

УДК 616.899-053.2 - 577.2 - 575.224

©Коллектив авторов

МАТЕРИНСКИЙ ЭФФЕКТ ПРИ ДЕТСКОМ АУТИЗМЕ: ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК У ПАЦИЕНТОВ И ИХ МАТЕРЕЙ

Л.Н. Пороховник^{1}, С.В. Костюк¹, Е.С. Ершова¹, С.М. Стукалов¹, Н.Н. Вейко¹, Н.Ю. Коровина²,
Н.Л. Горбачевская³, А.Б. Сорокин³, Н.А. Ляпунова¹*

¹Медико-генетический научный центр,
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1; эл. почта: med-gen@mail.ru

²Научно-практический центр детской психоневрологии, Москва

³Научный центр психического здоровья, Москва

Детский аутизм – распространённое расстройство психического развития, в возникновении которого существенную роль играет как наследственность, так и факторы среды, в том числе состояние организма матери во время беременности (“материнский эффект”). Предполагается, что ключевую роль в патогенезе детского аутизма играет окислительный стресс, оказывающий генотоксичный эффект, который выражается в возникновении одно- и двунитевых разрывов ядерной ДНК. Мы оценивали степень повреждённости ДНК у пациентов с детским аутизмом и их матерей методом ДНК-комет по параметрам момента хвоста ДНК-кометы и доли ДНК в хвосте. Оба параметра показали высокую корреляцию ($r=0,90$). Среднее и медианное значения обоих параметров в выборке детей, страдающих аутизмом, были существенно выше, чем в контрольной выборке нормальных детей того же возраста. Интересно, что у здоровых матерей больных детей значения этих параметров были также повышены, не отличаясь от таковых в выборке детей с аутизмом. Контрольная выборка здоровых женщин репродуктивного возраста, не имевших детей с аутизмом, по среднему значению момента хвоста ДНК-кометы отличалась от группы матерей больных детей, но значимо не отличалась от группы здоровых детей. Можно предположить, что в организме психически здоровых матерей детей с аутизмом имеются генотоксичные факторы, которые обуславливают развитие заболевания у плода через средовой “материнский эффект” во время вынашивания.

Ключевые слова: аутизм, метод комет, материнский эффект, разрывы ДНК

DOI 10.18097/PBMC20166204466

ВВЕДЕНИЕ

Ранний детский аутизм (РДА) и иные расстройства аутистического спектра (РАС) – это группа состояний, связанных с нарушением развития центральной нервной системы. Они характеризуются дефицитом социального взаимодействия и общения, ограниченными интересами, навязчивыми и стереотипными действиями, а также нарушением речевого развития.

Рост случаев аутизма и РАС у детей вызывает серьёзные опасения во всем мире и привлекает пристальное внимание к данной проблеме врачей и учёных различных специальностей [1]. По данным центра по контролю заболеваемости и профилактики США (CDC) за 2013 год, у одного ребенка из 68 имеется расстройство аутистического спектра. Это на 30% больше, чем аналогичный уровень в 2011 году (1 случай из 88). В России официальных статистических данных по частоте встречаемости РАС в настоящее время нет из-за отсутствия утвержденной методологии учёта [2].

Несмотря на то, что установлена связь между изменениями структуры и функции многих участков головного мозга и проявлениями аутизма, до сих пор нет общепризнанной патогенетической теории аутизма и изучены далеко не все факторы, предположительно вызывающие РАС.

Есть многочисленные указания на существенную роль окислительного стресса (ОС) в патогенезе РДА и РАС, в частности: повышенная концентрация F2t-изопростана и других маркеров окисления липидов в плазме; пониженные уровни антиоксидантных транспортных белков (трансферрина и церулоплазмينا) в сыворотке и повышенное содержание металлов в лейкоцитах; пониженное содержание восстановленной формы глутатиона в сравнении с его окисленной формой и нарушение гомоцистеин-метионинового метаболизма [3, 4]. Взаимосвязь ОС и нейропатологии обусловлена активным метаболизмом и высоким потреблением кислорода мозгом, на долю которого приходится только 2% массы тела, но 20% потребляемого организмом кислорода [5].

Гипотезы о роли и участии ОС и аутоиммунных процессов в патогенезе РДА получили широкое распространение, став предметом многочисленных дискуссий [6, 7]. Одной из мишеней ОС является генетический аппарат клетки: при ОС нарушается целостность и стабильность генома (генотоксичный эффект) из-за индукции одно- и двунитевых разрывов ДНК активными формами кислорода (АФК). Генотоксичные эффекты ОС у пациентов с РДА, по имеющимся у нас данным, ранее не исследовались.

Заслуживает внимания растущий объём данных о наследственной компоненте аутизма. Матери детей-аутистов, сами не страдающие аутизмом,

характеризуются различными аутоиммунными отклонениями: повышенной частотой ревматоидного артрита, волчанки, диабета; наличием определённых аллелей генов, порой даже не унаследованных больным ребёнком, в различных локусах систем тканевой несовместимости (HLA DRB1 и C4B) и детоксикации ксенобиотиков (GSTP1); перенесёнными во время беременности заболеваниями, возбудители которых не преодолевают плацентарный барьер, что даёт основания предполагать не прямое действие, опосредованное воспалением. Совокупность этих и некоторых других факторов формирует так называемый “материнский риск” развития РДА и РАС у ребёнка.

Если гипотеза “материнского риска” развития РДА и РАС у ребёнка верна, то следует ожидать ОС и вызванное им нарушение целостности генома (эффекты генотоксичности) не только у детей с РДА, но и у их матерей, например, на фоне повышенного иммунного статуса у последних. Высказанные предположения ранее экспериментально не проверялись.

Целью настоящей работы было сравнение методом “ДНК-комет” уровня повреждённости ДНК детей с аутизмом, здоровых детей того же возраста, здоровых матерей больных детей и здоровых матерей здоровых детей.

МЕТОДИКА

В исследование вошли дети ($n=21$) с расстройствами аутистического спектра, соответствующие критериям диагностики F 84.0, 84.1, 84.5 Международной классификации болезней (МКБ-10) и Американского общества психиатров (DSM-IV-TR) и проходившие стационарное лечение на базе Научно-практического центра детской психоневрологии департамента здравоохранения г. Москвы, а также матери этих пациентов, госпитализированные вместе со своими детьми ($n=14$).

Отбор больных осуществляли с использованием клинико-психопатологического метода, включавшего наблюдение за ребёнком в различных ситуациях с психопатологической оценкой поведения, эмоциональных и когнитивных проявлений, особенностей социального функционирования, дополненных материалами медицинской документации (карты амбулаторных исследований, предоставляемые родителями). Проводили изучение наследственных факторов, раннего анамнеза пациентов, учитывали особенности течения беременности и родов у матери, сведения о перенесённых ею заболеваниях. Первичную оценку состояния производили также с помощью шкалы оценки психического состояния при аутизме (Autism Mental Status Exam – AMSE).

Возраст пациентов варьировал от 4 до 10 лет при соотношении мальчиков и девочек 9,5:1. В исследование не включали детей, у которых аутистические проявления были связаны с другими заболеваниями, такими как врождённые дефекты обмена веществ, хромосомные аномалии, прогрессирующие дегенеративные заболевания и др. Для исключения такого рода заболеваний наряду с клиническим методом использовали визуальный и

компьютерный анализ ЭЭГ, включая сравнительное ЭЭГ-картирование.

Контрольная группа детского возраста сформирована из здоровых детей ($n=21$) того же возрастного диапазона, что и пациенты клинической группы, причём большинство здоровых детей были из многодетных семей. Всем детям контрольной группы проводили визуальный анализ ЭЭГ экспертного уровня и сравнительное ЭЭГ-картирование мозга для исключения любых субклинических состояний.

Контрольная группа матерей здоровых детей ($n=19$) состояла из женщин репродуктивного возраста (от 27 до 42 лет), имевших не менее двух здоровых детей. Большинство женщин были многодетными (от 3 до 10 детей), при этом ни у одного из детей не наблюдались расстройства аутистического спектра, задержки в развитии, аутоиммунные заболевания, аллергии и выраженные пищевые непереносимости.

Информированные согласия на участие в исследовании были получены от законных представителей детей клинической и контрольной групп, а также от взрослых добровольных участниц. Получено одобрение исследования этическим комитетом Медико-генетического научного центра.

Биологическим материалом исследования служили образцы венозной крови (3–4 мл), взятые у каждого участника эксперимента.

Определение количества одно- и двунитевых разрывов ДНК осуществляли с помощью метода “ДНК-комет” (single cell gel electrophoresis – электрофорез индивидуальных клеток, заключённых в гель) на предметных стёклах с агарозной подложкой по стандартному протоколу [8] в щелочных условиях. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле фрагментов ДНК лизированных клеток (в нашем случае лимфоцитов), заключённых в агарозный гель. При этом фрагментированная ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (рис. 1); его параметры зависят от степени повреждённости исследуемой ДНК. Нефрагментированная ДНК остаётся на месте и визуализируется как яркая округлая “голова” ДНК-кометы.

Приготовление и электрофорез препаратов для анализа ДНК-комет проводили следующим образом. После двухчасовой обработки в лизирующем буфере [2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА (pH 10,0), 10 мМ Трис (pH 9,6), 1% N-лаурилсаркозинат, 10% ДМСО, 1% Тритон X-100] при 25°C препараты выдерживали в электрофорезной камере с щелочным буфером [0,3 М NaOH, 1 мМ ЭДТА (pH 10,0)] в течение 20 мин при 15°C. При таких условиях одонитевые разрывы ДНК эффективно переходят в двунитевые. Затем препараты подвергали электрофорезу при 300 мА в течение 20 мин при той же температуре. Далее препараты фиксировали 70%-ным этанолом, окрашивали 10%-ным раствором бромистого этидия (“ПанЭко”, Россия) и анализировали на флуоресцентном микроскопе (при увеличении $\times 40$) с использованием программного обеспечения CASPlab.

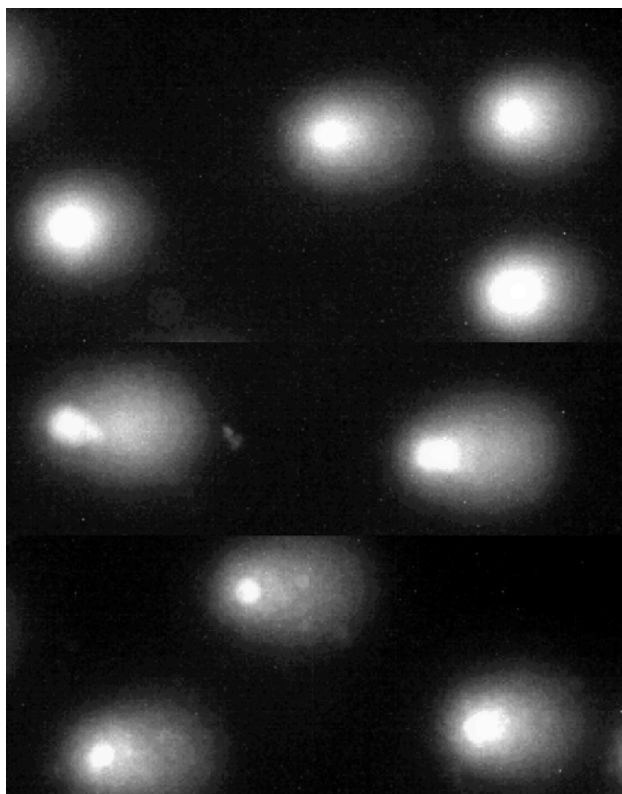


Рисунок 1. Фотография препарата “ДНК-комет”.

Соотношение интенсивностей свечения хвоста и головы ДНК-кометы показывает долю ДНК в хвосте, а длина хвоста находится в обратной зависимости от уровня фрагментированности ДНК. Для каждого индивида на 100-150 клетках определяли долю ДНК в хвосте ДНК-кометы (DNA_{Pr}, %) и вычисляли момент хвоста ДНК-кометы (Moment_T, усл.ед.) как произведение процента ДНК в хвосте кометы и длины хвоста кометы. Удаление “выбросов” (гибнущие клетки, возможные артефакты) из выборки производили по правилу “трёх сигм”, то есть, не включали в экспериментальные данные клетки, у которых исследуемый параметр отклонялся от среднего более чем на три среднеквадратичных отклонения (СКО). Поскольку распределения клеток по исследуемым параметрам отклонялись от нормального, мы использовали робастные оценки среднего и СКО. В качестве оценки среднего принимали медиану, а оценкой СКО служил межквартильный размах, то есть разность между третьим и первым квартилями, делённый на 1,349.

Для статистической обработки и анализа данных использовали пакет программ PAST версии 2.17с [9].

Таблица. Моменты хвоста ДНК-комет (в условных единицах) в исследованных выборках. СКО - среднеквадратичное отклонение

	Контроль	Больные дети (РДА и РАС)	Матери детей с аутизмом и РАС	Матери здоровых детей
N	21	21	14	19
Мин.значение	177	386	343	312
Макс.значение	800	2070	3095	813
Среднее арифметическое ± СКО	414±151	810±445	1277±858	479±135
Медиана	379	627	940	488

Пакет программ находится в общем доступе по адресу: <http://www.nhm2.uio.no/norlex/past/Past.exe>.

Стандартный уровень значимости отличий, на котором отвергается нулевая гипотеза, был принят при $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Корреляция между величинами момента хвоста ДНК-кометы и процентной доли ДНК в хвосте кометы одного и того же индивида

Обнаружена значимая и высокая корреляция между нормализованными (десятичный логарифм) показателями момента хвоста кометы и доли ДНК в хвосте кометы одного и того же индивида (таблица).

В контрольной выборке коэффициент линейной корреляции по Пирсону был равен $R=0,83$ ($p=3,0 \times 10^{-6}$), в выборке детей с РДА коэффициент корреляции был $R=0,87$ ($p=3,7 \times 10^{-7}$), в выборке матерей больных аутизмом детей коэффициент корреляции составил $R=0,86$ ($p=8,6 \times 10^{-5}$). Для объединённой выборки ($n=56$), в которую вошли все обследованные индивиды, кроме матерей контрольной группы (имеющих только здоровых детей), коэффициент корреляции по Пирсону составил $R=0,90$ ($p=1,4 \times 10^{-20}$) (рис. 2). У матерей контрольной группы (матери здоровых детей) корреляцию доли ДНК в хвосте кометы с моментом хвоста кометы не проверяли.

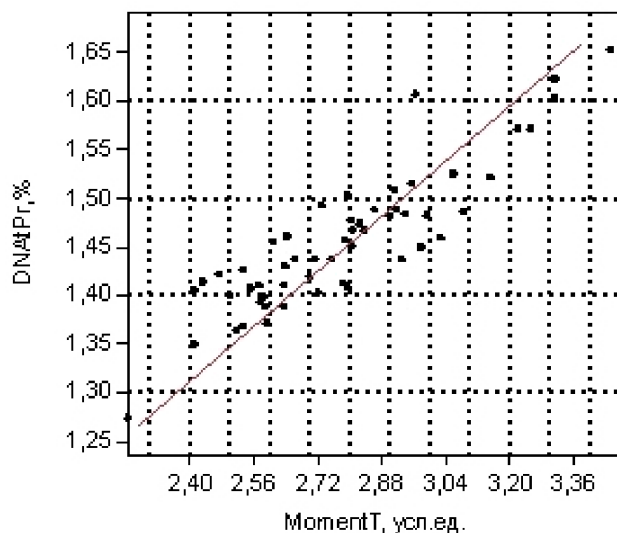


Рисунок 2. Зависимость между десятичными логарифмами момента хвоста ДНК-кометы в усл. ед. (абсцисса) и доли ДНК в хвосте, % (ордината) одного и того же индивида в объединённой выборке ($n=56$) здорового контроля, детей с аутизмом и матерей больных детей.

Далее мы анализировали только один показатель из двух: момент хвоста ДНК-кометы.

Также высокой была корреляция между несвязанными величинами процентной доли ДНК в хвосте кометы и длины хвоста кометы. Для объединённой выборки здоровых детей, детей с аутизмом и матерей детей с аутизмом коэффициент ранговой корреляции по Спирмену составил $R_s=0,92$ ($p=6,3 \times 10^{-24}$), а в выборке детей с ранним детским аутизмом коэффициент ранговой корреляции по Спирмену равнялся $R_s=0,96$ ($p=2,4 \times 10^{-12}$).

Сравнение значений момента хвоста ДНК-кометы в группах

Распределение контрольных выборок здоровых детей и матерей здоровых детей соответствовало нормальному закону ($p>0,05$), средние значения в подвыборках мальчиков и девочек не различались ($p=0,44$). Нормальность распределения выборки больных ранним детским аутизмом и выборки матерей этих больных детей опровергалась целым рядом критериев согласия: хи-квадрат, Жарка-Бера, Шапиро-Уилка, Монте-Карло и Андерсона-Дарлинга ($p<0,01$). Вследствие этого провели десятичное логарифмирование данных. После логарифмирования все четыре выборки показали соответствие нормальному закону по каждому из перечисленных выше критериев ($p>0,10$). Поскольку тест Левене показал однородность дисперсий для медиан ($p=0,07$), был применён однофакторный дисперсионный анализ, который позволил опровергнуть нуль-гипотезу о равенстве всех средних ($F=18,0$; $df=3,71$; $p=9,0 \times 10^{-9}$). Проведённые затем попарные сравнения выборок *post hoc* методом Тьюки показали, что контрольная выборка здоровых детей значительно отличается более низким уровнем повреждённости ДНК, выражаемого таким параметром как десятичный логарифм момента хвоста ДНК-кометы, от групп детей с аутизмом ($p=4,3 \times 10^{-4}$) и здоровых матерей детей с аутизмом ($p=1,5 \times 10^{-4}$), но не от контрольной выборки матерей здоровых детей ($p=0,64$). Различия между выборками детей с аутизмом и их матерей ($p=0,06$) не были статистически значимыми. Напротив, были значимыми отличия матерей больных аутизмом детей от контрольной выборки матерей здоровых детей ($p=1,5 \times 10^{-4}$), а также выборки детей с аутизмом от выборки матерей здоровых детей ($p=0,014$).

Проведено определение ранговой корреляции между моментом ДНК-кометы ребенка, страдающего аутизмом или РАС, и его матери. Таких пар мать-ребёнок было 13, потому что из 14 матерей детей, страдающих аутизмом, одну мать пришлось исключить из исследования, так как не удалось получить биоматериал от её ребенка. Исследование показало отсутствие значимой корреляции между моментом хвоста ДНК-комет больного ребенка и его матери по Спирмену (коэффициент корреляции $R_s=-0,04$; $p=0,91$) и Кэндаллу ($T=-0,05$; $p=0,81$). Показателем в этом плане пример одной из матерей, у которой имелось двое детей, разнояйцевых близнецов, страдающих аутизмом. Значения момента

хвоста ДНК-кометы у этих близнецов различались почти в четыре раза (434 и 1663 усл.ед.).

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В исследованных выборках выявлена высокая положительная корреляция между моментом “хвоста” ДНК-кометы (усл.ед.) и доли ДНК в “хвосте” (%). Это согласуется с данными литературы (например, см. рисунок 3 в [10]) и позволяет оперировать только одним из этих показателей.

Как и ожидалось, уровень повреждённости ДНК в выборке детей с аутизмом оказался значимо выше, чем в выборке здоровых детей. Это наблюдение можно связать с генотоксичностью ОС.

Менее тривиальным результатом исследования оказался тот факт, что у не страдающих аутизмом матерей детей-аутистов уровень повреждений ДНК также значимо превышает таковой в выборке здоровых детей и соответствует уровню повреждённости ДНК в выборке детей с аутизмом. Теоретически это можно приписать как просто большому возрасту матерей по сравнению с детьми (в рамках известной теории, связывающей старение со свободными радикалами и накоплением повреждений ДНК в ходе нормального онтогенеза), так и патологическим процессам в их организме, которые, возможно, являются компонентой “материнского риска” рождения больного ребёнка. Известно, что иммунный ответ через воспаление и активацию макрофагов связан с ОС, причём эта связь является обратной положительной в силу действия целого ряда механизмов. Проведённые нами ранее исследования показали, что внеклеточная ДНК из погибших под воздействием АФК клеток содержит метилированные ГЦ-богатые области, в первую очередь транскрибируемую область рибосомного повтора. Будучи устойчивыми к воздействию нуклеаз, они накапливаются в крови и активирует иммунную систему путём взаимодействия с TLR9 и, возможно, другими рецепторами к свободной ДНК [11]. Кроме того, внеклеточная ДНК содержит продукты окислительной модификации. Фрагменты окисленной внеклеточной ДНК служат стресс-сигналом, стимулирующим выработку активных форм кислорода и азота различными типами клеток человека [12].

Первое предположение о влиянии фактора возраста не согласуется с нашими экспериментальными наблюдениями, полученными на матерях клинической и контрольной групп одной и той же возрастной категории (репродуктивного возраста). Анализ контрольной выборки женщин, не имевших детей с аутизмом, даёт основания полагать, что в норме степень повреждённости ДНК увеличивается с возрастом с детского периода и до возраста 40+ незначительно: мы не наблюдали значимого отличия показателя разрывов ДНК женщин, не имевших детей с аутизмом, от такового в контрольной группе нормальных детей. Напротив, показатель повреждений ДНК матерей детей-аутистов по сравнению с матерями здоровых детей был значимо выше, что даёт основания предполагать наличие

тех или иных компонентов “материнского риска” (например, генотоксичный ОС в организме матерей, родивших больных детей) и отсутствие таковых у женщин того же возраста, но имеющих только здоровых детей. Однако механизмы реализации “материнского риска”, лежащих в основе влияния материнского организма на развитие РДА и РАС и задействующие ОС и эффекты генотоксичности, видимо, непросты и нелинейны. Об этом свидетельствует отсутствие корреляции между степенью поврежденности ДНК у ребенка с аутизмом и у его матери. Вероятно, показатели интенсивности ОС и величины эффекта генотоксичности непостоянны и могут подвергаться периодическим изменениям циклического характера, как показывают данные моделирования, опубликованные нами ранее [13]. Для выяснения возможных механизмов “материнского риска” необходимы дальнейшие исследования с анализом большего числа параметров.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCarthy M., Hendren R.L. (2009) Psychiatric Clinic North America. **32** (1), xiii1–xiii10.
2. Филиппова Н.В., Барыльник Ю.Б. (2014) Социальная и клиническая психиатрия, **24**(3), 96–101.
3. Chauhan A., Chauhan V. (2006) Pathophysiology, **13**(3), 171–181.
4. Rossignol D.A., Frye R.E. (2012) Mol.Psychiatry, **17**(3), 290–314.
5. Elia M. (1992) in: Energy metabolism: tissue determinants and cellular corollaries (Kinney J.M., Tucker H.N., eds.) N.Y.: Raven. 289 p.
6. Naviaux R.K. (2012) J. Pharmacol. Exp. Ther., **342**(3), 608–618.
7. Stigler K.A., Sweeten T.L., Posey D.J., McDougle C.J. (2009) Research in Autism Spectrum Disorders **3**, 840–860.
8. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R. (2008) Mutagenesis, **23**(3), 143–151.
9. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, **4**(1): 9 pp
10. El-Ansary A., Shaker G.H., El-Gezeery A.R., Al-Ayadhi L. (2013) Gut Pathog., **5**, 9.
11. Вейко Н.Н., Калашикова Е.А., Кокаровцева С.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Иванова С.М., Рязанцева Т.А., Егорова Н.А., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. (2006) Бюлл. экпер. биол. мед., **10**, 409.
12. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. (2013) Oxid Med Cell Longev. DOI: 10.1155/2013/649747. Epub 2013 Mar 6.
13. Porokhovnik L., Passekov V., Gorbachevskaya N., Sorokin A., Veiko N., Lyapunova N. (2015) Psychiatric Genetics, **25**(2), 79–87.

Поступила: 31. 03. 2015.
Принята к печати: 30. 12. 2015.

THE MATERNAL EFFECT IN INFANTILE AUTISM: ELEVATED DNA DAMAGE DEGREE IN PATIENTS AND THEIR MOTHERS

L.N. Porokhovnik¹, S.V. Kostyuk¹, E.S. Ershova¹, S.M. Stukalov¹, N.N. Veiko¹, N.Yu. Korovina²,
N.L. Gorbachevskaya³, A.B. Sorokin⁴, N.A. Lyapunova¹

¹Research Centre of Medical Genetics,

1 Moskvorechie str., Moscow, 115478 Russia; e-mail: med-gen@mail.ru

²Research and Practice Centre of Pediatric Neuropsychiatry, Moscow, Russia

³Research Centre for Mental Health, Moscow, Russia

Infantile autism is a common disorder of mental development, which is characterized by impairments in the communicative, cognitive and speech spheres and obsessional stereotyped behaviour. Although in most cases, pathogenic factors remain unclear, infantile autism has a significant hereditary component, however, its etiology is also under the influence of environmental factors, including the condition of the mother's body during pregnancy (“maternal effect”). Oxidative stress is assumed to play a key role in the pathogenesis of infantile autism. It is known that oxidative stress has a prominent genotoxic effect, which is realized through inducing single and double strand breaks of the nuclear DNA. We evaluated the degree of DNA damage in patients with infantile autism and their mothers using DNA comet assay. The comet tail moment and DNA per cent ratio in the tail were assessed for each individual. The two parameters appeared to be strongly correlated ($r=0.90$). Mean and median values of both parameters were considerably higher in the sample of autistic children, than in age-matching healthy controls. Interestingly, these parameters were also elevated in healthy mothers of autistic children, with no difference from the values in the group of autistic children. The control group of healthy women of reproductive age, who had no children with autism, differed by the DNA comet tail moment from the group of mothers of autistic children, but did not differ significantly from the control group of healthy children. The results suggest that there are genotoxic factors in mentally healthy mothers of autistic children, which can determine the pathological process in the foeti via environmental “maternal effect” during gestation.

Key words: autism, comet assay, maternal effect, DNA breaks