

СВЯЗЬ ПОВЫШЕННОГО УРОВНЯ ГОМОЦИСТЕИНА С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ И ДЕФИЦИТОМ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В ПРИ РАННЕМ ДЕБЮТЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 В.И. Людыно^{1*}, Е.А. Цымбалова¹, Е.А. Чернявская¹, Е.Ю. Скрипченко²,
Г.Н. Бисага³, А.В. Дмитриев¹, И.Н. Абдурасулова¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
197022 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vloudyno@mail.ru

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России,
197022 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»,
197341 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 30.10.2023

После доработки 29.11.2023

Принята к публикации 08.12.2023

В исследовании выполнен анализ содержания гомоцистеина, цианокобаламина (витамина В12), фолиевой кислоты (витамина В9) и пиридоксина (витамина В6) в крови у детей с подтвержденным демиелинизирующим поражением ЦНС. Определены генотипы по основным полиморфизмам генов фолатного цикла – С677Т и А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* и А66G гена *MTRR*. Сравнение исследуемых показателей проводили для пяти групп: контрольная группа – здоровые дети до 18 лет, дети в стадии дебюта рассеянного склероза (РС; с длительностью заболевания не более полугода), здоровые взрослые без неврологической патологии, взрослые пациенты с РС в стадии дебюта заболевания и пациенты с длительно протекающим РС. Выявлено значимое увеличение содержания гомоцистеина у детей в дебюте РС в сравнении со здоровыми детьми соответствующего возраста. Установлена высокая прогностическая ценность определения содержания гомоцистеина у детей. Продемонстрировано, что повышение уровня гомоцистеина выше безопасных значений не сопровождается наличием витаминдефицитного состояния, оцениваемого по содержанию фолиевой кислоты, витамина В6 и витамина В12 в крови. Отсутствие корреляции между лабораторными признаками витаминдефицитного состояния и содержанием гомоцистеина может быть обусловлено носительством полиморфных вариантов генов фолатного цикла, а повышение уровня гомоцистеина должно рассматриваться как маркер функциональных нарушений обмена фолатов, сопутствующих развитию патологического процесса при педиатрическом варианте РС. Выявленные закономерности могут быть использованы для разработки методов лечения и профилактики демиелинизирующего процесса у детей с РС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рассеянный склероз, гомоцистеин, метаболизм фолатов.

DOI: 10.31857/S0320972524030094 EDN: WJVDDR

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся появлением очагов воспаления, демиелинизации и нейродеструкции в центральной нервной системе (ЦНС) [1, 2]. По этиологии заболевание относится к мультифакториальным, его инициация явля-

ется результатом взаимодействия генетических и средовых факторов. Для большинства пациентов дебют РС приходится на возраст от 20 до 40 лет, более раннее начало заболевания регистрируется приблизительно в 3–10 % случаев. В ряде исследований отмечают рост заболеваемости РС среди детей и подростков, что, однако, может быть связано с совершенствованием методов диагностики [3].

Принятые сокращения: РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; *MTHFR* – метилен-тетрагидрофолатредуктаза; *MTR* – метионинсинтаза; *MTRR* – метионинсинтаза-редуктаза.

* Адресат для корреспонденции.

Несмотря на то что педиатрический РС (РС с дебютом до 18 лет) прогностически является относительно благоприятным, медленно прогрессирующим вариантом заболевания, в среднем у таких пациентов переход к вторично-прогрессирующему типу течения и развитие необратимых неврологических нарушений происходит в более молодом возрасте [4, 5], то есть существует опасность ранней инвалидизации. Стоит отметить также, что большинство используемых для лечения РС иммуномодулирующих препаратов разрешены к применению с 18-летнего возраста, следовательно, патогенетическая терапия может быть недоступна для пациентов с ранним дебютом РС [6].

Очевидна в связи с этим актуальность исследования механизмов педиатрического РС, поиск возможных специфических звеньев патогенеза РС с ранним дебютом и выявление специфических маркеров патологии.

Важную роль в повышении риска развития педиатрического РС могут играть факторы, нарушающие процессы созревания ЦНС, прежде всего формирование белого вещества и миелинизацию. В частности, в данном контексте представляет интерес изучение роли метаболизма фолатов. Особенности обмена фолатов, в том числе обусловленные наличием полиморфизмов в ключевых генах фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), метионинсинтазы (*MTR*), метионинсинтазы-редуктазы (*MTRR*), могут оказывать существенное влияние на созревание миелина, устойчивость к демиелинизирующим процессам и недостаточность механизмов репарации при повреждениях белого вещества [7–10]. Реализация этого влияния объясняется тем, что перечисленные ферменты, осуществляя превращения фолатов, контролируют обмен гомоцистеина и метионина, обеспечивают метаболизм одноуглеродных фрагментов и образование доноров метильных групп.

Целью представленного исследования было определение генотипов по полиморфным вариантам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* в группах пациентов с РС, разделённых по возрасту дебюта заболевания, анализ содержания гомоцистеина и витаминов группы В (фолиевой кислоты, цианокобаламина и пиридоксина) в крови пациентов и выявление взаимосвязи между определяемыми показателями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка уровня гомоцистеина и витаминов группы В в сыворотке крови. Для анализа уровня гомоцистеина, цианокобаламина (витамина В12), фолиевой кислоты (витамина В9) и пиридоксина (витамина В6) было сформировано несколько

групп. В группу пациентов детского возраста с демиелинизирующим заболеванием ЦНС было включено 18 детей в возрасте от 10 до 18 лет с клиническими и нейровизуализационными признаками демиелинизации; из них 13 детей – с подтверждённым диагнозом РС (дебют заболевания) и 5 детей – с диагнозами «острый диссеминированный энцефаломиелит» (ОДЭМ) и «демиелинизирующее заболевание ЦНС, высокий риск трансформации в РС». Контрольную группу составили здоровые дети от 8 до 18 лет. Кроме того, было сформировано 3 группы сравнения: взрослые пациенты в возрасте от 21 года до 69 лет с диагнозом РС и длительностью заболевания от 3 до 23 лет; взрослые пациенты в возрасте от 19 до 45 лет с диагнозом РС и длительностью заболевания менее 6 месяцев (начальная стадия заболевания) и контрольная группа – здоровые добровольцы в возрасте от 19 лет до 61 года без неврологической патологии. Диагноз РС как у детей, так и у взрослых был установлен на основании соответствия международным критериям МакДональда 2005, 2010 и 2017 гг. [11, 12], в сложных случаях, у пациентов, перенёсших ранее ОДЭМ, учитывались критерии, предложенные Международной группой по исследованию педиатрического РС (International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group, IPMSSG). Данные о возрасте на момент исследования, возрасте дебюта заболевания и длительности заболевания приведены в табл. 1.

Содержание гомоцистеина и цианокобаламина (витамина В12) определяли методом иммунохемилюминесцентного анализа, содержание фолиевой кислоты (витамина В9) определяли методом колориметрического анализа, содержание пиридоксина (витамина В6) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследования были выполнены на базе клинко-диагностической лаборатории с соблюдением всех правил преаналитического этапа. Забор крови осуществляли в утренние часы натощак, определение содержания гомоцистеина и витаминов группы В проводили непосредственно после взятия материала, образцы не хранили.

Определение генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*. Для проведения генетических исследований использовали образцы венозной крови, взятой в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА), тотальную ядерную ДНК выделяли по стандартной методике с применением набора реагентов «ДНК-сорб Б» (ООО «Некст-Био», Санкт-Петербург, Россия). Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Для проведения ПЦР использовали специфические олигонуклеотидные праймеры и аллель-специфические зонды с LNA-модификациями (LNA-нуклеотиды – замкнутые

Таблица 1. Демографические характеристики контрольной группы и пациентов с РС. Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего

	Дети		Взрослые		
	Контрольная группа, n = 20	Пациенты с РС, дебют, n = 18	Контрольная группа, n = 31	Пациенты с РС, дебют, n = 17	Пациенты с РС, n = 16
Возраст, лет	13,3 \pm 0,66	14,5 \pm 0,70	39,1 \pm 2,27	33,8 \pm 1,93	41,7 \pm 3,38
Возраст дебюта РС, лет	–	14,5 \pm 0,70	–	33,8 \pm 1,93	30,3 \pm 2,89
Длительность заболевания, лет	–	< полугод	–	< полугод	11,4 \pm 1,58
Пол (М : Ж)	11 : 9	7 : 11	8 : 23	5 : 12	1 : 15

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, использованные для определения генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*

Полиморфизм	Название	Последовательность 5' – 3'
Полиморфизм С677Т гена <i>MTHFR</i> (rs1801133)	F	CTTCACAAAGCGGAAGAATGTG
	R	CCTGAAGCACTTGAAGGAGAA
	Probe, C-allele	FAM–CGGGA+G+C+CG+ATTTTC–BHQ-1
	Probe, T-allele	ROX–CGG+GA+G+T+C+GATTTTC–BHQ-2
Полиморфизм А1298С гена <i>MTHFR</i> (rs1801131)	F	AGGAGCTGCTGAAGATGTG
	R	GTTCTCCCGAGAGGTAAGA
	Probe, A-allele	FAM–AGA+CA+CTT+T+CTT+CACTGG–BHQ1
	Probe, C-allele	ROX–AGA+CA+CTT+G+CTT+CACTG–BHQ2
Полиморфизм А2756G гена <i>MTR</i> (rs1805087)	F	CAGTGTTCCAGCTGTTAGATGAA
	R	TCTACCACTTACCTTGAGAGACTCAT
	Probe, A-allele	FAM–AAT+G+G+T+C+CTGTCTA–BHQ-1
	Probe, G-allele	ROX–AATG+G+C+C+CTGTCTA–BHQ-2
Полиморфизм А66G гена <i>MTRR</i> (rs1801394)	F	ATATGCTACACAGCAGGG
	R	CATAAATATCACTTCCCAACCA
	Probe, A-allele	FAM–AGAA+A+T+A+T+GTGAGCA–BHQ-1
	Probe, G-allele	ROX–GAAA+T+G+T+GTGAGC–BHQ-2

Примечание. Знаком «+» обозначены модифицированные LNA-нуклеотиды.

нуклеотиды (Locked nucleic acid)), синтезированные ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (последовательно праймеров и зондов приведены в табл. 2).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica (v. 10). Выбор статистических критериев основывался на соответствии или несоответствии данных закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Различия в содержании гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с разным возрастом начала РС. Анализ уровня гомоцистеина выявил достоверные различия между обследованными группами (ANOVA, $F = 3,495$; $p = 0,010$) (рис. 1). По результатам апостериорных сравнений выявлено

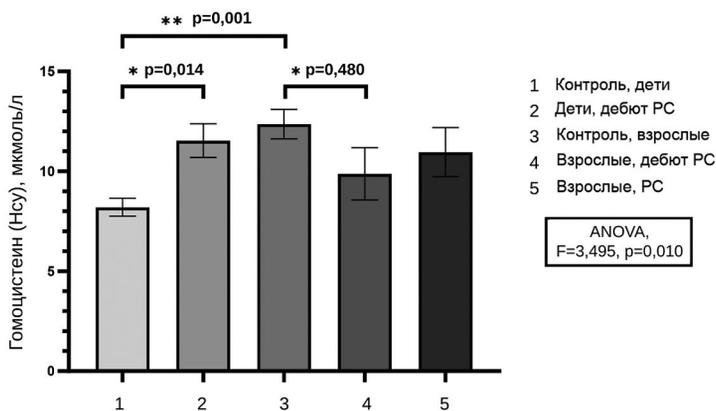


Рис. 1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови у здоровых испытуемых и пациентов с РС. Данные представлены в виде средних и ошибки среднего. * Достоверное отличие между группами, $p < 0,05$; ** достоверное отличие между группами, $p < 0,01$

достоверное увеличение содержания гомоцистеина у пациентов с детским вариантом РС в стадии дебюта заболевания по сравнению с детьми контрольной группы соответствующего возраста ($p = 0,014$).

Между двумя контрольными группами – детей и взрослых без неврологической патологии – также наблюдались достоверные различия ($p = 0,0006$): в группе взрослых ожидаемо регистрировались более высокие показатели уровня гомоцистеина. При сравнении среднегрупповых значений у взрослых пациентов в стадии дебюта заболевания не только не выявлено повышения содержания гомоцистеина относительно соответствующей группы контроля, но и, напротив, отмечено незначительное, но достоверное его снижение ($p = 0,048$). Нарастания уровня гомоцистеина у взрослых пациентов при большей длительности РС также выявлено не было.

В дополнение к сравнению среднегрупповых значений представлялось целесообразным провести анализ индивидуальной вариабельности уровня гомоцистеина в исследуемых группах. В первую очередь обращало на себя внимание то, что испытуемые, значения уровня гомоцистеина у которых выходили за границы референтного интервала, присутствовали не только среди пациентов с диагнозом РС, но и в контрольных группах. Кроме того, между группами контроля разного возраста были выявлены достоверные различия в содержании гомоцистеина, поэтому для проведения дальнейшего анализа отдельно для каждой из контрольных групп были рассчитаны значения концентрации гомоцистеина, соответствующие 95%-ному перцентилю. Эти значения были приняты как верхняя граница для соответствующей возрастной группы. Для детей из контрольной группы этот пороговый показатель составил 11,4 $\mu\text{mol/L}$. Содержание гомоцистеина, превышающее уровень 95%-ного перцентиля, было отмечено у 2 из 20 де-

тей контрольной группы и у 8 из 18 детей с дебютом демиелинизирующего заболевания; различия между группами в распределении испытуемых с нормальным и повышенным содержанием гомоцистеина были достоверны ($p = 0,039$, точный критерий Фишера). Величина отношения шансов (OR), характеризующая степень риска развития патологии, составила 7,2 (95% CI: 1,275, 40,67).

Для взрослых испытуемых контрольной группы 95%-ный перцентиль концентрации гомоцистеина оказался равен 19,7 $\mu\text{mol/L}$, значения выше этого уровня в контрольной группе имели 2 человека из 30, в группе дебюта РС – 2 из 17 пациентов, и 1 из 16 пациентов с длительностью заболевания более года. Величина OR составила 1,87 (95% CI: 0,239, 14,61) для взрослых пациентов в дебюте РС ($p = 0,919$) и 0,93 (95% CI: 0,078, 11,15) для пациентов с продолжительностью РС более полугода ($p > 0,99$). Соответственно, различий между группой контроля и группами пациентов выявлено не было.

Данные ROC-анализа подтвердили, что оценка содержания гомоцистеина у испытуемых детского возраста позволяет с высокой степенью точности определить наличие патологии, то есть повышение концентрации гомоцистеина является значимым маркером развития патологического процесса для детей в начальном периоде РС (рис. 2, а). Анализ на основе оценки уровня витамина В12 не позволяет выявить достоверные различия между группами здоровых детей и детей с дебютом РС (рис. 2, б). Совместное определение гомоцистеина и В12 также не приводит к улучшению прогностической ценности модели (рис. 2, в).

Анализ уровня витаминов группы В в сыворотке крови у пациентов с РС. Сравнение абсолютных значений уровней витамина В9 (фолиевой кислоты), В12 (цианокобаламина) и В6 (пиридоксина) не выявило различий между исследуемыми группами (табл. 3).

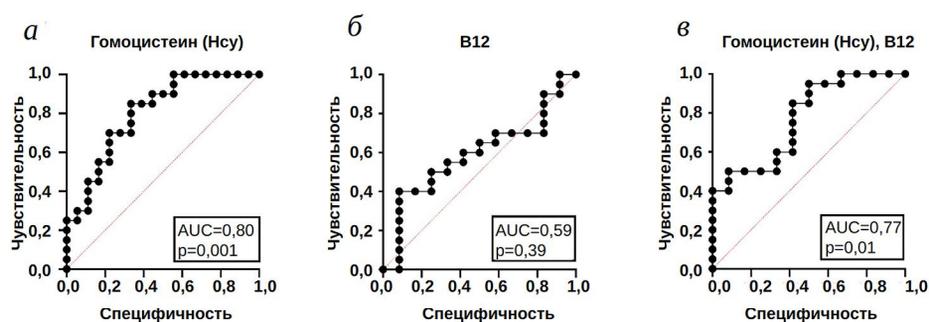


Рис. 2. Характеристические (ROC) кривые для оценки риска развития РС на основе определения уровня гомоцистеина (а), витамина В12 (б) и гомоцистеина и витамина В12 (в) у детей. AUC – площадь под кривой

Таблица 3. Содержание витаминов В6, В9 и В12 и значения отношений гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/В9) и гомоцистеин/кобаламин (Hcy/В12) у пациентов с РС и здоровых испытуемых контрольных групп

Группа	В6	В9	Hcy/В9	В12	Hcy/В12
Дети, контроль ($n = 20$)	79,3 [58,4; 137]	11,8 [8,97; 18,0]	0,62 [0,42; 0,95]	254,9 [190,8; 403,3]	0,035 [0,022; 0,043]
Дети, дебют РС ($n = 18$)	69,4 [42,8; 92,1]	11,5 [9,97; 14,5]	0,78 [0,60; 1,28]	296,1 [254,4; 372,8]	0,034 [0,02; 0,049]
Взрослые, контроль ($n = 31$)	59,5 [45,9; 76,9]	15,1 [12,1; 18,9]	0,09 [0,03; 0,57]	306,1 [192,0; 412,3]	0,036 [0,023; 0,075]
Взрослые, дебют РС ($n = 17$)	65,6 [40,6; 94,0]	15,5 [12,3; 25,5]	0,52 [0,24; 0,73]	328,5 [232,5; 488,3]	0,022 [0,013; 0,046]
Взрослые, РС ($n = 16$)	67,6 [52,8; 99,5]	18,3 [11,4; 23,1]	0,69 [0,34; 0,99]	372,3 [286,0; 566,0]	0,029 [0,015; 0,039]

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [1 квартиль; 3 квартиль]

Для оценки взаимосвязи между уровнем витаминов группы В и содержанием гомоцистеина и выявления роли дефицита витаминов в развитии РС были проанализированы корреляционные взаимосвязи между определяемыми показателями и рассчитаны соотношения гомоцистеин/кобаламин (Hcy/В12) и гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/В9). У детей контрольной группы выявлена достоверная отрицательная связь между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина В12. У детей в стадии дебюта РС этой зависимости обнаружено не было (данные приведены в табл. 4). Кроме того, все дети с РС, значения концентрации гомоцистеина у которых превышали 11,4 мкмоль/л (рассчитанный нами уровень 95%-ного перцентиля), имели нормальные значения концентрации витамина В12, у двоих из восьми детей отмечалось снижение концентрации фолиевой кислоты. Таким образом, для детей с педиатрическим вариантом РС в стадии дебюта заболевания характерно нарастание сывороточного уровня гомоцистеина, которое может не сопровождаться дефицитом фолиевой кислоты и/или кобаламина (В12) плазмы крови.

У здоровых взрослых уровень гомоцистеина отрицательно коррелировал и с содержанием витамина В12, и с уровнем фолиевой кислоты. У пациентов с РС (как в стадии дебюта, так и при большей продолжительности заболевания) эти корреляционные взаимосвязи отсутствовали (табл. 4). При этом гипергомоцистеинемия была отмечена у двух взрослых пациентов в стадии дебюта РС (21,5 и 23,9 мкмоль/л), у одного из этих пациентов повышение концентрации гомоцистеина сопровождалось дефицитом витамина В12, у другого отмечался недостаточный уровень фолиевой кислоты.

При сравнении соотношений гомоцистеин/кобаламин (Hcy/В12) и гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/В9) с применением теста Крускала-Уоллиса были обнаружены достоверные различия между группами для показателя Hcy/В9 ($N = 28,271$, $p < 0,001$). По результатам попарных сравнений соотношение Hcy/В9 оказалось достоверно выше у взрослых пациентов с РС по сравнению с соответствующей контрольной группой ($p = 0,006$), а также у здоровых взрослых по сравнению со здоровыми детьми контрольной группы ($p = 0,001$).

Таблица 4. Данные корреляционного анализа для оценки взаимосвязи между уровнями гомоцистеина (Hcy), фолиевой кислоты (B9) и витамина B12

Группа	Hcy – B9	Hcy – B12
Дети, контрольная группа (n = 20)	r = -0,17; p = 0,47	r = -0,51; p = 0,02
Дети, дебют РС (n = 18)	r = -0,18; p = 0,58	r = 0,16; p = 0,62
Взрослые, контрольная группа (n = 31)	r = -0,56; p = 0,001	r = -0,40; p = 0,03
Взрослые, дебют РС (n = 17)	r = 0,02; p = 0,95	r = -0,41; p = 0,11
Взрослые, РС (n = 16)	r = -0,36; p = 0,17	r = -0,32; p = 0,23

Примечание. r – коэффициент корреляции Пирсона; p – значение для 95%-ного уровня значимости. Статистически значимые корреляции выделены жирным шрифтом.

У детей в стадии дебюта РС отличий по этому показателю от здоровых детей выявлено не было.

Анализ влияния генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла на уровень гомоцистеина. При оценке взаимосвязи между изменением уровня гомоцистеина и наличием полиморфных вариантов генов, контролирующих фолатный обмен, обнаружены следующие закономерности. С использованием многофакторного анализа выявлено достоверное влияние полиморфизма A2756G гена *MTR* на уровень гомоцистеина ($F = 4,766$, $p = 0,04$) у пациентов в дебюте РС, но не у испытуемых контрольных групп ($F = 0,855$, $p = 0,36$). При оценке взаимодействия факторов с использованием анализа ANOVA-MANOVA установлено, что также у пациентов в дебюте РС, но не у здоровых испытуемых контрольных групп наблюдается достоверное сочетанное зависимое от возрастной группы влияние на уровень гомоцистеина генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* ($F = 9,95$; $p = 0,004$) и достоверное совместное влияние генотипов по полиморфизмам A1298C гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* на уровень гомоцистеина ($F = 8,29$; $p = 0,008$), которое также зависело от возраста. Зависимость от возраста выражалась, в частности, в том, что у детей наиболее высокие значения уровня гомоцистеина были отмечены при сочетании наличия минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* с генотипом CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, а также при сочетании наличия минорных аллелей по двум полиморфизмам – A2756G гена *MTR* и A1298C гена *MTHFR*. У взрослых пациентов в дебюте РС при сочетании наличия минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* с генотипом CC

по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, напротив, отмечались самые низкие значения концентрации гомоцистеина. Выявленные закономерности указывают на то, что разнонаправленные изменения уровня гомоцистеина, наблюдаемые у взрослых и педиатрических пациентов в дебюте РС, могут быть, по крайней мере, частично, обусловлены наличием полиморфных вариантов генов фолатного цикла.

Показано также достоверное сочетанное влияние генотипа по полиморфизму A2756G гена *MTR* и B12-дефицитного состояния на уровень гомоцистеина (ANOVA-MANOVA, $F = 9,042$, $p = 0,004$). Важно, что это влияние не зависело от возраста, то есть было характерно и для детей, и для взрослых. При этом наиболее высокие значения уровня гомоцистеина наблюдались при сочетании дефицита B12 и генотипа AA по полиморфизму A2756G гена *MTR*. Принимая во внимание полученные данные о том, что влияние дефицита B12 на уровень гомоцистеина зависит от генотипа по полиморфизму A2756G гена *MTR*, можно заключить, что повышение уровня гомоцистеина у носителей минорной аллели по этому полиморфизму может не сопровождаться снижением содержания витамина B12 в крови. Лабораторное исследование крови у этих пациентов без проведения генотипирования будет неинформативным.

Интересные закономерности, согласующиеся с выводами, описанными выше, были выявлены при проведении корреляционного анализа между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина B12 в плазме крови, если анализ выполнялся для отдельных подгрупп с учётом генотипа по полиморфизмам A2756G и C677T. Так, только для детей, у которых присутствовали минорные аллели по двум полиморфным локусам, была характерна достоверная сильная отрицательная корреляционная связь между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина B12 в плазме крови (рис. 3). У взрослых такой закономерности выявлено не было. Полученные данные позволяют предположить, что именно при таком сочетании генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* применение препаратов кобаламина для нормализации повышенного уровня гомоцистеина у детей может быть наиболее эффективным.

Поскольку на достоверность выявленных взаимодействий может оказывать влияние распределение частот по исследуемым полиморфным вариантам в сравниваемых группах, целесообразно представление данных о соотношении генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у здоровых испытуемых и пациентов с РС. В табл. 5 обобщены данные для пяти групп – с разделением по возрасту и наличию патологии. В табл. 6 данные объединены в две группы –

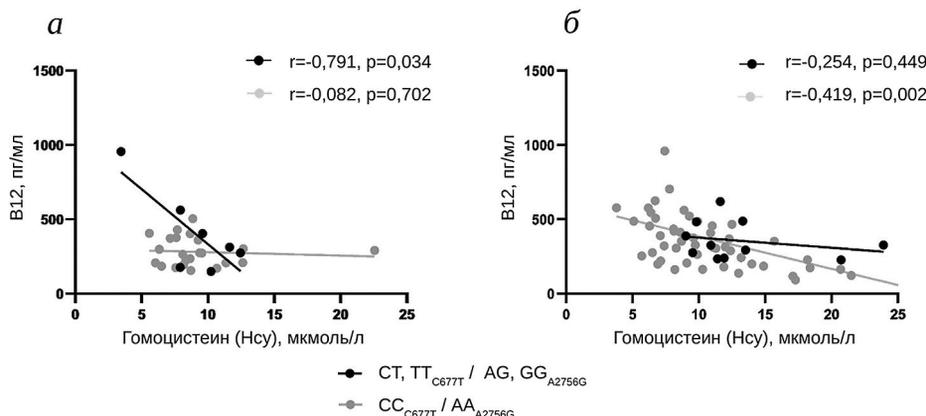


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием витамина В12 и уровнем гомоцистеина у испытуемых с учётом сочетания генотипов по полиморфизмам С677Т гена *MTHFR* и А2756 гена *MTR*. а – Дети (контрольная группа и пациенты детского возраста в стадии дебюта РС); б – взрослые (контрольная группа и взрослые пациенты с продолжительностью заболевания не более полугода (дебют РС)). Результаты корреляционного анализа представлены в виде коэффициента корреляции Пирсона и значения *p* для уровня значимости 95%

Таблица 5. Распределение генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла и частоты минорных аллелей в сравниваемых группах

Полиморфизм	Генотипы, минорная аллель	Группа							
		Дети, контроль (n = 20)	Дети, дебют РС (n = 18)	<i>p</i> (χ^2)	Взрослые, контроль (n = 31)	Взрослые, дебют РС (n = 17)	<i>p</i> (χ^2)	Взрослые, РС (n = 16)	<i>p</i> (χ^2)
<i>MTHFR</i> : С677Т	СС	13	8	0,18	19	7	0,54	10	0,99
	СТ	7	8		9	9		6	
	ТТ	0	2		3	1		0	
	Т, частота	0,18	0,33		0,24	0,32		0,19	
<i>MTHFR</i> : А1298С	АА	5	10	0,07	13	7	0,94	6	0,78
	АС	11	7		16	8		8	
	СС	4	1		2	2		2	
	С, частота	0,48	0,25		0,32	0,35		0,38	
<i>MTR</i> : А2756G	АА	8	12	0,30	14	10	0,72	12	0,14
	AG	11	5		14	5		3	
	GG	1	1		3	2		1	
	G, частота	0,33	0,19		0,32	0,26		0,16	
<i>MTRR</i> : А66G	АА	2	3	0,93	8	5	0,95	3	0,72
	AG	12	9		16	7		8	
	GG	6	6		7	5		5	
	G, частота	0,60	0,58		0,48	0,50		0,53	

Примечание. *p* – уровень достоверности различий для частот минорных аллелей между группами пациентов и соответствующей по возрасту контрольной группой (значения *p* рассчитаны для критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность).

Таблица 6. Сравнение распределений генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла и частот минорных аллелей в группах здоровых испытуемых и пациентов с РС без разделения по возрасту

Полиморфизм	Генотип	Группа		p (χ^2)
		Контроль ($n = 51$)	РС ($n = 51$)	
<i>MTHFR</i> : C677T	CC	32	25	0,63
	CT	16	23	
	TT	3	3	
	T-аллель, частота	0,22	0,26	
<i>MTHFR</i> : A1298C	AA	18	23	0,46
	AC	27	23	
	CC	6	5	
	C-аллель, частота	0,38	0,32	
<i>MTR</i> : A2756G	AA	22	34	0,08
	AG	25	13	
	GG	4	4	
	G-аллель, частота	0,32	0,21	
<i>MTRR</i> : A66G	AA	10	11	0,33
	AG	28	24	
	GG	13	16	
	G-аллель, частота	0,47	0,55	

Примечание. p – уровень достоверности различий для частот минорных аллелей между двумя группами (значения p рассчитаны для критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность).

здоровых испытуемых и пациентов с РС без разделения по возрастному признаку и длительности заболевания. В обоих случаях распределение генотипов у пациентов не отличалось достоверно от такового у контрольных испытуемых. Обращает на себя внимание, однако, тенденция к увеличению доли носителей минорной аллели по полиморфизму C677T гена *MTHFR* у пациентов в дебюте РС (как у детей, так и у взрослых) и тенденция к снижению частоты минорных аллелей по полиморфизмам A2756G гена *MTR* (у детей и взрослых) и A1298C гена *MTHFR* (у детей) (табл. 5). Несмотря на то что эти тенденции менее заметны в группах без разделения по возрастному признаку (табл. 6), оценить, обусловлены ли они малым размером групп или возрастными особенностями, не представляется возможным без дополнительных исследований. Достоверных различий в уровне витаминов при разделении сравниваемых групп на подгруппы в зависимости от генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла выявлено не было (данные приведены в табл. 1 и табл. 2 Приложения). Сравнение концентрации гомоци-

стеина в крови у носителей различных генотипов (табл. 7) подтверждает вклад исследуемых полиморфных локусов в нарушения фолатного обмена при РС. Так, в группах контроля (как у детей, так и у взрослых) различий в уровне гомоцистеина между гомозиготами по мажорной аллели и носителями минорных аллелей обнаружено не было. У пациентов в дебюте РС (и у детей, и у взрослых) выявлена зависимость изменений уровня гомоцистеина относительно соответствующих контрольных групп от генотипа по полиморфизмам генов *MTHFR* и *MTR*.

Стоит отметить также, что характер выявленных изменений уровня гомоцистеина у пациентов указывает на то, что они не являются следствием неравномерного распределения частот генотипов по исследуемым полиморфным вариантам. Так, в частности, достоверное повышение уровня гомоцистеина у детей с РС по сравнению со здоровыми детьми отмечено в подгруппе носителей генотипа CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR* и у носителей минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* (табл. 7), в то время как частоты этих

Таблица 7. Концентрация гомоцистеина (мкмоль/л) в крови здоровых испытуемых и пациентов с РС с различными генотипами по полиморфизмам генов фолатного цикла

Группа	Полиморфизмы генов фолатного цикла и соответствующие варианты генотипов							
	<i>MTHFR</i> , C677T		<i>MTHFR</i> , A1298C		<i>MTR</i> , A2756G		<i>MTRR</i> , A66G	
	CC	CT, TT	AA	AC, CC	AA	AG, GG	AA	AG, GG
Дети, контроль (n = 20)	8,35 [7,6; 8,74]	7,89 [6,37; 11,4]	7,6 [6,37; 9,56]	8,35 [7,73; 9,41]	8,21 [6,23; 10,06]	8,28 [7,74; 9,15]	9,57 [9,56; 9,85]	8,05 [6,53; 8,74]
Дети, дебют РС (n = 18)	12,68* [8,27; 13,71]	10,76 [9,3; 12,43]	10,76 [8,9; 12,96]	12,02* [8,92; 12,86]	10,34 [8,27; 12,99]	11,77* [10,41; 12,66]	11,37 [8,4; 14,41]	11,11* [8,9; 12,96]
Взрослые, контроль (n = 31)	11,65 [8,6; 14,9]	11,75 [9,75; 16,1]	11,8 [9,2; 13,65]	11,6 [8,7; 16,4]	11,1 [8,7; 16,4]	11,9 [9,3; 13,3]	9,9 [8,4; 14,9]	11,9 [9,8; 14,9]
Взрослые, дебют РС (n = 17)	6,91# [5,7; 9,74]	8,68 [6,74; 11,9]	7,44 [5,4; 13,5]	7,64# [6,3; 9,92]	6,94# [6,3; 9,92]	9,74 [6,91; 13,5]	7,13 [6,74; 7,44]	8,95 [6,35; 12,70]
Взрослые, РС (n = 16)	10,31 [8,89; 12,3]	9,71 [9,0; 10,9]	11,6 [9,9; 12,4]	9,31 [7,8; 11,02]	9,75 [8,35; 12,35]	10,21 [9,26; 11,6]	12,3 [9,52; 12,4]	9,6 [8,89; 11,02]
<i>p</i>	* <i>p</i> = 0,033 # <i>p</i> = 0,027		* <i>p</i> = 0,036 # <i>p</i> = 0,029		# <i>p</i> = 0,020	* <i>p</i> = 0,002	* <i>p</i> = 0,002	

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [1 квартиль; 3 квартиль]. * Достоверное отличие между группами «Дети, дебют РС» и «Дети, контроль»; # достоверное отличие между группами «Взрослые, дебют РС» и «Взрослые, контроль» (U-критерий Манна-Уитни). Достоверные различия дополнительно выделены жирным шрифтом.

генотипов у пациентов ниже, чем в контрольной группе (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе исследования результаты указывают на то, что уже в начальной стадии РС у пациентов наблюдаются нарушения фолатного обмена, маркером которых является изменение концентрации гомоцистеина. Однако у детей с педиатрическим РС и у взрослых пациентов выявленные нарушения, по-видимому, имеют в основе различные механизмы.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из незаменимой аминокислоты метионина и метаболизируемая двумя путями: обратной конверсией в метионин (реметилирование) и транссульфурацией. Повышение уровня гомоцистеина выше безопасных значений (гипергомоцистеинемия) признано важным фактором риска развития сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологии [13]. Активно исследуется роль гомоцистеина в патогенезе нейродегенера-

тивных заболеваний [14]. Отмечается, что увеличение концентрации гомоцистеина коррелирует с выраженностью когнитивного дефицита у пациентов с болезнью Альцгеймера [15], сывороточный уровень гомоцистеина отражает тяжесть моторных и немоторных нарушений при болезни Паркинсона, а также определяет прогноз заболевания [16, 17]. Результаты исследований, сравнивающих содержание гомоцистеина у пациентов с РС и контрольных лиц, достаточно противоречивы – в ряде исследований сообщается о повышенном уровне гомоцистеина при РС [18, 19], другие авторы не обнаруживают таких отличий [20, 21]. Однако связь повышения уровня гомоцистеина с прогрессированием заболевания у пациентов с РС убедительно доказана [22], установлено неблагоприятное влияние гипергомоцистеинемии на развитие когнитивных нарушений [23]. В ряде работ обнаружены различия в сывороточном уровне гомоцистеина у пациентов с ремитирующим и прогрессирующим течением [24].

Известно, что основной алиментарной причиной развития гипергомоцистеинемии является дефицит нутриентов и прежде всего витаминов

группы В, выполняющих роль кофакторов в цикле фолиевой кислоты и при реметилировании гомоцистеина [25, 26]. Процесс обратного превращения гомоцистеина в метионин (реметилирование гомоцистеина) контролируется тремя основными ферментами – *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*. Нарушение активности этих ферментов, вызванное наличием полиморфных вариантов в кодирующих их генах, также может способствовать избыточному накоплению гомоцистеина в крови [27, 28].

Наблюдаемое у детей с РС повышение уровня гомоцистеина относительно значений, характерных для группы контроля соответствующего возраста, в большинстве случаев не сопровождалось дефицитом фолиевой кислоты и витамина В12 в плазме крови. Причинами повышения уровня гомоцистеина при отсутствии лабораторных признаков витаминдефицитного состояния могут быть: 1) недостаточное поступление активной формы фолиевой кислоты (тетрагидрафолиевой кислоты, ТГФК) в клетку, то есть функциональный дефицит фолатов, обусловленный нарушением транспорта фолиевой кислоты; 2) низкий уровень ТГФК в тканях, связанный с наличием полиморфизмов в гене *MTHFR*; 3) генетические дефекты ферментов *MTR* и *MTRR*. Перечисленные причины способствуют снижению скорости реметилирования гомоцистеина в метионин и, соответственно, накоплению его в плазме крови. Кроме того, гипергомоцистеинемия может быть связана со снижением эффективности метаболического пути цистатиона, в процессе которого гомоцистеин метаболизируется до цистеина, сероводорода и других серосодержащих соединений.

Нарушение обмена гомоцистеина и развитие гипергомоцистеинемии у носителей полиморфизмов генов фолатного цикла обусловлено снижением активности фермента *MTHFR* при наличии Т-аллели полиморфизма С677Т и нарушением В12-зависимой реакции реметилирования, катализируемой ферментом *MTR* [29, 30]. Причём, по данным литературы, может наблюдаться кумулятивное действие полиморфизмов – большой метаболический эффект проявляется при наличии нескольких полиморфных вариантов [31].

Для выборки испытуемых, включённых в представленное исследование, получено подтверждение сочетанного влияния генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла на уровень гомоцистеина, причём это влияние проявлялось только у пациентов, но не в группах контроля, и, кроме того, зависело от возрастной группы. Также у обследованных детей в начальной стадии РС уровень гомоцистеина был достоверно выше, чем у здоровых детей, кроме того, у детей в дебюте РС не проявлялась характерная для здоровых детей контрольной группы взаимосвязь между уровнем

гомоцистеина и цианокобаламина (витамина В12). В целом, полученные данные позволяют сделать вывод о наличии у детей с РС признаков нарушения фолатного обмена. Предположительно, развитие этих нарушений в детском возрасте преимущественно связано с изменением биодоступности и/или нарушением реализации коферментной функции кобаламина, что, в свою очередь, определяется наличием полиморфизмов в генах *MTR* и *MTHFR* и их сочетанным влиянием. Стоит заметить, что размер выборки не позволяет сделать вывод о том, влияет ли наличие полиморфных аллелей генов фолатного цикла на риск развития педиатрического варианта РС. В частности, для уточнения вклада полиморфных вариантов генов фолатного цикла в патогенез педиатрического РС представляется целесообразным сравнение частот полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у пациентов с разным возрастом дебюта заболевания. Такое исследование, возможно, позволит оценить специфичность влияния этих полиморфных вариантов на восприимчивость к развитию РС и/или течение заболевания.

Сравнение лабораторных показателей у пациентов с РС на стадии дебюта заболевания с данными, полученными для здоровых испытуемых соответствующего возраста, выявило достоверное повышение уровня гомоцистеина только у пациентов педиатрической группы, но не у взрослых пациентов. Известно, что характерной особенностью дебюта заболевания при педиатрическом варианте РС является значительная выраженность воспалительной реакции с формированием крупных очагов демиелинизации [32, 33]. Кроме того, при раннем дебюте РС более выражены аксональные повреждения в зонах демиелинизации [34]. Одной из важных задач терапии на ранних стадиях заболевания у детей с РС является ограничение повреждения аксонов, вторичного по отношению к обширным воспалительным изменениям [35]. Контроль лабораторных показателей и нормализация сывороточного уровня гомоцистеина может быть одним из ценных инструментов в достижении этой цели. Важно, что такое раннее вмешательство может предотвратить когнитивные нарушения, риск развития которых также значителен у детей с РС [36–38].

В исследовании нами рассчитано значение сывороточного уровня гомоцистеина, соответствующее 95%-ному перцентилю для группы здоровых детей (11,4 мкмоль/л). Этот уровень близок к концентрациям (10–11 мкмоль/л), которые признаны Всемирной организацией здравоохранения как пограничные при диагностике заболеваний. Концентрация гомоцистеина 10,9 мкмоль/л была определена в работе Жлоба и Субботиной у пациентов с гипертонической болезнью как уровень,

указывающий на наличие функционального дефицита фолатов без снижения их уровня в плазме крови [39].

Необходимо отметить, что в лабораторной практике обычно используют более широкие диапазоны нормальных значений содержания гомоцистеина в крови – границы референтного интервала указывают в пределах от 4,44 до 13,56 мкмоль/л для женщин и от 5,46 до 16,2 мкмоль/л для мужчин. Такое определение максимальных значений диапазона обусловлено тем, что при концентрации в плазме, превышающей уровень 14–15 мкмоль/л, проявляется прямое токсическое действие гомоцистеина. Однако всё больший интерес у исследователей вызывает изучение механизмов и последствий умеренного повышения уровня гомоцистеина, не связанного с непосредственным повреждающим действием этой аминокислоты. Важно отметить также, что содержание гомоцистеина зависит от возраста, референтные интервалы для детей и подростков ниже, чем для взрослых – нормальным считается уровень 4,5–5 мкмоль/л и 6–7 мкмоль/л соответственно [40, 41].

Обобщая изложенные факты, стоит подчеркнуть, что механизмы повреждающего действия гомоцистеина на ЦНС включают различные пути. Прямое токсическое действие высоких концентраций гомоцистеина связывают с его стимулирующим влиянием на NMDA-рецепторы и чувствительностью нейронов к эксайтотоксичности [42]. Вазотоксическое влияние гомоцистеина способствует развитию эндотелиальной дисфункции и нарушению проницаемости гематоэнцефалического барьера [43, 44]. В частности, этот механизм играет важную роль в инициации демиелинирующего процесса при РС [45, 46]. Не меньшее внимание тем не менее должно уделяться умеренному повышению уровня гомоцистеина, являющемуся маркером нарушений метаболизма одноуглеродных фрагментов и, в частности, маркером нарушений фолатного обмена. Связанный с накоплением гомоцистеина дефицит метильных доноров, гипометилирование и, как следствие, нарушение процессов миелинизации и ремиелинизации – один из ключевых механизмов, опосредующих вовлечение фолатного обмена в патогенез демиелинизирующих заболеваний [47, 48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные дают основание рассматривать повышение уровня гомоцистеина как ранний маркер патологии при педиатрическом варианте РС. Важно, что гомоцистеин относится к так называемым потенциально модифицируемым факторам риска и его концентрация может быть нормализована назначением препаратов витаминов (в частности, В12, фолиевой кислоты), а также коррекцией пищевого рациона. Однако разработка алгоритмов коррекции должна проводиться с учётом обследования на наличие полиморфизмов генов *MTHFR* и *MTR*.

Вклад авторов. В.И. Людыно – написание текста, обсуждение результатов исследования; Е.А. Цымбалова – проведение экспериментов; Е.А. Чернявская – проведение экспериментов; Е.Ю. Скрипченко – обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи; Г.Н. Бисага – обсуждение результатов исследования; А.В. Дмитриев – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования; И.Н. Абдурасулова – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Санкт-Петербургского научного фонда (грант № 22-25-20191).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные при проведении исследования, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех включённых в исследование пациентов и контрольных испытуемых было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», протокол № 2/22 от 06.04.2022.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Compston, A., and Coles, A. (2008) Multiple sclerosis, *Lancet*, **372**, 1502-1517, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7).
2. Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2023) Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting, *Cell*, **186**, 1309-1327, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.008>.
3. Brenton, J. N., Kammeyer, R., Gluck, L., Schreiner, T., and Makhani, N. (2020) Multiple sclerosis in children: current and emerging concepts, *Semin Neuro.*, **40**, 192-200, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1703000>.

4. Simone, I. L., Carrara, D., Tortorella, C., Liguori, M., Lepore, V., Pellegrini, F., Bellacosa, A., Ceccarelli, A., Pavone, I., and Livrea, P. (2002) Course and prognosis in early-onset MS: comparison with adult-onset forms, *Neurology*, **59**, 1922-1928, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000036907.37650.8e>.
5. Renoux, C., Vukusic, S., Mikaeloff, Y., Edan, G., Clanet, M., et al. (2007) Natural history of multiple sclerosis with childhood onset, *N. Engl. J. Med.*, **356**, 2603-2613, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067597>.
6. Krysko, K. M., Graves, J. S., Rensel, M., Weinstock-Guttman, B., Rutatangwa, A., et al. (2020) US network of Pediatric MS centers. Real-world effectiveness of initial disease-modifying therapies in pediatric multiple sclerosis, *Ann. Neurol.*, **88**, 42-55, <https://doi.org/10.1002/ana.25737>.
7. Weng, Q., Wang, J., Wang, J., Tan, B., Wang, J., et al. (2017) Folate metabolism regulates oligodendrocyte survival and differentiation by modulating AMPK α activity, *Sci. Rep.*, **7**, 1705, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01732-1>.
8. McGarel, C., Pentieva, K., Strain, J. J., and McNulty, H. (2015) Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the lifecycle, *Proc. Nutr. Soc.*, **74**, 46-55, <https://doi.org/10.1017/S0029665114001554>.
9. Naninck, E. F. G., Stijger, P. C., and Brouwer-Brolsma, E. M. (2019) The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring, *Adv. Nutr.*, **10**, 502-519, <https://doi.org/10.1093/advances/nmy120>.
10. Zou, R., El Marroun, H., Cecil, C., Jaddoe, V. W. V., Hillegers, M., et al. (2021) Maternal folate levels during pregnancy and offspring brain development in late childhood, *Clin. Nutr.*, **40**, 3391-3400, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.025>.
11. Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria", *Ann. Neurol.*, **58**, 840-846, <https://doi.org/10.1002/ana.20703>.
12. Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., et al. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria, *Lancet Neurol.*, **17**, 162-173, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).
13. Ganguly, P., and Alam, S. F. (2015) Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease, *Nutr. J.*, **14**, 6, <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>.
14. Ansari, R., Mahta, A., Mallack, E., and Luo, J. J. (2014) Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review, *J. Clin. Neurol.*, **10**, 281-288, <https://doi.org/10.3988/jcn.2014.10.4.281>.
15. Farina, N., Jernerén, F., Turner, C., Hart, K., and Tabet, N. (2017) Homocysteine concentrations in the cognitive progression of Alzheimer's disease, *Exp. Gerontol.*, **99**, 146-150, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.008>.
16. Kocer, B., Guven, H., Conkbayir, I., Comoglu, S. S., and Delibas, S. (2016) The effect of hyperhomocysteinemia on motor symptoms, cognitive status, and vascular risk in patients with Parkinson's disease, *Parkinsons Dis.*, **2016**, 1589747, <https://doi.org/10.1155/2016/1589747>.
17. Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Elewa, Y. H. A., Zahran, M. H., Alexiou, A., et al. (2023) Parkinson's disease risk and hyperhomocysteinemia: the possible link, *Cell Mol. Neurobiol.*, **43**, 2743-2759, <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01350-8>.
18. Ramsaransing, G. S., Fokkema, M. R., Teelken, A., Arutjunyan, A. V., Koch, M., and De Keyser, J. (2006) Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **77**, 189-192, <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.072199>.
19. Li, X., Yuan, J., Han, J., and Hu, W. (2020) Serum levels of homocysteine, Vitamin B12 and folate in patients with multiple sclerosis: an updated meta-analysis, *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 751-761, <https://doi.org/10.7150/ijms.42058>.
20. Kararizou, E., Paraskevas, G., Triantafyllou, N., Koutsis, G., Evangelopoulos, M. E., et al. (2013) Plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis in the Greek population, *J. Chin. Med. Assoc.*, **76**, 611-614, <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2013.07.002>.
21. Bystrická, Z., Laubertová, L., Ďurfinová, M., and Paduchová, Z. (2017) Methionine metabolism and multiple sclerosis, *Biomarkers*, **22**, 747-754, <https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1334153>.
22. Oliveira, S. R., Flauzino, T., Sabino, B. S., Kallaur, A. P., Alfieri, D. F., et al. (2018) Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 1393-1399, <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4>.
23. Teunissen, C. E., Killestein, J., Kragt, J. J., Polman, C. H., Dijkstra, C. D., and Blom, H. J. (2008) Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 1349-1353, <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.151555>.
24. Mititelu, R. R., Albu, C. V., Bacanoiu, M. V., Padureanu, V., Padureanu, R., et al. (2021) Homocysteine as a predictor tool in multiple sclerosis, *Discoveries (Craiova)*, **9**, e135, <https://doi.org/10.15190/d.2021.14>.
25. Pietrzik, K., and Brönstrup, A. (1998) Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population, *Eur. J. Pediatr.*, **157**, S135-S138, <https://doi.org/10.1007/pl00014298>.
26. Jakubowski, H. (2019) Homocysteine modification in protein structure/function and human disease, *Physiol. Rev.*, **99**, 555-604, <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2018>.

27. Цыбиков Н. Н., Цыбикова Н. М. (2007) Роль гомоцистеина в патологии человека, *Успехи современной биологии*, **127**, 471-481.
28. Smith, A. D., and Refsum, H. (2021) Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention, *J. Intern. Med.*, **290**, 826-854, <https://doi.org/10.1111/joim.13279>.
29. Tsai, M. Y., Bignell, M., Yang, F., Welge, B. G., Graham, K. J., and Hanson, N. Q. (2000) Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels, *Atherosclerosis*, **149**, 131-137, [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00297-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00297-x).
30. Raghubeer, S., and Matsha, T. E. (2021) Methylene tetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks, *Nutrients*, **13**, 4562, <https://doi.org/10.3390/nu13124562>.
31. Li, W. X., Dai, S. X., Zheng, J. J., Liu, J. Q., and Huang, J. F. (2015) Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency, *Nutrients*, **7**, 6670-6687, <https://doi.org/10.3390/nu7085303>.
32. Ruet, A. (2018) Update on pediatric-onset multiple sclerosis, *Rev. Neurol. (Paris)*, **174**, 398-407, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.04.003>.
33. Хабиров Ф. А., Хайбуллин Т. И., Гранатов Е. В., Аверьянова Л. А., Бабицева Н. Н., и др. (2022) Дифференциальная диагностика рассеянного склероза у пациентов детского возраста, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **122**, 60-67, <https://doi.org/10.17116/jnevro202212207260>.
34. Pfeifenbring, S., Bunyan, R. F., Metz, I., Röver, C., Huppke, P., et al. (2015) Extensive acute axonal damage in pediatric multiple sclerosis lesions, *Ann. Neurol.*, **77**, 655-667, <https://doi.org/10.1002/ana.24364>.
35. Alroughani, R., and Boyko, A. (2018) Pediatric multiple sclerosis: a review, *BMC Neurol.*, **18**, 27, <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1026-3>.
36. Ghezzi, A., Goretti, B., Portaccio, E., Roscio, M., and Amato, M. P. (2010) Cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis, *Neurol. Sci.*, **31 (Suppl 2)**, S215-S218, <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0437-8>.
37. Weisbrot, D., Charvet, L., Serafin, D., Milazzo, M., Preston, T., et al. (2014) Psychiatric diagnoses and cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, **20**, 588-593, <https://doi.org/10.1177/1352458513504249>.
38. Portaccio, E., De Meo, E., Bellinva, A., and Amato, M. P. (2021) Cognitive issues in pediatric multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **11**, 442, <https://doi.org/10.3390/brainsci11040442>.
39. Жлоба А. А., Субботина Т. Ф. (2019) Оценка фолатного статуса с использованием общего гомоцистеина у пациентов с гипертонической болезнью, *Российский медицинский журнал*, **25**, 158-165, <https://doi.org/10.18821/0869-2106-2019-25-3-158-165>.
40. Bates, C. J., Mansoor, M. A., Gregory, J., Pentiev, K., and Prentice, A. (2002) Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over, *Br. J. Nutr.*, **87**, 71-79, <https://doi.org/10.1079/BJN2001479>.
41. Полушин А. Ю., Одинак М. М., Янишевский С. Н., Голохвастов С. Ю., Цыган Н. В. (2013) Гипергомоцистеинемия – предиктор тяжести инсульта на фоне обширности повреждения мозгового вещества, *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии*, **4**, 89-94.
42. Ho, P. I., Ortiz, D., Rogers, E., and Shea, T. B. (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage, *J. Neurosci. Res.*, **70**, 694-702, <https://doi.org/10.1002/jnr.10416>.
43. Beard, R. S., Jr., Reynolds, J. J., and Bearden, S. E. (2011) Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions, *Blood*, **118**, 2007-2014, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338269>.
44. Tawfik, A., Elsherbiny, N. M., Zaidi, Y., and Rajpurohit, P. (2021) Homocysteine and age-related central nervous system diseases: role of inflammation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6259, <https://doi.org/10.3390/ijms22126259>.
45. Dubchenko, E., Ivanov, A., Spirina, N., Smirnova, N., Melnikov, M., et al. (2020) Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **10**, 637, <https://doi.org/10.3390/brainsci10090637>.
46. Спирина Н. Н., Спирин Н. Н., Киселева Е. В., Дубченко Е. А., Бойко А. Н. (2021) Гомоцистеин и маркеры эндотелиальной дисфункции при рассеянном склерозе, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **121**, 90-93, <https://doi.org/10.17116/jnevro202112107290>.
47. Perla-Kaján, J., and Jakubowski, H. (2019) Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3140, <https://doi.org/10.3390/ijms20133140>.
48. Coppedè, F., Stoccoro, A., Tannorella, P., and Migliore, L. (2019) Plasma homocysteine and polymorphisms of genes involved in folate metabolism correlate with DNMT1 gene methylation levels, *Metabolites*, **9**, 298, <https://doi.org/10.3390/metabo9120298>.

ASSOCIATION OF INCREASED HOMOCYSTEINE LEVEL WITH IMPAIRED FOLATE METABOLISM AND VITAMINS B DEFICIENCY IN EARLY ONSET OF MULTIPLE SCLEROSIS

V. I. Liudyno^{1*}, E. A. Tsymbalova¹, E. A. Chernyavskaya¹, E. Y. Scripchenko²,
G. N. Bisaga³, A. V. Dmitriev¹, and I. N. Abdurasulova¹

¹*Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental medicine",
197022 Saint Petersburg, Russia; e-mail: vliudyno@mail.ru*

²*Federal State Budgetary Institution "Pediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases" FMBA,
197022 Saint Petersburg, Russia*

³*Almazov National Medical Research Center, 197341 Saint Petersburg, Russia*

The study analyzed the homocysteine, cyanocobalamin (vitamin B12), folic acid (vitamin B9) and pyridoxine (vitamin B6) levels in the blood of children with confirmed demyelinating lesions of the central nervous system. The genotypes of the main polymorphisms of the folate cycle genes such as C677T and A1298C of the *MTHFR* gene, A2756G of the *MTR* gene and A66G of the *MTRR* gene were determined. A comparison of the studied parameters was carried out for five groups: a control group – healthy children under 18 years old, children at the onset of MS (with disease duration of no more than six months), healthy adults without neurological pathology, adult patients with MS at the onset stage of the disease and patients with long-term MS. A significant increase in homocysteine amount was revealed in children at the onset of MS compared to healthy children of the corresponding age. A high predictive value of determining homocysteine levels in children has been established. It has been demonstrated that an increased above safe values level of homocysteine is not accompanied by the presence of a vitamin deficiency state, assessed by the amount of folic acid, vitamins B6 and B12 in the blood. The lack of correlation between laboratory signs of vitamin deficiency and homocysteine levels may be due to the carriage of polymorphic variants of folate cycle genes, and an increased homocysteine level should be considered as a marker of functional disorders of folate metabolism that accompany the onset of the pathological process in MS in children. The identified patterns can be used in the development of treating strategies and preventing of the demyelination process in children with multiple sclerosis.

Keywords: multiple sclerosis, homocysteine, folate metabolism