

Фрагменты окисленной внеклеточной ДНК влияют на развитие окислительного стресса в мононуклеарах периферической крови *in vitro* пациентов с детским аутизмом

Ю.М. Чудакова^{1,2}, С.Г. Никитина³, Л.Н. Пороховник¹, Е.С. Ершова¹, Г.В. Шмарина¹, Н.Н. Вейко¹, А.В. Мартынов¹, Е.Е. Балакирева³, С.В. Костюк¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Автор для корреспонденции: Юлия Михайловна Чудакова, julia.chudakova@yandex.ru

Резюме

Актуальность: этиология и патогенез детского аутизма (ДА) — одна из важных нерешенных проблем детской психиатрии. Ранее было показано, что концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови значительно повышается у детей, страдающих ДА, причем в наибольшей степени у пациентов с тяжелой формой течения ДА. В этих случаях также значительно выше содержание маркера окисленной ДНК 8-OHdG (8-оксогуанозин) в образцах внеклеточной и ядерной ДНК и маркера двунитевых разрывов γ H2AX (фосфорилированная форма гистонового белка X из семейства H2A). **Цель:** изучить влияние фрагментов окисленной вкДНК на образование свободных радикалов, окисление и разрывы ядерной ДНК *in vitro* в мононуклеарах периферической крови пациентов с диагнозом ДА. **Пациенты и методы:** в исследование включены 13 пациентов с диагнозом F84.02 по МКБ-10 и 10 условно здоровых детей в качестве группы сравнения. Используемые методы: клинико-психопатологический, молекулярно-биологический, статистический. **Результаты:** окисленные модельные фрагменты ДНК воздействуют на мононуклеары периферической крови детей с ДА и условно здоровых доноров по-разному. В мононуклеарах условно здоровых доноров в ответ на воздействие фрагментов окисленной ДНК повышаются уровни активных форм кислорода (АФК) ($p < 0,05$), окисления ДНК ($p < 0,05$) и поврежденности хромосом ($p < 0,05$), но в течение следующих 24 ч эти показатели возвращаются к прежнему уровню. При этом в мононуклеарах детей с ДА уровни АФК, окисления ДНК и поврежденности хромосом тоже повышаются, но последующее понижение происходит медленнее, и эти показатели не возвращаются к прежним значениям. **Заключение:** на основании полученных результатов можно выдвинуть гипотезу об участии фрагментов окисленной внеклеточной ДНК в патогенезе ДА.

Ключевые слова: аутизм, внеклеточная ДНК, свободные радикалы, окислительный стресс

Для цитирования: Чудакова Ю.М., Никитина С.Г., Пороховник Л.Н., Ершова Е.С., Шмарина Г.В., Вейко Н.Н., Мартынов А.В., Балакирева Е.Е., Костюк С.В. Фрагменты окисленной внеклеточной ДНК влияют на развитие окислительного стресса в мононуклеарах периферической крови *in vitro* пациентов с детским аутизмом. *Психиатрия*. 2023;21(5):77–85. <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2023-21-5-77-85>

RESEARCH OVERVIEW

UDC 616.89-02-053

<https://doi.org/10.30629/2618-6667-2023-21-5-77-85>

Fragments of Oxidized Extracellular DNA Affect the Development of Oxidative Stress in the Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro* in Patients with Childhood Autism

Ju.M. Chudakova^{1,2}, S.G. Nikitina³, L.N. Porokhovnik¹, E.S. Ershova¹, G.V. Shmarina¹, N.N. Veiko¹, A.V. Martynov¹, E.E. Balakireva³, S.E. Kostuk¹

¹FSBSI "Research Centre for Medical Genetics", Moscow, Russia

²The Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russia

Corresponding author: Julia M. Chudakova, julia.chudakova@yandex.ru

Summary

Background: the etiology and pathogenesis of childhood autism (CA) is one of the important unresolved problems of child psychiatry. It has been shown that the concentration of extracellular DNA (cfDNA) in the blood significantly increases in children with CA, and to the greatest extent in patients with severe CA. Patients with more severe CA also have significantly elevated levels of the oxidized DNA marker 8-OHdG in cfDNA and nuclear DNA samples and the double-strand break marker γ H2AX. **The aim** was to study the effect of oxidized cfDNA fragments on the formation of free radicals, oxidation and breaks of nuclear DNA in the peripheral blood mononuclear cells *in vitro* in children with CA. **Patients and methods:** the study involved 13 patients diagnosed

with F84.02 according to ICD-10 and 10 conditionally healthy children as a control group. Clinical-psychopathological, molecular-biological, statistical methods were used. **Results:** oxidized model DNA fragments affect the peripheral blood mononuclear cells of children with CA and conditionally healthy donors in different ways. In the mononuclear cells of conditionally healthy donors, in response to exposure to oxidized DNA fragments, the levels of ROS (reactive oxygen species) ($p < 0.05$), DNA oxidation ($p < 0.05$) and chromosome damage ($p < 0.05$) increase, but within the next 24 hours these indicators return to the previous level. At the same time, in the mononuclear cells of children with CA, the levels of ROS, DNA oxidation, and chromosome damage also increase, but the subsequent decrease occurs more slowly, and the levels of these indicators do not return to their previous values. **Conclusion:** on the basis of the obtained results, it is possible to put forward a hypothesis about the participation of fragments of oxidized extracellular DNA in the pathogenesis of CA.

Keywords: autism, extracellular DNA, free radical, oxidative stress

For citation: Chudakova Ju.M., Nikitina S.G., Porokhovnik L.N., Ershova E.S., Shmarina G.V., Veiko N.N., Martynov A.V., Balakireva E.E., Kostuk S.E. Fragments of Oxidized Extracellular DNA Affect the Development of Oxidative Stress in the Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro* in Patients with Childhood Autism. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2023;21(5):77–85. (In Russ.). <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2023-21-5-77-85>

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос этиологии и патогенеза детского аутизма (ДА) остается открытым в современной детской психиатрии. Клинически это расстройство характеризуется манифестацией в возрасте до трех лет, наличием аномалий и задержек в развитии, ограниченным, стереотипным поведением, дефицитом общения и социального взаимодействия. Описанные нарушения сопровождаются наличием неспецифических синдромов: кататонического, тревожно-фобического, психопатоподобного, аффективного, что приводит к трудностям клинической диагностики как внутри расстройств аутистического спектра (РАС), так и в рамках других нозологических групп [1–3].

Существует множество гипотез развития ДА, однако в настоящее время считается, что ключевую роль в развитии ДА играет сочетание двух факторов: генетической предрасположенности и воздействия факторов окружающей среды [4–6]. Выделяют три физиологические и метаболические причины ДА: иммунную дисфункцию, окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию [7–10]. Окислительный стресс влияет на развитие структур головного мозга [11, 12]. Было показано, что у детей с диагнозом ДА окислительный стресс наблюдается не только в клетках мозга, но и в клетках крови [11–13]. В ранее проведенных исследованиях обнаружено, что у пациентов с тяжелой формой ДА значимо повышен уровень активных форм кислорода (АФК) в мононуклеарах периферической крови, в то время как у пациентов с легкой формой ДА наблюдается тенденция к повышению этого показателя, но уровень статистической значимости не достигается. Кроме того, у пациентов с ДА значимо повышен уровень 8-OHdG (маркера окисления ДНК 8-оксогуанозина) в геномной ДНК мононуклеаров периферической крови [14].

Фрагменты молекул ДНК постоянно присутствуют в крови и других биологических жидкостях каждого человека и носят название внеклеточной ДНК (вкДНК). Основным источником вкДНК являются гибнущие клетки [15]. В отличие от ядерной ДНК вкДНК не несет кодирующую функцию как материальный носитель наследственности, но является биологически активной

молекулой, сигнализирующей о массивной гибели или повреждении клеток при травме или инфекции [16–18]. Показано, что концентрация вкДНК в крови значимо повышается у детей с ДА, причем в наибольшей степени у пациентов с тяжелой формой течения ДА [14, 19]. Также обнаружено значительное повышение уровня 8-OHdG (8-оксогуанозина, маркера окисления ДНК) в образцах вкДНК и образцах ядерной ДНК, выделенной из мононуклеаров периферической крови пациентов с более тяжелой формой ДА. У этих пациентов уровень фосфорилированной формы гистона γ H2AX — маркера двуниевых разрывов ДНК — тоже был значительно повышен [14]. При этом ранее было показано, что при депрессивном расстройстве концентрация вкДНК в плазме крови значимо не отличается, а уровень 8-OHdG значимо повышен по сравнению со здоровыми детьми из группы контроля [20, 21]. Окисленная вкДНК при воздействии на мезенхимальные стволовые клетки *in vitro* усиливает образование АФК и повышает уровень поврежденности и окисленности ядерной ДНК клеток [22]. Предполагается, что и в патогенезе ДА фрагменты вкДНК также могут играть роль в развитии окислительного стресса в клетках.

Целью данной работы было изучение влияния фрагментов окисленной вкДНК на образование АФК, окисление и повреждение ядерной ДНК *in vitro* в мононуклеарах периферической крови детей с диагнозом ДА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели были изучены две выборки общим количеством 23 человека. Выборки представлены пациентами с детским аутизмом ($n = 13$, мальчики в возрасте 4–15 лет) и условно здоровыми детьми ($n = 10$, мальчики того же возрастного диапазона). Клиническая группа была сформирована врачами ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», пациенты наблюдались в стационаре. Пробы венозной крови забирались у пациентов при первой госпитализации, до начала фармакологической терапии. В контрольную группу условно здоровых детей вошли учащиеся спортивной школы. Поскольку контрольная группа включала только мальчиков, было решено

обеспечить совпадение по полу и отобрать пациентов только мужского пола. Учитывая известное отклонение в сторону значительно большей доли мальчиков (в 3–4 раза больше, чем девочек) среди детей, страдающих данным заболеванием, мы сочли данное ограничение по полу (отсутствие девочек) некритичным.

Критерии включения: возраст от 4 до 15 лет (включительно); диагноз «Детский аутизм» (F84.02 в МКБ-10).

Критерии невключения: умственная отсталость, обусловленная тяжелыми органическими повреждениями мозга, в том числе у больных с ДЦП; верифицированные генетические аномалии; иные формы ДА, за исключением указанной в критериях включения.

Этические аспекты

Исследование проведено с соблюдением положений Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. по вопросам медицинской этики, пересмотренной в 1975–2013 гг. Родители всех участников подписывали информированное согласие на участие детей в исследовании. Работа получила одобрение Локального этического комитета ФГБНУ

«МГНЦ» (Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, протокол № 6/4 от 15.11.2016).

Ethic approval

This study complies with the Principles of the WMA Helsinki Declaration 1964 amended 1975–2013. The parents of all examined children signed the informed consent to take part their children in a study. This study was approved by the Ethical Committee of FSBSI “Research Centre for Medical Genetics” (protocol # 6/4 from 15.11.2016).

Сформированная выборка пациентов с ДА характеризовалась наличием текущего кататонического ($n = 6, 46\%$) или полиморфного ($n = 7, 53\%$) психотического приступа в рамках основного заболевания. У обследованных наблюдалась персистенция кататонической симптоматики гипер- и гипокинетического типа с проявлениями негативизма, импульсивности, эпизодов «замирания», стереотипных действий, преходящего повышения мышечного тонуса. Указанные расстройства сопровождались психопатоподобными нарушениями в виде агрессии, аутоагрессии, патологии влечений в 69% случаев ($n = 9$), аффективными нарушениями

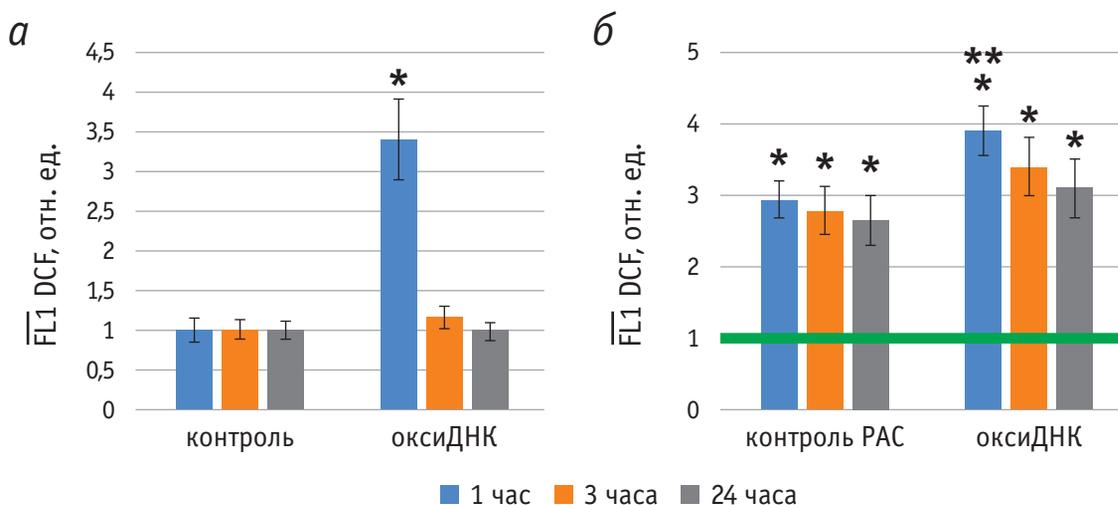


Рис. 1. Уровень АФК (активных форм кислорода) при воздействии окисленных фрагментов ДНК в культурах лимфоцитов здоровых доноров (а) и пациентов с ДА (б). Даны усредненные значения по всем индивидам в соответствующей выборке и доверительный интервал, обозначенный отрезками на вершине каждого столбика: а — уровень АФК в клетках здоровых доноров при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с контролем (необработанными клетками здоровых доноров): * — различия с контролем (необработанными клетками здоровых доноров) достоверны, $p < 0,05$; б — уровень АФК в клетках детей с ДА при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с базовым уровнем — необработанными клетками того же донора: зеленая горизонтальная линия — уровень АФК в мононуклеарах здоровых доноров; * — различия с контролем (интактными мононуклеарами здоровых доноров) достоверны, $p < 0,05$; ** — различия с контролем ДА (интактными мононуклеарами доноров с аутизмом) достоверны, $p < 0,05$

Fig. 1 The level of ROS when exposed to oxidized DNA fragments in lymphocyte cultures of healthy donors (a) and patients with ASD (b): a — the level of reactive oxygen species in cultures of mononuclear cells from healthy donors under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the control: * — differences with control are significant, $p < 0.05$; б — the level of reactive oxygen species in cultures of mononuclear cells of children with ASD under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the control of RAS — intact mononuclear cells of the same donor: the green horizontal line is the level of ROS in the mononuclear cells of healthy donors; * — differences with the control (mononuclear cells of a healthy donor) are significant, $p < 0.05$; ** — differences with RAS control (intact mononuclear cells from the same donor) are significant, $p < 0.05$

в 77% ($n = 10$) в виде плаксивости, раздражительности. У всех обследованных пациентов отмечались нарушения речевого развития, трудности в социализации, проявления когнитивного дизонтогенеза.

Методы исследования: клиничко-психопатологический, молекулярно-биологический, статистический.

ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. *Выделение и культивация мононуклеаров.* Биологическим материалом в исследовании служили 6 мл гепаринизированной периферической крови. Из образцов крови в стерильных условиях выделяли G_0 -мононуклеары методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$) («Панэко», Россия). Полученные клетки культивировали *in vitro* в среде, содержащей раствор Хенкса и 1 ммоль/л NEPES («Fluka») с 10% эмбриональной телячьей сывороткой («Панэко») [23].

2. *Создание модельной окисленной вкДНК.* Для создания модельных фрагментов окисленной вкДНК в пробу геномной ДНК (для всех экспериментов использовали геномную ДНК одного участника контрольной выборки)

добавили перекись водорода 300 мМ и облучили ультрафиолетом ($\lambda = 312 \text{ нм}$), при этом в ходе химической реакции образуются активные формы кислорода, которые окисляют ДНК. Полученную окисленную ДНК добавляли к индивидуальным культурам мононуклеаров (50 нг/мл) и культивировали в течение 1,3 и 24 ч [24].

3. *Исследование уровня γH2AX .* Степень поврежденности ДНК мононуклеаров оценивали по уровню фосфорилированной формы гистона H2AX (γH2AX) в клетке, который определяли методом проточной цитофлуориметрии (Partec CyFlow® ML) с использованием антител к H2AX (γH2AX) [25].

4. *Исследование уровня активных форм кислорода (АФК).* Уровень АФК в мононуклеарах определяли при окрашивании клеток красителем DCFH-DA [26]. Это соединение в присутствии АФК окисляется до DCF (2,7-дихлорфлуоресцеина). Уровень флуоресценции оценивали на проточном цитофлуориметре (Partec CyFlow® ML).

5. *Исследование уровня 8-OHdG.* Содержание 2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в клетках рассчитывали по показателю метода проточной цитофлуориметрии (Partec CyFlow® ML) с использованием антител

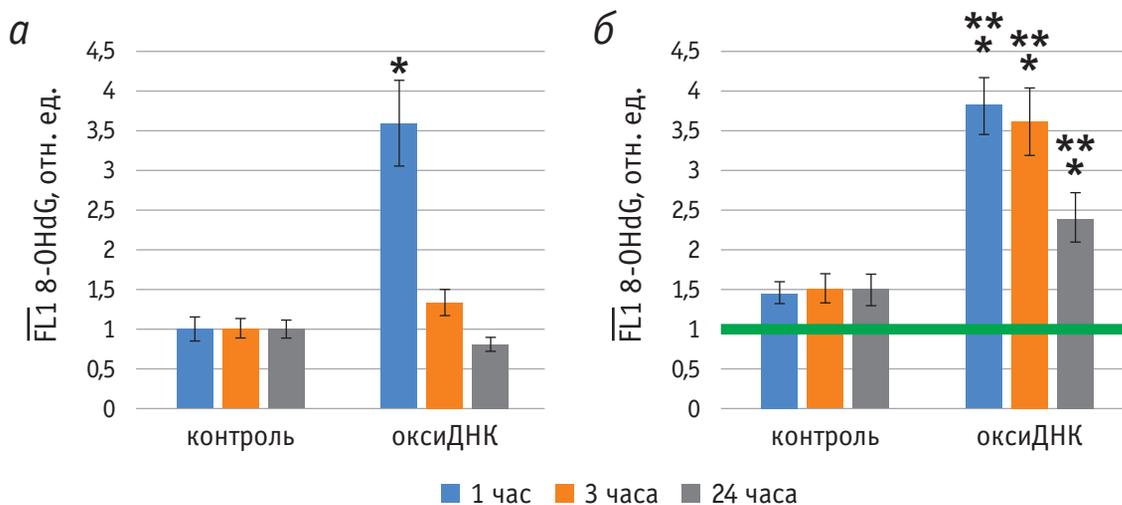


Рис. 2. Уровень 8-OHdG при воздействии окисленных фрагментов ДНК на мононуклеары периферической крови здоровых доноров (а) и пациентов с ДА (б). Даны усредненные значения по всем индивидам в соответствующей выборке и доверительный интервал, обозначенный отрезками на вершине каждого столбика: а — уровень 8-OHdG в культурах мононуклеаров здоровых доноров при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с контролем: * — различия с контролем достоверны, $p < 0,05$; б — уровень 8-OHdG в культурах мононуклеаров детей с ДА при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с контролем ДА — интактными мононуклеарами того же донора: * — различия с контролем (мононуклеарами здорового донора) достоверны, $p < 0,05$; ** — различия по сравнению с контролем (интактные клетки того же пациента с ДА, без воздействия ДНК) достоверны, $p < 0,01$

Fig. 2 The level of 8-OHdG when exposed to oxidized DNA fragments on peripheral blood mononuclear cells of healthy donors (a) and patients with ASD (b): a — the level of 8-OHdG in cultures of mononuclear cells from healthy donors under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the control: * — differences with control are significant, $p < 0.05$; б — the level of 8-OHdG in cultures of mononuclear cells of children with ASD under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the control of RAS — intact mononuclear cells of the same donor: * — differences with the control (mononuclear cells of a healthy donor) are significant, $p < 0.05$; ** — differences compared to individual control (intact MNCs of the same patient with ASD, without DNA exposure) are significant, $p < 0.01$

к 8-OHdG, меченных FITC FITC (sc393871 «SantaCruz», США) [12, 22].

6. *Статистический анализ данных.* Данные обрабатывали в программе InStat GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) с применением U-критерия Манна–Уитни. Нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости $p < 0,05$ или $p < 0,01$ (указано на рисунках).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование влияния окисленных фрагментов ДНК на образование активных форм кислорода (АФК) in vitro в мононуклеарах крови детей с ДА

Мононуклеары детей с ДА и условно здоровых детей реагировали на окисленные модельные фрагменты ДНК по-разному. В культурах клеток условно здоровых детей уровень АФК повышался через час в 3–3,5 раза, а затем снижался через 3–24 ч до уровня интактных клеток (рис. 1, а). Можно предположить, что окисленные фрагменты быстро проникают в мононуклеары здоровых доноров, возможно, путем эндоцитоза [20,

24], и активируют ферменты, синтезирующие АФК. В то время как уровень АФК в мононуклеарах пациентов с ДА при воздействии на них окисленной ДНК в течение 1 ч значимо повышался относительно интактных клеток детей с ДА и в 3,7–4,3 раза по сравнению с интактными клетками условно здоровых доноров, после чего постепенно уменьшался в течение следующих 23 ч, оставаясь значимо выше интактного контроля с ДА и тем более здорового контроля (рис. 1, б).

Изучение воздействия окисленных фрагментов ДНК in vitro на окисление ДНК в мононуклеарах крови детей с ДА

В ходе описанного выше эксперимента *in vitro* оценивали генотоксический эффект модельных фрагментов вДНК в культивируемых мононуклеарах здоровых доноров и доноров с ДА. В мононуклеарах условно здоровых детей после 1 ч воздействия окисленной ДНК уровень 8-OHdG (маркера окислительных повреждений) в ядерной ДНК повысился в 3,5 раза, а после 3–24 ч воздействия снизился до уровня интактных клеток (рис. 2, а). Клетки детей с ДА реагировали на воздействие по-другому. Через 1 ч инкубации

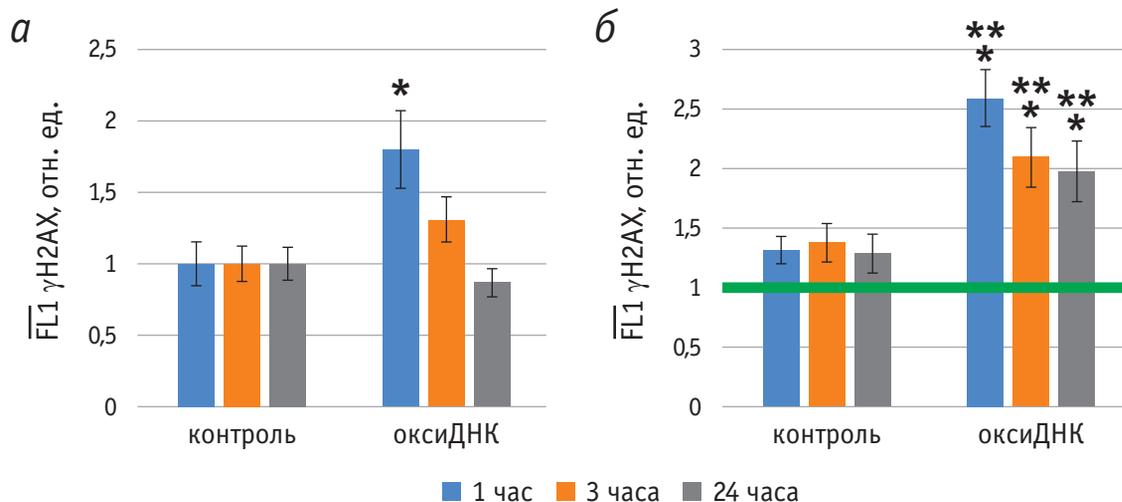


Рис. 3. Уровень двунитевых разрывов при воздействии окисленных фрагментов ДНК на мононуклеары периферической крови здоровых доноров (а) и пациентов с ДА (б) *in vitro*. Даны усредненные значения по всем индивидам в соответствующей выборке и доверительный интервал, обозначенный отрезками на вершине каждого столбика: а — уровень двунитевых разрывов в культурах мононуклеаров здоровых доноров при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с контролем (интактными мононуклеарами здоровых доноров): * — различия с контролем (интактными мононуклеарами здоровых доноров) достоверны, $p < 0,05$; б — уровень двунитевых разрывов в культурах мононуклеаров детей с ДА при действии окисленных фрагментов ДНК (50 нг/мл) по сравнению с контролем ДА — интактными мононуклеарами того же донора: * — различия с контролем (мононуклеарами здорового донора) достоверны, $p < 0,05$; ** — различия с контролем ДА (интактными мононуклеарами того же донора) достоверны, $p < 0,01$

Fig. 3 The level of double-strand breaks when exposed to oxidized DNA fragments on peripheral blood mononuclear cells of healthy donors (a) and patients with ASD (б) *in vitro*: а — the level of double-strand breaks in cultures of mononuclear cells from healthy donors under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the control: * — differences with control are significant, $p < 0.05$; б — the level of double-strand breaks in cultures of mononuclear cells from children with ASD under the action of oxidized DNA fragments (50 ng/ml) compared with the ASD control — intact mononuclear cells from the same donor: * — differences with the control (mononuclear cells of a healthy donor) are significant, $p < 0.05$; ** — differences with RAS control (intact mononuclear cells from the same donor) are significant, $p < 0.01$

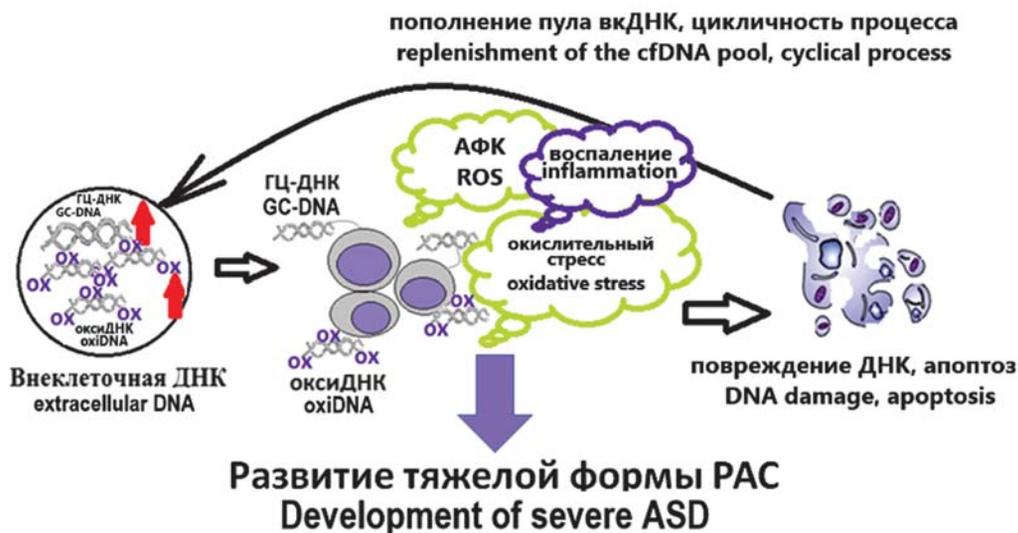


Рис. 4. Предположительный механизм развития тяжелой формы ДА
Fig. 4 The proposed mechanism for the development of a severe form of autism

с окисленными фрагментами ДНК уровень окислительных повреждений ядерной ДНК также повысился в 3,5–3,8 раза по сравнению с контролем, а в течение следующих 23 ч происходило снижение, но незначительное. В итоге уровень маркера окислительных повреждений оставался повышенным в 2–2,5 раза по сравнению со здоровым контролем и в 1,5–2 раза по сравнению с интактными клетками донора с ДА (рис. 2, б).

Исследование воздействия окисленных фрагментов ДНК на повреждение ДНК in vitro в мононуклеарах крови детей с ДА

В ходе экспериментов *in vitro* сравнивали также уровень γ H2AX — маркера двунитевых разрывов ядерной ДНК — в мононуклеарах детей с ДА и условно здоровых доноров под воздействием окисленных фрагментов ДНК. Обнаружено, что и в этом случае мононуклеары реагируют на окисленную ДНК по-разному. В мононуклеарах условно здоровых детей после 1 ч воздействия окисленной ДНК уровень γ H2AX повышался, а после 3–24 ч воздействия снижался до уровня интактных клеток (рис. 3, а). В мононуклеарах периферической крови детей с ДА наблюдался повышенный уровень двунитевых разрывов ДНК, который сохранялся в течение последующих 23 ч (рис. 3, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, окисленные модельные фрагменты ДНК воздействуют на мононуклеары в периферической крови детей с ДА и условно здоровых доноров по-разному. В мононуклеарах условно здоровых доноров в ответ на воздействие фрагментов окисленной ДНК повышаются уровни АФК (активных форм кислорода, т.е. свободных радикалов), окисления ДНК и двунитевых разрывов ДНК, однако в течение следующих 24 ч эти показатели возвращаются к прежнему уровню. В мононуклеарах детей с ДА уровни АФК, окисления ДНК и поврежденности ДНК тоже повышаются,

но последующее понижение происходит медленнее, и уровни этих показателей не возвращаются к прежним значениям. Интерпретация этих результатов позволяет считать ответ клеток здоровых доноров на воздействие вкДНК адаптивным, а клеток детей с ДА — дезадаптивным. Вероятнее всего, причины таких отличий коренятся в генетических или эпигенетических различиях.

Полученные данные подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что окисленная вкДНК принимает участие в патогенезе ДА. Повышение уровня окисленной вкДНК приводит к усилению окислительного стресса в клетках и активации синтеза АФК. Можно предположить, что усиление синтеза АФК увеличивает окисление и повреждение ДНК. Повреждение ядерной ДНК может вызывать апоптоз клеток, погибшие клетки становятся источником новых фрагментов вкДНК в кровотоке, обуславливая цикличность процесса и усиливая симптомы ДА (рис. 4).

Запуск такого патогенетического «замкнутого круга» может быть осуществлен при воздействии какого-либо стресс-фактора, приводящего к разрушению клеток и выбросу вкДНК, включая интеркуррентные заболевания, аллергические реакции, прививки или даже психоэмоциональный стресс [20]. Данная патогенетическая схема полностью соответствует многофакторной гипотезе патогенеза ДА, которая предполагает наложение наследственной предрасположенности и средовых воздействий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Симашкова НВ, Коваль-Зайцев АА, Иванов МВ, Никитина СГ. Диагностические, клинико-психопатологические, патопсихологические аспекты обследования детей с расстройствами аутистического спектра. *Психиатрия*. 2021;19(1):45–53. doi: 10.30629/2618-6667-2021-19-1-45-53

- Simashkova NV, Koval-Zaitsev AA, Ivanov MV, Nikitina SG. Diagnostic, clinical, psychopathological, psychological aspects of the examination of children with autism spectrum disorders. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2021;19(1):45–53. (In Russ.). doi: [10.30629/2618-6667-2021-19-1-45-53](https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-1-45-53)
2. Симашкова НВ, Ключник ТП. Расстройства аутистического спектра. ГЭОТАР-Медиа. 2016:292. Simashkova NV, Klyushnik TP. Autism Spectrum Disorders. GEOTAR-Media. 2016:292. (In Russ.).
 3. Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, Amoakohene E, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, Fitzgerald RT, Furrer SM, Hughes MM, Ladd-Acosta CM, McArthur D, Pas ET, Salinas A, Vehorn A, Williams S, Esler A, Grzybowski A, Hall-Lande J, Nguyen RHN, Pierce K, Zahorodny W, Hudson A, Hallas L, Mancilla KC, Patrick M, Shenouda J, Sidwell K, DiRienzo M, Gutierrez J, Spivey MH, Lopez M, Pettygrove S, Schwenk YD, Washington A, Shaw KA. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR. Surveill. Summ.* 2016;65(3):1–23. doi: [10.15585/mmwr.ss6513a1](https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6513a1) PMID: 30439868 PMCID: PMC6237390.
 4. Ng M, de Montigny JG, Ofner M, Do MT. Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003–2013. *Heal. Promot. chronic Dis. Prev. Canada Res.* 2017;37(1):1–23. doi: [10.24095/hpcdp.37.1.01](https://doi.org/10.24095/hpcdp.37.1.01) PMID: 28102992 PMCID: PMC5480297
 5. Porokhovnik LN, Pisarev VM, Chumachenko AG, Chudakova JM, Ershova ES, Veiko NN, Gorbachevskaya NL, Mamokhina UA, Sorokin AB, Basova AY, Lapshin MS, Izhevskaya VL, Kostyuk SV. Association of NEF2L2 Rs35652124 Polymorphism with Nrf2 Induction and Genotoxic Stress Biomarkers in Autism. *Genes (Basel)*. 2023;14(3):718. doi: [10.3390/genes14030718](https://doi.org/10.3390/genes14030718)
 6. Hodges H, Fealko C, Soares N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr.* 2020;9(S1):S55–S65. doi: [10.21037/tp.2019.09.09](https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09) PMID: 32206584. PMCID: PMC7082249.
 7. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen LA, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether JK, Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(11):1095–102. doi: [10.1001/archgenpsychiatry.2011.76](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76) PMID: 21727249. PMCID: PMC4440679.
 8. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla BB, Bonassi S. Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(10):2128–2141. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011) PMID: 22542447
 9. Yoon SH, Choi J, Lee WJ, Do JT. Genetic and Epigenetic Etiology Underlying Autism Spectrum Disorder. *J Clin Med.* 2020;9(4):966. doi: [10.3390/jcm9040966](https://doi.org/10.3390/jcm9040966) PMID: 32244359 PMCID: PMC7230567
 10. Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):1–14. doi: [10.3390/ijms21093293](https://doi.org/10.3390/ijms21093293) PMID: 32384730 PMCID: PMC7247582
 11. Shmarina GV, Ershova ES, Simashkova NV, Nikitina SG, Chudakova JM, Veiko NN, Porokhovnik LN, Basova AY, Shaposhnikova AF, Pukhalskaya DA, Pisarev VM, Korovina NJ, Gorbachevskaya NL, Dolgikh OA, Bogush M, Kutsev SI, Kostyuk SV. Oxidized cell-free DNA as a stress-signaling factor activating the chronic inflammatory process in patients with autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):212. doi: [10.1186/s12974-020-01881-7](https://doi.org/10.1186/s12974-020-01881-7) PMID: 32677958; PMCID: PMC7364812.
 12. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology.* 2006;13(3):171–181. doi: [10.1016/j.pathophys.2006.05.007](https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.007) PMID: 16766163.
 13. Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res.* 2016;176(1):52–71. doi: [10.1016/j.schres.2015.06.022](https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.06.022) Epub 2015 Nov 15. PMID: 26589391.
 14. Никитина СГ, Ершова ЕС, Чудакова ЮМ, Шмарина ГВ, Вейко НН, Мартынов АВ, Костюк СЭ, Модестов АА, Рожнова ТМ, Ижевская ВЛ, Костюк СВ, Симашкова НВ. Окислительные повреждения ДНК клеток периферической крови и внеклеточной ДНК плазмы крови как показатель тяжести окислительного стресса при расстройствах аутистического спектра и шизофрении у детей. *Психиатрия.* 2021;19(4):15–25. doi: [10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25](https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25)
 15. Nikitina SG, Ershova ES, Chudakova JM, Shmarina GV, Veiko NN, Martynov AV, Kostyuk SE, Modestov AA, Rozhnova TM, Izhevskaya VL, Kostuk SV, Simashkova NV. Oxidative DNA Damage of Peripheral Blood Cells and Blood Plasma Cell-Free DNA as an Indicator of the Oxidative Stress Level in Children with Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2021;19(4):15–25. (In Russ.). doi: [10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25](https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25)
 15. Kostyuk SV, Porokhovnik LN, Ershova ES, Malinovskaya EM, Konkova MS, Kameneva LV, Dolgikh OA, Veiko VP, Pisarev VM, Martynov AV, Sergeeva VA, Kalivanov AA, Filev AD, Chudakova JM, Abramova MS, Kutsev SI, Izhevskaya VL, Veiko NN. Changes of KEAP1/NRF2 and IKB/NF-κB Expression Levels Induced by Cell-Free DNA in Different Cell Types. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018;2018(1052413). doi: [10.1155/2018/1052413](https://doi.org/10.1155/2018/1052413)
 16. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks R. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem.* 2000;46(3):319–323. PMID: 10702517.
 17. Ngan RK, Yip TT, Cheng WW, Chan JK, Cho WC, Ma VW, Wan KK, Au SK, Law CK, Lau WH. Circulating

- Epstein–Barr virus DNA in serum of patients with lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a potential surrogate marker for monitoring disease. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):986–994. PMID: 11948104.
18. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199(8):1177–1185. doi: [10.1086/597476](https://doi.org/10.1086/597476) PMID: 19265479. PMCID: PMC2728622.
 19. El-Ansary A, Cannell JJ, Bjørklund G, Bhat RS, Al Dbass AM, Alfawaz HA, Chirumbolo S, Al-Ayadhi L. In the search for reliable biomarkers for the early diagnosis of autism spectrum disorder: the role of vitamin D. *Metab Brain Dis.* 2018;33:917–931. doi: [10.1007/s11011-018-0199-1](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0199-1). PMID: 29497932.
 20. Filev AD, Shmarina GV, Ershova ES, Veiko NN, Martynov AV, Borzikova MA, Poletkina AA, Dolgikh OA, Veiko VP, Bekker AA, Chirkov AV, Volynshchikov ZN, Deviataikina AS, Shashin DM, Puretskiy VK, Tabakov VJ, Izhevskaya VL, Kutsev SI, Kostyuk SV, Umriukhin PE. Oxidized Cell-Free DNA Role in the Antioxidant Defense Mechanisms under Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019(1245749):1. doi: [10.1155/2019/1245749](https://doi.org/10.1155/2019/1245749)
 21. Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;51:164–175. doi: [10.1016/j.psyneuen.2014.09.025](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.025) PMID: 25462890.
 22. Sergeeva VA, Ershova ES, Veiko NN, Malinovskaya EM, Kalyanov AA, Kameneva LV, Stukalov SV, Dolgikh OA, Konkova MS, Ermakov AV, Veiko VP, Izhevskaya VL, Kutsev SI, Kostyuk SV. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9515809. doi: [10.1155/2017/9515809](https://doi.org/10.1155/2017/9515809) Epub 2017 Aug 22.
 23. Pavlushina SV, Orlova TG, Tabagari DZ. Isolation of mononuclear cells from the bone marrow of patients with hemoblastoses using one-step ficoll-vero-graphin density gradient separation. *Eksp Onkol.* 1984;6(2):68–70. PMID: 6595113.
 24. Kostyuk SV, Tabakov VJ, Chestkov VV, Konkova MS, Glebova KV, Baydakova GV, Ershova ES, Izhevskaya VL, Baranova A, Veiko NN. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2013;747–748:6–18. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2013.04.007](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.04.007) PMID: 23644378
 25. Jacobs KM, Misri S, Meyer B, Raj S, Zobel CL, Sleckman BP, Hallahan DE, Sharma GG. Unique epigenetic influence of H2AX phosphorylation and H3K56 acetylation on normal stem cell radioresponses. *Mol Biol Cell.* 2016;27(8):1332–1345. doi: [10.1091/mbc.E16-01-0017](https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0017) PMID: 26941327 PMCID: PMC4831886.
 26. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(2):227–231. doi: [10.1021/tx00026a012](https://doi.org/10.1021/tx00026a012) PMID: 1322737.
 27. Chestkov IV, Jestkova EM, Ershova ES, Golimbet VG, Lezheiko TV, Kolesina NY, Dolgikh OA, Izhevskaya VL, Kostyuk GP, Kutsev SI, Veiko NN, Kostyuk SV. ROS-Induced DNA Damage Associates with Abundance of Mitochondrial DNA in White Blood Cells of the Untreated Schizophrenic Patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8587475. doi: [10.1155/2018/8587475](https://doi.org/10.1155/2018/8587475) PMID: 29682166. PMCID: PMC5845523.
 28. Melamud MM, Buneva VN, Ermakov EA. Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2023;24:3402. doi: [10.3390/ijms24043402](https://doi.org/10.3390/ijms24043402) PMID: 36834811 PMCID: PMC9963116.

Сведения об авторах

Юлия Михайловна Чудакова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-0299-426X>

julia.chudakova@yandex.ru

Светлана Геннадьевна Никитина, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, отдел детской психиатрии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-7775-1692>

Nikitina.svt@mail.ru

Лев Николаевич Пороховник, кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-3664-6685>

med-gen@mail.ru

Елизавета Сергеевна Ершова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

es-ershova@rambler.ru

Галина Васильевна Шмарина, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0003-4851-8987>

sakmarariver@yahoo.com

Наталья Николаевна Вейко, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0003-1847-0548>

ribgene@rambler.ru

Андрей Владимирович Мартынов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-6697-8306>

avm@med-gen.ru

Елена Евгеньевна Балакирева, кандидат медицинских наук, и.о. заведующей отделом, старший научный сотрудник, отдел детской психиатрии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-3919-7045>

balakirevalena@yandex.ru

Светлана Викторовна Костук, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией, лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-6336-9900>

svet-vk@yandex.ru

Information about the authors

Julia M. Chudakova, Cand. of Sci. (Biol.), Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-0299-426X>

julia.chudakova@yandex.ru

Svetlana G. Nikitina, Cand. of Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Child Psychiatry, FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-7775-1692>

nikitina.svt@mail.ru

Lev N. Porokhovnik, Cand. of Sci. (Biol.), Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-3664-6685>

med-gen@mail.ru

Elizaveta S. Ershova, Cand. of Sci. (Biol.), Assistant Professor, Lead Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

med-gen@mail.ru

Galina V. Shmarina, Cand. of Sci. (Med.), Lead Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0003-4851-8987>

sakmarariver@yahoo.com

Natalia N. Veiko, Dr. of Sci. (Biol.), Chief Scientific Officer, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0003-4851-8987>

ribgene@rambler.ru

Andrey V. Martynov, Cand. of Sci. (Biol.), Senior Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-6697-8306>

avm@med-gen.ru

Elena E. Balakireva, Cand. of Sci. (Med.), Senior Researcher, Acting Head of the Department, Department of Child Psychiatry, FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-3919-7045>

balakirevalena@yandex.ru

Svetlana V. Kostuk, Dr. of Sci. (Biol.), Head of Laboratory, the Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-6336-9900>

svet-vk@yandex.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interests.

Дата поступления 27.05.2023 Received 27.05.2023	Дата рецензии 15.08.2023 Revised 15.08.2023	Дата принятия 05.09.2023 Accepted for publication 05.09.2023
--	--	---