенетическая болезнь

Мозаичная форма синдрома Шерешевского-Тернера.

Нарушение фолатного цикла (полиморфизм в генах системы фолатного цикла. Обнаружен полиморфизм 677 С/Т MTHFR в гетерозиготном состоянии, ген эндотеллиальной NO-синтазы 4a/4b в гомозиготном состоянии). Нарушение энергетического обмена (MNGIE?).

Врожденный горизонтальный нистагм с ротаторным компонентом (оперативная коррекция). Гиперметропический астигматизм обоих глаз. Амблиопия



Рис. 7. Семейный случай эпигенетической болезни.

*Гипометилирование ДНК, дефицит фолатного цикла, нарушение обмена метионина (мозаичная форма трисомии по 21 хромосоме, хромосомный полиморфизм по хромосоме 1).
Полиморфизмы в генах фолатного цикла: MTHFR 677 C/T в гетерозиготном состоянии, MTRR 66 A/G в гомозиготном состоянии*

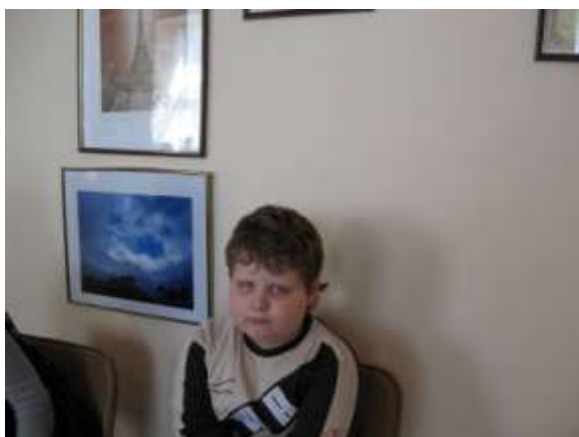


Рис. 8. Наследственная болезнь обмена жирных кислот, ассоциированная с дефицитом фолатного цикла



Рис. 9. Синдром Дауна, регулярная форма. Дефицит фолатного цикла



Рис. 10. Синдром Дауна, мозаичная форма. Дефицит фолатного цикла

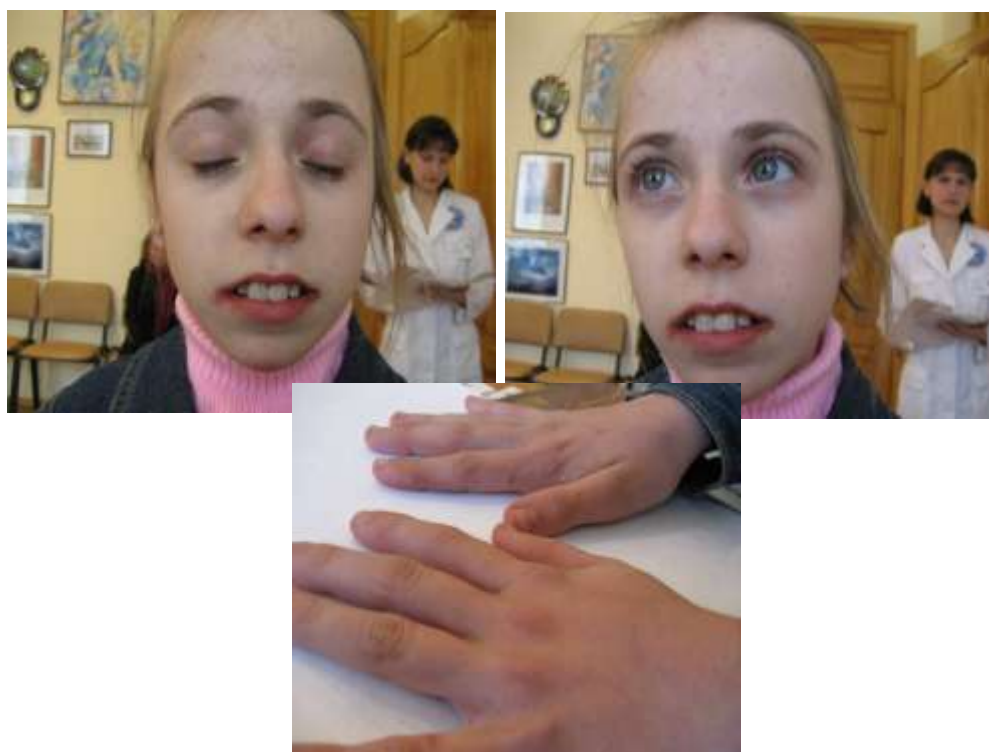


Рис. 11. Гомоцистинурия



Рис. 12. Миотоническая дистрофия. Дефицит фолатного цикла



*Рис. 13. Синдром Кохена.
Мягкая ГЦУ*

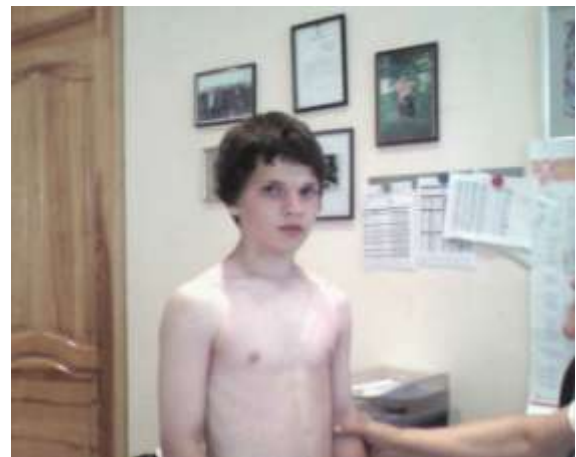


Рис. 14. Эпигенетическая болезнь: нарушение обмена гликопротеидов (дефект посттрансляционной модификации лизосомальных ферментов). Нарушение обмена фолатного цикла (полиморфизм 66A→G (122M) в гене MTRR в гетерозиготном состоянии).

Хромосомный полиморфизм:

46, XY, 14 ps+

*Длинные (очень длинные) ресницы, гипертелоризм,
серо-голубые склеры, эпикант)*



***Рис. 15. Мягкая гомоцистинурия
(нарушение транссульфатирования метионина)
Нижняя сублюксация хрусталика***



*Рис. 16. Полиморфизм в генах фолатного цикла.
Ангиоматозная форма гамартоза*

Теоретические доказательства полученных данных.

Для нормальной реализации генетической программы индивидуума эпигенетическая регуляция активности генов имеет существенное значение, поскольку обеспечивает установление и поддержание их дифференциальной экспрессии [11,40,43,46].

Согласно современным представлениям, под эпигенетическими процессами понимают наследуемые, стабильные, но потенциально обратимые изменения экспрессии генов, не связанные с нарушениями их нуклеотидной последовательности [1,13,14]. Собственно, метилирование и является основным эпигенетическим модификатором генома, поскольку вовлечено в такие фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки, как регуляция экспрессии генов и поддержание стабильности генома.

Метилирование ДНК осуществляется, главным образом, в результате обратимой химической модификации цитозина (С), путем присоединения метильной группы с S-аденозилметионина (SAM) к углероду, расположенному в 5'-положении пиримидинового кольца, что приводит к образованию 5'-метилцитозина. Цитозин метилируется только в том случае, если рядом с ним находится гуанин (G) в сочетании CpG, где p – остаток фосфорной

кислоты, связывающийся с сахарными остатками с образованием сахарофосфатного остова ДНК [2]. SAM, являющийся универсальным донором метильных групп для целого ряда акцепторов (норадреналин, гуанидинацетат, глицин, нуклеиновые кислоты, гормоны и др.), образуется из метионина в процессе реметилирования последнего из гомоцистеина. Следовательно, при дефиците метионина, будет наблюдаться дефицит SAM. В данной связи, рассмотрим более подробно один из путей метаболизма гомоцистеина – реметилирование (фолатный цикл).

Фолатный цикл является сложным каскадным процессом. В реакции, катализируемой ферментом MTHFR, из тетрагидрофолата и серина образуется 5,10-метилентетрагидрофолат, который затем восстанавливается до 5-метилтетрагидрофолата. На следующем этапе метильная группа от 5-метилтетрагидрофолата переносится на гомоцистеин в реакции, которая катализируется B12-зависимой метилтрансферазой [15]. При реметилировании гомоцистеин получает метильную группу и образует метионин. Данную реакцию катализирует цитоплазматический фермент метионин-синтаза (MTR). Для работы фермента необходим метилкобаламин, производное витамина B12. Метионин-синтаза

обеспечивает преобразование гомоцистеина в метионин посредством реакции, в которой метилкобаламин выступает в роли промежуточного переносчика метильной группы. При этом происходит окисление кобаламина, и фермент MTR переходит в неактивное состояние. Восстановление функции фермента возможно в ходе реакции метилирования при участии фермента MTRR [17]. Таким образом, дефицит фолиевой кислоты и витаминов группы В, связанный с особенностями диеты, а также мутации в генах фолатного обмена, обуславливающие снижение активности ферментов, приводят к избыточному накоплению гомоцистеина в крови и нарушению процессов метилирования в клетке.

Следует подчеркнуть особую роль генов, кодирующих ферменты фолатного цикла, поскольку дефицит метильных групп напрямую связан с полиморфизмами в данных генах. Полиморфные варианты генов MTHFR, MTRR и MTR, обуславливая различную функциональную значимость белковых продуктов, влияют на широкий спектр биохимических реакций в ходе фолатного цикла, и, по мнению ряда авторов, могут рассматриваться как фактор риска развития некоторых заболеваний [17,66].

Существует ряд аллельных вариантов гена MTHFR, вызывающих тяжелую недостаточность фермента, но большинство из них являются редкими. Наиболее изучен полиморфизм C677T: точковая замена (миссенс-мутация) цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 677, приводящая к замене аминокислотного остатка аланина на валин (Ala222Val) в сайте связывания фолата [26,35,53]. У лиц, гетерозиготных по данной мутации, отмечается термолабильность фермента и снижение его активности примерно до 35%, у гомозигот - до 70% [63]. Наличие этой мутации может сопровождаться повышением уровня гомоцистеина в крови. Другим полиморфизмом гена MTHFR является точковая замена аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298, приводящая к замене аминокислотного остатка глутамина на

аланин (Glu429Ala) в регуляторном домене фермента [54,63]. Аллель A1298C незначительно снижает активность фермента. В отличие от полиморфизма C677T, гетерозиготность и гомозиготность по мутации A1298C не сопровождается повышением концентрации общего гомоцистеина и снижением уровня фолата в плазме. Однако, компаунд-гетерозиготность по двум аллелям 677Т и 1298С сопровождается снижением активности фермента на 40-50%, повышением концентрации гомоцистеина в плазме и снижением уровня фолата, как это бывает при гомозиготном носительстве аллеля 677Т [17,63].

В гене метионин-синтазы, катализирующем реметилирование гомоцистеина в метионин описан полиморфизм в позиции A2756G в сайте связывания фермента MTR, приводящий к замене аспарагиновой кислоты на глицин [55,60]. Большинство исследований свидетельствуют о сниженном уровне гомоцистеина в плазме, чаще при гомозиготном носительстве полиморфизма A2756G, чем при гетерозиготном [23,28,30,47,56].

Полиморфизмом гена MTRR является A66G - точковая замена аденина (А) на гуанин (G) в позиции 66, приводящая к замене аминокислотного остатка изолейцин на метионин (Ile22Met). Данный полиморфизм в 4 раза снижает активность фермента MTRR [38].

Таким образом, на эпигенетическом статусе гена могут отразиться изменения локусов, которые тем или иным способом вовлечены в регуляцию структуры хроматина, т.е. полиморфные варианты гена 5,10-MTHFR могут оказывать влияние на характер метилирования ДНК, изменяя уровень SAM. Было показано, что наличие гомозиготной замены 677Т в гене MTHFR у женщины увеличивает риск рождения ребенка с синдромом Энгельмана и эпимутацией в центрах импринтинга [67].

Метилирование ДНК в геноме является специфической формой клеточной памяти (эпигенетическая память), которая играет ключевую роль в развитии благодаря специфическому кодированию генной

экспрессии в разных клетках. Несмотря на единый геном, клетки организма имеют разные эпигеномы, что обеспечивает дифференциальную экспрессию, разные клеточные фенотипы и функции [13]. Также установлено, что метилирование цитозинового основания ДНК предопределяет взаимодействие между ДНК и белками, входящими в состав хроматина и такое взаимодействие через механизм компактизации-декомпактизации хроматина регулирует экспрессию генов. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции генной активности тесно взаимосвязаны. Нуклеотидная последовательность гена определяет локализацию потенциальных сайтов метилирования (CpG-островков) и кодирует ферменты, вовлеченные в процесс генной регуляции. В то же время, сама экспрессия генов, записанных в генетическом коде, регулируется процессом метилирования. Метилирование также может прямо влиять на генетический код через увеличение частоты генных мутаций вследствие дезаминирования цитозина [5,13], выступая в качестве мощного генератора мутаций, а остатки 5-метилцитозина – горячие точки мутагенеза [12].

Нарушение статуса метилирования ДНК, которое происходит вследствие гипометилирования или гиперметилирования аллелей генов является эпимутацией. Первичные эпимутации приводят к изменению экспрессии гена без изменения его нуклеотидной последовательности. Представлены, в основном, в регуляторных областях гена. Вторичные эпимутации характеризуются абберрантными модификациями хроматина. Такие заболевания как, синдром Мартина-Белл, Ретта, ICF, Коффина-Лаури, Рубинштейна-Тейби обусловлены мутациями в генах, кодирующих белки и ферменты (транскрипционная активность хроматина), которые участвуют в эпигенетической реорганизации хроматина [11].

Для доказательства выдвинутой нами гипотезы рассмотрим механизм метилирования при синдроме Ретта (RTT) (MIM и OMIM, 312750). Его происхождение остается недостаточно выясненным. К

настоящему времени большинство исследователей предполагают, что RTT — не нейродегенеративное прогрессирующее мозговое поражение, а скорее генетическое нарушение развития мозга, и связывают данный синдром с нарушениями в X-хромосоме. Среди других возможных механизмов наследования обсуждается также митохондриальная модель, предложенная в 1989 году Eeg-Olofsson O. и соавторами на основании найденных ими структурных изменений митохондрий и метаболических аномалий, указывающих на митохондриальную дисфункцию (примерно у 50% девочек с синдромом Ретта обнаруживается умеренное повышение молочной и пировиноградной кислот в крови или ликворе) [33].

Частота RTT составляет 1 на 10 000 – 15 000 детей женского пола, а в отдельных регионах — 1 на 3000 [18,36]. Географическое распространение RTT неравномерно. Отмечено скопление больных в определенных небольших сельских районах «Ретт-ареалы», что может быть связано с существующими популяционными изолятами. Такая концентрация заболевания наблюдается в Норвегии, Италии, Албании и Венгрии [16].

До 1990 г. считалось, что RTT поражает только девочек [22]. В последние годы появились единичные публикации [65], в которых представлено описание лиц мужского пола с RTT. Патогенетические механизмы при RTT также остаются недостаточно изученными.

В 95% случаев к заболеванию приводят мутации в гене MeCP2 (Methyl-CpG binding protein 2), который находится на длинном плече X-хромосомы Xq28 и участвует в регуляции транскрипции [20]. В настоящее время известны 8 патогенных рекуррентных мутаций гена MeCP2 (R160W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C), приводящими к RTT [18,49].

Атипичная форма RTT (5%), характеризующаяся инфантильными спазмами и ранним началом судорог, возникает при мутации CDKL5 в гене Xq22 [59]. У мальчиков с мутацией MeCP2 отмечается неонатальная энцефалопатия,

приводящая к смерти вскоре после рождения [45,48]. Фенотипические мальчики с клиническими проявлениями РТТ имеют кариотип 46, XX или 46, XXУ и мутацию гена MeCP2 [37]. У мальчиков с РТТ выявляется соматический мозаицизм: часть клеток с нормальным геном и часть – с мутированным [58]. Следует отметить, что мутации гена MeCP2 у них приводят не только к классической или атипичным формам РТТ, но также к врожденной энцефалопатии и умственной отсталости в сочетании с различными неврологическими отклонениями [48]. Изучение влияния различных мутаций гена MeCP2 на фенотипические проявления болезни у мальчиков представляется информативным при изучении зависимости течения болезни от типа и положения мутации, поскольку это позволяет исключить влияние нормального аллеля гена MeCP2 [19].

У девочек с РТТ тяжесть проявлений зависит от типа и расположения мутации MeCP2 и степени инактивации X-хромосомы. Если большинство клеток мозга экспрессируют X-хромосому с нормальным аллелем MeCP2, то РТТ проявляется в легкой степени. Если же в большинстве нейронов активирована X-хромосома с мутантным MeCP2 аллелем, то РТТ протекает очень тяжело, как и в случаях с мальчиками [42]. Однако, генетическая природа РТТ у девочек без мутации в гене MeCP2 остается неизвестной.

При нейроморфологическом исследовании выявлено наличие низкого числа дендритных шипиков и нарушение структуры дендритного ветвления нейронов коры и базальных ганглиев. Полученные данные послужили основанием для появления гипотезы «прерванного развития мозга» [24]. С помощью позитронно-эмиссионной томографии обнаружены снижение плотности глутаматных рецепторов в базальных ганглиях, дофаминергических нейронов в хвостатом ядре, гипофункция холинергической системы, ослабление мозгового кровотока [34,42]. И снижение активности лобных отделов мозга при нейрофизиологических исследованиях [4,52].

Известно, что эпигенетические факторы, в частности, неравная инактивация хромосомы X могут оказывать модифицирующее влияние на действие белка MeCP2 при РТТ [61]. Ряд исследований показали возможность влияния неравной X-инактивации на клинические особенности РТТ [39,62].

Уровень метилирования ДНК является фактором, определяющим структуру гетерохроматиновых локусов хромосом на уровне компактизации хроматина. Деметилирование ДНК вызывает резкие изменения в макромолекулярной организации хроматина в составе хромоцентров. Причины, по которым изменение уровня метилирования приводит к декомпактизации хроматина на макромолекулярном уровне, остаются неизвестными [3]. Метильные группы на остатках цитозина являются сайтами, присоединяющими MeCP2 [27,29]. Распознавание метилированной ДНК осуществляется благодаря присоединению метил- CpG-связывающих белков и, в частности, MeCP2 (Methyl-CpG binding protein 2), которые затем привлекают другие белки корепрессорного комплекса, приводя к подавлению транскрипции [44]. MeCP2 достаточно единственного метилированного CpG динуклеотида для связывания и активного подавления транскрипции. Если предположить, что дефицит SAM, вызванный мутациями в генах ферментов фолатного цикла повлечет за собой резкое снижение метильных групп, и как следствие, снижение метилирования, что в конечном итоге скажется на нарушении распознавания метилированной ДНК и потере способности гетерохроматина к компактизации до уровня хромоцентра. Таким образом, не происходит подавления транскрипции мутантного гена, что приводит к развитию РТТ.

Выводы:

1. Украинская популяция является полиморфной по аллелям MTHFR (C677T, A1298C, G1793A); MTRR (A66G); RFC-1 (G80A).
2. Частоты генотипов в украинской популяции отличаются от европейских высоким удельным весом гомозигот и частотой

- мутантного аллеля A66G MTRR, что позволяет предположить адаптивное значение полиморфизма A66G в процессе эволюции.
3. Распределение компаундов обнаруживает сходство по частотам вариантов: C677T Htzg/ A66G Htzg, N/ A66G Hmzg, а также C677T Htzg/ A66G Hmzg, N/ A66G Htzg, что является предметом дальнейших наших фено- и генотипических сопоставлений.
 4. Клинические проявления, ассоциированные с дефицитом ферментов фолатного цикла имеют право на существование как отдельные нозологические формы гомотистнурии.
 5. Суммарная частота полиморфных генов фолатного цикла среди 627 больных с различными формами наследственной патологии, составившая 89,1% обследованных, подтверждает значительную роль гипометилирования в манифестации клинических проявлений наследственных заболеваний и мультифакториальных нарушений,
- что необходимо учитывать при выборе тактики лечения.
6. В сложном механизме регуляции активности генома значительную роль играют эпигенетические модификаторы.
 7. Дефицит ферментов фолатного цикла, являющихся донорами метильных групп, сопровождаются гипометилированием.
 8. Если рассматривать метилирование ДНК как защитный механизм, который обеспечивает инактивацию паразитических последовательностей ДНК, таких как транспозоны и провирусные ДНК, то его нарушение может приводить к потере защиты от вредных рецессивных мутаций.
 9. Можно предположить, что дефект работы донора метильных групп, каким является метионин, влечет за собой длинную цепь генетических событий, просматривающихся при оценке полиморфных аллелей и генов, регулирующих метаболизм фолатов и влияющих на фенотипические проявления мутаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика 2006. Т.42. №9. С. 1186-1199.
2. Гвоздев В.А. Регуляция активности генов, обусловленная химической модификацией (метилированием) ДНК// Соросовский образовательный журнал. 1999. № 10. С. 11-17.
3. Голышев С.А., Вихрева П.Н., Шеваль Е.В., Кирьянов Г.И., Поляков В.Ю. Роль метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов в организации и поддержании структуры гетерохроматиновых доменов (хромоцентров)// Цитология. - 2008. - Т.50, №11. - С.972-982.
4. Горбачевская Н.Л. и др. Электроэнцефалографическое исследование детской гиперактивности // Физиология человека. - 1996. - Т. 22, № 5. - С. 49.
5. Гречанина Е.Я., Гречанина Ю.Б., Гольдфарб И.Г. Хромосомный полиморфизм и метаболические нарушения – причинно-следственные связи // Ультразвукова перинатальна діагностика.- 2004.- N17.- С.3-43.
6. Гречанина Е.Я., Молодан Л.В., Гречанина Ю.Б. и др. Клинический полиморфизм и генетическая гетерогенность наследственных мотосенсорных невропатий // Ультразвукова перинатальна діагностика. – 2007. – № 23-24. – С. 3-10.
7. Гречанина О.Я., Гречанина Ю.Б., Маталон Р. Порушення обміну метионіну та репродуктивні втрати (I частина) / //Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2009.- Т.71, №4. - С. 69-74.

8. Гречанина Е.Я., Маталон Р., Гречанина Ю.Б. и др. Наследственные нарушения обмена серосодержащих аминокислот // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2009. - №54(1). – С.53-61.
9. Гречанина Ю.Б. Діагностичні критерії симптоматичних епілепсій, що сполучаються із хромосомними порушеннями: Автореф. дис... к-та мед. наук. – К., 2005. – 18с.
10. Лебедев И.Н., Саженова Е.А. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. 2008. Т.44. № 10. С. 1356-1373.
11. Малярчук Б.А. CG-метилирование и мутагенез митохондриальной ДНК человека // Молекулярная Биология. - 1995. - Т.29. - Вып.2. - С.281-286.
12. Назаренко С.А. Эпигенетические модификации генома и болезни человека Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Под ред.. В.П. Пузырева, А.Б.Масленникова. – Вып.7. – Новосибирск: Альфа Виста, 2005. 240 с.
13. Назаренко С.А. Эволюционная биология. Материалы II Международной конференции "Проблема вида и видообразование". Томск: Томский государственный университет, 2002 - Т. 2. - С. 82-93.
14. Озолина Л.А., Ефимов В.С., Абдулраб А.С., Смирнова Е.Н., Чеховская Д.А., Кашежева А.З. Гипергомоцистеинемия и акушерская патология // Российский вестник акушера-гинеколога. 2003. Т. 3. №4. С. 26–29.
15. Самохвалов В.П. Психиатрия. Учебное пособие для студентов медицинских вузов 2003. 576 с.
16. Фетисова И.Н. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / Фетисова И.Н., Добролюбов А.С., Липин М.А., Поляков А.В. // Вестник новых медицинских технологий – 2007. – Т. X, № 1.
17. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Воинова-Улас В.Ю., Виллард Л., Демидова И.А., Жианти Л., Джовануччи-Узиелли М.-Л., Будилов А.В., Берешева А.К., Новиков П.В., Юров Ю.Б. Эпигенетические исследования синдрома Ретта как адекватной одели аутистических расстройств // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. 2005. Т. 105. №7. С.4-11.
18. Юров И.Ю., Виллард Л., Ворсанова С.Г. и др. Особенности инактивации хромосомы X у женщин старше 70 лет // Цитология и генетика. – 2004. – Т.4. С.49-54.
19. Amir R. E., Van den Veyver I. B. et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2// Nature Genet. – 1999. - Vol.23. – P. 185-188.
20. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B₁₂) Increases Risk for Spina Bifida / A. Wilson, R. Platt, Q. Wu [et al.] // Mol Genet Metab. – 1999. – Vol.67. - P.317-323.
21. Anvert M., Wahlstrom J. et al. Segregation analysis of the X-chromosome in a family with Rett syndrome in two generations// Americ. J. of medical genetics. — 1990. — Vol. 37. — P. 31-35.
22. Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented endstage renal disease patients undergoing hemodialysis/ W. Anwar, J.L. Gueant, I. Abdelmoutaleb [et al.] //Clin Chem Lab Med. – 2001. – Vol.39. – P.747–752.
23. Belichenko P. V., Hagberg B., Dahlstrom A. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome//Acta neuropathol. – 1997. – Vol. 93. – P. 50-61.
24. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 6-21.
25. Botto L.D. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review / Botto L.D, Yang Q. // Am. J. Epidemiol. – 2000. – Vol.151. – P. 862-877.
26. Boyes J., Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein// EMBO J. - 1992.- Vol.11.- P.327—333.

27. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. J.Chen, M.J.Stampfer, J.Ma [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol.154. – P.667–672.
28. Craig J. M. Heterochromatin—many flavours, common themes // *Bioessays*. - 2004. - Vol.27. P.17—28.
29. Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men / V. Dekou, V. Gudnason, E. Hawe [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2001.- Vol.85. – P.67–74.
30. Genetic Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), Methionine Synthase Reductase (MTRR), and Reduced Folate Carrier-1 (RFC-1) in a High Neural Tube Defect Risk Population / Grechanina E., Matalon R.K., Holmse B.B. [et al.] // *J. Inherit. Metab.Dis.* – 2007. – Vol.30, № 1.- P.30.
31. Doerfler W. Jost J.P., Saluz H.P. In *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*// BirkhauserVerlag, Basel. 1993. P. 262-299.
32. Eeg-Oloofsson O., Al-Zuhair A. G. H., Teebi A. S., Al-Essa M. M. N. Rett syndrome: Genetic clues based on mitochondrial changes in muscle // *Amer. J. Med. Genet.* 1989. № 32. P. 142-144.
33. Ellaway C. J., Sholler G., Leonard H. et al. Prolonged QT interval in Rett syndrome // *Arch. Dis. Child.* - 1999. - Vol.80. P.470-472.
34. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. (Letter) / Frosst P., Blom H.J., Milos R. [et al.] // *Nat Genet.* – 1995. – Vol.10. – P.111–113.
35. Hagberg B., Skjeldal O.H. Rett variants: a suggested model for inclusion criteria // *Pediat. Neurol.* 1994. № 11. P. 5-11.
36. Hammer S., Dorrani N. et al. Rett syndrome in a 47,XXX patient with a de novo MECP2 mutation // *Am. J. Med. Genet.* - 2003.- Vol. 122A. – P.223-226.
37. Hobbs C.A. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.*– 2000.– Vol. 67.– P. 623–630.
38. Hoffbuhr K., Devaney J.M., LaFleur B. et al. MECP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome // *Neurology*. – 2001. - Vol.56. - P.1486-1495.
39. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects // *Science*.1987. V. 238. P. 163-170.
40. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects / H. Zhu, N.J.Wicker, G.M. Shaw [et al.] // *Mol Genet Metab.* – 2003. – Vol.78. – P.216-221.
41. Huppke P., Laccone F., Kramer N. et al. Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients// *Hum. Mol. Genet.* – 2000. - Vol. 9(9). P.1369-1375.
42. Jablonka E., Lamb M. Epigenetic inheritance systems // *Evolution in Four Dimensions* / Eds Jablonka E., Lamb M. MIT Press, 2005. P. 242-265.
43. Jost J. P., Hofsteenge, J. The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially in vitro and in vivo to methylated nonspecific DNA sequences// *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* -1992. - Vol.89. – P. 9499-9503.
44. Kankirawatana P., Leonard H., Ellaway C., et al. Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations // *Neurology*. – 2006. - Vol.67(1). P. 164-166.
45. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V.3. P. 662-673.
46. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. / J. Ma, M.J. Stampfer, B. Christensen [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1999.- Vol.8. – P.825–829.
47. Moog U., Smeets E. E. et al. Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2) // *Europ. J. Paediat. Neurol.* - 2003. Vol. 7. P.5-12.
48. Miltenberger-Miltenyi G., Laccone F. Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2 // *Hum. Mutat.* – 2003. - Vol.22(2). – P. 107-115.
49. Noyer-Weidner M., Trautner T. A. Methylation of DNA in prokaryotes // *EXS.*- 1993. - Vol.64. – P.39-108.

50. Neural tube defects and folate: case far from closed / H.J. Blom, G.M Shaw., M. den Heijer, R.H. Finnell //Nat Rev Neurosci. – 2006. – Vol. 7. – P.724-731.
51. Rett A. Rett syndrome: history and general overview // Am. J. Med. Genet. - 1986. - Vol.1. P. 21-25.
52. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) / Rozen R. //Thromb Haemost – 1997. – Vol.78. – P.523–526.
53. High Prevalence of MTHFR Gene A1298C Polymorphism in Lebanon / A.S. Sabbagh, Z.Mahfoud [et al.] //Genetic Testing. -2008.-Vol.12, № 1. - P.75–80.
54. Sharp L. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review / Sharp L., Little J. // Am. J. Epidemiol. – 2004. – Vol. 159. – P. 423–443.
55. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women / M.L. Silaste, M. Rantala, M. Sampi [et al.] //J Nutr. – 2001. – Vol.131. – P.2643–2647.
56. Smit A.F.A. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes //Curr. Opin. Genet. Dev. - 1999. - Vol. 9. - P.657-663.
57. Topcu M., Akyerli C.et al. Somatic mosaicism for a MECP2 mutation associated with classic Rett syndrome in a boy// Europ. J. Hum. Genet. - 2002.- Vol. 10. – P.77-81.
58. Van den Veyver I. B., Subramanian S., Zoghbi H. Y. Genomic structure of a human holocytochrome c-type synthetase gene in Xp22.3 and mutation analysis in patients with Rett syndrome // Am. J. Med. Genet.- 1998. - Vol.78 – P.179-181.
59. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease./ N.M.J. van der Put, E.F. van der Molen, L.A.J. Kluijtmans [et al.] //QJM. – 1997.-Vol.90. – P.511–517.
60. Villard L., Levy N., Xiang F. et al. Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without MECP2 mutation: implication for the disease// J. Med. Genet. – 2001. Vol. 38. – P.435-442.
61. Weaving L.S., Williamson S.L., Bennetts B. et al. Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype// Am. J. Med. Genet. – 2003. - Vol.118A.- P.103-114.
62. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity / I. Weisberg, P.Tran, B. Christensen [et al.] // Mol Genet Metab. – 1998. – Vol.64. – P.169–172.
63. Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenic parasites// Trends Genet. - 1997. - Vol. 13. - P. 335-340.
64. Zapella M. The Rett girls with preserved speech// Brain & Development. — 1992. — Vol. 14. — P. 98-101.
65. Zetterberg H. [et al.] // Thromb. Res.– 2002.– Vol.108.– P.127–131.
66. Zogel C., Bohringer S., Gross S. et al. Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15 // Eur. J. Hum. Genet. 2006. V. 14. №6. P. 752-758.

РЕЗЮМЕ

Исследование последних лет свидетельствуют о важности процесса метилирования в этиологии и патогенезе многих наследственных заболеваний, что открывает новые возможности их лечения. В работе обсуждается гипотеза – дефицит ферментов генов фолатного цикла сопровождается, в частности, недостатком метильных групп, что в свою очередь, оказывает влияние на эпигенетический статус, приводя к запуску эпимутаций и как следствие – манифестации некоторых эпигенетических и онкогенетических синдромов. На большом клиническом материале с использованием методов клинической протеогеномики показана роль дефицита ферментов фолатного цикла и гипометилирования в манифестации некоторых форм моногенной и хромосомной патологии.

Ключевые слова: эпигенетическая болезнь, метилирование ДНК, ферменты фолатного цикла, дефицит.

РЕЗЮМЕ

Дослідження останніх років свідчать про важливість процесу метилювання в етіології і патогенезі багатьох спадкових захворювань, що відкриває нові можливості їх лікування. В роботі обговорюється гіпотеза – дефіцит ферментів генів фолатного циклу супроводжується, зокрема, недоліком метильних груп, що у свою чергу, робить вплив на епігенетичний статус, приводячи до запуску епімутацій і як наслідок – маніфестації деяких епігенетичних і онкогенетичних синдромів. На великому клінічному матеріалі з використанням методів клінічної протеогеноміки показана роль дефіциту ферментів фолатного циклу і гіпометилювання в маніфестації деяких форм моногенної і хромосомної патології.

Ключові слова: епігенетична хвороба, метилювання ДНК, ферменти фолатного циклу, дефіцит.

SUMMARY

Studies of recent years shows the importance of methylation at the etiology and pathogenesis of many inherited diseases, which opens up new possibilities of their treatment. We discuss the hypothesis - enzyme deficiency gene of folate cycle is accompanied by the lack of methyl groups, which affects the epigenetic status, leading to the launch of epimutation and as a result - the manifestation of some epigenetic and oncogenetic syndromes. Large clinical material with using of methods of clinical proteogenomics shows the role of enzymes deficiency of folate cycle and hypomethylation in the manifestation of some forms of monogenic and chromosomal pathology.

Key words: epigenetic disease, DNA methylation, enzymes, folate cycle deficiency.