

УДК 577.29

Статус метилирования LINE-1 у пациентов с рассеянным склерозом ассоциирован с изменениями фолатного обмена

Е. А. Цымбалова¹, Е. А. Чернявская¹, Г. Н. Бисага², А. Ю. Полушин³, Е. И. Лопатина³, И. Н. Абдурасулова¹, В. И. Людино^{1*}

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022 Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, 197341 Россия

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, 197022 Россия

*E-mail: vliudyno@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2024

Принята к печати 21.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27579

РЕФЕРАТ Нарушение эпигенетической регуляции и формирование aberrантных паттернов метилирования ДНК – важный компонент патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Изменения метилирования, обнаруживаемые у пациентов с рассеянным склерозом (РС), могут лежать в основе нарушения экспрессии генов, связанных с контролем воспалительных реакций, образованием миелина и поддержанием стабильной структуры миелиновой оболочки. Потенциальная обратимость эпигенетических изменений определяет целесообразность изучения их механизмов. В представленной работе оценено метилирование ретротранспозонов семейства LINE-1 в периферических клетках крови пациентов с РС и здоровых лиц контрольной группы. У здоровых испытуемых отмечено снижение уровня метилирования LINE-1 с возрастом. У пациентов с РС выявлена положительная корреляционная связь уровня метилирования LINE-1 с длительностью РС. Показано, что при прогрессирующем течении РС уровень метилирования LINE-1 достоверно выше, чем при ремиттирующем типе РС. Установлено, что обнаруживаемые при РС изменения метилирования LINE-1 коррелируют с изменением сывороточных уровней гомоцистеина и витамина B9, а также зависят от генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR*. Полученные данные показывают вклад полиморфизма C677T в реализацию эпигенетических нарушений при развитии РС и указывают на то, что гиперметилирование может быть опосредовано нарушениями фолатного обмена при РС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метилирование, LINE-1, рассеянный склероз, гомоцистеин, метаболизм фолатов, полиморфизм C677T.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РС – рассеянный склероз; РР РС – ремиттирующий РС; ПП РС – первично-прогрессирующий РС; ВП РС – вторично-прогрессирующий РС; КИС – клинически изолированный синдром; LINE-1 – Long Interspersed Nuclear Element-1, длинные диспергированные ядерные элементы семейства L1; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; SAM – S-аденозилметионин; SAH – S-аденозилгомоцистеин; MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза; MTR – метионинсинтаза; MTRR – метионинсинтаза-редуктаза; Hcy – гомоцистеин; Hcy/B9 – отношение уровня гомоцистеина к уровню витамина B9; ПМНК – периферические мононуклеарные клетки крови; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; EDSS – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала оценки инвалидизации; MSSS – Multiple Sclerosis Severity Score, шкала оценки скорости прогрессирования рассеянного склероза; MS-HRM-анализ – Methyl-sensitive High-Resolution Melting Assay, метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением; ПЦР – полимеразная цепная реакция; AUC – Area Under Curve, площадь под кривой.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое демиелинизирующее заболевание аутоиммунной природы, сопровождающееся прогрессированием неврологической симптоматики и инвалидизацией пациентов. Генетическая предрасположенность и внешние факторы, выполняющие роль триггера в запуске патологического процесса, составляют основу этиологии РС [1, 2]. Развитие возможностей для изучения модификаций генома привело к пониманию более сложной картины патогенеза РС, включающей также эпигенетические влияния, в том числе изменения метилирования ДНК. Нарушения экспрессии генов в результате гипо- либо гиперметилирования регуляторных областей генома могут способствовать изменению восприимчивости к внешним факторам и повышению риска развития заболевания [3].

При полногеномном анализе у пациентов с РС обнаруживаются значительные отличия профилей метилирования ДНК в сравнении с контрольной группой [4–6]. Прогрессирующее течение РС характеризуется тем, что дифференциально метилированные сайты в большинстве случаев оказываются гиперметилированными [7]. Выявляемые изменения метилирования ДНК затрагивают механизмы регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), контроля иммуновоспалительных реакций, механизмы образования зрелых миелинизирующих олигодендроцитов и поддержания стабильности миелиновой оболочки [6, 8, 9]. При анализе глобального уровня метилирования генома на основе оценки метилирования ретротранспозонов LINE-1 в клетках крови установлена взаимосвязь гиперметилирования LINE-1 с повышением риска клинической активности заболевания [10]. У пациентов, получавших IFN- β , высокий уровень метилирования LINE-1 коррелировал с неэффективностью проводимой иммуномодулирующей терапии [11]. Гиперметилированные фрагменты LINE-1 обнаружены в свободно циркулирующей (внеклеточной) ДНК пациентов с РС [12]. В аналитическом обзоре, обобщающем результаты изучения метилирования ДНК при РС, отмечено, что уровень метилирования LINE-1 может быть перспективным маркером для диагностики и прогнозирования при РС, так как показана связь этого показателя как с выраженностью неврологического дефицита, так и с наличием ответа на терапию [13].

Известно, что поддержание адекватного уровня метилирования тесно связано с метаболизмом одноуглеродных фрагментов [14]. При функционировании двух сопряженных циклов – фолатного и цикла гомоцистеин–метионин – образуется универсальный донор метильной группы S-аденозилметионин

(SAM) и ингибитор ДНК-метилтрансфераз S-аденозилгомоцистеин (SAH). Баланс этих промежуточных продуктов одноуглеродного метаболизма может быть нарушен при недостатке метионина в рационе питания, а также при дефиците витаминов группы B, выполняющих функцию кофакторов в реакциях реметилирования гомоцистеина. Изменение активности ключевых ферментов фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), метионинсинтазы (MTR) и метионинсинтазы-редуктазы (MTRR), обусловленное наличием полиморфизмов в генах, кодирующих эти ферменты, также может приводить к изменению уровня общегеномного метилирования вследствие замедленной конверсии гомоцистеина в метионин, избыточного накопления гомоцистеина в сыворотке крови и изменения соотношения SAM/SAH [15].

Целью представленного исследования была характеристика уровня метилирования LINE-1 в периферических клетках крови у пациентов с рассеянным склерозом, определение лабораторных показателей, характеризующих состояние фолатного обмена – уровня гомоцистеина, цианокобаламина (витамина B12) и фолиевой кислоты (витамина B9) в сыворотке крови, определение генотипов по основным полиморфизмам генов фолатного цикла и анализ взаимосвязей между метилированием LINE-1 и метаболизмом фолатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения исследования была сформирована выборка, в которую вошли 27 пациентов – 23 с диагнозом РС, подтвержденным согласно международным критериям МакДональда 2005, 2010 и 2017 [16, 17], и четыре пациента с диагнозом клинически изолированный синдром (КИС), вероятный РС. У 11 пациентов длительность заболевания не превышала 1 год, у 16 пациентов длительность РС составила от 1 до 23 лет. Все пациенты находились на амбулаторном наблюдении в клинике ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» и клинике Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова. Контрольную группу составили 20 человек без неврологической патологии. Характеристики исследованных групп представлены в *табл. 1*. Степень неврологического дефицита определяли в соответствии с расширенной шкалой оценки инвалидизации (EDSS). Для определения скорости прогрессирования заболевания на основе данных о возрасте, длительности заболевания и степени инвалидизации рассчитывали балл по шкале Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) [18]. От всех пациентов и здоровых добровольцев получали добровольное инфор-

Таблица 1. Характеристика пациентов и здоровых испытуемых, принимавших участие в исследовании

Характеристика	Контроль (n = 20)	РС (n = 27)
Возраст, г.	31.0 [24.5; 39.3]	33.0 [27.5; 42.5]
Пол (Ж : М)	16 : 4	18 : 9
EDSS, балл	-	3.0 [2.0; 3.9]*
MSSS, балл	-	3.0 [2.1; 4.1]*
Диагноз и тип течения РС (КИС/РР РС/ВП РС/ПП РС)	-	4/18/3/2
Длительность РС, г.	-	6.5 [2.8; 14.0]*

Примечание. Данные для возраста, EDSS и MSSS представлены в виде: медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль]. *Медиану и межквартильные интервалы значений EDSS, MSSS и длительности заболевания определяли у пациентов с длительностью заболевания 1 год и более.

мированное письменное согласие на участие в исследовании.

Первичная подготовка образцов для оценки уровня метилирования

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) получали методом градиентного центрифугирования с фиколлом из образцов венозной крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (EDTA). Из полученной суспензии ПМНК выделяли ДНК колоночным методом с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот («Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Качество выделенной ДНК контролировали, измеряя концентрацию и отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) на спектрофотометре NanoDrop LITE (Thermo Fisher Scientific, США). Для бисульфитной конверсии использовали набор реагентов BisQuick («Евроген», Россия), в реакцию брали не менее 100 нг ДНК.

Уровень метилирования LINE-1

Уровень метилирования LINE-1 определяли с использованием метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM-анализ, Methyl-sensitive High-Resolution Melting Assay). ПЦР проводили с использованием протокола амплификации и олигонуклеотидных праймеров согласно [19]. Амплификацию, детекцию флуоресцентного сигнала и последующий анализ кривых плавления проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТ-прайм («ДНК-Технология», Россия). ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, с использованием готовой реакци-

онной смеси, содержащей интеркалирующий краситель SYBER Green («Евроген»), 20 пмоль каждого праймера и 10 нг модифицированной бисульфитом матрицы ДНК. Все реакции проводили в двух повторях.

Для построения калибровочных кривых готовили образцы с заданным процентом метилирования – от 0 до 100%. Полностью метилированную ДНК получали с использованием CpG-метилазы M.SSI («СибЭнзим», Россия) из геномной ДНК клеточной линии человека L68 («СибЭнзим»). В качестве полностью неметилированной ДНК использовали стандарт неметилированной ДНК человека (CpGenome Human Non-Methylated DNA Standard Set, Sigma-Aldrich, Швеция). Образцы 100% метилированной и неметилированной контрольной ДНК подвергали бисульфитной конверсии (одновременно с исследуемыми образцами), далее амплифицировали целевой фрагмент с использованием конвертированных стандартных образцов в качестве матрицы и выравнивали стандарты по концентрации таким образом, чтобы при детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени разница значений порогового цикла Ct не превышала двух. Подготовленные таким образом полностью метилированный и неметилированный стандартные образцы смешивали в соответствующих соотношениях для получения калибраторов с уровнем метилирования 25, 50, 75%. В последующем при каждой постановке проводили амплификацию всех калибровочных образцов. Различия профилей плавления и разница температур для пиков плавления метилированной и неметилированной ДНК указывают на амплификацию продуктов, отличающихся соотношением цитозина и тимина (рис. 1А).

Для возможности количественной оценки уровня метилирования данные измерений флуоресценции от каждой точки по градиенту температуры для калибраторов и исследуемых образцов импортировали в Excel в виде текстового файла. Данные нормировали и для каждой нормализованной кривой плавления строили график различий относительно кривой плавления, выбранной в качестве базовой линии и соответствующей графику для 100% метилированного стандартного образца. Для постобработки данных MS-HRM вычисляли величину площади под кривой (AUC, Area Under Curve), являющейся производной кривой плавления HRM. После нормализации на графике различий каждая кривая отображалась в том виде, в котором она появляется при вычитании значения AUC для базовой линии. Примеры графиков различия для образцов с разным уровнем метилирования представлены на рис. 1Б. Уровень метилирования образцов вы-

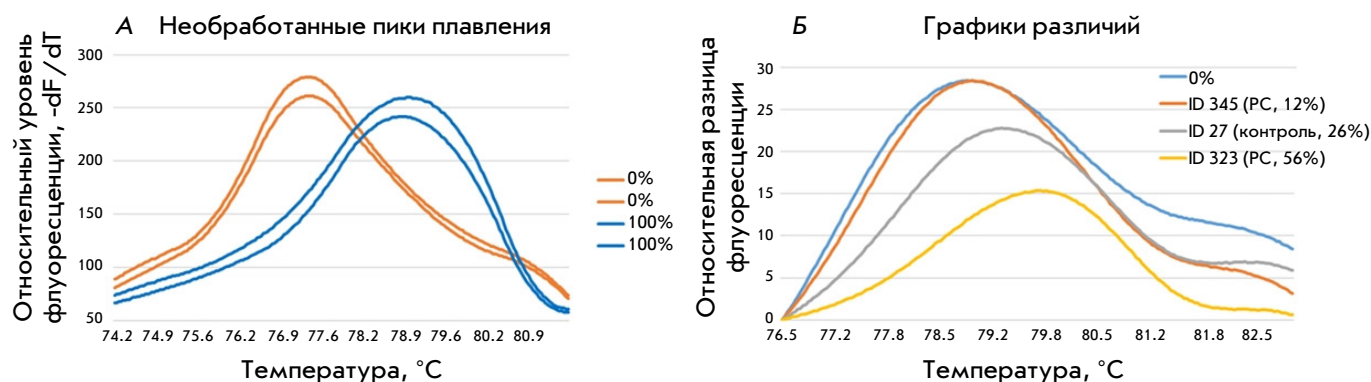


Рис. 1. Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) для оценки уровня метилирования LINE-1. А – необработанные кривые плавления и пики плавления полностью метилированного (100%) и полностью неметилированного (0%) стандартных образцов; Б – кривые плавления для стандартного образца (0%) и трех исследуемых образцов с высоким (56%), низким (12%) и средним (26%) уровнями метилирования, преобразованные в графики различий

числяли, сравнивая показатели AUC с калибровочной кривой для стандартных образцов с известным уровнем метилирования, при проведении вычислений основывались на рекомендациях [20].

Анализ показателей фолатного обмена

Забор крови у пациентов и здоровых доноров осуществляли в утренние часы, натощак, соблюдая все правила преаналитического этапа. Определение сыровоточных уровней гомоцистеина, фолиевой кислоты (витамина B9) и цианокобаламина (витамина B12) проводили непосредственно после забора крови, образцы не хранили. Все исследования проводили на базе клинико-диагностической лаборатории. Содержание фолиевой кислоты измеряли на иммуноферментном автоматическом анализаторе Alisei Q.S. (Next Level S.R.L, Италия); метод хемилюминесцентного иммуноанализа применяли для определения содержания цианокобаламина (на анализаторе Alinity i (Abbott Laboratories, США)) и гомоцистеина (с использованием автоматизированной модульной платформы Roche Cobas 6000 с иммунохимическим модулем e601 (Roche Diagnostics, Швейцария)).

Генотипирование по полиморфизмам C677T и A1298C гена MTHFR, A2756G гена MTR и A66G гена MTRR

Генотипирование проводили методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных аллель-специфических зондов («ДНК-Синтез», Россия). Последовательности праймеров и зондов приведены в [21]. Геномную ДНК выделяли из цельной крови по стандартной методике с применением набора реагентов «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилирование LINE-1 у пациентов с РС и лиц контрольной группы

Сравнение уровня общегеномного метилирования проводили для двух групп – контрольной и группы пациентов с РС, а также оценивали влияние типа течения заболевания на уровень метилирования LINE-1, сравнивая показатели у пациентов с ремиттирующим течением РС (PP РС) и прогрессирующими типами заболевания (вторично-прогрессирующим – ВП РС и первично-прогрессирующим – ПП РС). При сравнении контрольной группы и группы пациентов с РС без учета продолжительности и типа течения заболевания достоверных различий не выявлено (критерий Краскела–Уоллиса, $H = 2.002$; $p = 0.966$) (рис. 2А). Однако пациенты с прогрессирующими типами течения РС имели достоверно более высокий уровень метилирования по сравнению с пациентами с ремиттирующим течением (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.023$) (рис. 2Б). У пациентов с прогрессирующими типами течения балл EDSS, характеризующий степень неврологического дефицита по расширенной шкале инвалидизации Курцке, также был достоверно выше, чем у пациентов с ремиттирующим типом РС – медианы и межквартильные интервалы для групп 4.0 [3.5; 5.0] балла и 2.0 [1.5; 3.0] балла соответственно (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.012$) (рис. 2В).

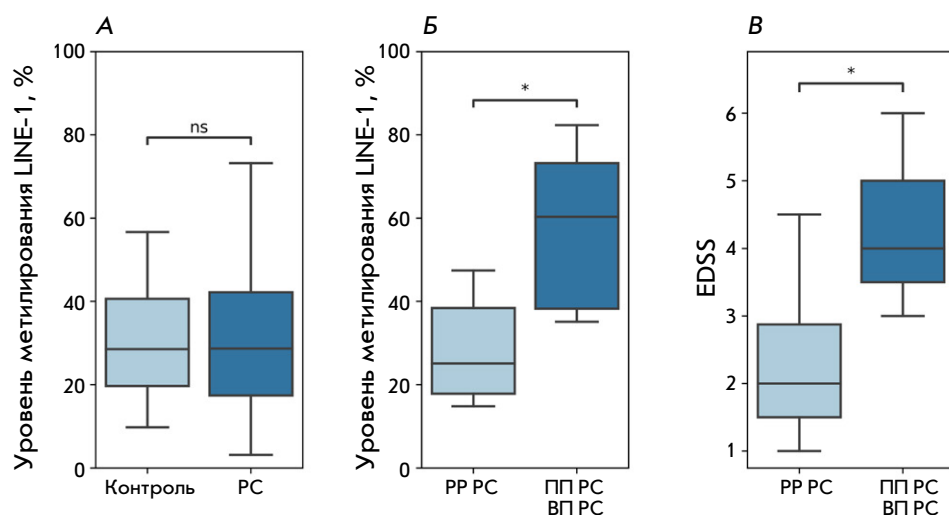


Рис. 2. Уровень метилирования LINE-1 в периферических мононуклеарных клетках крови. А – сравнение показателей в контрольной группе и в группе пациентов с РС; Б – сравнение показателей у пациентов с ремиттирующим типом течения – РР РС и прогрессирующими формами РС – ПП РС и ВП РС; В – степень неврологического дефицита у пациентов с ремиттирующим и прогрессирующим течением РС. * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, ns – нет достоверных различий

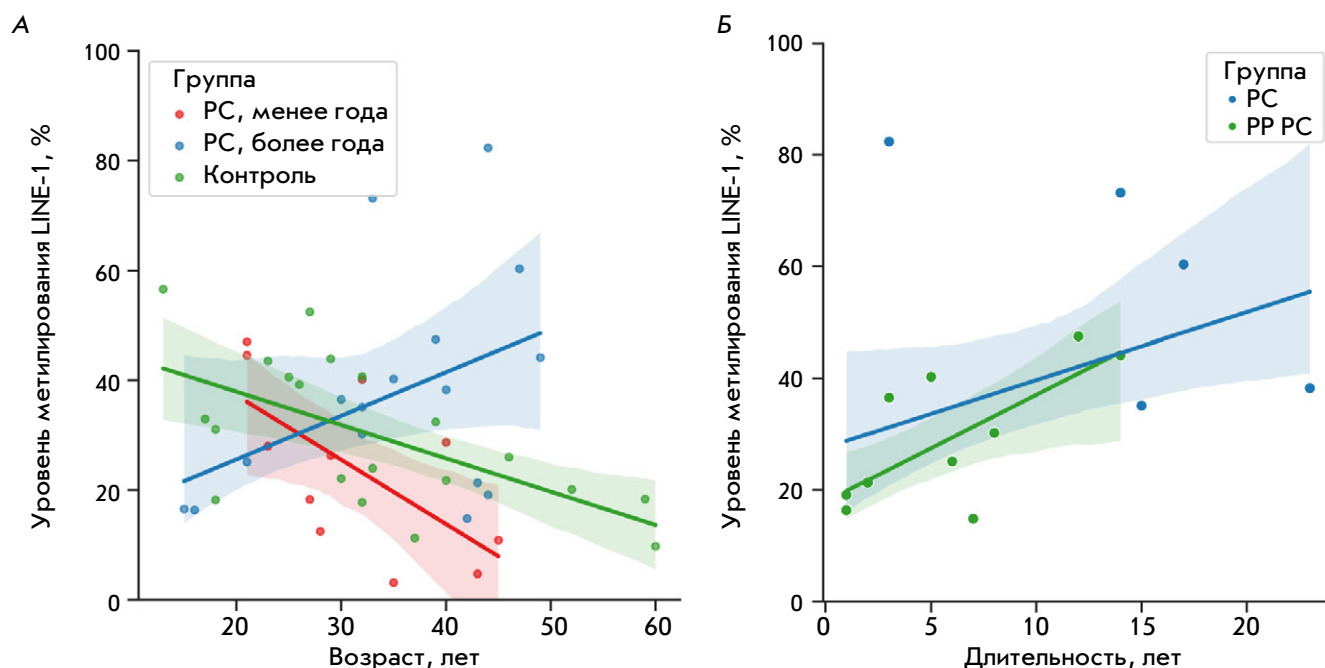


Рис. 3. Данные корреляционного анализа для выявления изменений уровня метилирования LINE-1. А – данные всех пациентов с РС и лиц контрольной группы; Б – синяя линия отображает корреляционную связь между уровнем метилирования LINE-1 и длительностью заболевания для всей группы пациентов; зеленая линия – результаты анализа пациентов с ремиттирующим течением (PP PC) и длительностью более 1 года

Влияние возраста и длительности заболевания на уровень метилирования LINE-1

Исследуемые группы не различались по возрасту, медиана и межквартильный интервал в группе контроль составили 31.0 [24.5; 39.3] года, в группе РС – 33.0 [27.5; 42.5] года. У лиц контрольной группы выявлена достоверная отрицательная корреляционная зависимость между уровнем метилирования LINE-1 и возрастом ($r = -0.61$; $p = 0.004$) (рис. 3А). У пациентов с РС достоверная взаимосвязь между этими показателями была сохранена на том же уровне

($r = -0.65$; $p = 0.032$) только при длительности заболевания менее 1 года, при большей длительности РС эта корреляционная зависимость отсутствовала, что указывает на нарушение механизмов контроля метилирования при РС. Напротив, с увеличением длительности заболевания отмечалось повышение уровня метилирования, что подтверждается данными корреляционного анализа – наличием положительной связи между длительностью РС и уровнем метилирования ($r = 0.47$; $p = 0.014$) (рис. 3Б). Если анализ проводился отдельно в группе пациентов

Таблица 2. Содержание гомоцистеина (Нсу), фолиевой кислоты (витамина В9), витамина В12 и отношение Нсу/В9 у пациентов с РС и лиц контрольной группы

Показатель, ед. изм.	Контроль (n = 20)	РС все пациенты (n = 27)	РС Длительность заболевания		Референтный интервал
			< года (n = 11)	≥ года (n = 16)	
Гомоцистеин, мкмоль/л	11.1 [8.5; 14.5]	11.7 [8.0; 14.8]	9.9 [6.35; 11.7]	13.5 [10.0; 15.5]	Мужчины: 5.46–16.20 Женщины: 4.44–13.56
В9, нмоль/л	14.95 [12.0; 18.5]	12.6 [8.0; 27.0]	26.1 [15.1; 31.7]	8.36 #* [6.1; 11.1]	7.0–46.4
В12, пг/мл	277 [211; 392]	363 [264; 551]	300 [233; 500]	375 [277; 553]	197.0–771.0
Нсу/В9	0.693 [0.455; 1.244]	0.981 [0.251; 1.7]	0.271 [0.207; 0.719]	1.724 # [1.129; 2.144]	

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

#Достоверные отличия между группами пациентов с РС с разной длительностью заболевания (критерий Краскела–Уоллиса для групп «контроль», «РС, < года», «РС, ≥ года» с последующим попарным сравнением.

*Достоверные отличия от группы контроля (U-критерий Манна–Уитни).

с ремиттирующим течением РС и не включал пациентов с продолжительностью заболевания менее 1 года, то эта закономерность сохранялась и приобретала характер сильной положительной связи ($r = 0.72$; $p = 0.013$) (рис. 3Б). Отдельно для пациентов с прогрессирующими формами РС такой анализ не мог быть проведен в связи с малым числом наблюдений ($n = 5$). Таким образом, наиболее низкие значения уровня метилирования отмечены у пациентов с длительностью РС менее 1 года (пациенты в стадии дебюта заболевания), по мере прогрессирования заболевания уровень метилирования повышался, у пациентов с первично-прогрессирующим и вторично-прогрессирующим течением РС уровень метилирования был наиболее высоким. Интересно, что увеличение уровня метилирования при увеличении продолжительности заболевания у пациентов с РР РС не было связано с нарастанием инвалидизации по шкале EDSS (корреляция между длительностью РС и величиной балла EDSS у пациентов отсутствовала – $r = -0.27$; $p = 0.452$).

Уровень метилирования LINE-1 и метаболизм фолатов

Для выявления механизмов, обуславливающих нарушения регуляции метилирования при РС, измеряли уровни гомоцистеина и витаминов группы В и рассчитывали соотношения гомоцистеина и фолиевой кислоты (Нсу/В9), а также гомоцистеина и цианокобаламина (Нсу/В12) в сравниваемых группах. В табл. 2 представлены значения всех исследованных показателей. Также проведено генотипирование всех включенных в исследование испытуемых по полиморфизмам генов фолатного цикла – C677T и A1298C гена *MTHFR*, A2756G гена *MTR* и A66G гена *MTRR*.

Ранее мы выявили специфические для стадии дебюта РС изменения параметров, характеризующих состояние фолатного обмена (в частности, снижение уровня гомоцистеина при дебюте РС во взрослом возрасте) [21], поэтому у всех пациентов с РС, а также отдельно у пациентов с длительностью заболевания менее и более 1 года проанализировали показатели, характеризующие метаболизм фолатов. С использованием такого подхода установили, что в группе пациентов с длительностью РС менее 1 года преобладали низкие и средние значения уровня гомоцистеина, в то время как при продолжительном течении – высокие и средние значения (рис. 4). За низкий и высокий уровни принимали содержание гомоцистеина относительно нижнего квартиля (≤ 8.45 мкмоль/л) и верхнего квартиля (≥ 14.45 мкмоль/л) в контрольной группе.

У пациентов с разной длительностью РС также выявлены достоверные различия для соотношения Нсу/В9 – у пациентов в начальном периоде заболевания медиана отношения Нсу/В9 составила 0.271, при продолжительном течении заболевания – 1.724 ($p = 0.007$), в контрольной группе этот показатель имел промежуточное значение – 0.693 (рис. 5А). В снижение этого показателя в начальном периоде заболевания (группа пациентов с длительностью РС менее 1 года) основной вклад вносило снижение уровня гомоцистеина при нормальных значениях уровня фолиевой кислоты, содержание которой у всех пациентов этой группы находилось в пределах референтных значений (7.0–46.4 нмоль/л). При продолжительном течении РС содержание В9 достоверно снижалось относительно уровня в группе контроля (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.024$), у 10 пациентов из 16 концентрация витамина В9 была ниже или близка к нижней границе рефе-

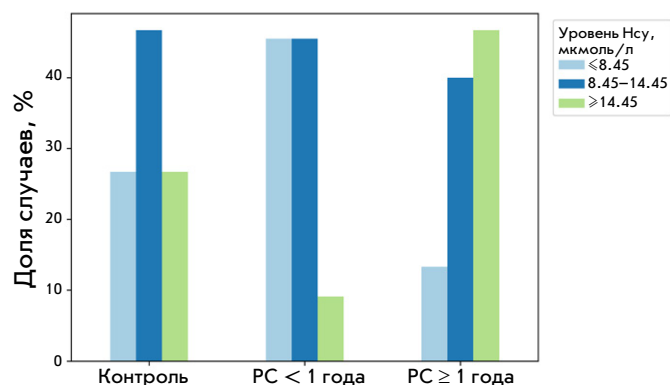


Рис. 4. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови лиц контрольной группы и пациентов с РС. Диапазоны концентраций соответствуют квартилям, определенным для группы контроля. Данные для каждого диапазона представлены в процентах от общего числа испытуемых, включенных в каждую группу

рентного интервала. Содержание гомоцистеина при длительно протекающем РС, напротив, имело тенденцию к повышению, у троих пациентов отмечалась гипергомоцистеинемия (концентрация гомоцистеина более 13.56 мкмоль/л у женщин и более 16.20 мкмоль/л у мужчин). Таким образом, высокие значения Hcy/B9 при продолжительном течении РС были обусловлены как повышением уровня гомоцистеина, так и снижением уровня витамина B9.

Кроме того, у пациентов с РС, но не в контрольной группе выявлена достоверная положительная связь между уровнем метилирования и содержанием гомоцистеина ($r = 0.45$; $p = 0.020$), а также меж-

ду уровнем метилирования и отношением Hcy/B9 ($r = 0.52$; $p = 0.006$) (рис. 5Б,В). С использованием регрессионного анализа установлено, что отношение Hcy/B9 может быть предиктором уровня метилирования ($p = 0.010$).

Проведение регрессионного анализа не выявило достоверного вклада ни одного из исследованных полиморфных вариантов генов фолатного цикла в изменения уровня метилирования LINE-1. Однако показано достоверное снижение уровня витамина B9 по сравнению с группой контроля только у пациентов с генотипом CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, но не у носителей минорного T-аллеля (рис. 6А) (анализ проводился в группе пациентов с длительностью РС более 1 года). У пациентов – носителей генотипа CC – также наблюдалась тенденция к увеличению содержания гомоцистеина (рис. 6Б) и достоверное увеличение соотношения Hcy/B9 (рис. 6В).

Наблюдаемые закономерности указывают на возможное влияние генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR* на опосредованные изменениями фолатного обмена нарушения контроля метилирования у пациентов с РС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 используется в качестве суррогатного маркера полногеномного метилирования, поскольку на долю этих повторяющихся генетических элементов приходится до 70% метилированных CpG-сайтов генома [22, 23]. Изменения метилирования

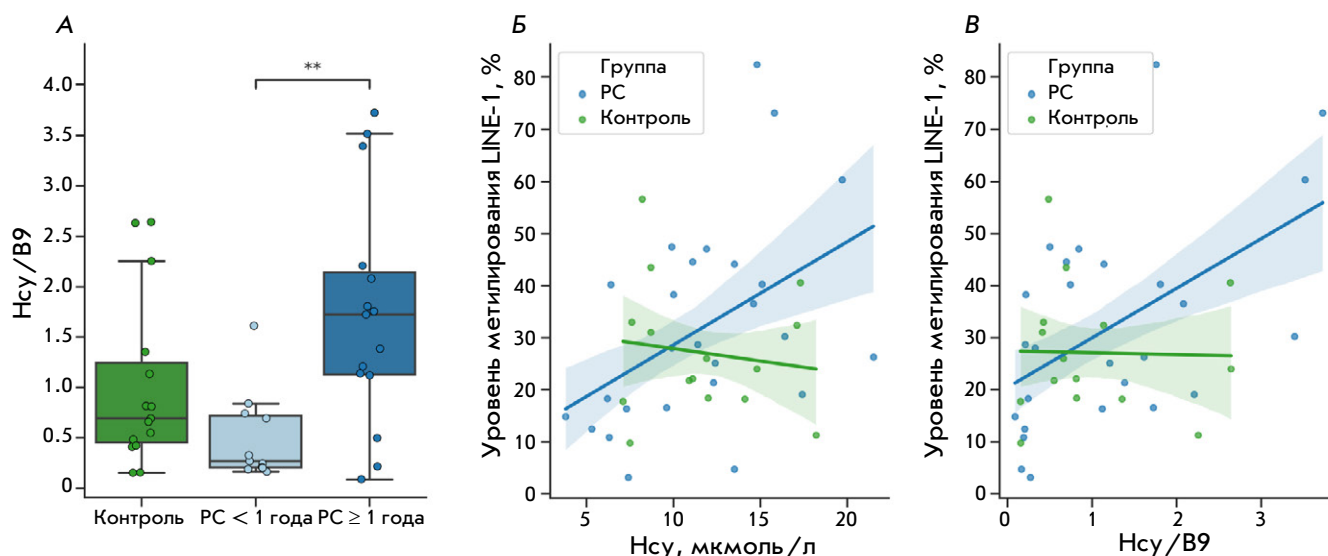


Рис. 5. Изменение отношения сывороточных концентраций гомоцистеина и фолиевой кислоты (Hcy/B9) у пациентов с РС (А), и взаимосвязь изменений уровня гомоцистеина (Б) и отношения Hcy/B9 (В) с уровнем метилирования LINE-1 в периферических мононуклеарных клетках крови. ** – достоверные различия между группами, $p < 0.05$ (критерий Краскела–Уоллиса с последующими попарными сравнениями)

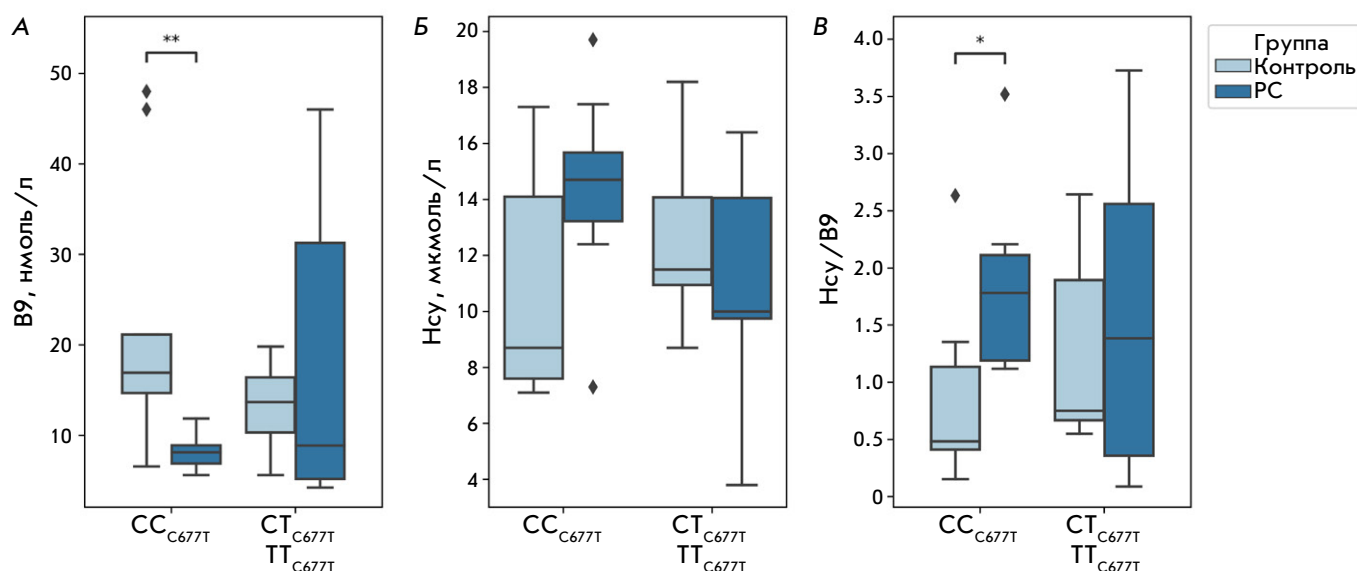


Рис. 6. Концентрация витамина B9 (А), гомоцистеина (Б) и отношение Hcy/B9 (В) у лиц контрольной группы и пациентов с РС в зависимости от генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR*. ♦ – значения, отклоняющиеся от медианы на величину, превышающую 1.5 межквартильных размаха. * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, ** – достоверные различия между группами, $p < 0.01$.

LINE-1 представляют и самостоятельный интерес, так как эпигенетическая инактивация ретротранспозонов может способствовать нестабильности генома, структурным хромосомным перестройкам и малигнизации [24, 25]. Активация ретротранспозона LINE-1 в пожилом возрасте вызывает индукцию синтеза интерферонов и способствует стимуляции воспалительных реакций [26].

В представленном исследовании выявлены достоверные различия между уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1 в ПМНК у пациентов с ремиттирующим и прогрессирующим течением, при этом более высокие значения метилирования обнаруживаются при прогрессирующем течении РС. Кроме того, показано повышение уровня метилирования LINE-1 у пациентов с РС при увеличении длительности заболевания. В контрольной группе, напротив, уровень метилирования снижается с увеличением возраста. То есть при РС наблюдается перестройка корреляционных взаимосвязей, в частности, у пациентов разрушается присущая здоровым индивидам отрицательная корреляционная зависимость между возрастом и уровнем общегеномного метилирования.

Обнаруживаемые у пациентов с РС изменения концентраций гомоцистеина, фолиевой кислоты и их соотношения, а также взаимосвязь этих изменений с уровнем общегеномного метилирования указывают на то, что гиперметилирование при РС может быть опосредовано нарушениями фолатного обмена. Одноуглеродный

метаболизм – многокомпонентный, многостадийный метаболический процесс. S-аденозинметионин (SAM) и S-аденозингомоцистеин (SAH) – промежуточные продукты цикла гомоцистеин–метионин – являются регуляторами активности ДНК-метилтрансфераз, оказывая стимулирующее (SAM) и ингибирующее (SAH) действие [27, 28]. Изменение баланса этих метаболитов может быть вызвано множеством факторов, среди которых недостаточное или избыточное количество метионина в рационе питания, дефицит кофакторов ферментов фолатного обмена, наличие полиморфизмов генов, участвующих в реметилировании гомоцистеина. В нормальных физиологических условиях гомоцистеин подвергается быстрой конверсии, в связи с чем его образование является биохимически выгодной реакцией. Однако при накоплении гомоцистеина равновесие смещается в сторону преимущественного образования SAH, который благодаря структурному сходству с молекулой SAM является мощным ингибитором метилтрансферазной активности [29, 30]. ДНК-метилтрансфераза DNMT1, необходимая для поддержания паттернов метилирования в процессе клеточного деления, особенно чувствительна к ингибирующему действию SAH. Таким образом, повышение концентрации гомоцистеина в крови должно сопровождаться гипометилированием, что и было продемонстрировано в ряде работ [31–34]. У пациентов с РС, однако, возрастание уровня гомоцистеина сопровождалось увеличением уровня метилирования, что позволяет предположить нару-

шение реализуемого по принципу обратной связи механизма регуляции активности DNMT. Проверка этого предположения требует проведения дополнительных исследований.

С другой стороны, стоит отметить, что только у четырех из 27 пациентов содержание гомоцистеина превышало верхний порог референтного интервала, максимальное значение у одного из этих пациентов составило 21.5 мкмоль/л, что соответствует умеренному уровню гипергомоцистеинемии. Возможно, что такое повышение концентрации гомоцистеина не является достаточным для сдвига равновесия в сторону образования SAH и, соответственно, подавления активности метилтрансфераз.

Наблюдаемые у пациентов с РС изменения, возможно, обусловлены нарушением регуляции активности MTHFR, фермента, преобразующего 5,10-метилентетрагидрофолат в 5-метилтетрагидрофолат, образование достаточного количества которого необходимо для синтеза SAM и обеспечения доступности метильных групп. SAM является аллостерическим ингибитором MTHFR [35], при нарушении этого механизма 5-метилтетрагидрофолат образуется непрерывно, способствуя усиленному реметилированию гомоцистеина, биосинтезу метионина независимо от его концентрации и образованию SAM [36]. Полученные нами данные могут указывать на реализацию такого механизма. Так, при длительном течении РС наблюдалось увеличение доли пациентов с высоким (относительно среднего в контрольной группе) содержанием гомоцистеина в сыворотке крови; чаще обнаруживались признаки дефицита фолиевой кислоты, при этом закономерно возрастало отношение Нсу/В9. При анализе этих показателей с учетом генотипа по полиморфизму С677Т гена *MTHFR* оказалось, что эти изменения были в большей степени присущи носителям генотипа СС. Изменения фолатного обмена при этом коррелировали с изменениями уровня метилирования. То есть, логично предположить вклад С-аллеля по этому полиморфному варианту в реализацию эпигенетических нарушений при развитии РС. С этой гипотезой хорошо согласуется тот факт, что наличие миссенс-мутации гена *MTHFR* в позиции 677 приводит к снижению активности фермента [37]. Катализируя реакцию превращения тетрагидрофолата в его активную форму – 5-метилтетрагидрофолат, MTHFR обеспечивает субстрат для другой ферментативной реакции – реметилирования гомоцистеина в метионин, осуществляемого MTR. Присутствие Т-аллеля по полиморфизму С677Т в гене *MTHFR* снижает активность фермента до 70% (при гетерозиготном) и до 30% (при гомозиготном варианте). Таким образом, значительное снижение уровня витамина В9 у носителей

«активного» варианта гена (генотип СС) может быть связано с его активным расходом в реакции конверсии гомоцистеина в метионин, поддержанием уровня метионина, образования SAM и сохранения на высоком уровне потенциала метилирования. Это предположение согласуется с ранее опубликованными данными о том, что носительство генотипа ТТ по полиморфизму С677Т связано с более низким глобальным метилированием в лимфоцитарной ДНК [38]. Кроме того, влияние гипергомоцистеинемии на уровень метилирования в периферических мононуклеарных клетках зависит от генотипа по полиморфизму С677Т гена *MTHFR* и фолатного статуса – снижение уровня метилцитозина отмечалось у носителей генотипа ТТ при низком содержании фолатов в крови [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании впервые показана связь между уровнем метилирования LINE-1 при рассеянном склерозе и состоянием фолатного обмена. В целом, полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о влиянии метаболических процессов на основной эпигенетический феномен – метилирование ДНК. Нарушения метаболизма одноуглеродных фрагментов могут возникать в результате несбалансированного поступления витаминов и нутриентов либо обуславливаться наличием полиморфных вариантов генов, осуществляющих превращения в циклах фолиевой кислоты и цикле реметилирования гомоцистеина. Снижение доступности метильных доноров и нарушение контроля метилтрансферазной активности, являющиеся результатом нарушения функционирования фолатного обмена, – основа формирования aberrантных паттернов метилирования и долговременных изменений экспрессии генов. Важно отметить, что эпигенетические изменения являются регулируемыми и обратимыми. Дополнительные исследования должны быть направлены на создание алгоритмов коррекции метаболических нарушений и поддержание адекватного уровня метилирования. ●

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00312).

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/23 от 20.09.2023). До проведения исследования всеми испытуемыми, данные которых использованы в публикации, было подписано добровольное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oksenberg J.R. // *Expert. Rev. Neurother.* 2013. V. 13. № 12. Suppl. P. 11–19.
- Jakimovski D., Bittner S., Zivadinov R., Morrow S.A., Benedict R.H., Zipp F., Weinstock-Guttman B. Multiple sclerosis. // *Lancet.* 2024. V. 403. № 10422. P. 183–202. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01473-3.
- Manna I., De Benedittis S., Porro D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 16. P. 8921. doi: 10.3390/ijms25168921.
- Kulakova O.G., Kabilov M.R., Danilova L.V., Popova E.V., Baturina O.A., Tsareva E.Y., Baulina N.M., Kiselev I.S., Boyko A.N., Favorov A.V., et al. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 3. P. 103–110.
- Castro K., Casaccia P. // *Mult. Scler.* 2018. V. 24. № 1. P. 69–74. doi: 10.1177/1352458517737389.
- Kiselev I.S., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorova O.O. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 2. P. 45–57. doi: 10.32607/actanaturae.11043.
- Киселев И.С., Кулакова О.Г., Данилова Л.В., Батурина О.А., Кабилов М.Р., Попова Е.В., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Молекулярная биология.* 2022. Т. 56. № 3. С. 468–475. doi: 10.31857/S0026898422030089.
- Sokratous M., Dardiotis E., Tsouris Z., Bellou E., Michalopoulos A., Siokas V., Arseniou S., Stamati T., Tsvigoulis G., Bogdanos D., et al. // *Auto Immun. Highlights.* 2016. V. 7. № 1. P. 12. doi: 10.1007/s13317-016-0084-z.
- Hojati Z. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 958. P. 65–90. doi: 10.1007/978-3-319-47861-6_6.
- Neven K.Y., Piola M., Angelici L., Cortini F., Fenoglio C., Galimberti D., Pesatori A.C., Scarpini E., Bollati V. // *BMC Genet.* 2016. V. 17. № 1. P. 84. doi: 10.1186/s12863-016-0395-0.
- Pinto-Medel M.J., Oliver-Martos B., Urbaneja-Romero P., Hurtado-Guerrero I., Ortega-Pinazo J., Serrano-Castro P., Fernández Ó., Leyva L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8727. doi: 10.1038/s41598-017-09301-2.
- Dunaeva M., Derksen M., Pruijn G.J.M. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 6. P. 4681–4688. doi: 10.1007/s12035-017-0679-z.
- Киселев И.С., Кулакова О.Г., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Acta Naturae.* 2021. Т. 13. № 2 (49). С. 45–57. doi: 10.32607/actanaturae.11043.
- Choi S.W., Friso S. // *Nutr. Res. Pract.* 2023. V. 17. № 4. P. 597–615. doi: 10.4162/nrp.2023.17.4.597.
- Weiner A.S., Boyarskikh U.A., Voronina E.N., Mishukova O.V., Filipenko M.L. // *Gene.* 2014. V. 533. № 1. P. 168–172. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.098.
- Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., et al. // *Ann. Neurol.* 2005. V. 58. № 6. P. 840–846. doi: 10.1002/ana.20703.
- Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W. M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., et al. // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. № 2. P. 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- Roxburgh R.H., Seaman S.R., Masterman T., Hensiek A.E., Sawcer S.J., Vukusic S., Achiti I., Confavreux C., Coustans M., le Page E., et al. // *Neurology.* 2005. V. 64. № 7. P. 1144–1151. doi: 10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8.
- Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N., King W.D., Taylor S.A., Pang S.C. // *BMC ResNotes.* 2011. V. 4. P. 565. doi: 10.1186/1756-0500-4-565.
- Samsø Mathiasen S., Bińkowski J., Kjeldsen T., Wojdacz T.K., Hansen L.L. // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 9. P. e0273058. doi: 10.1371/journal.pone.0273058.
- Lioudyno V.I., Tsymbalova E.A., Chernyavskaya E.A., Scripchenko E.Y., Bisaga G.N., Dmitriev A.V., Abdurasulova I.N. // *Biochemistry (Moscow).* 2024. V. 89. № 3. P. 562–573. doi: 10.1134/S0006297924030143.
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Gervas P.A., Cherdyntseva N.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L. // *Cells.* 2020. V. 9. № 9. P. 2017. doi: 10.3390/cells9092017.
- Alves V.R.G., Micali D., Ota V.K., Bugiga A.V.G., Muniz Carvalho C., Belangero S.I. // *Complex Psychiatry.* 2023. V. 9. № 1–4. P. 119–129. doi: 10.1159/000530641.
- Jones P.A., Baylin S.B. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 6. P. 415–428. doi: 10.1038/nrg816.
- Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1775. № 1. P. 138–162. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.007.
- De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P., Elias A.E., Skvir N.J., Criscione S.W., Caligiana A., Broccoli G., Adney E.M., Boeke J.D., Le O., et al. // *Nature.* 2019. V. 566. № 7742. P. 73–78. doi: 10.1038/s41586-018-0784-9. Erratum in: *Nature.* 2019. V. 572. № 7767. P. E5. doi: 10.1038/s41586-019-1350-9.
- Lu S.C. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. № 4. P. 391–395. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00139-9.
- Zhang J., Zheng Y.G. // *ACS Chem. Biol.* 2016. V. 11. № 3. P. 583–597. doi: 10.1021/acscchembio.5b00812.
- Perla-Kaján J., Jakubowski H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 13. P. 3140. doi: 10.3390/ijms20133140.
- Caracausi M., Ramacieri G., Catapano F., Cicilloni M., Lajin B., Pelleri M.C., Piovesan A., Vitale L., Locatelli C., Pirazoli G.L., et al. // *Biofactors.* 2024. V. 50. № 4. P. 709–724. doi: 10.1002/biof.2044.
- Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 38. P. 29318–29323. doi: 10.1074/jbc.M002725200.
- Castro R., Rivera I., Struys E.A., Jansen E.E., Ravasco P., Camilo M.E., Blom H.J., Jakobs C., Tavares de Almeida I. // *Clin. Chem.* 2003. V. 49. № 8. P. 1292–1296. doi: 10.1373/49.8.1292.
- Fux R., Kloor D., Hermes M., Röck T., Proksch B., Grenz A., Delabar U., Bücheler R., Igel S., Mörike K., et al. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005. V. 289. № 4. P. F786–F792. doi: 10.1152/ajprenal.00465.2004.
- Loscalzo J., Handy D.E. // *Pulm Circ.* 2014. V. 4. № 2. P. 169–174. doi: 10.1086/675979.
- Bhatia M., Thakur J., Suyal S., Oniel R., Chakraborty R., Pradhan S., Sharma M., Sengupta S., Laxman S., Masakapali S.K., Bachhawat A.K. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 47. P. 16037–16057. doi: 10.1074/jbc.RA120.015129.
- Petrova B., Maynard A.G., Wang P., Kanarek N. // *J. Biol. Chem.* 2023. V. 299. № 12. P. 105457. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105457.
- Liew S.C., Gupta E.D. // *Eur. J. Med. Genet.* 2015. V. 58. № 1. P. 1–10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004.
- Figureredo J.C., Grau M.V., Wallace K., Levine A.J., Shen L., Hamdan R., Chen X., Bresalier R.S., McKeown-Eyssen G., Haile R.W., et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. V. 18. № 4. P. 1041–1049. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0926.
- Friso S., Choi S.W., Girelli D., Mason J.B., Dolnikowski G.G., Bagley P.J., Olivieri O., Jacques P.F., Rosenberg I.H., Corrocher R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 8. P. 5606–5611. doi: 10.1073/pnas.062066299.