

УСИЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, УРОВНЯ АПОПТОЗА И ИЗМЕНЕНИЕ В УРОВНЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕННОВ *BCL* И *BAX* У ДЕТЕЙ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ РАС

Чудакова Ю.М.¹, Шмарина Г.В.¹, Ершова Е.С.¹, Мартынов А.В.¹, Никитина С.Г.², Костюк С.В.¹

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова
Москворечье ул., 1, г. Москва, 115478, РФ; e-mail: julia.chudakova@yandex.ru

² Научный центр психического здоровья
ул. Каширское шоссе, 34, г. Москва, 115522, РФ

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0564

Аннотация. Расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа психиатрических заболеваний, часто встречающихся у детей. Пациенты с РАС характеризуются дефицитом когнитивных, поведенческих, коммуникативных сфер и навязчивым стереотипным поведением. На данный момент этиология и патогенез РАС одна из важнейших проблем детской психиатрии. Для пациентов с РАС характерно усиление окислительного стресса. Целью данного исследования было охарактеризовать роль окислительного стресса у пациентов с РАС в усилении уровня апоптоза. Клиническую группу составили 133 ребенка с РАС (DSM-5) 4-12 лет, наблюдавшиеся ФГБНУ НЦПЗ. Дети с РАС были разделены на две подгруппы по тяжести течения заболевания, согласно баллам CARS. В контрольную группу вошли 27 здоровых детей. Из цельной крови выделяли лимфоциты центрифугированием в градиенте фиколла-урографина. Уровень экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови пациентов с РАС и здоровых контролей оценивали по количественному определению уровня мРНК методом ПЦР в реальном времени и по уровню содержания белка в клетках, проточной цитофлюориметрией. Уровень активных форм кислорода (АФК) внутри лимфоцитов оценивали по уровню окисленного до DCF реагента H₂DCFH с помощью проточной цитофлюориметрии. В лимфоцитах детей из подгруппы с легкой и средней формой РАС уровень АФК был повышен, но уровень значимости не был достигнут, при этом в лимфоцитах детей с тяжелым течением РАС уровень АФК был в 2,2-2,5 раз выше, чем у детей контрольной группы ($p < 0,01$). Уровень экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* в лимфоцитах детей с тяжелой формой РАС был понижен в 2-2,5 раза ($p < 0,01$), а уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* был в 1,8-2,3 ($p < 0,01$) раза выше по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать об усилении у пациентов с тяжелым течением РАС окислительного стресса и апоптоза.

Ключевые слова: РАС, аутизм, АФК, активные формы кислорода, окислительный стресс, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа психиатрических заболеваний детей. Пациенты с РАС характеризуются дефицитом когнитивных, поведенческих, коммуникативных сфер и навязчивым стереотипным поведением. РАС один из самых распространенных психиатрических диагнозов среди детей. Этиология и патогенез аутизма является одной из главных задач современной детской психиатрии во всем мире. В США в 2016 году РАС был диагностирован у 1 ребенка из 68 детей [1]. В России в данный момент нет утвержденной методики учета случаев аутизма, поэтому официальной статистики распространенности заболевания в нашей стране нет. По данным Минздрава РФ, общая численность детей с расстройством аутистического спектра (РАС), согласно мониторингу 2020 года, превысила 32 тысячи человек. Проведенный мониторинг выявил выраженную динамику увеличения численности по сравнению с 2019 годом на 42%, и в 2,3 раза – по сравнению с 2014 годом. На данный момент этиология и патогенез РАС одна из важнейших проблем детской психиатрии. На развитие аутизма влияют генетические, эпигенетические и средовые факторы. Для пациентов с РАС характерно усиление окислительного стресса, аберантное воспаление, дисфункция митохондрий [2].

Целью данного исследования было охарактеризовать роль окислительного стресса у пациентов с РАС в усилении уровня апоптоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническую группу составили 133 ребенка с РАС (диагноз был поставлен согласно DSM-5) (102 мальчика и 31 девочка 4-12 лет [3]). Дети были обследованы в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр психического здоровья» в 2016-2018 гг.

Пациенты прошли оценку согласно AMSE (Autism Mental Status Examination, обследование психического статуса пациента с РАС), CARS (The Childhood Autism Rating Scale, оценка тяжести аутизма), SCQ

(Communication Questionnaire, опрос родителей) [4-6]. В исследовании не принимали участие пациенты с синдромальной формой аутизма. Критериями исключения служили расстройства известной этиологии, клинически значимые сенсорные или двигательные нарушения, серьезных медицинских состояний, влияющие на развитие мозга, тяжелые воспалительные расстройства или аллергические реакции. Как и в ранее проводимых исследованиях [7-11] Клиническая группа была поделена на две подгруппы в соответствии с баллам CARS, оценивающими тяжесть протекания аутизма [2]. Первую группу (n=62) составили дети со слабыми и средними проявлениями аутизма, набравшие по шкале CARS от 30 до 36 баллов. Вторую группу (n=71) составили дети с тяжелым проявлением аутизма, набравшие по шкале CARS от 30 до 36 баллов [2]. В контрольную группу вошли 27 здоровых детей мужского пола из того же возрастного диапазона, что и клиническая группа.

Биологическим материалом служили 8-9 мл венозной крови, взятые у детей, вошедших в исследуемую выборку.

Опекуны детей подписали информированное согласие о заборе 8 мл веной крови и участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова».

Из цельной крови выделяли лимфоциты центрифугированием в градиенте фиколла-урографина.

Выделяли тотальную РНК из лимфоцитов набором RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen» Германия). Обратную транскрипцию проводили обратной транскриптазой MuLV-RT («Силекс» (Россия)). Оценивали концентрацию кДНК, окрашивая ее красителем *rhoGreen*, мерили флуорисценцию. Уровень экспрессии генов оценивали полимеразной цепной реакцией в реальном времени, используя интерколирующий краситель SYBRGreen PCRMasterMix (Applied Biosystems), амплификатор StepOnePlus instrument (Applied Biosystems). В качестве референсного гена использовали TBP. Использовали праймеры TBP (F: GCCCGAAACGCCGAATAT, R: CCGTGGTTCGTGGCTCTCT), BAX (F: GGAGCTGCAGAGGATGATTG, R: AGTTGAAGTTGCCGTCAGAA), BCL2 (F: TTTGGAAATCCGACCACTAA, R: AAAGAAATGCAAGTGAATGA).

Уровень АФК внутри лимфоцитов оценивали по уровню окисленного до DCF реагента H2DCFH с помощью проточной цитофлуориметрии. Уровень опоптотических клеток в крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки иодидом пропидия и антителами к аннексину-V, меченные FITC. Статистический анализ результатов исследования проводили в пакете программ PAST версии 2.17.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках организма активные формы кислорода (АФК) участвуют в регуляции внутренних процессов. Повышение уровня АФК в клетках приводит к у сильению окислительного стресса и развитию патологий в организме. Уровень АФК в лимфоцитах периферической крови здоровых детей и детей с РАС оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки H2DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate или 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). Этот реагент в присутствии различных радикалов АФК окисляется до дихлорфлуоресцеина (DCF), что позволяет по его флуорисценции определить уровень окислительного стресса в клетках.

Уровень DCF в клетках детей РАС из обеих клинических групп был выше, чем у здоровых детей из контрольной группы. В клетках детей с легкой и средней формой РАС уровень АФК в мононуклеарах был выше на 30-40% выше, чем в лимфоцитах здоровых детей, но уровень значимости не был достигнут. Однако в группе с тяжелой формой РАС уровень АФК был значимо выше в 2,2-2,5 раз выше ($p < 0,01$). Эти данные свидетельствуют о повышении уровня окислительного стресса в клетках детей с РАС особенно при тяжелом течении заболевания.

Усиление окислительного стресса может приводить к апоптозу клеток. Уровень опоптотических клеток в крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки иодидом пропидия и антителами к аннексину-V, меченные FITC.

Уровень опоптоза был повышен и в группе со средней и легкой формой РАС (на 5-15%) и в группе с тяжелой формой РАС (35-45%), но уровень значимости был достигнут только в группе с тяжелым течением РАС (рис. 2).

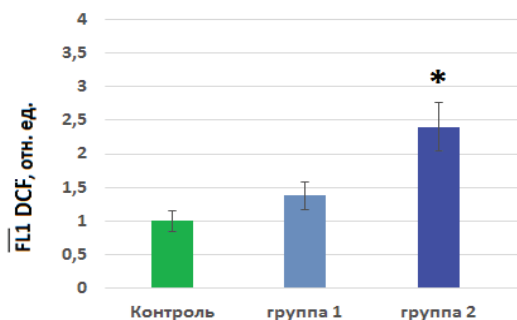


Рисунок 1. Уровень АФК в мононуклеарах периферической крови детей с тяжелой формой РАС (группа 2) и с легкой и средней тяжестью РАС (группа 1). * - $p < 0,01$, критерий U Манна — Уитни

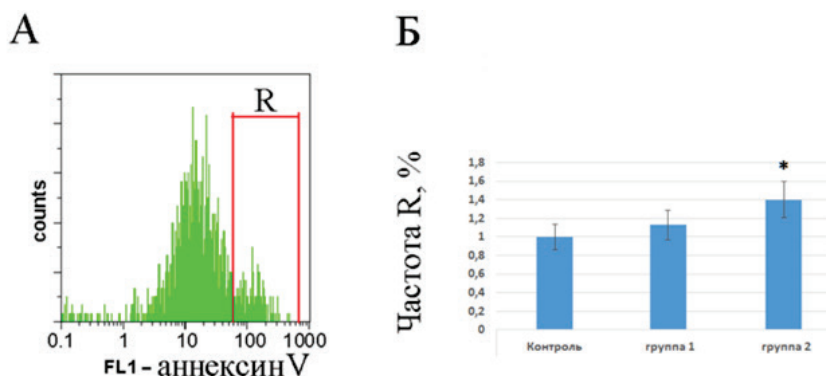


Рисунок 2. Уровень апоптотических клеток в мононуклеарах периферической крови детей с тяжелой формой РАС (группа 2) и с легкой и средней тяжестью РАС (группа 1). * - $p < 0,01$, критерий U Манна–Уитни. Окислительный стресс, приводя к усилению уровня апоптоза, так же влияет экспрессию генов в клетках. Мы оценивали уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* и антиапоптотического гена *BCL2* методом ПЦР в реальном времени (рис. 3)

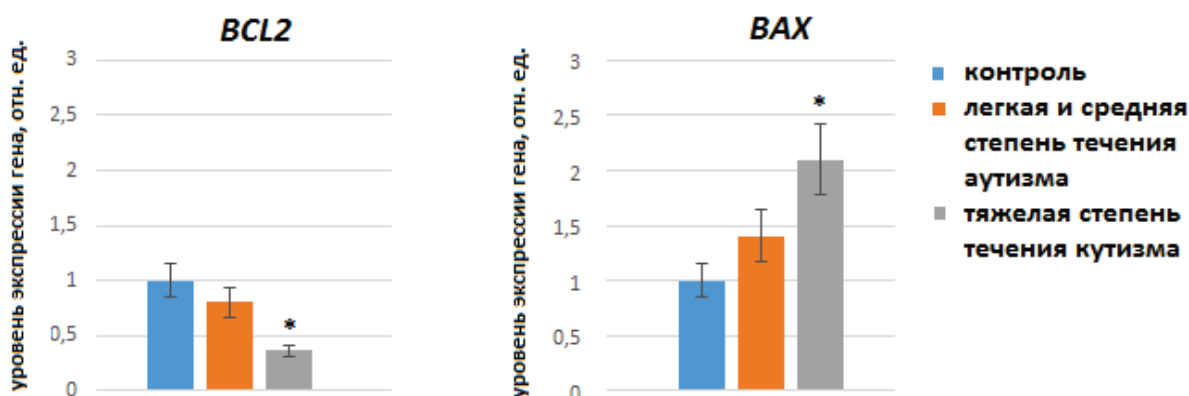


Рисунок 3. Уровни экспрессии генов *BCL2*, *BAX* в мононуклеарах периферической крови пациентов с РАС по сравнению с контролем. Группа 1 - дети с легкой и средней формой аутизма, группа 2 - дети с тяжелой формой аутизма. * p -value $< 0,01$ в сравнении с контрольной выборкой (критерий Манна-Уитни)

Уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* был повышен в группе детей с легким и средним течением РАС в 1,3 раза и в группе детей с тяжелой формой РАС в 1,8-2,3 ($p < 0,01$), но повышение было значимо только в группе с тяжелым течением РАС. Подобная картина наблюдалась при оценке уровня экспрессии антиапоптотического гена *BCL2*. Уровень его экспрессии был понижен в группе детей с легким и средним течением РАС на 30-40 % и в группе детей с тяжелой формой РАС в 2-2,5 ($p < 0,01$), но понижение было значимо только в группе с тяжелым течением РАС. При этом отношение уровней экспрессии гена *BAX* к уровню экспрессии *BCL2* у детей с тяжелой формой РАС было выше в 4-5 раз ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Данные были подтверждены и на уровне белков *BCL2* и *BAX*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У детей с тяжелой формой РАС в клетках периферической крови наблюдается увеличение количества апоптотических клеток, а также повышение уровня окислительного стресса по сравнению с группами сравнения (клетки условно-здоровых доноров и детей со средней и легкой формой РАС). Определение уровня апоптоза клеток и уровня АФК в клетках крови может способствовать дифференциальной диагностике тяжелой формы течения РАС и выбору подходящей конкретному пациенту схемы терапии.

Список литературы / References:

- Christensen D.L. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. Morbidity and mortality weekly report. *Surveillance summaries*, 2016, vol. 65, no. 3, pp. 1-23.
- Симашкова Н., Ключник Т., Якупова Л. Клинико-биологические подходы к диагностике и обоснованию персонализированной терапии у пациентов с расстройствами аутистического спектра. *Психиатрия*, 2018, т. 2, с. 17-24. [Simashkova N., Klyushnik T., Yakupova L. Clinical-Biological Approaches to Diagnosis and Rationale for Personalized Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry*, 2018, 2, 17-24.

3. American Psychiatric Association. In Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), Fifth Edition, 2013, pp. 50-59.
4. Grodberg D. et al. Brief Report: The Autism Mental Status Examination: Development of a Brief Autism-Focused Exam. *Journal of autism and developmental disorders*, 2012, vol. 42, no. 3, pp. 455-59.
5. Rutter M., Bailey A. (SCQ) *Social Communication Questionnaire*. 2003.
6. Scholper E., Van Bourgondien M.E., Wellman G.J., Love S.R. (CARS-2) *Childhood Autism Rating Scale*. 2010.
7. Esnafoglu Erman, Sema Nur Ayyıldız. Decreased Levels of Serum Fibroblast Growth Factor-2 in Children with Autism Spectrum Disorder. *Psychiatry research*, 2017, vol. 257, pp. 79-83.
8. Kaku Sowmyashree Mayur et al. Early Childhood Network Alterations in Severe Autism. *Asian journal of psychiatry*, 2019, vol. 39, no. 114-119.
9. Ning J. et al. Increased Serum Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Autism Spectrum Disorders. *Neurotoxicology*, 2019, vol. 71, pp. 1-5.
10. Ocakoglu, Fevzi Tuna, Sezen Kose, Burcu Ozbaran, and Huseyin Onay. The Oxytocin Receptor Gene Polymorphism -Rs237902- Is Associated with the Severity of Autism Spectrum Disorder: A Pilot Study. *Asian journal of psychiatry*, 2018, vol. 31, pp. 142-149.
11. Qasem H. et al. Impaired Lipid Metabolism Markers to Assess the Risk of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Metabolic brain disease*, 2018, vol. 33, no. 4, pp. 1141-1153.

INCREASED OXIDATIVE STRESS AND CHANGES IN THE LEVEL OF EXPRESSION OF THE BCL AND BAX GENES IN CHILDREN WITH SEVERE ASD

Chudakova Y.M.¹, Shmarina G.V.¹, Ershova E.S.¹, Martynov A.V.¹, Nikitina S.G.², Kostyuk S.V.¹

¹ Research Centre For Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: julia.chudakova@yandex.ru

² Mental Health Research Center

Kashirskoe highway, 34, Moscow, 115522, Russia

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0564

Abstract. Autism Spectrum Disorders (ASDs) are a heterogeneous group of psychiatric disorders most commonly seen in children. Patients with ASD are characterized by cognitive, behavioral, communicative deficits and obsessive stereotypical behavior. At that moment, the etiology and pathogenesis of ASD is one of the most important problems in child psychiatry. Patients with ASD are characterized by increased oxidative stress. The aim of this study was to characterize the role of oxidative stress in patients with ASD in enhancing the level of apoptosis. The clinical group consisted of 133 children with ASD (DSM-5), 4-12 years old, who were followed up by the Federal State Budget Scientific Institution National Center for Health Care. Children with ASD were divided into two subgroups according to the severity of the course of the disease, according to CARS scores. The control group included 27 healthy children. Lymphocytes were isolated from whole blood by centrifugation in a ficoll-urographin gradient. The level of gene expression in peripheral blood lymphocytes of patients with ASD and healthy controls was assessed by quantitative determination of the mRNA level by real-time PCR and by the level of protein in cells, flow cytometry, cytofluorometry. In the lymphocytes of children from the subgroup with mild and moderate forms of ASD, the level of ROS was increased, but the level of significance was not reached, while in the lymphocytes of children with severe ASD, the level of ROS was 2.2-2.5 times higher than in children of the control group. groups ($p < 0.01$). The level of expression of the anti-apoptotic gene BCL2 in lymphocytes of children with severe ASD was reduced by 2-2.5 times ($p < 0.01$), and the level of expression of the pro-apoptotic BAX gene was increased by 1.8-2.3 ($p < 0.01$) times higher compared to the control. This may indicate an increase in oxidative stress and apoptosis in patients with severe ASD.

Key words: ASD, autism, ROS, reactive oxygen species, oxidative stress, apoptosis.