

КОНЦЕНТРАЦИЯ ГОМОЦИСТЕИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ С МУТАЦИЯМИ С677Т (ALA 222 VAL) В ГЕНЕ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (MTHFR) и A2756G (ASP 919 GLY) В ГЕНЕ МЕТИОНИН-СИНТАЗЫ (MTR)

**Суховольская М. А.,
научные руководители канд. биол. наук, доц. Субботина Т. Н., канд. мед. наук,
доц. Ольховский И. А.
Сибирский федеральный университет**

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения являются главной причиной заболеваемости, инвалидизации и смертности населения всех развитых стран. Это заставляет искать новые возможности прогнозирования, оценки риска, диагностики, профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений.

На основании экспериментальных работ, проведенных в последние годы, сформировалось представление о неблагоприятном влиянии избытка гомоцистеина на механизмы, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, обмене липидов и коагуляционном каскаде. Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, являющаяся промежуточным продуктом обмена метионина и цистеина. Единственным источником его поступления в организм является незаменимая аминокислота метионин, содержащаяся в продуктах животного происхождения. В организме человека гомоцистеин образуется из метионина путем деметилирования.

В течение жизни уровень гомоцистеина в плазме крови постепенно повышается. У взрослого человека он колеблется от 5 до 15 мкмоль/л, составляя в среднем 10 мкмоль/л, причем у мужчин этот показатель выше, чем у женщин примерно на 2 мкмоль/л. При беременности концентрация гомоцистеина снижается примерно на 50% от исходного уровня. Это, возможно, является адаптационным механизмом, способствующим улучшению маточно-плацентарного кровотока.

В норме гомоцистеин, как один из важнейших метаболитов, накапливается в клетке в небольших количествах. Нарушения метаболизма гомоцистеина приводят к увеличению его содержания внутри клетки и соответствующему повышению его уровня в плазме крови. Избыточное накопление гомоцистеина внутри клеток может нанести им непоправимый вред (повреждение ДНК, нарушение деятельности клетки, вплоть до гибели).

Повышение содержания гомоцистеина в плазме трактуется как умеренная (16-30 мкмоль/л), средняя (31-100 мкмоль/л) и тяжелая, или выраженная (более 100 мкмоль/л) гипергомоцистеинемия. Гипергомоцистеинемия встречается в популяции с частотой 5–10%.

Гомоцистеин в избыточной концентрации способен оказывать токсическое воздействие на эндотелий сосудов, что обуславливает его участие как тромбогенного фактора в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Гипергомоцистеинемия также является одной из причин болезни Альцгеймера, привычного невынашивания беременности и врожденных патологий плода.

Уровень гомоцистеина в сыворотке крови может обуславливаться особенностями питания, в частности, недостаточным поступлением с пищей фолиевой кислоты, витаминов В₆ и В₁₂, диетой обогащенной метионином, употреблением кофе, а также приемом ряда медикаментов и курением. Повышение уровня гомоцистеина в плазме крови с возрастом связывают со снижением функции почек или с нарушением

всасывания в кишечнике витамина В₁₂. Известны наследственные особенности обмена метионина и гомоцистеина.

Наиболее распространенным ферментным дефектом является мутация в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR). Этот фермент обеспечивает превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, активную форму фолиевой кислоты, которая способствует превращению гомоцистеина в метионин, снижая тем самым концентрацию гомоцистеина в плазме крови.

Наиболее клинически значимым полиморфизмом гена МТНFR является вариант, при котором происходит замена аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата (полиморфизм С677Т (Ala222Val) гена МТНFR). В результате мутации образуется вариант фермента с порогом термолабильности 55°С, обладающий вдвое сниженной активностью. У гомозигот по Т-аллелю активность фермента *in vitro* снижена на 70%, а у гетерозигот – на 35%. При снижении активности МТНFR нарушается доставка и метаболизм фолиевой кислоты, что приводит к накоплению гомоцистеина в плазме крови и развитию гипергомоцистеинемии.

Одним из важнейших ферментов фолатного обмена является метионин-синтаза (МTR). Этот цитоплазматический фермент катализирует реакцию метилирования гомоцистеина с превращением его в метионин с использованием 5-метилтетрагидрофолата в качестве донора метильной группы, тем самым снижая концентрацию гомоцистеина в крови. Для работы фермента необходим метилкобаламин, производное витамина В₁₂. Ген, кодирующий структуру фермента МTR, локализован на длинном плече 1-ой хромосомы в 43 локусе. Он содержит большое число описанных мутаций, нарушающих обмен гомоцистеина. Активность метионин-синтазы зависит от другого фермента – метионин-синтазы-редуктазы (МТРR). Наиболее клинически значимым, однако до сих пор слабо изученным, является полиморфизм А2756G (Asp919Gly) гена МTR.

В настоящее время обсуждается целесообразность скрининга населения на носительство мутаций ферментов обмена метионина с целью разработки индивидуальных профилактических программ.

Целью настоящей работы явилось определение зависимости концентрации гомоцистеина в сыворотке крови клинически здоровых людей от наличия мутаций С677Т (Ala222Val) в гене МТНFR и А2756G (Asp919Gly) в гене МTR. Проводимое исследование было одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России.

В качестве объекта исследования использовалась сыворотка крови и геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови. Группу обследованных составили 107 добровольцев (58 женщин и 49 мужчин в возрасте от 16 до 71 лет, средний возраст составил 28,86 лет), находящихся на своей обычной диете и не имеющих на момент исследования клинических проявлений сердечно-сосудистой патологии.

Материалы и методы. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводилось с использованием реагентов «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс-РВ» (НПФ Литех) на амплификаторе iCycler iQ5 (BioRad). Определение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови проводилось энзиматическим методом с использованием комплекта реагентов Homocysteine FS (DyaSis) на автоматическом биохимическом анализаторе

Sapphire-400. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statistica 7.0 и электронных таблиц Microsoft Office Excel 2007.

Результаты. В общей группе добровольцев (107 человек) мутация С677Т (Ala222Val) в гене МТНFR выявлена у 12 человек (11,2%) в гомозиготном состоянии, 44 (41,1%) имели гетерозиготное состояние мутантного гена у 51 (47,7%) мутация не выявлена. Во всех образцах сыворотки крови, соответствующих пробам анализируемых ДНК было проведено определение концентрации гомоцистеина (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость концентрации гомоцистеина в сыворотке крови от наличия мутации С677Т (Ala222Val) в гене МТНFR

Показатель	Нормальные гомозиготы n=51		Гетерозиготы n=44		Мутантные гомозиготы n=12		
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	
Гомоцистеин, мкмоль/л	16,20	13,90 - 19,60	16,75	15,40 - 20,55	21,35	18,95 - 32,80	
						P ₁ <0,001; P ₂ =0,005	

Показано статистически достоверное увеличение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови у людей, имеющих гомозиготное состояние мутантного гена, как по сравнению с людьми, не имеющими мутацию (P₁<0,001), так и по сравнению с людьми, имеющими гетерозиготное состояние мутантного гена (P₂=0,005). Таким образом, люди, имеющие мутацию С677Т (Ala222Val) в гене МТНFR, входят в потенциальную группу генетического риска развития гипергомоцистеинемии, и, как следствие, патологий, к которым она может привести.

При обследовании на наличие мутации А2756G (Asp919Gly) в гене МTR в общей группе добровольцев (104 человека) мутация А2756G (Asp919Gly) в гене МTR выявлена у 3 человек (2,88%) в гомозиготном состоянии, 30 (28,85%) имели гетерозиготное состояние мутантного гена у 71 (68,27%) мутация не выявлена. Во всех образцах сыворотки крови, соответствующих пробам анализируемых ДНК, было проведено определение концентрации гомоцистеина (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость концентрации гомоцистеина в сыворотке крови от наличия мутации А2756G (Asp919Gly) в гене МTR

Показатель	Нормальные гомозиготы n=71		Гетерозиготы n=30		Мутантные гомозиготы n=3		
	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	Me	C ₂₅ -C ₇₅	
Гомоцистеин, мкмоль/л	17,80	14,80 - 21,70	16,90	15,80 - 19,30	12,00	9,50 - 15,90	
						P ₁ =0,045; P ₂ =0,033	

Было показано статистически достоверное уменьшение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови у людей, имеющих гомозиготное состояние мутантного гена, как по сравнению с людьми, не имеющими мутацию (P₁=0,045), так и по сравнению с людьми, имеющими гетерозиготное состояние мутантного гена

($P_2=0,033$). Таким образом, мутацию A2756G (Asp919Gly) в гене MTR можно рассматривать в качестве протективной в отношении развития гипергомоцистеинемии.

Мы предположили, что мутация A2756G (Asp919Gly) в гене MTR может частично компенсировать повышение уровня гомоцистеина, обусловленное гомозиготным носительством мутации C677T (Ala222Val) в гене MTHFR. И действительно, подобные тенденции наблюдаются. Ниже представлена зависимость концентрации гомоцистеина в сыворотке крови от наличия сочетания мутаций в генах MTHFR и MTR (табл.3).

Таблица 3. Зависимость концентрации гомоцистеина в сыворотке крови от сочетания мутаций C677T (Ala222Val) в гене MTHFR и A2756G (Asp919Gly) в гене MTR

MTHFR	MTR		Гомоцистеин, мкмоль/л
Нормальные гомозиготы	Нормальные гомозиготы n=31	Me	16,00
		C ₂₅ -C ₇₅	14,10 - 19,90
	Гетерозиготы n=16	Me	17,60
		C ₂₅ -C ₇₅	14,25 - 19,60
	Мутантные гомозиготы n=1	Me	9,50
		C ₂₅ -C ₇₅	9,50 - 9,50
Гетерозиготы	Нормальные гомозиготы n=29	Me	18,00
		C ₂₅ -C ₇₅	15,00 - 21,80
	Гетерозиготы n=13	Me	16,60
		C ₂₅ -C ₇₅	16,20 - 17,30
	Мутантные гомозиготы n=2	Me	13,95
		C ₂₅ -C ₇₅	12,00 - 15,90
Мутантные гомозиготы	Нормальные гомозиготы n=11	Me	22,10
		C ₂₅ -C ₇₅	18,80 - 37,90
	Гетерозиготы n=1	Me	19,10
		C ₂₅ -C ₇₅	19,10-19,10
	Мутантные гомозиготы n=0	Me	-
		C ₂₅ -C ₇₅	-

По результатам статистической обработки полученных данных в группе людей, не имеющих мутацию C677T (Ala222Val) в гене MTHFR, нет статистически достоверных различий между нормальными гомозиготами, гетерозиготами и мутантными гомозиготами по мутации A2756G (Asp919Gly) в гене MTR. Аналогичная ситуация наблюдается и в группах гетерозигот и мутантных гомозигот по мутации C677T (Ala222Val) в гене MTHFR. Людей с сочетанием мутаций в обоих генах не было выявлено. Отсутствие статистически значимых различий может быть связано с недостаточной большой выборкой.

Таким образом, проведение генетического исследования на наличие мутаций в генах, кодирующих ферменты фолатного цикла, в молодом возрасте позволяет выделить потенциальную группу генетического риска развития гипергомоцистеинемии и предложить комплекс профилактических мер с целью уменьшения фенотипического проявления мутации и снижения риска развития тромбогенной патологии. Использование информации об индивидуальных генетических особенностях конкретных пациентов важно для более точной диагностики и назначения наиболее оптимальных методов профилактики и лечения.