

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ И ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ г. ГРОДНО И ГРОДНЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

БИЗЮКЕВИЧ С.В., КАРПЮК В.А.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №3. – С. 106-111.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE DISTRIBUTION OF ALLELES AND POLYMORPHISMS OF THE FOLATE CYCLE GENES IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS AND HEALTHY CHILDREN OF GRODNO AND GRODNO REGION

BIZIUKEVICH S.V., KARPIUK V.A.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2020;19(3):106-111.

Резюме.

Цель работы – сравнительная характеристика распределения аллелей и полиморфизмов генов фолатного цикла у детей с расстройствами аутистического спектра и здоровых детей г. Гродно и Гродненской области.

Материал и методы. В исследование включено 187 детей в возрасте 2-10 лет. В первую группу (n=102) вошли дети с расстройствами аутистического спектра, во вторую (n=85) – здоровые дети. Выявление мутаций генов фолатного цикла MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G у здоровых детей и детей с расстройствами аутистического спектра проводили методом молекулярно-генетического анализа, включающего в себя экстракцию ДНК из 5 мл образцов периферической крови с использованием диагностических наборов «SNP-Скрин» и «ДНК-Экстран».

Результаты. Сравнительный анализ распределения частот аллелей генов MTRR A66G ($\chi^2=12,63$; $p=0,001$) и MTHFR C677T ($\chi^2=9,36$; $p=0,0092$) в группе детей с расстройствами аутистического спектра выявил достоверные различия относительно распределения их частот в группе здоровых детей. Отмечается тенденция к увеличению частот встречаемости мутантных аллелей G (53,9%) и T (44,6%) генов MTRR A66G, MTHFR C677T в группе детей с расстройствами аутистического спектра по сравнению с группой здоровых детей – 35,29% и 28,8%.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют, что носительство гомозиготных полиморфизмов генов MTHFR C677T и MTRR A66G и их ассоциаций может свидетельствовать о вероятном риске развития расстройств аутистического спектра у детей.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, полиморфизм, гены фолатного цикла, гомозиготы, аллели гена, иммунитет, дети.

Abstract.

The purpose of this article is a comparative characteristic of the distribution of alleles and polymorphisms of the folate cycle genes in children with autism spectrum disorders and healthy children residing in Grodno and Grodno Region.

Material and methods. The study included 187 children aged 2-10 years. The first group (n = 102) consisted of children with autism spectrum disorders, the second group (n = 85) was composed of healthy children. The detection of mutations of the MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G folate cycle genes in healthy children and children with autism spectrum disorders was performed using molecular genetic analysis, including DNA extraction from 5 ml of peripheral blood samples using the diagnostic kits «SNP-Screen» and «DNA-Extran».

Results. Comparative analysis of the frequency distribution of alleles of the MTRR A66G ($\chi^2=12.63$; $p=0.001$) and MTHFR C677T ($\chi^2=9.36$; $p=0.0092$) genes in the group of children with autism spectrum disorders revealed significant differences with regard to the distribution of their frequencies in the group of healthy children. There is a tendency towards the increase in the occurrence frequencies of mutant alleles G (53.9%) and T (44.6%) of the genes MTRR A66G, MTHFR C677T in the group of children with autism spectrum disorders compared to the group of healthy children – 35.29% and 28.8%.

Conclusions. The results obtained demonstrate that the presence of homozygous polymorphisms of the MTHFR C677T and MTRR A66G genes and their associations may testify to the risk of the development of autism spectrum disorders in children.

Key words: autism spectrum disorders, polymorphism, folate cycle genes, homozygotes, gene alleles, immunity, children.

Генетическая природа развития расстройств аутистического спектра (РАС) на сегодняшний день не вызывает сомнений. Об этом свидетельствует многочисленное количество публикаций, посвящённых генетическим аспектам этиопатогенеза расстройств аутистического спектра. Существенный вклад в развитие РАС вносят иммунные нарушения, влияющие на нейротрансмиттерные механизмы областей головного мозга, ответственных за формирование социально-коммуникативных способностей [1].

Многими исследователями доказана взаимосвязь полиморфизмов генов фолатного цикла и развития расстройств аутистического спектра.

В исследованиях учёных из Ирана (кафедра биологии Гилянского университета) показано влияние полиморфизма гена MTR A2756G, а именно мутантной гомозиготы G/G на риск развития аутизма [2]. Группой генетиков из Египта (университет Ain Shams), полиморфизм гена MTHFR C677T был определен как генетический фактор риска развития РАС, в то время как полиморфизм гена MTRR A66G, по мнению учёных, снижает риск развития аутизма. Однако полиморфизм гена MTHFR A1298C играет роль дополнительного отягощающего фактора в развитии расстройств аутистического спектра [3].

По имеющимся литературным данным, полиморфизм генов фолатного цикла не является фактором, приводящим к возникновению РАС, а создаёт предрасполагающие условия для протекания каскадных процессов, которые, в свою очередь, способствуют манифестации расстройств аутистического спектра [4, 5]. Украинские учёные установили, что полиморфизм генов фолатного цикла приводит к развитию первичного иммунодефицита у 90% детей с РАС. Основой такого иммунодефицита является аномально малое количество натуральных киллеров (НК) и

натуральных Т-киллерных лимфоцитов (НКТ) [5]. В связи с такой особенностью иммунодефицита дети с РАС имеют повышенную склонность к развитию аутоиммунных осложнений [5]. В своих исследованиях авторы подчёркивают, что повреждение головного мозга при генетическом полиморфизме ферментов фолатного цикла происходит разными путями: в результате развития аутоиммунной реакции к мозговым антигенам с формированием лейкоэнцефалопатии разной степени тяжести [5, 6] или нарушения внутриутробного развития нервной системы с возникновением нейроденегерации, включая склероз отдельных участков головного мозга [5,6].

В Белорусской популяции имеется исследование ($n=482$) по распределению полиморфных вариантов у здоровых людей в гене MTHFR 677: C/C – 41,1%, C/T – 53,5%, T/T – 5,4% [7].

Несмотря на имеющиеся научные исследования, посвящённые влиянию генетического полиморфизма ферментов фолатного цикла на риск развития РАС, в Республике Беларусь исследований, направленных на изучение частоты распределения аллелей и полиморфизмов генов фолатного цикла у детей расстройствами аутистического спектра, не проводилось.

Цель исследования – изучить и сравнить частоты распределения аллелей и полиморфизмов генов фолатного цикла у детей с расстройствами аутистического спектра и здоровых детей г. Гродно и Гродненской области.

Материал и методы

В исследовании участвовали 187 человек. Все обследуемые были разделены на две группы. В первую группу ($n=102$) вошли дети с расстройствами аутистического спектра, проходившие стационарное обследование и лечение в детском от-

делении УЗ «ГОКЦ «Психиатрия-наркология»». Из них мальчики составили 84% (86 человек), девочки – 16% (16 человек). Возраст мальчиков составил $5,4 \pm 1,62$ года, девочек – $5,0 \pm 1,86$ года.

Во вторую группу ($n=85$) были включены здоровые дети. Из них мальчики – 56% (48 человек), девочки – 44% (37 человек). Средний возраст мальчиков составил $7,2 \pm 2,57$ года, девочек – $6,6 \pm 2,89$ года.

Выборка формировалась методом направленного отбора в соответствии со следующими критериями: письменное информированное согласие родителя или законного представителя пациента на участие в исследовании, наличие диагноза «расстройства аутистического спектра» (F84) в соответствии с исследовательскими диагностическими критериями Международной классификации болезней 10-го пересмотра (для первой группы), женский, мужской пол, возраст 2-10 лет. Критерии исключения составили: сопутствующая острая и хроническая соматическая патология, врождённые пороки и дефекты физического развития, отказ от участия в исследовании.

Выявление мутаций или полиморфизмов генов фолатного цикла MTHFR C677T и A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G осуществляли методом полимеразной цепной реакции, включающей в себя экстракцию ДНК из 5 мл образцов периферической крови, с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (амплификатор «Rotor-Gene 6000/Q»). Использовались диагностические наборы «SNP-Скрин» и «ДНК-Экстрен» (производство «Синтол», Российская

Федерация), в молекулярно-генетической лаборатории УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Статистическую обработку фактического материала выполняли с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0. Использовались методы описательной статистики и χ^2 Пирсона. Описание количественных признаков выполнено с помощью средней арифметической и стандартного отклонения. О взаимосвязи полиморфных аллелей генов фолатного цикла с риском развития расстройств аутистического спектра судили по величине отношения шансов (ОШ) с поправкой на доверительный интервал (ДИ) в 95%. Распределение изученных полиморфизмов находятся в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга. Различия сравниваемых величин считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Исследование проведено в соответствии с принципами клинической биоэтики. Конфликт интересов отсутствует.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты распределения полиморфных вариантов генов фолатного цикла в первой и второй групп отражают тенденцию к увеличению доли гомозиготных генотипов: GG (29%) гена MTRR A66G, гомозиготного генотипа TT (22,5%) гена MTHFR C677T, генотипа GG (15,6%) гена MTR A2756G и генотипа CC (11,7%) гена MTHFR A1298C в группе детей с расстройствами аутистического спектра по сравнению с группой здоровых детей (табл. 1).

Таблица 1 – Распределение полиморфных вариантов генов фолатного цикла в первой и второй группе

Локус	Генотип	Первая группа, $n=102$		Вторая группа, $n=85$		χ^2 , p
		n	%	n	%	
MTHFR A1298C	AA	49	48	48	56	4,55584 $p=0,102$
	AC	41	40	34	40	
	CC	12	11,7	3	4	
MTHFR C677T	CC	34	33	43	51	9,36724, $p=0,009$
	CT	45	44	35	41	
	TT	23	22,5	7	8	
MTRR A66G	AA	22	21,5	35	41	12,6350 $p=0,001$
	AG	50	49	40	47	
	GG	30	29	10	12	
MTR A2756G	AA	50	49	45	53	3,34797 $p=0,187$
	AG	36	35	34	40	
	GG	16	15,6	6	7	

Однако, как видно из таблицы 1, статистически достоверно различаются частоты полиморфизма генов MTHFR C677T ($\chi^2=9,36$; $p=0,0092$) и MTRR A66G ($\chi^2=12,63$; $p=0,001$).

Известно, что гомозиготные, аллельные варианты генов фолатного цикла являются наиболее неблагоприятным вариантом носительства и способствуют снижению активности фермента фолатного цикла на 65-70% [8]. В связи с этим, фермент, который кодируется гомозиготным полиморфным вариантом, не выполняет свою функцию в фолатном цикле и приводит к значимым метаболическим нарушениям в организме человека. Однако усиление неблагоприятного влияния полиморфизмов фолатного цикла происходит по мере накопления мутаций.

По данным научных публикаций, частота распределения мутантной аллели по полиморфизму гена MTHFR C677T в белорусской популяции среди здоровых людей составляет 32,2%, что сопоставимо с распределением частот в других европейских популяциях, за исключением итальянской (46%) [7].

Результаты нашего исследования демонстрируют более высокие значения распределений гомозиготных аллелей генов MTRR A66G и MTHFR C677T у детей с расстройствами аутистического спектра. Как следует из данных таблицы 2, отмечается тенденция к увеличению частот аллеля G (53,9%) гена MTRR A66G и аллеля T (44,6%) гена MTHFR C677T в группе детей с расстройствами аутистического спектра по сравнению с группой здоровых детей – 35,29% и 28,8%.

Многочисленные научные исследования демонстрируют противоречивые результаты о влиянии полиморфных вариантов различных генов фолатного цикла на риск развития расстройств аутистического спектра.

Имеются исследования, доказывающие, что дефицит фолиевой кислоты у матери в течение 1-го месяца беременности и полиморфизм гена MTHFR C677T повышает риск рождения детей с РАС [9]. Группа учёных из Турции в своих исследованиях отмечает, что полиморфизм гена MTHFR C677T чаще встречается у детей с аутизмом [10]. В свою очередь, учёные из Кореи изучили взаимосвязь между риском развития расстройств аутистического спектра и полиморфизмом генов MTHFR C677T, MTHFR A1298C [11]. В своём исследовании авторы утверждают о достоверной взаимосвязи полиморфизма гена MTHFR C677T и повышенному риску развития РАС [12]. Однако результаты научного исследования, проведённого учёными из Китая, опровергают влияние полиморфизмов генов фолатного цикла на риск развития расстройств аутистического спектра в Ханьской китайской популяции [13].

С целью оценить влияние мутаций полиморфизма генов фолатного цикла на риск развития расстройств аутистического спектра у детей г.Гродно и Гродненской области вычисляли отношения шансов (ОШ). В группу риска включали гомозиготы и гетерозиготы по полиморфному аллелю. Значимым фактором для риска развития расстройств аутистического спектра считали, если показатель относительных шансов с поправкой на ДИ превышал единицу.

При анализе ОШ были получены статистически достоверные значения для мутантных аллелей G и T генов MTRR A66G, MTHFR C677T. Отношения шансов для G аллеля гена MTRR A66G составили 2,145, для T аллеля гена MTHFR C677T – 1,989. Нижняя граница значений ОШ для мутантных аллелей генов MTRR A66G и MTHFR C677T при внесении поправок на 95% ДИ также составила больше единицы: 1,412, 1,291.

Таблица 2 – Распределение частот аллелей генов фолатного цикла в первой и второй группе

Локус	Аллель	Первая группа, n=102		Вторая группа, n=85		ОШ (95% ДИ)
		n	%	n	%	
MTHFR C677T	C	113	55,3	121	71,1	1,989 (1,291-3,062)
	T	91	44,6	49	28,8	
MTRR A66G	A	94	46	110	64,7	2,145 (1,412-3,062)
	G	110	53,9	60	35,29	
MTR A2756G	A	136	66,6	124	72,9	1,348 (0,863-2,106)
	G	68	33,3	46	27	
MTHFR A1298C	A	139	68,1	130	76,4	0,235 (0,959-2,409)
	C	65	31,8	40	23,5	

В связи с полученными результатами можно предположить, что ген MTHFR C677T, а именно мутантная гомозигота Т/Т является значимым фактором, оказывающим влияние на риск развития расстройств аутистического спектра у детей г. Гродно и Гродненской области, что сопоставимо с результатами исследования ученых из Египта и Турции [3, 10]. В то же время, наше исследование показало, что гомозиготный полиморфный вариант G/G гена MTRR A66G также является фактором риска развития расстройств аутистического спектра.

Заключение

Таким образом, анализ показателей распределения аллелей и полиморфных вариантов генов фолатного цикла в нашем исследовании отражает тенденцию к увеличению доли гомозиготных полиморфизмов генов фолатного цикла в группе детей с расстройствами аутистического спектра по сравнению с группой здоровых детей. Более высокие значения распределений гомозиготных аллелей генов MTRR A66G и MTHFR C677T у детей с расстройствами аутистического спектра свидетельствуют о том, что полиморфные варианты данных генов, вероятно, могут оказывать значимое влияние на характер метилирования ДНК, тем самым являться участниками иммуногенетической теории развития РАС.

По нашему мнению, наличие гомозиготных полиморфизмов генов MTHFR C677T и MTRR A66G и их ассоциаций может указывать на риск развития расстройств аутистического спектра у детей.

Литература

1. Бизюкевич, С. В. Генетические аспекты этиопатогенеза расстройств аутистического спектра. Обзор литературы / С. В. Бизюкевич, В. А. Карпюк // Психиатрия, психотерапия и клин. психология. – 2019. – Т. 10, № 1. – С. 148–156.
2. Analysis of methionine synthase (rs1805087) gene

- polymorphism in autism patients in Northern Iran / R. Haghiri [et al.] // Acta. Neurobiol. Exp. (Wars.). – 2016. – Vol. 76, N 4. – P. 318–323.
3. Study of the C677T and 1298AC polymorphic genotypes of MTHFR Gene in autism spectrum disorder / F. El-Baz [et al.] // Electron. Physician. – 2017 Sep. – Vol. 9, N 9. – P. 5287–5293.
4. Гречанина, Е. Я. Аутизм. Генетические и эпигенетические проблемы / Е. Я. Гречанина // Наук. журн. МОЗ України. – 2013. – № 2. – С. 29–48.
5. Мальцев, Д. В. Расширенный клинико-лабораторный фенотип при генетически детерминированном нарушении фолатного цикла у детей с расстройствами спектра аутизма / Д. В. Мальцев // Междунар. неврол. журн. – 2018. – Т. 5, № 99. – С. 5–19.
6. Мальцев, Д. В. Дефіцит природних кілерних Т-клітин / Д. В. Мальцев // Україн. мед. журн. – 2015. – № 1. – С. 65–70.
7. Полиморфизм C677T гена MTHFR в белорусской популяции / А. А. Яцкив [и др.] // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы VII Междунар. молодеж. науч.-практ. конф., Пинск, Респ. Беларусь, 10 апр. 2013 г. Ч. 2 / редкол.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2013. – С. 232–234.
8. Фолаты в XXI веке вне беременности. Только доказанные факты : информ. письмо / под ред. В. Е. Радзинского. – Москва : Ред. журн. Status Praesens, 2014. – 16 с.
9. Жилиева, Т. В. Прием фолатов при беременности и риск аутизма у потомства / Т. В. Жилиева, Ж. В. Альбицкая, Л. Н. Касимова // Психиатрия на этапах реформ: проблемы и перспективы [Электронный ресурс] : XVI съезд психиатров России, Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Казань, 23–26 сент. 2015 г. : тезисы / под общ. ред. Н. Г. Незнанова. – Санкт-Петербург : Альта Астра, 2015. – С. 194–195. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
10. Sener, E. F. MTHFR Gene C677T polymorphism in autism spectrum disorders / E. F. Sener, D. B. Oztop, Y. Ozkul // Genet. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – P. 698574.
11. MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population / J. Park [et al.] // Psychiatry Res. – 2014 Jan. – Vol. 215, N 1. – P. 258–259.
12. Pu, D. Association between gene MTHFR polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis / D. Pu, Y. Shen, J. Wu // Autism Res. – 2013 Oct. – Vol. 6, N 5. – P. 384–392.
13. Association study of polymorphisms in genes relevant to vitamin B12 and folate metabolism with childhood autism spectrum disorder in a Han chinese population / Z. Zhang [et al.] // Med. Sci. Monit. – 2018 Jan. – Vol. 24. – P. 370–376.

Поступила 24.03.2020 г.

Принята в печать 01.06.2020 г.

References

1. Biziukevich SV, Karpiuk VA. Genetic aspects of the etiopathogenesis of autism spectrum disorders. Literature review. *Psikhiatriia Psikhoterapiia Klin Psikhologiia*. 2019;10(1):148–56. (In Russ.)
2. Haghiri R, Mashayekhi F, Bidabadi E, Salehi Z. Analysis of methionine synthase (rs1805087) gene polymorphism in autism patients in Northern Iran. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2016;76(4):318–323. doi: 10.21307/ane-2017-030
3. El-Baz F, El-Aal MA, Kamal TM, Sadek AA, Othman AA. Study of the C677T and 1298AC polymorphic genotypes

- of MTHFR Gene in autism spectrum disorder. Electron Physician. 2017 Sep;9(9):5287-5293. doi: 10.19082/5287
4. Grechanina EYa. Autizm. Genetic and epigenetic problems. Nauk Zhurn MOZ Ukraïni. 2013;(2):29-48. (In Russ.)
5. Mal'tsev DV. An expanded clinical and laboratory phenotype in genetically determined folate cycle disorders in children with autism spectrum disorders. Mezhdunar Nevrol Zhurn. 2018;5(99):5-19. (In Russ.)
6. Мальцев ДВ. Дефіцит природних кілерних Т-клітин. Украин Мед Журн Mal'tsev DV. Deficiency of natural killer T cells. Ukrain Med Zhurn. 2015;(1):65-70. (In Ukr.)
7. Yatskiv AA, Ermak OA, Ruzhilo OS, Lebed' T. C677T Polymorphism of the MTHFR Gene in the Belarusian Population. V: Shebeko KK i dr, redkol. Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi: materialy VII Mezhdunar molodezh nauch-prakt konf, Pinsk, Resp Belarus', 10 apr 2013 g. Ch 2. Pinsk, RB: PolesGU; 2013. P. 232-4. (In Russ.)
8. Radzinskiy VE, red. Folates in the 21st century outside pregnancy. Only proven facts. Moscow, RF: Red zhurn Status Praesens; 2014. 16 p. (In Russ.)
9. Zhilyaeva TV, Al'bitskaya ZhV, Kasimova LN. Taking folates during pregnancy and the risk of autism in offspring. V: Neznanov NG, red. Psikhiairiia na etapakh reform: problemy i perspektivy [Elektronnyi resurs]: XVI s'ezd psikhiatrov Rossii, Vseros nauch-prakt konf s mezhdunar uchastiem, Kazan', 23–26 sent 2015 g: tezisy. Saint Petersburg, RF: Al'ta Astra; 2015. R. 194-5. 1 elektron opt disk (CD-ROM). (In Russ.)
10. Sener EF, Oztup DB, Ozkul Y. MTHFR Gene C677T polymorphism in autism spectrum disorders. Genet Res Int. 2014;2014:698574. doi: 10.1155/2014/698574
11. Park J, Ro M, Pyun JA, Nam M, Bang HJ, Yang JW, et al. MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. Psychiatry Res. 2014 Jan;215(1):258-9. doi: 10.1016/j.psychres.2013.11.006
12. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between gene MTHFR polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. Autism Res. 2013 Oct;6(5):384-92. doi: 10.1002/aur.1300
13. Zhang Z, Yu L, Li S, Liu J. Association study of polymorphisms in genes relevant to vitamin B12 and folate metabolism with childhood autism spectrum disorder in a Han chinese population. Med Sci Monit. 2018 Jan;24:370-376. doi: 10.12659/msm.905567

Submitted 24.03.2020

Accepted 01.06.2020

Сведения об авторах:

Бизюкевич С.В. – старший преподаватель кафедры психиатрии и наркологии, Гродненский государственный медицинский университет;

Карпюк В.А. – к.м.н., доцент, заведующая кафедрой психиатрии и наркологии, Гродненский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Biziukevich S.V – senior lecturer of the Chair of Psychiatry and Narcology, Grodno State Medical University;

Karpiuk V.A. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Psychiatry and Narcology, Grodno State Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Обухова, 15/1, Гродненский государственный медицинский университет, кафедра психиатрии и наркологии. E-mail: svetlana.lana13@mail.ru – Бизюкевич Светлана Викторовна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 230009, Grodno, 15/1 Obukhov str., Grodno State Medical University, Chair of Psychiatry and Narcology. E-mail: svetlana.lana13@mail.ru – Svetlana V. Biziukevich.