

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії та екології
Кафедра біології людини та імунології**

**АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНИХ ПІДХОДІВ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА КОРЕКЦІЇ МЕТИЛМАЛОНОВОЇ АЦИДУРІЇ**

Кваліфікаційна робота (проект)
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконав: здобувач 211М групи
спеціальності 091 Біологія
Освітньої програми Біологія
Сизов Володимир Петрович

Керівник к.б.н., доцент Гасюк О.М.
Рецензент: доктор біологічних наук,
професор Волинського національного
університету ім. Лесі Українки
Чернозуб А.А.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел	5
1.1. Метилмалонова ацидурия як спадкове метаболічне захворювання.....	5
1.1.1. Етіологія метилмалонової ацидурії.....	5
1.1.2. Патогенез метилмалонової ацидурії.....	6
1.1.3. Діагностика метилмалонової ацидурії.....	9
1.2. Основні методи генетичної діагностики спадкових метаболічних захворювань.....	13
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	21
2.1. Організація дослідження	21
2.2. Методика проведення генетичного аналізу спадкових хвороб	22
РОЗДІЛ 3. Аналіз та обговорення отриманих результатів	30
3.1. Корекція результатів генетичного аналізу	30
3.2. Корекція з використанням генних технологій.....	36
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ВСТУП

Актуальність дослідження. Метилмалонова ацидурія є досить важким спадковим захворюванням, тож пошук шляхів її диференційної діагностики є важливою задачею як у теоретичному, так і у практичному сенсі. Теоретично це поглиблює наші знання про спадкові хвороби, а практично – дозволяє робити пошук шляхів корекції означених мутацій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана кваліфікаційна робота виконана в межах роботи над ініціативною науково-дослідною темою «Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження» (державний реєстраційний номер 0119U101093).

Мета дослідження. Провести аналіз генетичних варіантів для диференційної діагностики метилмалонової ацидурії та корекції визначених мутацій.

Завдання дослідження:

1. Визначити які метаболічні процеси в організмі впливають на виникнення та розвиток метилмалонової ацидурії.
2. Встановити зв'язок цих процесів та генами, які кодують відповідні білки.
3. Розглянути класифікацію метилмалонової ацидурії, яка пов'язана з обігом та перетворенням кобаламіну в організмі людини.
4. Визначити можливості корекції дефектів метаболізму через виявлення мутацій окремих генів.

Об'єкт дослідження. Генетичні варіанти метилмалонової ацидурії.

Предмет дослідження. Аналіз генетичних варіантів метилмалонової ацидурії для диференційної діагностики та корекції.

Методи дослідження. Аналітичний огляд наукових джерел, аналіз та узагальнення інформації, робота з базами даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримано нові дані щодо можливості проведення корекції метилмалонової ацидурії як результат детального вивчення мутацій генів.

Практична значущість результатів дослідження. Дані, отримані в результаті дослідження будуть застосовуватися для поширення діагностування спадкових захворювань.

Апробація результатів дослідження. Результати, отримані в ході виконання кваліфікаційної роботи представлені на звітній студентській конференції на кафедрі біології людини та імунології у 2022 році.

Структура роботи. Робота складається з трьох розділів, вступу, висновків, списку використаних джерел. У роботі присутні 5 рисунків і 2 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Метилмалонова ацидурія як спадкове метаболічне захворювання

1.1.1. Етіологія метилмалонової ацидурії. Метилмалонова кислота ($C_4H_6O_4$) є похідною маленової кислоти, яка є важливим проміжним продуктом у метаболізмі жиру та білка (рис. 1.1).

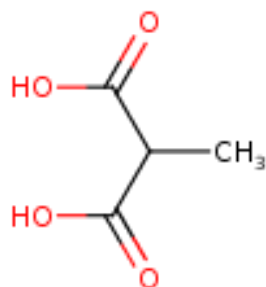


Рис. 1.1. Структурна формула метилмалонової кислоти

Зокрема, зв'язана з коферментом А форма метилмалонової кислоти, метилмалоніл-КоА, перетворюється на сукциніл-КоА мутазою метилмалоніл-КоА в реакції, яка потребує вітаміну В₁₂ як кофактора. Таким чином метилмалонова кислота потрапляє в цикл Кребса. Ця реакція відбувається в мітохондріях.

Порушення метаболізму метилмалонової кислоти призводять до метилмалонової ацидемії (ацидурії). Ця вроджена помилка метаболізму пояснюється блокуванням ферментативного перетворення метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА. Важливим фактором є наявність в мітохондріях необхідної кількості кобаламіну (вітамін В₁₂). Вітамін В₁₂ не виробляється в організмі, а може бути отриманий лише з їжею.

Метилмалонова кислота також виявилася пов'язаною з іншими вродженими порушеннями метаболізму, включаючи дефіцит

кобаламіну, мальабсорбцію кобаламіну, дефіцит малоніл-КоА-декарбоксилази та дефіцит транскобаламіну II. [2]

1.1.2. Патогенез метилмалонової ацидурії. Метилмалонова ацидурія (ацидемія) (ММА) є аутосомно-рецесивним метаболічним розладом, при якому організм не в змозі належним чином переробляти певні білки та жири (ліпіди). Дві копії гена — по одній від кожного з батьків, мають бути успадковані, щоб у дитини проявилось захворювання. Батьки дитини є носіями однієї копії дефектного гена, зазвичай не страждають від розладу.

Метилмалонова ацидурія може бути спричинена мутаціями у кількох генах. Пацієнтів можна розділити на дві групи - пацієнти з ізольованою ММА, де підвищена лише метилмалонова кислота, та пацієнтів з комбінованими вадами, які також мають підвищений рівень гомоцистеїну.

Ізольована метилмалонова ацидемія спричинена мутаціями у генах ММАА, ММАВ, МСЕЕ та MUT. Близько половини пацієнтів з ізольованою метилмалоновою ацидемією мають мутації гену MUT. Цей ген кодує фермент під назвою метилмалоніл-КоА-мутаза, який відповідає за етап розщеплення кількох амінокислот, певних ліпідів і холестерину. Мутації в гені MUT змінюють структуру або зменшують кількість ферменту, що перешкоджає належному розщепленню цих молекул. У результаті речовина під назвою метилмалоніл-КоА та інші потенційно токсичні сполуки можуть накопичуватися, викликаючи ознаки та симптоми метилмалонової ацидурії.

Пацієнтів з метилмалоновою ацидемією, які мають мутації в гені MUT, зазвичай поділяють на дві групи. Коли мутації в гені MUT призводять до відсутності активності ферменту, пацієнтів класифікують як «mut0». Коли мутації в гені MUT змінюють структуру метилмалоніл-

CoA-мутази, але не усувають її активність повністю, пацієнтів позначають як «mut-». Крім того, пацієнти, які класифікуються в групу «mut-», можуть мати клінічно більш легку форму захворювання.

Ізольована метилмалонова ацидемія також може бути викликана мутаціями принаймні трьох інших генів. Тип кобаламіну А (cblA) метилмалонової ацидемії спричинений мутаціями в гені MMAA. Тип кобаламіну В (cblB) метилмалонової ацидемії спричинений мутаціями гена MMAB. Обидва ці стани схожі на пацієнтів, які мають «mut0» метилмалонову ацидемію. Однак, більшість пацієнтів із cblA та cblB демонструють клінічне та метаболічне покращення при прийомі добавки з формою вітаміну В₁₂ (гідроксикобаламіну). Ген MCEE кодує фермент метилмалоніл-CoA-епімераза, який перетворює D-метилмалоніл CoA в L-метилмалоніл CoA. Мутації в цьому гені також викликають ізольовану метилмалонову ацидемію (рис. 1.2).

Ген CD320 кодує рецептор транскобаламіну, який функціонує на поверхні клітини. Він опосередковує клітинне поглинання кобаламіну.

Дефіцит кобаламіну C (cb1C) викликають мутації в генах MMADHC і MMACHC, які кодують білки, що відіграють роль у внутрішньоклітинному транспортуванні кобаламіну.

Дефіцит cb1D і cb1F викликають мутації в генах ABCD4 і LMBRD1. Білок ABCD4 міститься в мембрані, яка оточує лізосоми. У лізосомальній мембрані білок ABCD4 взаємодіє з білком під назвою LMBD1 (виробляється з гена LMBRD1). Разом ці два білки транспортують вітамін B12 з лізосом, роблячи його доступним для подальшої переробки в AdoCbl і MeCbl.

Інші гени, мутації яких призводять до комбінованої метилмалонової ацидурії:

- ген HCFC1 (фактор клітини-господаря C1) кодує білок, який бере участь у контролі клітинного циклу.
- ген ALDH6A1 кодує білок який каталізує необоротне окислювальне декарбоксілювання напівальдегідів малонату та метилмалоната до ацетил- та пропіоніл-КоА.
- ген SUCLA2 кодує мітохондріальний фермент сукциніл-КоА-синтетазу, який є важливим компонентом циклу Кребса, приймає участь у перетворенні сукцинату на сукциніл-КоА.
- ген SUCLG1 забезпечує інструкції для створення альфа-субодиниці, ферменту під назвою сукцинат-КоА-лігаза. У мітохондріях цей фермент приймає участь у циклі Кребса.
- ген ACSF3 кодує фермент, який в мітохондріях перетворює малонову кислоту в малоніл-КоА, що є першим етапом синтезу жирних кислот, і метилмалонову кислоту в метилмалоніл-КоА. На основі цієї активності фермент класифікується як малоніл-КоА-синтетаза або як метилмалоніл-КоА-синтетаза.

1.1.3. Діагностика метилмалонової ацидурії. Метилмалонова ацидемія зазвичай спричинена дефіцитом ферменту метилмалоніл-КоА-мутази, дефектом транспорту або синтезу його кофактора - аденозилкобаламіну (cblA, cblB, cblC, cblF, cblD та cblX), або дефіцитом ферменту метилмалоніл-КоА-епімерази. Комплексний діагностичний підхід включає дослідження метаболітів за допомогою тандемної мас-спектрометрії, аналіз органічних кислот за допомогою газової хроматографії, ферментативні дослідження з культурою клітин фібробластів і, нарешті, аналіз мутацій.

Термін «ізолювана метилмалонова ацидурія» відноситься до групи вроджених порушень метаболізму, пов'язаних із підвищеною концентрацією метилмалонової кислоти у крові та сечі, що виникає внаслідок нездатності перетворити метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА під час метаболізму пропіоніл-КоА в мітохондріальному матриксі, без гіпергомоцистеїнемії або гомоцистинурії, гіпометіонінемії або варіацій інших метаболітів, таких як малонова кислота. Ізолювана метилмалонова ацидурія спричинена повним або частковим дефіцитом ферменту метилмалоніл-КоА-мутази (класифікується як ферментативний підтип mut0 або ферментативний підтип mut- відповідно), дефектом транспорту або синтезу його кофактора - аденозилкобаламіну. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1231/>)

У відповідності до Наказу Міністерства охорони здоров'я України від 01.10.2021 № 2142 «Про забезпечення розширеного неонатального скринінгу в Україні» [5] діагностування метилмалонової ацидурії проводиться по метаболіту С3 (пропіонілкарнітин) у сухих краплях крові. Референсні значення для терміну гестації 27-36 тижнів - 0,1-3,7 мкмоль/л; для терміну гестації 37-40 тижнів - 0,2-4,8 мкмоль/л.

Оскільки пропіонілкарнітин є одним із метаболітів, який найчастіше відповідає за хибнопозитивні результати, в США рекомендовано враховувати співвідношення, включаючи C3/C2, C3/C0, C3/C16, C3/гліцин або C3/метіонін, в поєднанні з високою концентрацією C3 в крові як критерій прийняття рішення для «позитивного» тестування у новонароджених. [6] Пацієнти з підозрою на порушення метаболізму кобаламіну або пропіонату мають значення C3 більше 7 мкмоль/л і співвідношення C3:C2 більше 0,2; однак, такий скринінг не може відрізнити метилмалонову ацидурию від пропіонової ацидурії. [7]

У випадку позитивного тесту виконується ряд уточнювальних обстежень: повторне дослідження рівня діагностичних аналітів у капілярній крові, плазмі та сечі. [8] Проводиться тестування на метилмалонову кислоту, 2-метилцитрат і загальний гомоцистеїн для відокремлення ізольованої метилмалонової ацидурії від пропіонової ацидемії і захворювань, що призводять до комбінованої метилмалонової ацидурії.

У випадку ізольованої метилмалонової ацидурії подальше біохімічне тестування після аномального C3 зазвичай демонструє: підвищений рівень метилмалонової кислоти у плазмі; підвищені рівні метилмалонової кислоти в сечі та присутність 3-гідроксипропіонату, 2-метилцитрату та тиглілгліцину в органічних кислотах сечі; підвищені концентрації гліцину та, можливо, аланіну з нормальним метіоніном на амінокислоти плазми; підвищення рівня C4-дикарбонової кислоти в плазмі; підвищення рівня аміаку в плазмі; нормальний рівень B₁₂ і гомоцистеїну в плазмі.

Хронічно високий рівень метилмалонової кислоти пов'язаний із принаймні 5 вродженими порушеннями метаболізму, включаючи дефіцит малоніл-КоА-декарбоксилази, малонову ацидурию, дефіцит

метилмалонат-семіальдегіддегідрогенази, метилмалонову ацидурию та метилмалонову ацидурию через розлади, пов'язані з кобаламіном. [2]

Діагностувати метилмалонову ацидурию можливо за допомогою аналізу органічних кислот. При спадкових захворюваннях, відомих як органічна ацидемія, дефект ферменту або кофактора в метаболічному шляху призводить до накопичення та посиленого виведення одного або кількох із цих кислих метаболітів із сечею. Таким чином, сеча людини містить численні органічні кислоти та інші хімічні сполуки в різних концентраціях, і аналіз органічних кислот сечі став важливим інструментом для лабораторій, які беруть участь у діагностиці цих спадкових метаболічних розладів. У пацієнтів з ММА виявляють збільшення екскреції метилмалонової кислоти з сечею (рис. 1.3).

Крім того, профіль органічних кислот дозволяє оцінити метаболічні порушення на основі їх відносин один до одного як попередників або продуктів. Таким чином, ретельне врахування невеликих змін у співвідношенні органічних кислот має важливе значення для точної діагностики та оптимального лікування для прогнозу після лікування на додаток до кількісного визначення органічних кислот.

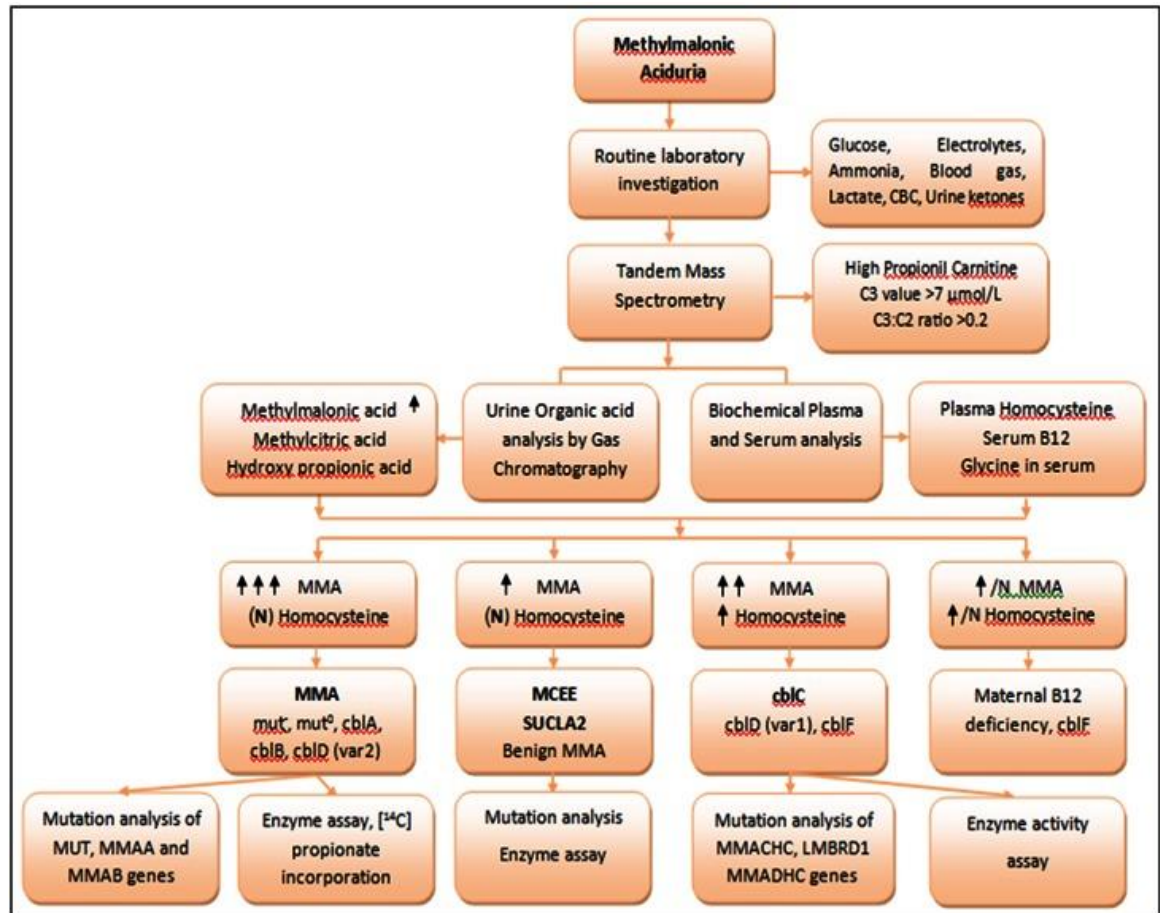


Рис 1.3. Блок-схема для різних етапів діагностики MMA [7]

Застосування газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ-МС) є важливим методом діагностики вроджених порушень ліпідного, амінокислотного та вуглеводного обміну. За допомогою попередньої обробки зразків сечі уреазою та інших методологічних удосконалень ГХ-МС було застосовано для одночасного аналізу численних метаболічних проміжних продуктів кількох категорій у сечі, надаючи діагностичні докази для більш ніж 130 вроджених помилок метаболізму. [7]

1.2. Основні методи генетичної діагностики спадкових метаболічних захворювань

Генетичний код – це запис всієї спадкової інформації усистематизований особливими властивостями нуклеїнових кислот, які там використовуються.

Кожне «слово» (кодон) генетичного коду має довжину 3 нуклеотиди (тобто кожна амінокислота кодується трьома нуклеотидами), які позначаються буквами: А (аденін), Т (тимін), С (цитозин), G (гуанін). В РНК замість тиміну – урацил U. Код геному вкладений в полімерний ланцюг, що складається з залишків цукру рибози і фосфорної кислоти (ДНК). ДНК з'єднуються між собою за допомогою водневих зв'язків на основі принципу комплементарності. Тобто А з'єднується з Т, а С – з G.

Початком трансляції любого будь-якого гена є кодон AUG. Закінчується ген стоп-кодонами UAA, UAG, або UAG. Для більшої надійності стоп-кодони зазвичай дублюються.

Якщо відбувається зміна ДНК, то говорять про мутації гена. Гомозиготними їх вважають коли синхронні однакові зміни сталися у двох ланцюгах ДНК, але є і гетерозиготні мутації гена, коли перестановки у складі ДНК тільки в одному із ланцюгів.

Якщо брати місцерозташувальні зміни, то мутації ДНК можна розкласифікувати на:

- моноточкові – заміна одного нуклеотиду на інший;
- вставочні – з певних причин додається певна кількість нуклеотидів;
- делеції (видалення) – вилучено певну кількість.

Мутації вставки або делеції, які призводять до зміни позицій рамки зчитування називають мутаціями зсуву рамки зчитування (frameshift mutation). Оскільки послідовність нової рамки зчитування буде повністю відрізнитися, то функцію такого білка буде утрачено.

Моноточкові мутації, які призводять до зміни кодону, що кодує іншу амінокислоту – називають міссенс мутаціями (missense mutation). Якщо точкова мутація призводить до заміни амінокислоти на аналогічну, то таку мутацію називають синонімічною (synonymous mutations).

Якщо точкова мутація приводить до утворення стоп-кодону, що приводить до синтезу укороченого білка, то таку мутацію називають нонсенс мутацією (nonsense mutation).

Різні зміни генетичного коду по-різному впливають на функцію відповідного білка. Деякі мутації призводять до повної втрати функції, інші - до зниження кількості білка, що синтезується, та мутації, що призводять до пошкодження певних клітин або органел.

На хромосомальному рівні мутації можуть бути спричинені дублюванням хромосоми, втратою великих областей, зміною орієнтації хромосомного сегменту, втратою одного із алелів, коли повинно бути 2.

Зчитування генетичного коду виконується шляхом секвенування ДНК – це набір біохімічних методів встановлення послідовності нуклеотидних основ ДНК.

Таким чином, визначення послідовності ДНК корисне як для дослідження всіх фундаментальних біологічних процесів в організмі, так і для прикладних методів.

Спадкові хвороби (захворювання) виникають як наслідок мутацій геному людини. З розвитком генетики встановлено зв'язки між генами та хворобами які вони можуть викликати. [1]

Нещодавно було винайдено та уведено до практики певну низку методів секвенування ДНК. Вони розрізняються за характеристиками і призначенням.

Ось деякі з методів секвенування ДНК:

- метод Сенгера;

- секвенування методом синтезу на ДНК-полімеразах, які знерухомлені та закріплені на у металевих чарунках на поверхні скла;
- кризьнанопопове секвенування ;
- Next-Generation Sequencing (NGS) секвенування [60].

Метод Сенгера [9]. Був розроблений ще в далекому 1977 році, але не втратив своєї актуальності. Такий метод вважають класичним. Він вимагає присутності одноланцюгової ДНК-матриці, а також наявності ДНК-праймера, нормальних dNTP (дезоксинукелотидтрифосфатів), ДНК-полімерази та модифікованих ddNTP (дідезоксинукелотидтрифосфатів), які є стоперами подовження ДНК-анцюга.

Метод Сенгера дає можливість дуже точно визначити послідовність до тисячануклеотидного фрагменту ДНК. Але метод стає надмірно затратним при великій кількості таких фрагментів.

Секвенування нового покоління (NGS) [3] - революційна методика паралельного секвенування. Вона характеризується надвисокою пропускнуою здатністю та іншими твагомими перевагами. Найчастіше маже використовуватися для визначення упорядкованого розташування нуклеотидів у геномах або певних місцях РНК чи ДНК.

Секвенування нового покоління паралельно розмножує значні ділянки ДНК з більшою пропускнуою здатністю ніж метод секвенування Сенгера. Зауважимо, що цей метод дозволяє виявити майже всі типи змін геномної ДНК (навіть зміни кількості копій, одонуклеотидні варіанти, вставки та вирізки, хромосомні аберації). Для того, щоб отримати ген, екзом або цілісний геном, метод є зручним, бо забезпечує високу роздільну здатність. За інтенсивності сигналу проводить кількісні вимірювання.

Секвенування — це метод, який використовується для визначення точної послідовності певної довжини ДНК. Можна секвенувати короткий фрагмент, весь геном або частини геному, такі як «екзом», які є областями геному, які містять інструкції для РНК (рибонуклеїнової кислоти) і білків. Залежно від регіону, певна ділянка послідовності може включати деяку кількість ДНК, яка відрізняється між індивідами, на додаток до постійних ділянок. Таким чином, секвенування можна використовувати для генотипу когось за відомими варіантами, а також для ідентифікації варіантів, які можуть бути унікальними для цієї людини.

Генотипування - це процес визначення того, якими генетичними варіантами володіє індивід. Генотипування можна проводити різними методами залежно від потрібних варіантів і наявних ресурсів. Для перегляду багатьох різних варіантів одночасно, особливо поширених варіантів, чіпи для визначення генотипу є ефективним і точним методом. Однак вони вимагають попереднього визначення певних варіантів.

Багато лабораторій, зокрема «23andMe», «AncestryDNA», «FamilyTreeDNA» та ін. використовують генотипування, а не секвенування, щоб проаналізувати ДНК. Технологія секвенування ще не просунулася до такого рівня, щоб можна було секвенувати геном цілої людини досить швидко та дешево, щоб знизити витрати для споживачів. Проекту «Геном людини», консорціуму кількох дослідницьких лабораторій, знадобилося понад 10 років, щоб секвенувати цілі геноми лише кількох людей.

Для людей із особливими потребами (наприклад, недіагностовані медичні проблеми) секвенування ставатиме все більш привабливим варіантом. На даний момент, однак, технології генотипування забезпечують ефективний і економічно ефективний спосіб оцінки генетичної варіації в окремих людей і в різних популяціях.

Після того, як лабораторія отримує зразок біоматеріалу (зазвичай використовується слина), з клітин виділяється ДНК. Потім ДНК копіюється багато разів, цей процес має назву ампліфікація. Щоб визначити генотип, ампліфіковану ДНК «розрізають» на менші частини, які потім наносять на ДНК-чіп (також відомий як мікрочіп), маленьке предметне скло з нанесеними на його поверхні фрагментами тестової послідовності, які відповідає одному з генетичних варіантів, які перевіряються. Вирізані шматочки ДНК прилипають до відповідних фрагментів ДНК. Флуоресцентна мітка на кожному фрагменті визначає, яка версія генетичного варіанту, відповідає ДНК, яка перевіряється.

Багато різних чіпів для конкретних завдань виготовляє «Illumina, Inc». (<https://www.illumina.com/>)

Аналізування результатів секвенування та генотипування проводять за порівнюючи результати з еталонним геномом людини (GRCh38, з референтного консорціуму генома, отриманого від тринадцяти анонімних добровольців, та збірка геному людини GRCh37 (hg19).

Для аналізу геномної інформації звичайно користуються базами даних National Center for Biotechnology Information (NCBI) – «Національний центр біотехнологічної інформації - організація, яка ставить за мету зробити доступною інформацію в галузі біотехнології для широкого кола користувачів» [10]. Найбільшими та найзручнішими є каталоги NCBI: dbSNP, Clinvar, PubMed.

«База даних dbSNP – містить інформацію генома, згруповану по референтному номеру SNP (rs або RefSNP) (SNP - single nucleotide polymorphism) Каталог RefSNP - це унікальна колекція поданих варіантів, які були згруповані, інтегровані та анотовані» [11]. Номери RefSNP роблять можливими великі дослідження з популяційної,

асоціативної, медичної генетики, функціональної та фармакогеноміки, еволюційної біології, точної медицини.

Каталог dbSNP анотований і пов'язаний з останньою збіркою людини та послідовностями нуклеотидів і білків RefSNP та містить понад 2 мільярдів SNP від тисяч осіб. Він може містити відкрите та комерційне програмне забезпечення та інструменти. Пов'язаний з ClinVar, PubMed, PubMedCentral, RefSeq, UCSC, EBI, TopMed та GnomAD. Є багатоцитованим.

«**PubMed** - це безкоштовний ресурс, який підтримує пошук біомедичної та наукової літератури. Доступний для громадськості в Інтернеті з 1996 року, PubMed був розроблений і підтримується Національним центром біотехнологічної інформації (NCBI) у Національній медичній бібліотеці США (NLM), розташованої в Національному інституті здоров'я (NIH)» [13].

Містить понад 33 мільйони цитат і тез біомедичної літератури. Цей ресурс не включає повний текст журнальних статей; однак посилання на повний текст часто присутні, якщо вони доступні з інших джерел, таких як веб-сайт видавця або PubMed Central (PMC).

Цитування в PubMed, в основному, походить із біомедицини та здоров'я, а також суміжних дисциплін, таких як науки про життя, поведінкові науки, хімічні науки та біоінженерія.

Цитування статей PubMed Central (PMC) є другим за величиною компонентом PubMed.

«**PMC** — це повнотекстовий архів, який містить статті з журналів, які були переглянуті та відібрані NLM для архівування (сучасні та історичні), а також окремі статті, зібрані для архівування відповідно до політики фінансування» [14].

MEDLINE [15] є найбільшим компонентом PubMed і складається переважно з цитат із журналів, відібраних для MEDLINE; статті,

проіндексовані MeSH (Медичні предметні заголовки) та кураторські з фінансовими, генетичними, хімічними та іншими метаданими.

Bookshelf – це повнотекстовий архів книг, звітів, баз даних та інших документів, пов'язаних з біомедичними, медичними та природничими науками.

Крім цього, ClinVar і dbSNP пов'язані з LitVar. [16] LitVar надає доступ до інформації про геномні варіанти з біомедичної літератури шляхом видобутку 27 мільйонів тез PubMed і понад мільйона повнотекстових статей PMC. LitVar показує результати досліджень, проведених у відділі обчислювальної біології NCBI.

І ще одна дуже важлива база даних – **OMIM**. «OMIM – це повний, авторитетний збірник людських генів і генетичних фенотипів, який є у вільному доступі та оновлюється щодня. Повнотекстові огляди з посиланнями в OMIM містять інформацію про всі відомі менделівські розлади та понад 16000 генів. OMIM зосереджується на зв'язку між фенотипом і генотипом. Він оновлюється щодня, і записи містять численні посилання на інші генетичні ресурси» [17].

Ця база даних була започаткована на початку 1960-х років доктором Віктором А. Маккусіком як каталог менделівських рис і розладів під назвою «Спадкування Менделя у людини» (MIM). У період з 1966 по 1998 рр. було опубліковано 12 книжкових видань MIM. Інтернет-версія OMIM, була створена у 1985 році в результаті співпраці Національної медичної бібліотеки та Медичної бібліотеки Вільяма Х. Уелча при Джоні Хопкінсі. Він став загальнодоступним в Інтернеті з 1987 року. У 1995 році OMIM був розроблений для всесвітньої мережі NCBI, Національним центром біотехнологічної інформації.

Ще є ряд комерційних і некомерційних організацій, які займаються аналізом геномної інформації.

Наприклад, VarSome.com [18] є розробником набору біоінформатичних інструментів для обробки та анотації даних NGS.

VarSome.com – це керований спільнотою проект, спрямований на обмін глобальним досвідом щодо варіантів генома людини. Він має пошукову систему варіантів і агреговану базу знань, що складається з понад 100 перехресних посилань, а також функціональну анотацію будь-якого варіанту в реальному часі.

VarSome.com пропонує величезну базу знань із перехресними посиланнями, що складається з понад 33 мільярдів точок даних. VarSome обробляє її і робить доступною для всієї спільноти генетиків для анотації та класифікації!

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Організація дослідження

Дослідження щодо перевірки на метилмалонову ацидурию проводять багато різних лабораторій генетичних досліджень. Так, наприклад панель лабораторії «Invitae» з метилмалонкової ацидемії та гомоцистинуриї аналізує гени, пов'язані з підвищенням рівня метилмалонкової кислоти та/або гомоцистеїну. Цей тест корисний для діагностики пацієнтів, у яких підозрюють метилмалонову ацидурию, гомоцистинурию або комбіновані дефекти метаболізму кобаламіну на основі клінічних симптомів, біохімічних аналізів або аномальних результатів скринінгу новонароджених. До тесту включено гени: ABCD4, ACSF3, ADK, ANCY, ALDH6A1, AMN, CBS, CD320, CUBN, GIF, GNMT, HCFC1, LMBRD1, MAT1A, MCEE, MMAA, MMAV, MMACHC, MMADHC, MTHFD1, MTHFR, MTR, MTRR, MMUT, PRDX1, SUCLA2, SUCLG1, TCN1, TCN2, THAP11, ZNF143. Для проведення тесту використовують як зразок 3 мл цільної крові в спеціальній пробірці. [19]

Шляхом секвенування повного геному можна отримати дані про всі гени та хромосоми. Після встановлення послідовності є можливість отримувати інформацію з даних протягом усього життя. Такий тест пропонують ще декілька лабораторій, зокрема і «Sequencing.inc». [20] Але секвенування повного геному все ще залишається дорогим та займає більше часу, ніж генотипування.

Лабораторії «23andMe» «MyHeritage» та ін. використовують генотипування для аналізу ДНК. Це означає, що розглядаються тільки конкретні місця у геномі, які обрані лабораторією. Генотипування

відрізняється від секвенування ДНК, яке розглядає кожен літер в певній ділянці ДНК. [21]

Якщо є необхідність підтвердити діагноз метилмалонової ацидурії та визначити конкретну мутацію, то доцільним буде замовити секвенування панелі генів, які можуть викликати метилмалонову ацидурію. У випадку, коли діагноз не встановлений, а є наявності деякі симптоми захворювання, і вони можуть вказувати на різні види органічних ацидурій, доцільно спочатку провести генотипування і по його результатах або підтвердити діагноз, або визначити гени для подальшого досліджування.

2.2. Методика проведення генетичного аналізу спадкових хвороб

В результаті секвенування по панелі генів, клієнту звичайно надають висновок лабораторії, де вказується щодо підтвердження або не підтвердження діагнозу. Приводиться опис виявлених варіантів патогенних SNP (single nucleotide polymorphism) - однонуклеотидний поліморфізм, якщо такі були виявлені. Деякі лабораторії надають «сирі» дані секвенування ДНК. Вони можуть існувати в різних форматах, але розроблено багато різного програмного забезпечення для перетворення одного формату в інший. Дані секвенування повного геному мають великий розмір (~ 80 ГБ), для їх обробки застосовують спеціальні центри (хмарні обчислення).

У випадку генотипування клієнт отримує «сирі» дані і деякі висновки лабораторії щодо наявних патогенних мутацій, якщо це передбачено тим пакетом, який оплатив клієнт. Для подальшого аналізу отриманих результатів, є багато мережевих ресурсів та напрацювання лікарів, які займаються діагностикою.

Розглянемо варіант тесту «FamilyTreeDNA». [22] Дані генотипування лабораторія надає в форматі CSV відповідно до збірки генома людини GRCh37. Заголовок файлу включає `RSID,CHROMOSOME,POSITION,RESULT`. `RSID` – це унікальний ідентифікатор SNP - reference single nucleotide polymorphism. `CHROMOSOME` – номер хромосоми. `POSITION` – позиція SNP в хромосомі. `RESULT` – результат тесту, який відповідає позиції SNP. Дані виглядають так:

```
RSID,CHROMOSOME,POSITION,RESULT
```

```
...
```

```
rs16830693,1,43805240,AA
```

```
rs141311765,1,43805698,TT
```

```
rs121913611,1,43805713,CC
```

```
rs149265851,1,43806166,GG
```

```
rs190674570,1,43826252,AA
```

```
rs12039931,1,43839810,AA
```

```
rs199859472,1,43868903,GG
```

```
...
```

Для того щоб перевірити їх на наявність мутації використовується шлях порівняння отриманих результатів з базами даних ClinVar, dbSNP та ін.

Виконаємо перевірку для гена `MMUT`. Для цього на сайті GeneCards [23] знаходимо розташування гена для збірки генома людини GRCh37.

```
chr6:49,398,073-49,430,966(GRCh37/hg19 by Entrez Gene)
```

```
Size:32,894 basesOrientation:Minus strand
```

(Тут «basesOrientation:Minus strand» вказує на те, що для цього гена результат прийнято вказувати в «мінусовій» орієнтації. Лабораторії результати досліджень геному надають в орієнтації «плюс». Тобто

потрібно мати на увазі, що результатам «А» (орієнтація «плюс») буде відповідати «Т» (орієнтація «мінус») і результатам «Т» (орієнтація «плюс») буде відповідати «А» (орієнтація «мінус»). І результатам «G» (орієнтація «плюс») буде відповідати «C» (орієнтація «мінус») і навпаки.)

Або на сайті NCBI Gene [24]

GRCh37.p13 (GCF_000001405.25) 6 NC_000006.11
(49398073..49430966, complement)

Або на сайті Ensembl GRCh37 release 107 - Jul 2022 [25]

Chromosome 6: 49,398,073-49,430,904 reverse strand.

Дані про розташування гена відрізняються, це залежить від конкретних досліджень. Для того, щоб щось важливе не пропустити, я вважаю за доцільне трохи розширити зону розташування гена, зайве завжди можна буде потім видалити. Важливою буває зона перед початком гена, там можуть бути мутації, які суттєво впливають на якість білку, який кодується геном.

По цьому гену лабораторія надає інформацію по наступним SNP:

RSID,CHROMOSOME,POSITION,RESULT

rs748363752,6,49399532,AA

rs121918252,6,49399544,CC

rs79666796,6,49401499,TT

rs121918255,6,49403186,CC

rs147715336,6,49403267,CC

rs863224898,6,49407984,--

rs796052004,6,49407990,TT

rs121918254,6,49408008,CC

rs201536536,6,49408010,AA

rs9473555,6,49409487,CG

rs140727018,6,49409599,GG

rs753564352,6,49412365,CC
rs796052008,6,49412397,--
rs1141321,6,49412433,CT
rs185371031,6,49412910,TT
rs200019422,6,49415382,CC
rs2229385,6,49415448,CT
rs398123276,6,49415500,TT
rs188766510,6,49416556,CC
rs796052003,6,49419187,CC
rs201741770,6,49419225,TT
rs186505851,6,49419247,CC
rs727504020,6,49419304,--
rs150968643,6,49419396,AA
seq-rs564069299,6,49419405,--
rs777031588,6,49419437,TT
rs796052002,6,49421399,GG
rs796052007,6,49423862,AA
rs766420051,6,49423878,CC
rs796052006,6,49425402,AA
rs121918256,6,49425502,TT
rs760782399,6,49425585,GG
rs796052009,6,49426806,--
rs796052005,6,49426851,TT
rs121918257,6,49426858,GG
rs190834116,6,49426896,GG
rs727504022,6,49426900,CC
rs121918251,6,49426902,CC
rs398123278,6,49427089,GG

Табл 1. Результати генотипування по гену MMUT

SNP, де результат вказано як «--» - це не визначені.

Розглянемо варіанти цього гена.

rs748363752,6,49399532,AA (-/-) dbSNP - MMUT : Missense Variant, Not Reported in ClinVar. Але ресурс <https://varsome.com/> по цьому SNP має інформацію (рис. 2.1 та 2.2).

The screenshot shows the varsome.com interface for variant rs748363752. The search bar contains 'rs748363752' and 'hg19'. The main content area is divided into several panels:

- General Information:** SNV MMUT(NM_000255.4):c.2162T>C (p.Val721Ala)
- PharmGKB:** No data available
- ACMG Classification:** Uncertain Significance (4 points = 4 P - 0 B)
- Frequencies gnomAD Exomes:** f = 0.0000199, Mean Coverage: 83.3
- Pathogenicity Scores:** 9 (red), 7 (orange), 1 (green)
- Genes:** MMUT
- Publications:** Variant: 0, Gene: 235
- ClinVar:** No data available
- MitoMap:** No data available
- Region Browser:** (link)
- Community Contributions:** (link)
- Transcripts:** NM_000255.4 - missense, MANE Select
- Uniprot Variants:** No data available
- Conservation Scores:** phyloP100: 8.59
- Expression Data:** Top: Liver, Tissues: 54

Рис.2.1. Інформація щодо rs748363752 varsome.com [26]

Сайт ensembl.org теж має інформацію по rs748363752.

The screenshot shows the ensembl.org interface for variant rs748363752. The page displays the following information:

- Variant displays:** Explore this variant, Genomic context, Genes and regulation, Flanking sequence, Population genetics, Phenotype data, Sample genotypes, Linkage disequilibrium, Phylogenetic context, Citations, 3D Protein model.
- Variant:** rs748363752 SNP
- Most severe consequence:** missense variant | See all predicted consequences
- Alleles:** A/G/T | Ancestral: A | Highest population MAF: < 0.01
- Change tolerance:** CADD: G:26.1, T:27.2
- Location:** Chromosome 6:49399532 (forward strand) | VCF: 6 49399532 rs748363752 A G T
- Evidence status:** (info icon)
- HGVS names:** This variant has 12 HGVS names - Hide
- Ensembl HGVS:**
 - Variant allele T:
 - NC_000006.11:g.49399532A>T
 - ENST00000274813.3:c.2162T>A
 - ENSP00000274813.3:p.Val721Glu
 - Variant allele G:
 - NC_000006.11:g.49399532A>G
 - ENST00000274813.3:c.2162T>C
 - ENSP00000274813.3:p.Val721Ala
- dbSNP HGVS:**
 - NM_000255.3:c.2162T>A
 - NM_000255.3:c.2162T>C
 - NM_000255.4:c.2162T>A
 - NM_000255.4:c.2162T>C
 - NP_000246.2:p.Val721Ala
 - NP_000246.2:p.Val721Glu
- Synonyms:** ClinGen Allele Registry CA3846632 (G), CA312773 (T)
- Original source:** Variants (including SNPs and indels) imported from dbSNP (release 154) | View in dbSNP
- About this variant:** This variant overlaps 1 transcript.
- Description from SNPedia:** Description not available [More information from SNPedia]

Рис 2.2. . Інформація ensembl.org по rs748363752 [27]

На цій сторінці, крім іншої інформації, є значення коефіцієнту CADD –це інструмент для оцінки патогенності однонуклеотидних варіантів, а також варіантів вставок/видалень у геномі людини. [28]

Наступний варіант rs121918252,6,49399544, **CC (-/-)** – норма. Він є в базі даних ClinVar – [29] і є його опис на OMIM – [30], який свідчить, що цей варіант може привести до зниженої активності білка у випадку мутації - METHYLMALONIC ACIDURIA, mut(-) TYPE.

Наступний rs79666796,6,49401499, **TT (-/-)** – норма. Він є в базі даних dbSNP - MMUT : Intron Variant, Not Reported in ClinVar, Publications: 0 citations, ALFA Allele Frequency: Ref Allele T=0.97889; Alt Allele C=0.02111. Intron Variant – дуже рідко бувають патогенними. Їх враховують у випадку наявності досліджень. Цей варіант не впливає на функціональність білка.

Наступний rs121918255,6,49403186, **CC (-/-)** норма. Він є на ClinVar – [31] і є на OMIM [32], це варіант METHYLMALONIC ACIDURIA, mut(-) TYPE, тобто відсутня активність білка MUT у випадку мутації.

Варіант rs2229385,6,49415448, **CT (+/-)** - гетерозиготна мутація. dbSNP - MMUT : Missense Variant, ALFA Allele Frequency Ref Allele: C=0.896064; Alt Allele: T=0.103936 є в базі даних ClinVar NM_000255.4(MMUT):c.1495G>A (p.Ala499Thr) Benign/Likely benign. [33] Є дослідження на LitVar. [34] Із досліджень стає відомо, що цей SNP виявляли у пацієнтів з метилмалоновою ацидурією разом з іншими патогенними варіантами. Частота розподілу алелів указує на те, що мутантний алель T досить поширений, це не відповідає поширеності захворювання. Захворюваність ММА становить ~ 1: 50 000. [63] Тому висновок, що цей варіант самостійно не може викликати захворювання, а тільки у випадку комбінації з іншими мутаціями.

Варіант rs1141321,6,49412433, **CT (+/-)**- гетерозиготна мутація. dbSNP - MMUT : Missense Variant, ALFA Allele Frequency Ref Allele:

C=0.638310; Alt Allele: T=0.361690, є в базі даних ClinVar NM_000255.4(MMUT):c.1595G>A (p.Arg532His) Benign. [35] Є дослідження на LitVar. [36] Із досліджень стає відомо, що цей SNP виявляли у пацієнтів з метилмалоновою ацидурією разом з іншими патогенними варіантами. Частота розподілу алелів указує на те, що мутантний алель Т досить поширений, це не відповідає поширеності захворювання. Тому висновок - цей варіант також самостійно не може викликати захворювання, а тільки у випадку комбінації з іншими мутаціями.

І так само перевіряємо всі варіанти тесту.

В результаті ми отримали в нашому тесті два гетерозиготні варіанти, які вказують на зниження активності білка MUT. Ці варіанти самостійно не викликають захворювання, але якщо будуть присутні інші фактори: погане харчування з низьким вмістом вітаміну В12, підвищений рівень вірусного навантаження, значне фізичне навантаження, то можливі деякі прояви метилмалонової ацидурії.

Якщо лабораторні тести вказують на метилмалонову ацидурію, а перевірка інших генів на виявила патогенних варіантів, то для підтвердження діагнозу є доцільним провести секвенування гена MMUT.

РОЗДІЛ 3.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Корекція результатів аналізу генома

Метилмалонова ацидурія, яка пов'язана зі зниженням кобаламіну, зазвичай коригується вітаміном В₁₂, і тому цей тип метилмалонової ацидурії класифікуються як тип «cbl». В залежності від гена, в якому відбулася мутація, розрізняють типи cblA, викликаний мутаціями в гені ММАА, cblB викликаний мутаціями в гені ММАВ. Поєднання метилмалонової ацидурії та гомоцистинурії є порушенням метаболізму кобаламіну, що спричиняє зниження рівня коферментів аденозилкобаламіну (AdoCbl) і метилкобаламіну (MeCbl) і призводить до зниження активності метіонінсинтази (MTR). Різні форми розладу були класифіковані як: cblC, cblD, cblX і cblF. Ізольована форма, яка спричинена повним або частковим дефіцитом ферменту метилмалоніл-КоА-мутази, класифікується як ферментативний підтип «mut0» або ферментативний підтип «mut-» відповідно.

Розглянемо можливість проведення корекції при мутаціях різних генів.

Так, білки, які кодують гени CUBN, AMN, CBLIF, TCN1, TCN2, виконують поглинання вітаміну В₁₂ з їжі в і перенесення його через кров до клітин.

Всмоктування кобаламіну в кишечнику включає кілька етапів, і порушення будь-якого з них може спричинити мальабсорбцію кобаламіну, що призводить до дефіциту кобаламіну. У фізіологічних умовах вітамін вивільняється з їжі за допомогою травних ферментів і згодом зв'язується з глікопротеїном гаптокорином (також званим R-

білком або кобалофіліном, або транскобаламіном I), який присутній у лейкоцитах, слині та інших секретах. У тонкій кишці зміна рН і дія панкреатичних ферментів призводять до дисоціації кобаламіну і гаптокорину. Тоді вітамін стає доступним для зв'язування з внутрішнім фактором, що виділяється слизовою оболонкою шлунка. Отриманий комплекс кобаламін-внутрішній фактор приєднується до рецептора внутрішнього фактора кобаламіну слизової оболонки клубової кишки (в дистальному відділі клубової кишки) у присутності іонів кальцію. Згодом вітамін В₁₂ вивільняється та з'єднуючись у транскобаламін (також званий транскобаламін II), потрапляє в кров. В крові комплекс транскобаламін-кобаламін доставляє кобаламін до тканин шляхом приєднання до специфічних рецепторів. [37] [38]

Мутації цих генів зі зниженням функції призводять в першу чергу до зниження кобаламіну в плазмі крові. Коригується парентеральним введенням кобаламіну. [39] На практиці застосовують ін'єкції гідроксокобаламіну.

Гідроксокобаламін ($C_{62}H_{89}CoN_{13}O_{15}P$), також відомий як гідроксикобаламін або вітамін В₁₂, належить до класу сполук - похідних кобаламіну. Ці органічні сполуки містять корінове кільце, атом кобальту та нуклеотидний фрагмент. Кобаламіни характеризуються порфіриноподібним коріновим ядром, яке містить один атом кобальту, зв'язаний з бензімідазоліловим нуклеотидом, і змінну групу залишку (R). Змінна група R дає початок чотирьом найбільш відомим кобаламінам: ціанокобаламіну, метилкобаламіну, 5-дезоксиденозилкобаламіну та гідроксикобаламіну.

Гідроксокобаламін міститься у всіх живих організмах, від мікробів до рослин і тварин. Однак він синтезується лише мікробами та рослинами. Оскільки люди не можуть виробляти гідроксокобаламін, а він необхідний у раціоні, що робить його важливою поживною

речовиною (тобто вітаміном). Вітаміну В₁₂ більше в продуктах тваринного походження, особливо в м'ясі, рибі, яйцях і молочних продуктах, хоча він міститься у всіх фруктах і овочах у менших концентраціях. У сироватці крові гідроксокобаламін і ціанокобаламін, як вважають, функціонують як запасні або транспортні форми вітаміну В₁₂, тоді як метилкобаламін і 5-дезоксиаденозилкобаламін є активними формами коферменту, необхідного для росту та реплікації клітин.

Гідроксокобаламін часто називають вітаміном В₁₂, він є природною формою вітаміну В₁₂, однак вітамін В₁₂ відноситься до групи кобаламінів, які доступні в організмі людини в різноманітних, переважно взаємоперетворюваних формах. Разом із фолатом кобаламіни є важливими кофакторами, необхідними для синтезу ДНК у клітинах, де відбувається реплікація та поділ хромосом. Ціанокобаламін зазвичай перетворюється на гідроксокобаламін у сироватці крові, тоді як гідроксокобаламін перетворюється або на метилкобаламін, або на 5-дезоксиаденозилкобаламін. Кобаламіни циркулюють у зв'язці з білками сироватки крові, які називаються транскобаламінами (ТС) і гаптокоринами. Гідроксокобаламін практично нерозчинний у воді.

Гідроксокобаламін вперше був виділений у 1949 році. Він входить до списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я, найбільш ефективних і безпечних ліків, необхідних системі охорони здоров'я. [40] Як добавка гідроксокобаламін використовується для лікування дефіциту вітаміну В₁₂, включаючи перніціозну анемію. Він також використовується для профілактики та лікування дефіциту вітаміну В₁₂, що виникає внаслідок алкоголізму, порушення всмоктування, зараження стрічковими хробаками, целиакії, гіпертиреозу, захворювань печінки та жовчних шляхів, постійної діареї, резекції клубової кишки, раку підшлункової залози, захворювань нирок, тривалого стресу; веганських, макробіотичних та інших обмежувальних

дієт. Інші використання гідроксокобаламіну включають лікування отруєння ціанідами, оптичної атрофії Лебера та токсичної амбліопії.

Рецептор транскобаламіну (ген CD320) забезпечує поглинання транскобаламіну, насиченого кобалоїном, шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу. В клітині транскобаламін руйнується в лізосомі, а відокремлений кобаламін надходить для подальшого перетворення у метилкобаламін та аденозилкобаламін. [41] Зниження концентрації кобаламіну в клітині, що спричинене мутаціями гена CD320, коригується парентеральним введенням гідроксокобаламіну або пероральним прийомом кобаламіну.

Білки ABCD4 (тип cblJ) і LMBD1 (тип cblF) містяться в мембрані, яка оточує лізосому. Разом ці два білки транспортують вітамін B12 з лізосом, роблячи його доступним для подальшої переробки в AdoCbl і MeCbl. [42] [43] Дослідження функціональної експресії *in vitro* в клітинах пацієнтів показали, що біохімічний дефект мутацій генів ABCD4 і LMBD1 можна врятувати шляхом трансфекції білка дикого типу. [44]

Для коригування наслідків дефектів цих генів рекомендовано парентеральне введення гідроксокобаламіну, перорального бетаїну та фолієвої кислоти. [45] [46]

Внутрішньоклітинні білки ММАСНС і ММАДНС відіграють важливу роль у обробці та направленні кофактора Cbl до ферментів призначення. У клітині ці білки працюють разом, утворюючи комплекс ММАСНС-ММАДНС (рис. 3.1).

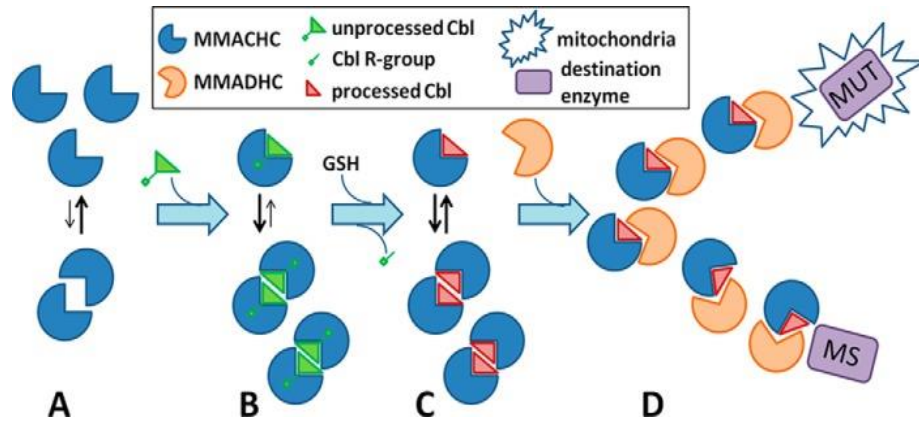


Рис 3.1. Роль комплексу MMACHC-MMADHC у націлюванні на Cbl (пояснення у тексті)

A - MMACHC (синій сектор) у незв'язаному стані існує переважно як мономер.

B - при зв'язуванні необробленого кобаламіну з інтактним верхнім аксіальним лігандом (трикутником) MMACHC може зміщуватися в бік гомодимерного стану.

C - після обробки кобаламіну (трикутник із зеленого на червоний) через GSH-опосередковане видалення його верхнього аксіального ліганду (зелена паличка та квадрат), MMACHC доступний для взаємодії з MMADHC (помаранчевий сектор).

D - MMADHC зв'язує MMACHC у гетеродимері 1:1 і супроводжує навантажений Cbl MMACHC або до мітохондрій для використання метилмалоніл-КоА MUT, або MS у цитозолі. [47]

Комбінована метилмалонова ацидурія та гомоцистинурія типу cb1C може бути викликана гомозиготною або складною гетерозиготною мутацією в гені MMACHC. [48]

Комбінована метилмалонова ацидурія та гомоцистинурія типу cb1D, ізольована гомоцистинурія та ізольована метилмалонова ацидурія групи комплементатії cb1D можуть бути спричинені гомозиготною або гетерозиготною мутаціями гена MMADHC. [49]

Для коригування цих дефектів використовують карнітин, внутрішньо м'язові ін'єкції гідроксокобаламіну та пероральний прийом бетаїну. [50; 51]

Далі всі процеси відбуваються в мітохондріях.

У випадку ізольованої метилмалонової ацидурії основні принципи корекції полягають у забезпеченні додатковим вітаміном В₁₂ тим, хто, як відомо, має варіант чутливий до вітаміну В₁₂; обмежити природний білок, зокрема попередників пропіогенних амінокислот, при дотриманні висококалорійної дієти; надати додатковий карнітин тим, хто має дефіцит карнітину; зменшити виробництво пропіонату кишковою флорою; і забезпечити невідкладне лікування під час епізодів гострої декомпенсації з метою запобігання катаболізму та мінімізації ураження центральної нервової системи (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301409/>)

Ген ММАА кодує компонент транспортера, необхідний для транслокації кобаламіну в мітохондрії. [52] Мутації в гені ММАА відповідають за тип cb1A метилмалонової ацидурії, яка реагує на вітамін В₁₂ через дефіцит синтезу аденозилкобаламіну.

Для коригування можна використовувати внутрішньо м'язові ін'єкції гідроксокобаламіну.

Метилмалонова ацидурия типу cb1B спричинена мутаціями в гені ММАВ. Він кодує фермент кобаламінаденозилтрансферазу, який перетворює відновлений кобаламін в 5-дезоксаденозилкобаламін (AdoCb1), коферментну форму вітаміну В₁₂.

Пацієнти з дефектами синтезу аденозилкобаламіну зазвичай реагують на корекцію внутрішньо м'язовими ін'єкціями гідроксокобаламіну.

Дефіцит метилмалоніл-коензимуА-епімерази (МСЕЕ). Результати досліджень осіб з гомозиготними патогенними варіантами МСЕЕ коливаються від повної відсутності симптомів до важкого метаболічного

ацидозу з підвищенням ММА, 2-метилцитрату та кетонів у сечі при первинному прояві. Особи з дефіцитом МСЕЕ не реагували на добавки В₁₂.

Метилмалоніл-КоА-мутаза (MUT), яка кодується геном MMUT є мітохондріальним ферментом, який каталізує ізомеризацію метилмалоніл-КоА до сукциніл-КоА. Активність MUT вимагає 5-дезоксиаденозилкобаламіну, коферментної форми вітаміну В₁₂. [54]

Багато досліджень направлено на виявлення варіантів мутацій, які чутливі до вітаміну В₁₂. Так, було виявлено [55], що мутації с.1663G>А, с.2080С>Т, с.1880А>G, с.1208G>А були повністю чутливими до вітаміну В₁₂ та ці 3 мутації с.1741С>Т, с.1630_1631GG>ТА, с.599Т>С - частково відповідали на введення кобаламіну.

Найпоширеніші варіанти мутацій генів, що викликають ізольовану метилмалонову ацидурію, приведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Найпоширеніші варіанти мутацій генів, що викликають ізольовану метилмалонову ацидурію [6]

Ген	DNA нуклеотид	Прогнозована зміна білка	Коментар
МСЕЕ	с.139С>Т	p.Arg47Ter	Поширений патогенний варіант, який спостерігається в гомозиготному стані у >50% зареєстрованих осіб [64]
	с.379-644А>G	--	Глибокий інтронний варіант, який створює нове місце з'єднання [65]
	с.419del	p.Lys140ArgfsTer6	Повідомляється у дорослих з ↑ ММА сироватки; нейродегенерація, спочатку пов'язана з хворобою Паркінсона, деменцією та інсультом [66]
ММАА	с.433С>Т	p.Arg145Ter	Поширений патогенний варіант, що становить 43% мутуваних алелів [67]
	с.503del	p.(Thr168MetfsTer10)	Цей варіант базується на загальному гаплотипі, його також можна побачити в іспанців [68]

Ген	DNA нуклеотид	Прогнозована зміна білка	Коментар
<i>MMAB</i>	c.556C>T	p.Arg186Trp	Найпоширеніший патогенний варіант, становить 33% усіх алелів; спостерігається виключно у осіб європейського походження [69]
	c.700C>T	p.Gln234Ter	Кобаламін-чутливий варіант асоціації з пізнім початком захворювання
	c.656_659del	p.Tyr219SerfsTer4	Реакція in vivo на вітамін B12, зареєстрована у гетерозиготах
<i>MMUT</i> ²	c.322C>T	p.Arg108Cys	Спостерігається у осіб латиноамериканського походження [71]
	c.2150G>T	p.Gly717Val	Частіше зустрічається у осіб африканського походження [71]
	c.655A>T	p.Asn219Tyr	Спостерігається частіше в осіб європейського походження [72]
	c.1106G>A	p.Arg369His	

Мутацій у гені ACSF3 було виявлено у людей з комбінованою малоновою та метилмалоновою ацидурією (СМАММА). Цей ген кодує фермент, який каталізує перетворення малонової кислоти та метилмалонової кислоти на малоніл-КоА та метилмалоніл-КоА відповідно. Змінений фермент має знижену функцію. Оскільки фермент не може перетворювати малонову та метилмалонову кислоти, вони накопичуються в організмі. Для корекції мутацій гена ACSF3 застосовується дієта з високим вмістом вуглеводів і низьким вмістом білка. [56]

3.2. Корекція з використанням генних технологій

Метилмалонова ацидурія є важким, а іноді й летальним, метаболічним розладом, який потребує вдосконаленого лікування.

У деяких випадках мутацій гена ММAB, які викликають метилмалонову ацидурию, були виявлені додаткові можливості проведення корекції. Так, дослідження функціональної експресії *in vitro* в *E. coli* показали, що мутантний білок I96T (p.Ple96Thr) мав зменшений період напіврозпаду та знижену експресію білка порівняно з диким типом, а також знижену ферментативну активність (приблизно 60-65% порівняно з диким типом), але суттєвих відмінностей не було. Мутантний білок R191W (p.Arg191Trp) також був дуже нестабільним і демонстрував знижену експресію білка, а також знижену ферментативну активність (приблизно 52% від дикого типу). Хорхе-Фінніган та ін. (2010) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932867/>) припустили, що мутації I96T і R191W можуть призвести до аномального згортання білка. [57]

В одному з досліджень [53] було встановлено, що деякі фармакологічні шаперони можуть впливати на процес згортання білку кобаламінаденозилтрансферази та можуть значно підвищувати активність мутантних білків p.Ple96Thr і p.Arg191Trp.

Шаперони – це білки, які необхідні для формування третинної структури поліпептидних ланцюгів інших білків, але вони не утворюють з білками ковалентних зв'язків та не входять до складу кінцевих білкових структур. Шаперони зв'язуються з гідрофобними ділянками та допомагають білкам набути правильної стабільної конформації. [58]

У дослідженні автори встановили, що сполука N-{{(4-chlorophenyl)carbamothioyl}amino}-2-phenylacetamid підвищує стабільність мутантного білка p.Ple96Thr та ефект додатково посилюється кобаламіном. Сполука 4-(4-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzene-1,3-diol була найбільш ефективною для стабілізації кобаламінаденозилтрансферази дикого типу.

Це дослідження показує, що використання фармакологічних шаперонів може якісно вплинути на корекцію метилмалонової ацидурії.

Низка нових геномних терапій, які включають канонічне додавання гена аденоасоційованого вірусу, редагування геному та системну терапію мРНК, показали великі перспективи на мишачих моделях ММА. [59]

Деякі аденоасоційовані віруси (AAV), такі як AAV9, можуть проникати в ЦНС та трансдукувати нейрони, що дозволило розробити генну терапію для розладів, які раніше вважалися невиліковними, таких як спінальна м'язова атрофія типу 1.

Дослідження, яке проводили Francis J May, Pamela Sara E Head, Leah E Venturoni, Randy J Chandler, Charles P Venditti «Central nervous system-targeted adeno-associated virus gene therapy in methylmalonic acidemia» [60] продемонструвало, що тропний (той що стимулює активність) до ЦНС вектор AAV може відновити експресію MMUT у ЦНС.

В цьому дослідженні відновлення експресії MMUT було обмежено ЦНС, тими ділянками мозку, які залучені до прогресування метилмалонової ацидурії, такими, як смугасте тіло. Зниження системних рівнів токсичних метаболітів, коли корекція експресії MMUT була обмежена лише ЦНС, підтвердило припущення про те, що AAV-опосередкована генна терапія ЦНС може принести користь пацієнтам із ММА.

Хоча низка досліджень доставки генів AAV для ММА на моделях мишей показала вражаючу ефективність, але не обійшлося без ускладнень або обмежень. Після лікування AAV новонароджених мишей з ММА спостерігалася генотоксичність у формі утворення гепатоцелюлярної карциноми.

ClinicalTrials.gov з 24.05.2021 року з 9.10.2020 року проводить дослідження фази 1/2 на людях (FHN), призначене для оцінки безпеки, переносимості та попередньої ефективності одноразової внутрішньовенної інфузії hLB-001 у педіатричних пацієнтів із ММА, що характеризується мутацією гена метилмалоніл-КоА-мутази (MMUT). hLB-001 — це націлений на печінку рекомбінантний сконструйований аденоасоційований вірусний (rAAV) вектор, що використовує капсид LK03 (rAAV-LK03), призначений для безперервної інтеграції гена мутази метилмалоніл-КоА людини в локус альбуміну. Дослідження проходить на замовлення Sunrise MMA Clinical Trial. [61]

На відміну від доставки генів AAV, генна терапія ліпідними наночастинками (LNP)-мРНК має дуже низький ризик генотоксичності, оскільки вантаж не досягає ядра. Крім того, LNP-мРНК можна повторно дозувати, на відміну від AAV.

Автори дослідження [62] інформують, що створили мРНК, оптимізовану за 5-метоксиU-кодоном, що кодує людську метилмалоніл-КоА-мутазу (MUT), фермент, який найчастіше мутує в ММА, і інкапсулювали її в біорозкладані ліпідні наночастинки. Внутрішньовенне введення мРНК MUT у двох різних мишачих моделях ММА призвело до зниження на 75–85% метилмалонової кислоти в плазмі крові та було пов'язано зі збільшенням експресії і активності білка MUT у печінці. Повторне введення мРНК MUT зменшувало кількість циркулюючих метаболітів і значно покращувало виживання та збільшення ваги. Додаткове дозування не підвищувало маркери печінкової токсичності або запалення у гетерозиготних мишей з ММА.

Терапія мРНК має низку унікальних особливостей, які роблять клінічну трансляцію перспективною для вроджених помилок метаболізму, таких як ММА. Однією з переваг терапії на основі мРНК перед доставкою вірусних генів є те, що мРНК не проходить транзитом

до ядра, тим самим зменшуючи ризики інсерційного мутагенезу. мРНК забезпечує тимчасову, залежну від періоду напіввиведення експресію білка, уникаючи конститутивної активації гена та зберігаючи чутливість до дози. Таким чином, системна терапія мРНК може розглядатися як альтернатива звичайній і може відновлювати «нелікарські» мішені, такі як трансмембранні та внутрішньоклітинні білки.

ClinicalTrials.gov з 24.05.2021 року проводить «Дослідження для оцінки безпеки, фармакокінетики та фармакодинаміки препарату мРНК-3705 в учасників із ізольованою метилмалоновою ацидемією». мРНК-3705 розробка компанії Moderna. [61]

Таким чином, розвиток генних технологій відкриває нові можливості щодо лікування важких метаболічних захворювань, таких як метилмалонова ацидурия.

ВИСНОВКИ

1. Метилмалонова ациду́рія є одним з важких захворювань, яке важливо коригувати на ранніх стадіях, щоб не допустити важких наслідків.
2. Корекція метилмалонової ациду́рії потребує встановлення точного місця, де відбулося порушення нормальної роботи організму.
3. Діагностика шляхом генетичного аналізу спадкової інформації дозволяє уточнити діагноз метилмалонової ациду́рії та призначити лікування.
4. Розвиток генних технологій розширює можливості лікування метилмалонової ациду́рії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гречанина Е.Я. Богатырева Р.В. Волосовец А.П. Медицинская генетика. Киев, ВСИ «Медицина», 2010. 550 с.
2. Methylmalonic acid. [<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000202>]
3. Understanding the genetic code. NGS technology enables massively parallel DNA analysis for a deeper understanding of biology. [<https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html>]
4. MedGen National Library of Medicine. Methylmalonic aciduria due to methylmalonyl-CoA mutase deficiency [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/C1855114/>]
5. Про забезпечення розширеного неонатального скринінгу в Україні.
Наказ Міністерства охорони здоров'я від 01.10.2021 №2142. [<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1403-21#Text>]
6. Isolated Methylmalonic Acidemia. GeneReviews® [Internet]. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1231/>]
7. Fatemeh Keyfi, Saeed Talebi and Abdol-Reza Varasteh. Methylmalonic Acidemia Diagnosis by Laboratory Methods. PMID: PMC5214677 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214677/>]
8. Органічні ацидурії. Baby Screen. [<https://baby-screen.com.ua/organichni-aczyduriyi/>]
9. Sanger Sequencing: Introduction, Principle, and Protocol. CD Genomics Blog. [<https://www.cd-genomics.com/blog/sanger-sequencing-introduction-principle-and-protocol/>]
10. National Library of Medicine. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]
11. dbSNP National Library of Medicine. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>]

12. ClinVar National Library of Medicine.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]
13. PubMed National Library of Medicine.
[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>]
14. PMC PubMed Central. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>]
15. MEDLINE. [<https://www.nlm.nih.gov/medline/index.html>]
16. LitVar National Library of Medicine.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/>]
17. OMIM. [<https://www.omim.org/>]
18. Varsome.com. [<https://varsome.com/>]
19. Invitae Methylmalonic Acidemia and Homocystinuria Panel.
[<https://www.invitae.com/en/providers/test-catalog/test-06141>]
20. Sequencing. [<https://sequencing.com/>]
21. 23andMe. [<https://www.23andme.com/>]
22. FamilyTreeDNA. [<https://www.familytreedna.com/>]
23. GeneCards. [<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMUT>]
24. NCBI Gene. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4594#genomic-context>]
25. Ensembl GRCh37 release 107 - Jul 2022
[https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000146085;r=6:49398073-49430904;t=ENST00000274813]
26. Інформація щодо rs748363752 varsome.com.
[<https://varsome.com/variant/hg19/rs748363752?annotation-mode=germline>]
27. Інформація ensembl.org по rs748363752
[http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=6:49399032-49400032;v=rs748363752;vdb=variation;vf=369123038]
28. CADD - Combined Annotation Dependent Depletion.
[<https://cadd.gs.washington.edu/>]

29. Інформація ClinVar по rs121918252.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1881/>]
30. Інформація OMIM по rs121918252.
[<https://www.omim.org/entry/609058#0005>]
31. Інформація ClinVar по rs121918255.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1881/>]
32. Інформація OMIM по rs121918255.
[<http://www.omim.org/entry/609058#0005>]
33. Інформація ClinVar по rs2229385.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/92680/>]
34. Дослідження на LitVar по rs2229385.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/#!?query=rs2229385>]
35. Інформація ClinVar по rs1141321.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/92681/>]
36. Дослідження на LitVar по rs1141321.
[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/#!?query=rs1141321>]
37. Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B12 malabsorption with proteinuria). Orphanet Journal of Rare Diseases volume 1, Article number: 17 (2006). [<https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-1-17>]
38. Вітамін B12 > Травлення, поглинання і транспортування.
[<http://www.veganhealth.in.ua/2019/02/digestion-absorption-and-transport.html?m=1>]
39. IMERSLUND-GRASBECK SYNDROME 1; IGS1 OMIM 261100
[<https://omim.org/entry/261100>]
40. Hydroxocobalamin. [<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002308>]

41. Edward V. Quadros, corresponding, Yasumi Nakayama, and Jeffrey M. Sequeira The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. PMID: PMC2614632 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614632/]

42. Kosuke Kawaguchi, Takumi Okamoto, Masashi Morita, and Tsuneo Imanakaa Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. PMID: PMC4960490 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960490/]

43. METHYLMALONIC ACIDURIA AND HOMOCYSTINURIA, cblJ TYPE; MAHCJ OMIM 614857 [https://www.omim.org/entry/614857]

44. LMBR1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1: LMBRD1 OMIM 612625 [https://omim.org/entry/612625]

45. Martina Huemer, Daria Diodato, Bernd Schwahn, Manuel Schiff , Anabela Bandeira, Jean-Francois Benoist, Alberto Burlina, Roberto Cerone, Maria L Couce, Angeles Garcia-Cazorla, Giancarlo la Marca, Elisabetta Pasquini, Laura Vilarinho, James D Weisfeld-Adams, Viktor Kožich, Henk Blom, Matthias R Baumgartner, Carlo Dionisi-Vici Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. PMID: 27905001 [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27905001/]

46. Methylmalonic acidemia with homocystinuria. Orphanet. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=26]

47. D. Sean Froese, Jolanta Kopec, Fiona Fitzpatrick, Marion Schuller, Thomas J. McCorvie, Rod Chalk, Tanja Plessl, Victoria Fettelschoss, Brian Fowler, Matthias R. Baumgartner, and Wyatt W. Yue Structural Insights into the MMACHC-MMADHC Protein Complex Involved in Vitamin B₁₂ Trafficking. PMID: PMC4705923 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705923/]

48. METHYLMALONIC ACIDURIA AND HOMOCYSTINURIA, cblC TYPE; MAHCC OMIM 277400 [<https://omim.org/entry/277400>]

49. METHYLMALONIC ACIDURIA AND HOMOCYSTINURIA, cblD TYPE; MAHCD OMIM 277410 [<https://www.omim.org/entry/277410>]

50. H. C. Andersson, M. Marble, E. Shapira Long-term outcome in treated combined methylmalonic acidemia and homocystinemia PMID: 11258350 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11258350/>]

51. Terttu Suormala, Matthias R. Baumgartner, David Coelho, Adrian Sewell, Jürgen Herwig, Brian Fowler The cblD Defect Causes Either Isolated or Combined Deficiency of Methylcobalamin and Adenosylcobalamin Synthesis

DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M407733200>

[[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)77020-1/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)77020-1/fulltext)]

52. C. Melissa Dobson, Timothy Wai, Daniel Leclerc, Aaron Wilson, Xuchu Wu, Carole Doré, Thomas Hudson, David S. Rosenblatt, and Roy A. Gravel Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC137755/>]

53. Ana Jorge-Finnigan, Sandra Brasil, Jarl Underhaug, Pedro Ruíz-Sala, Begoña Merinero, Ruma Banerjee, Lourdes R. Desviat, Magdalena Ugarte, Aurora Martinez, and Belén Pérez Pharmacological chaperones as a potential therapeutic option in methylmalonic aciduria cblB type [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749860/>]

54. METHYLMALONYL-CoA MUTASE; MMUT OMIM 609058 [<https://omim.org/entry/609058>]

55. Yue Yu, Ruixue Shuai, Lili Liang, Wenjuan Qiu, Linghua Shen, Shengnan Wu, Haiyan Wei, Yongxing Chen, Chiju Yang, Peng Xu, Xigui Chen, Hui Zou, Jizhen Feng, Tingting Niu, Haili Hu, Jun Ye, Huiwen Zhang,

Deyun Lu, Zhuwen Gong, Xia Zhan, Wenjun Ji, Xuefan Gu, Lianshu Han
Different mutations in the MMUT gene are associated with the effect of
vitamin B12 in a cohort of 266 Chinese patients with mut-type methylmalonic
acidemia: A retrospective study [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34668645/>]

56. A. R. Gregg, A. W. Warman, D. R. Thorburn, W. E. O'Brien
Combined malonic and methylmalonic aciduria with normal malonyl-
coenzyme A decarboxylase activity: a case supporting multiple aetiologies
PMID: 9700595 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9700595/>]

57. Ana Jorge-Finnigan, Cristina Aguado, Rocio Sánchez-Alcudia,
David Abia, Eva Richard, Begoña Merinero, Alejandra Gámez, Ruma
Banerjee, Lourdes R Desviat, Magdalena Ugarte, Belen Pérez Functional and
structural analysis of five mutations identified in methylmalonic aciduria cblB
type PMID: 20556797 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20556797/>]
[<https://www.omim.org/entry/607568#0004>]

58. Чому шаперони цікаві фармакологам? Журнал "Фармацевт
Практик" [<https://fp.com.ua/foto/chomu-shaperony-tsikavi-farmakologam/>]

59. Randy J Chandler, Charles P Venditti Gene Therapy for
Methylmalonic Acidemia: Past, Present, and Future
[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31303064/>]

60. Francis J May, Pamela Sara E Head, Leah E Venturoni, Randy J
Chandler, Charles P Venditti Central nervous system-targeted adeno-
associated virus gene therapy in methylmalonic acidemia
[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34169115/>]

61. ClinicalTrials.gov
[<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Methylmalonic+Acidemia&term=&cntry=&state=&city=&dist=>]

62. Ding An, Jessica L. Schneller, Andrea Frassetto, Lin T. Guey,
Charles P. Venditti, Paolo G.V. Martini у дослідженні 2017 року Systemic

Messenger RNA Therapy as a Treatment for Methylmalonic Acidemia
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.081>

[[https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(17\)31748-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124717317485%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(17)31748-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124717317485%3Fshowall%3Dtrue)]

63. Matthias R Baumgartner, Friederike Hörster, Carlo Dionisi-Vici, Goknur Haliloglu, Daniela Karall, Kimberly A Chapman, Martina Huemer, Michel Hochuli, Murielle Assoun, Diana Ballhausen, Alberto Burlina, Brian Fowler, Sarah C Grünert, Stephanie Grünewald, Tomas Honzik, Begoña Merinero, Celia Pérez-Cerdá, Sabine Scholl-Bürgi, Flemming Skovby, Frits Wijburg, Anita MacDonald, Diego Martinelli, Jörn Oliver Sass, Vassili Valayannopoulos, Anupam Chakrapani Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia PMID: 25205257 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25205257/>]

64. Kathrin Heuberger, Henry J. Bailey, Patricie Burda, a Apirat Chaikuad, Ewelina Krysztofinska, Terttu Suormala, Céline Bürer, Seraina Lutz, Brian Fowler, D. Sean Froese, Wyatt W. Yue, and Matthias R. Baumgartner Genetic, structural, and functional analysis of pathogenic variations causing methylmalonyl-CoA epimerase deficiency doi: 10.1016/j.bbadis.2019.01.021 PMID: PMC6525113 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6525113/>]

65. Paula J. Waters, Fanny Thuriot, Joe T.R. Clarke, Serge Gravel, David Watkins, David S. Rosenblatt, and Sébastien Lévesque Methylmalonyl-coA epimerase deficiency: A new case, with an acute metabolic presentation and an intronic splicing mutation in the MCEE gene PMID: PMC5037260 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037260/>]

66. Mattias Andréasson, Rolf H. Zetterström, Ulrika von Döbeln, Anna Wedell, and Per Svenningsson MCEE Mutations in an Adult Patient with

Parkinson's Disease, Dementia, Stroke and Elevated Levels of Methylmalonic Acid
PMCID: PMC6600349

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600349/>]

67. Jordan P Lerner-Ellis, C. Melissa Dobson, Timothy Wai, David Watkins, Jamie C. Tirone, Daniel Leclerc, Carole Doré, Pierre Lepage, Roy A. Gravel, David S. Rosenblatt Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism PMID: 15523652
[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15523652/>]

68. Maria Angeles Martínez, Ana Rincón, Lourdes R. Desviat, Begoña Merinero, Magdalena Ugarte, Belén Pérez Genetic analysis of three genes causing isolated methylmalonic acidemia: identification of 21 novel allelic variants PMID: 15781192 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15781192/>]

69. Jordan P Lerner-Ellis, Abigail B Gradinger, David Watkins, Jamie C. Tirone, Amélie Villeneuve, C. Melissa Dobson, Alexandre Montpetit, Pierre Lepage, Roy A. Gravel, David S. Rosenblatt Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the cblB complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria PMID: 16410054
[<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16410054/>]

70. Forny P, Horster F, Ballhausen D, Chakrapani A, Chapman KA, Dionisi-Vici C, Dixon M, Gruenert SC, Grunewald S, Haliloglou G, Hochuli M, Hnozik T, Karall D, Martinelli D, Molema F, Sass JO, Scholl-Burgi E, Tal G, Williams M, Huemer M, Baumgartner MR. Guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic acidemia and propionic acidemia: first revision. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8252715/>]

71. Lisa C. Worgan, Kirsten Niles, Jamie C. Tirone, Adam Hofmann, Andrei Verner, Alya'a Sammak, Terrence Kucic, Pierre Lepage, David S Rosenblatt Spectrum of mutations in mut methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16281286/>]

72. Patrick Forny, Anne-Sophie Schnellmann, Celine Buerer, Seraina Lutz, Brian Fowler, D Sean Froese, Matthias R. Baumgartner Molecular Genetic Characterization of 151 Mut-Type Methylmalonic Aciduria Patients and Identification of 41 Novel Mutations in MUT PMID: 27167370 [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27167370/>]

**КОДЕКС АКАДЕМІЧНОЇ ДОБРОЧЕСНОСТІ
ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ХЕРСОНЬСЬКОГО
ДЕРЖАВНОГО УНІВЕРСИТЕТУ**

Я, Сизов Володимир Петрович, учасник освітнього процесу Херсонського державного університету, **УСВІДОМЛЮЮ**, що академічна доброчесність – це фундаментальна етична цінність усієї академічної спільноти світу.

ЗАЯВЛЯЮ, що у своїй освітній і науковій діяльності **ЗОБОВ'ЯЗУЮСЯ**:

– дотримуватися:

- вимог законодавства України та внутрішніх нормативних документів університету, зокрема Статуту Університету;
- принципів та правил академічної доброчесності;
- нульової толерантності до академічного плагіату;
- моральних норм та правил етичної поведінки;
- толерантного ставлення до інших;
- дотримуватися високого рівня культури спілкування;

– надавати згоду на:

- безпосередню перевірку курсових, кваліфікаційних робіт тощо на ознаки наявності академічного плагіату за допомогою спеціалізованих програмних продуктів;
- оброблення, збереження й розміщення кваліфікаційних робіт у відкритому доступі в інституційному репозитарії;
- використання робіт для перевірки на ознаки наявності академічного плагіату в інших роботах виключно з метою виявлення можливих ознак академічного плагіату;

– самостійно виконувати навчальні завдання, завдання поточного й підсумкового контролю результатів навчання;

– надавати достовірну інформацію щодо результатів власної навчальної (наукової, творчої) діяльності, використаних методик досліджень та джерел інформації;

– не використовувати результати досліджень інших авторів без використання покликань на їхню роботу;

– своєю діяльністю сприяти збереженню та примноженню традицій університету, формуванню його позитивного іміджу;

– не чинити правопорушень і не сприяти їхньому скоєнню іншими особами;

– підтримувати атмосферу довіри, взаємної відповідальності та співпраці в освітньому середовищі;

– поважати честь, гідність та особисту недоторканність особи, незважаючи на її стать, вік, матеріальний стан, соціальне становище, расову належність, релігійні й політичні переконання;

– не дискримінувати людей на підставі академічного статусу, а також за національною, расовою, статевою чи іншою належністю;

– відповідально ставитися до своїх обов'язків, вчасно та сумлінно виконувати необхідні навчальні та науково-дослідницькі завдання;

– запобігати виникненню у своїй діяльності конфлікту інтересів, зокрема не використовувати службових і родинних зв'язків з метою отримання нечесної переваги в навчальній, науковій і трудовій діяльності;

– не брати участі в будь-якій діяльності, пов'язаній із обманом, нечесністю, списуванням, фабрикацією;

– не підроблювати документи;

– не поширювати неправдиву та компрометуючу інформацію про інших здобувачів вищої освіти, викладачів і співробітників;

– не отримувати і не пропонувати винагород за несправедливе отримання будь-яких переваг або здійснення впливу на зміну отриманої академічної оцінки;

– не залякувати й не проявляти агресії та насильства проти інших, сексуальні домагання;

– не завдавати шкоди матеріальним цінностям, матеріально-технічній базі університету та особистій власності інших студентів та/або працівників;

– не використовувати без дозволу ректорату (деканату) символіки університету в заходах, не пов'язаних з діяльністю університету;

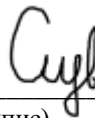
– не здійснювати і не заохочувати будь-яких спроб, спрямованих на те, щоб за допомогою нечесних і негідних методів досягати власних корисних цілей;

– не завдавати загрози власному здоров'ю або безпеці іншим студентам та/або працівникам.

УСВІДОМЛЮЮ, що відповідно до чинного законодавства у разі недотримання Кодексу академічної доброчесності буду нести академічну та/або інші види відповідальності й до мене можуть бути застосовані заходи дисциплінарного характеру за порушення принципів академічної доброчесності.

27.09.2021

(дата)



(підпис)

Володимир Сизов

(ім'я, прізвище)