

Окислительные повреждения ДНК клеток периферической крови и внеклеточной ДНК плазмы крови как показатель тяжести окислительного стресса при расстройствах аутистического спектра и шизофрении у детей

С.Г. Никитина¹, Е.С. Ершова^{2,3}, Ю.М. Чудакова², Г.В. Шмарина², Н.Н. Вейко², А.В. Мартынов², С.Э. Костюк², А.А. Модестов⁴, Т.М. Рожнова⁴, В.Л. Ижевская², С.В. Костюк^{2,3}, Н.В. Симашкова¹

¹Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

³Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Авторы для корреспонденции: Светлана Викторовна Костюк, svet-vk@yandex.ru; Наталья Валентиновна Симашкова, simashkovanv@mail.ru

Резюме

Обоснование: неоднородность и сложность патогена являются основными препятствиями для дифференциальной диагностики шизофрении и расстройств аутистического спектра (РАС) у детей. Роль окислительного стресса в молекулярных механизмах патогенеза шизофрении и аутизма не вызывает сомнений. Свободные радикалы, накапливающиеся при развитии стресса, могут вызывать окислительные модификации и образование разрывов внеклеточной ДНК (вкДНК) и ядерной ДНК клеток крови. На сегодняшний день доказано, что 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) можно рассматривать как биомаркер окислительного стресса. Однако до сих пор неясно, насколько выражены генотоксические последствия окислительного стресса при РАС разной степени тяжести и при шизофрении у детей (ШД). **Цель исследования:** изучение связи уровня окислительных повреждений ДНК в клетках периферической крови и характеристик циркулирующей вкДНК с ШД и тяжестью течения РАС у детей. **Пациенты и методы:** образцы крови 96 пациентов, больных детским аутизмом (ДА — F84.0 по МКБ-10), атипичным аутизмом (АА — F84.1 по МКБ-10) и шизофренией с началом в детском возрасте (ШД — F20.8 по МКБ-10), были получены из отдела детской психиатрии ФГБНУ НЦПЗ. Образцы крови группы контроля (34 чел.) взяты из коллекции образцов МГНЦ. Отбор больных проводился с использованием клинко-психопатологического метода. Выделение вкДНК проводили методом экстракции органическими растворителями. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли флуориметрически. Уровень 8-OHdG в составе вкДНК определяли по связыванию соответствующих антител на мембранных фильтрах, эндонуклеазную активность определяли методом радиальной диффузии в геле. G0-лимфоциты периферической крови выделяли методом градиентного центрифугирования. Уровень 8-OHdG и уровень фосфорилированной формы гистона H2AX (γH2AX) в G0-лимфоцитах периферической крови анализировали в фиксированных клетках методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител. Статистическую обработку проводили с использованием программ Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. **Результаты и заключение:** окислительный стресс имеет разную выраженность при РАС, протекающих в тяжелой форме (АА) и легкой/средней форме (ДА). При ДА уровень окислительных повреждений ДНК лимфоцитов имеет тенденцию к повышению, но не достигает уровня достоверности; уровень окислительных повреждений внеклеточной ДНК не отличается от контроля. При АА и еще в более сильной степени при ШД уровень окислительных повреждений ДНК клеток и внеклеточной ДНК значительно повышен, что свидетельствует о развитии системного окислительного стресса, который не компенсируется антиокислительной системой организма. Уровень 8-OHdG в составе вкДНК и ДНК ядер клеток периферической крови может являться маркером окислительного стресса, что важно не только для диагностики тяжести течения патологического процесса, но и для разработки схем терапии ШД и РАС у детей.

Ключевые слова: РАС, детский аутизм, атипичный аутизм, шизофрения у детей, окислительный стресс, окислительные повреждения ДНК

Для цитирования: Никитина С.Г., Ершова Е.С., Чудакова Ю.М., Шмарина Г.В., Вейко Н.Н., Мартынов А.В., Костюк С.Э., Модестов А.А., Рожнова Т.М., Ижевская В.Л., Костюк С.В., Симашкова Н.В. 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. <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25>

Исследование окислительного стресса при шизофрении было поддержано Российским научным фондом (проект 18-15-00437, продолжение), исследование окислительного стресса при аутизме поддержано государственным заданием Министерства науки и высшего образования.

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

S.G. Nikitina¹, E.S. Ershova^{2,3}, Ju.M. Chudakova², G.V. Shmarina², N.N. Veiko², A.V. Martynov², S.E. Kostuk², A.A. Modestov⁴, T.M. Rozhnova⁴, V.L. Izhevskaya², S.V. Kostuk^{2,3}, N.V. Simashkova¹

¹Mental Health Research Center, Moscow, Russia

²Research Centre For Medical Genetics, Moscow, Russia

³Federal Scientific and Clinical Center of Reanimatology and Rehabilitation, Moscow, Russia

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Corresponding authors: Svetlana V. Kostuk, svet-vk@yandex.ru; Nataliya V. Simashkova, simashkovanv@mail.ru

Summary

Background: pathogen heterogeneity and complexity are the main obstacles for schizophrenia and autism spectrum disorders (ASD) differential diagnosis in children. The role of oxidative stress in the molecular mechanisms of schizophrenia and autism pathogenesis is beyond doubt. Free radicals that accumulate during stress can cause oxidative modifications and the formation of breaks in the cell-free DNA (cfDNA) and nuclear DNA of blood cells. To date, it has been proven that 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) can be considered as an oxidative stress biomarker. However, it is still unclear how pronounced the genotoxic consequences of oxidative stress are in ASD of varying severity and in childhood onset schizophrenia (COS). **Objective:** to study the relationship between the oxidative DNA damage level in peripheral blood cells and the circulating cell-free DNA characteristics with the severity of COS and the course of ASD in children. **Patients and methods:** blood samples of 96 patients with childhood autism (CA — F84.0 according to ICD-10), atypical autism (AA — F84.1 according to ICD-10) and with childhood onset schizophrenia (COS — F20.8 according to ICD-10) were obtained from the Child Psychiatry Department of the Mental health research center. Blood samples of the control group (34 people) — from the collection of samples of the Research Centre for medical Genetics. The selection of patients was carried out using the clinical and psychopathological method. Cell-free DNA was isolated by extraction with organic solvents. The concentration of cfDNA was determined fluorimetrically. The level of 8-OHdG in cell-free DNA was determined by binding of the corresponding antibodies on membrane filters, endonuclease activity was determined by radial diffusion in a gel. G0-peripheral blood lymphocytes were isolated by gradient centrifugation. The level of 8-OHdG and the level of the phosphorylated form of histone H2AX (γH2AX) in G0-peripheral blood lymphocytes were analyzed in fixed cells by flow cytofluorometry using appropriate antibodies. Statistical processing was carried out using Microsoft Office Excel, Statistica 6.0, StatGraph. **Results and conclusions:** oxidative stress has different severity in ASD, occurring in severe form (AA) and mild/moderate form (CA). In CA, the level of oxidative damage to the DNA of lymphocytes tends to increase, but does not reach statistically significant level; the level of oxidative damage to cfDNA does not differ from the control. In AA and, to an even stronger extent, in COS, the level of oxidative damage to the DNA of cells and cfDNA is significantly increased, which indicates the development of systemic oxidative stress, which is not compensated by the body's antioxidant system. The level of 8-OHdG in the composition of the cfDNA and DNA of the nuclei of peripheral blood cells can be a marker of oxidative stress, which is important not only for diagnosing the severity of the pathological process, but also for treatment regimens development for COS and ASD in children.

Keywords: ASD, childhood autism, atypical autism, childhood onset schizophrenia, oxidative stress, oxidative DNA damage

For citation: Nikitina S.G., Ershova E.S., Chudakova Ju.M., Shmarina G.V., Veiko N.N., Martynov A.V., Kostuk S.E., Modestov A.A., Rozhnova T.M., Izhevskaya V.L., Kostuk S.V., Simashkova N.V. 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. <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-4-15-25>

ВВЕДЕНИЕ

В основе этиологии шизофрении и расстройств аутистического спектра (РАС) лежат множественные комбинации генетических факторов и факторов окружающей среды [1–7]. Наряду с изучением генетической составляющей психических заболеваний биологи и клиницисты в настоящее время все больше внимания уделяют анализу патофизиологических изменений, наблюдаемых при шизофрении и РАС, что способствует дифференциальной диагностике психических расстройств и пониманию их этиологии и патогенеза [3, 4, 6].

Окислительный стресс сопровождает течение многих заболеваний, включая рак, сердечно-сосудистые

заболевания и нейродегенеративные расстройства [5]. Неспецифическая природа окислительного стресса вызвала незначительный интерес исследователей-психиатров к работам в этой области. Однако технические достижения последних десятилетий, включая прогресс в клеточной биологии, позволяющий *in vitro* перепрограммировать клетки в нейроны, достижения молекулярной биологии в понимании ключевых биологических механизмов, лежащих в основе окислительного стресса, развитие инструментальных методов визуализации и диагностики головного мозга, привели к возрастающему вниманию исследователей к роли окислительного стресса в патогенезе шизофрении и аутизма [7–9]. Окислительный стресс возникает в результате дисбаланса между избыточным синтезом активных

форм кислорода (АФК) и дефицитом антиоксидантов [7, 8]. Когда этот гомеостаз нарушается, окислительный стресс повреждает клеточные структуры, основными мишенями окислительного стресса являются белки, липиды и ДНК [9]. Окислительный стресс, вероятно, может увеличивать риск развития психоза в кризовые «уязвимые» периоды онтогенеза, «физиологического апоптоза» [10] и влиять на развитие структур головного мозга, приводя к более тяжелому клиническому фенотипу [11]. У пациентов с шизофренией и РАС отмечаются признаки окислительного стресса не только в мозге пациентов, но и системно — в периферической крови [11, 12]. Таким образом, маркеры окислительного стресса могут не только свидетельствовать о тяжести течения психических расстройств в континууме РАС и ШД [13], но и представлять собой биомаркеры для определения стратегий лечения пациентов с психозами: инфантильным психозом (ИП) при ДА; атипичным детским психозом (АДП) при АА и ШД.

Однако до сих пор ведутся дискуссии о связи окислительного стресса, регистрируемого в периферической крови, с тяжестью течения РАС и шизофрении, особенно с манифестацией в раннем детском возрасте.

Целью настоящего исследования является изучение связи уровня окислительных повреждений ДНК в клетках периферической крови и характеристик циркулирующей внеклеточной ДНК с шизофренией и тяжестью течения РАС у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

1.1. Дизайн исследования

Образцы периферической крови для исследования были получены у детей, больных РАС разной степени тяжести ($n = 58$) и шизофренией ($n = 38$). Отбор больных проводился в отделе детской психиатрии (руководитель д.м.н., профессор Н.В. Симашкова) НЦПЗ (директор д.м.н., профессор Т.П. Ключник) с использованием клинко-психопатологического метода, включавшего наблюдение за ребенком в различных ситуациях с психопатологической оценкой поведения, эмоциональных и когнитивных проявлений, особенностей социального функционирования, дополненных материалами медицинской документации (карты амбулаторных исследований, предоставляемые родителями). Из образцов крови были выделены мононуклеары, в которых проанализировали показатели окислительного стресса — уровень активных форм кислорода, уровень окислительных повреждений ДНК и двунитевых разрывов ДНК — по сравнению с аналогичными показателями в контрольной выборке здоровых детей соответствующего возраста ($n = 34$). Клетки с высоким уровнем повреждений гибнут, пополняя пул циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК). В плазме периферической крови пациентов, больных РАС и ШД, определили концентрацию вкДНК и уровень окисления вкДНК. Определяемые показатели окислительного повреждения ДНК клеток и вкДНК проанализировали

в подгруппах с разной степенью тяжести течения психотических расстройств.

1.2. Этическая экспертиза

Родители каждого ребенка подписывали информированное согласие на отбор венозной крови (6 мл) и проведение научно-исследовательских экспериментов с биоматериалом, взятым у ребенка. Работа получила одобрение Локального этического комитета ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 6/4 от 15.11.2016).

1.3. Пациенты, психометрические шкалы, критерии включения/исключения

Исследуемая выборка включала 96 больных ДА, АА, ШД, охарактеризованных на основе клинических критериев МКБ-10 [1], DSM-5 [2], а также здоровых доноров (34 чел.) соответствующего возраста. В исследовании принимали участие пациенты в возрасте 4–12 лет. Психометрическая оценка пациентов с РАС осуществлялась с использованием рейтинговой шкалы детского аутизма (Childhood Autism Rating Scale, CARS) [14], основанной на текущей регистрации поведения обследуемого. Больные шизофренией дети оценивались по шкале PANSS [15], состоящей из перечня 33 симптомов, оцениваемых по семи степеням тяжести, и отражающей выраженность продуктивных, негативных и неспецифических расстройств по соответствующим подшкалам. Оценивалась выраженность кататонических расстройств как общих для двух нозологий по шкале кататонии Буша–Фрэнсиса (Bush–Francis Catatonia Rating Scale, BFCRS) [16].

Динамика развития оценивалась в том числе с помощью детского варианта шкалы личного и социального функционирования (Personal and social performance scale, PSP) [17] для определения способности пациентов адекватно регулировать свою деятельность в четырех основных областях.

Критерии включения:

- больные ДА, инфантильным психозом;
- больные АА, атипичным детским психозом (АДП);
- больные ШД с началом в раннем детском возрасте.

Критерии исключения:

- больные с синдромальными формами АА (врожденные дефекты обмена веществ, хромосомные аномалии);
- прогрессирующие дегенеративные заболевания.

1.4. Клинический анализ в подгруппах

Выборка детей с аутизмом была разбита на две группы по тяжести течения заболевания.

В I группу вошли пациенты с диагнозом ДА, «инфантильный психоз» (F84.0) со слабо- и средне выраженными проявлениями аутизма и тенденцией к компенсации состояния (30 человек). Расстройства кататонического регистра ярко проявлялись в разгаре заболевания, носили по большей части гиперкинетический характер с выраженным моторным возбуждением, негативизмом, клишированным стереотипным поведением и двигательными стереотипиями. В период психоза останавливалось развитие речи. На этапе ремиссии

симптомы РАС смягчались, преобладали гиперкинетические расстройства с дефицитом произвольного внимания и психопатоподобными проявлениями. Активно развивались эмоциональные реакции на окружение, сопровождавшиеся мимической, жестовой и речевой продукцией. Обращала на себя внимание общая моторная неловкость, нарушение соразмерности крупных движений, трудности в усвоении навыков, требующих развития мелкой моторики пальцев.

II группу составила выборка больных с диагнозом «атипичный детский психоз» (АДП) в рамках АА (F84.1), у которых преобладало выраженное расстройство контакта, речи и эмоций, сопровождавшееся «тяжелой» кататонией (28 человек). Манифестный приступ с полиморфной (преимущественно кататонической и психопатоподобной симптоматикой) развивался на фоне аутистического дизонтогенеза в кризовых периодах развития 1,5 и 3 лет. В клинической картине психоза значительную часть симптоматики представляло двигательное хаотичное возбуждение, в части наблюдений сменяющееся эпизодами кататонического ступора. Двигательные стереотипии, возникающие в результате перераздражения подкорковых структур, подавляли целенаправленные движения, обусловленные активностью префронтальной коры головного мозга. Продолжительность манифестных состояний составляла не менее трех лет. Регистрируемые ремиссии, как правило, были терапевтическими, низкого качества, с сохраняющейся стертой симптоматикой первого приступа, стереотипными движениями и выраженным когнитивным снижением. Речевая активность восстанавливалась медленно, частично. В кризовые периоды развития (7 и 12–13 лет) возникали повторные психотические приступы с развернутой кататонической, психопатоподобной, аффективной симптоматикой. Сохранялись выраженные когнитивные нарушения вплоть до интеллектуальной недостаточности. По шкале социального функционирования больные соответствовали II уровню социальной дезадаптации.

Выборку детей, больных шизофренией с началом в раннем детском возрасте, злокачественным непрерывным течением (F20.8), составили 38 пациентов. Заболевание характеризовалось бурной манифестацией кататонно-регрессивных приступов в возрасте 1,5 и 3 лет. Яркой его особенностью было быстрое формирование негативных изменений: «нажитого» аутизма, астении, редукции или снижения энергетического потенциала, эмоционального оскудения, регресса речи, моторики, навыков опрятности. Олигофреноподобный дефект формировался уже в манифестном периоде болезни и не преодолевался в течение жизни. Речь не развивалась у половины пациентов. Прогноз был неблагоприятным. Около трети больных проявляли резистентность к нейролептической терапии. Обострение кататонической симптоматики прослеживалось в кризах 7, 11–12 лет. Пациенты нуждались в постоянной опеке и уходе, длительном (пожизненном) приеме психотерапии, которая повышала качество жизни.

По шкале социального функционирования больные соответствовали III уровню дезадаптации.

Контрольная группа детского возраста (34 человека) сформирована из здоровых детей того же возрастного диапазона, что и пациенты клинической группы. Всем детям контрольной группы проводили визуальный анализ ЭЭГ экспертного уровня и сравнительное ЭЭГ-картирование мозга для исключения любых патологических субклинических состояний.

1.5. Биохимические методы исследования

1.5.1. Выделение внеклеточной ДНК (вкДНК) и определение концентрации вкДНК

Выделение вкДНК из плазмы периферической крови доноров проводилось стандартным методом экстракции органическими растворителями [18, 24]. Концентрацию вкДНК в плазме крови определяли методом флуоресценции с ДНК-интеркалирующим красителем PicoGreen (Invitrogen) на планшетном спектрофотометре-флуориметре EnSpire (PerkinElmer). Для исключения влияния возможных примесей на флуоресценцию вкДНК в комплексе с красителем флуоресценцию также определяли и после исчерпывающего гидролиза вкДНК ДНКазой 1. Относительная стандартная ошибка исследования концентрации вкДНК в плазме определяется в основном процедурой выделения ДНК и составляет $12 \pm 5\%$ от измеряемой величины.

1.5.2. Исследование уровня содержания во вкДНК маркера окисления: 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG)

Уровень 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в составе вкДНК определяли методом дот-иммуноблоттинга по разработанному авторами протоколу [11]. Для этого пробы ДНК известной концентрации наносили на нитроцеллюлозный фильтр (HybondExtraC, «Amersham»), по 1,5 мкл в 3–5 повторах. После иммобилизации ДНК (30 мин при 80 °C) фильтр смачивали PBS и 30 мин инкубировали в блокирующем буфере (0,5% сухое обезжиренное молоко на PBS) при 37 °C, затем 3 ч при комнатной температуре при покачивании в свежеприготовленном растворе анти-8-OHdG антител (SC-66036, SantaCruz, США), в подобранном разведении 15 мкл на 1 мл блокирующего буфера. Фильтр трижды по 5 мин отмывали буфером PBS-0,05%TWEEN20 и инкубировали 1 ч в свежеприготовленном растворе конъюгата анти-мышь-щелочная фосфатаза (Sc-2008, SantaCruz, США) в рекомендованном производителем разведении 1:1000 на PBS-0,05%TWEEN) при комнатной температуре при покачивании. Затем фильтр дважды по 5 мин промывали PBS-0,05%TWEEN20, однократно AP pH 9,5 (0,05M ТРИС pH 9,5, 0,2M NaCl), помещали в раствор субстрата для щелочной фосфатазы (BCIP-NBT) и инкубировали в темноте до проявления отчетливых сигналов. Интенсивность окрашенных пятен определяли компьютерным анализом изображения фильтра. В качестве стандартного образца для построения калибровочной зависимости, связывающей содержание окисленного основания 8-OHdG в составе исследуемой ДНК и сигнала иммуноблоттинга, использовали набор

образцов ДНК, предварительно охарактеризованных масс-спектрометрически и окисленных под воздействием ультрафиолета.

1.5.3. Определение количества активных форм кислорода

Уровень активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) («Molecular Probes/Invitrogen», США), который под действием АФК окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF) [26]. Краситель добавляли к клеткам, инкубировали 10 мин, клетки осаждались, анализ проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, «ПанЭко», Россия). Детектировали методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CyFlow® (Sysmex Partec GmbH, Германия).

1.5.4. Выделение G0-лимфоцитов периферической крови

G0-лимфоциты выделяли в системе фиколл–урографин из периферической крови (гепаринизированной) здоровых доноров [11, 18].

1.5.5. Определение двухцепочечных разрывов ДНК ядер клеток

Метод определения двухцепочечных разрывов ДНК ядер клеток с помощью антител к фосфорилированной форме гистона H2AX (γ H2AX) осуществляли по стандартному протоколу, который основан на том, что высококонсервативный гистоновый белок, участвующий в упаковке ДНК хроматина (H2AX), фосфорилируется по остатку серина 139 в сайте образования разрыва ДНК [26]. Клетки фиксировали 3,7% формальдегидом («ХимМед», Россия) 10 мин при 37 °С, пермеабилizовали 0,2% раствором Тритон X-100 («Merck», Германия) 10 мин при комнатной температуре и инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами DyLight488- γ H2AX (pSer139) (nb100-78356G NovusBio, USA) 2 ч при 24 °С. Детектировали методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CyFlow® (Sysmex Partec GmbH, Германия).

5.5.6. Определение маркера окисления: 8-гидроксисин-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в клетках

Для диагностики уровня маркера окисления — 8-гидроксисин-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) — клетки фиксировали 2% параформальдегидом («ХимМед», Россия) 15 мин, 25 °С, пермеабилizовали 1% раствором Тритона X100 («Merck», Германия), инкубировали с антителами к 8-OHdG, мечеными FITC (sc393871 «SantaCruz», США), 2 ч при температуре 24 °С, 8-гидроксисин-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) в ДНК клеток определяли с использованием метода проточной цитофлуориметрии на приборе CyFlow® (Sysmex Partec GmbH, Германия) [11, 18, 26].

1.6. Статистический анализ

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. При анализе предполагаемых различий между выборками исходили из нуль-гипотезы об отсутствии различий, которую проверяли с помощью

расчета U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При физиологических условиях активные формы кислорода (АФК) регулируют клеточный цикл, активность протеинкиназ и генную экспрессию. Увеличение синтеза АФК приводит к развитию окислительного стресса и патологии [18–20]. Определяли уровень АФК в выделенных G0-лимфоцитах периферической крови исследуемых подгрупп пациентов. Для определения внутриклеточного уровня АФК использовали реагент — H2DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate или 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат), который применяется для определения АФК в клетках [19, 21]. Этот краситель быстро проникает через мембрану клеток и подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами [21]. В цитозоле нефлуоресцирующий дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH) считается чувствительным внутриклеточным маркером окислительного стресса при его окислении до дихлорфлуоресцеина (DCF) различными радикалами АФК [21]. В ряде работ было показано, что окисление DCFH неспецифично и появление сигнала DCF в клетках отражает общий уровень АФК [21, 22]. Инкубация клеток с H2DCFH-DA приводит к возникновению в клетках флуоресцентного сигнала. Метод флуоресцентной микроскопии позволяет проанализировать локализацию в клетках сигналов, отражающих синтез АФК. Метод проточной цитометрии определяет среднее количество АФК в клетке [21]. Мы проанализировали уровень АФК в выделенных G0-лимфоцитах периферической крови в трех выборках детей с патологией: в группе 1 — легкая и средняя форма течения РАС (ДА по МКБ-10); в группе 2 — тяжелая форма течения РАС (АА по МКБ-10); в группе 3 — ШД и в контрольной группе — здоровых детей (рис. 1).

Показали, что в лимфоцитах периферической крови детей группы 1 (ДА) уровень активных форм кислорода был на 30–40% выше, чем в лимфоцитах детей из контрольной группы, что свидетельствует о наличии компенсируемого окислительного стресса у этих детей. В группе 2 (АА) уровень активных форм кислорода был в 2,2–2,5 раза выше ($p < 0,01$), чем в лимфоцитах детей из контрольной группы, а в группе 3 (у детей с диагнозом ШД) уровень активных форм кислорода в 3–3,3 раза выше ($p < 0,01$), чем в лимфоцитах детей из контрольной группы (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о наличии ярко выраженного окислительного стресса у детей с тяжелым АА и ШД.

Предположили, что интенсивный синтез АФК в клетках крови может вызывать окисление и повреждение ДНК ядер клеток. В условиях окислительного стресса в той или иной степени способны окисляться все основания ДНК [19, 21, 22]. Основными продуктами окисления клеточной ДНК являются тимидингликоль и 8-гидроксисин-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG), который

является широко используемым маркером для определения окислительных повреждений ДНК [22].

Оценили уровень 8-OHdG в лимфоцитах периферической крови у детей с РАС, у детей с шизофренией и у здоровых детей. Этот показатель анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В лимфоцитах крови пациентов из группы 1 ДА медиана уровня 8-OHdG была недостоверно выше этого показателя для детей из контрольной выборки (рис. 2А). Однако уровень 8-OHdG в лимфоцитах крови пациентов из 2-й группы АА был в два раза выше, чем в контрольной выборке ($p < 0,01$, рис. 2А). Уровень 8-OHdG в лимфоцитах крови пациентов из 3-й группы с ШД был в 2,8–3 раза выше ($p < 0,01$), чем у детей из контрольной выборки ($p < 0,01$, рис. 2А).

Активные формы кислорода вызывают окислительную модификацию оснований ДНК в ядре, что приводит к повреждению хроматина и образованию одно- и двунитевых разрывов [19, 23]. Уровень повреждения ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови детей с РАС, с диагнозом ШД и здоровых детей из контрольной выборки оценивали по уровню фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX) методом проточной цитофлуориметрии. Фосфорилирование гистонов H2A по Ser139 происходит в ответ на двунитевые разрывы ДНК (DSB), и метод гамма-фокусов используется для оценки уровня двунитевых разрывов ДНК ядер клеток. В лимфоцитах крови пациентов из группы 1 ДА медиана уровня γ H2AX в ядрах лимфоцитов была недостоверно выше этого показателя для детей из контрольной выборки (рис. 2Б). Уровень γ H2AX в ядрах лимфоцитов крови пациентов из 2-й группы АА был в два раза выше,

чем в контрольной выборке ($p < 0,01$, рис. 2Б). Уровень 8-OHdG в лимфоцитах крови пациентов из 3-й группы ШД был в 2,6–2,9 раза выше ($p < 0,01$), чем у детей из контрольной выборки ($p < 0,01$, рис. 2Б).

Таким образом, было показано, что при тяжелой степени аутизма (АА по МКБ-10), так же как и при шизофрении в детском возрасте, окислительный стресс имеет генотоксичный эффект, что проявляется в накоплении одно- и двухцепочечных разрывов в ядрах клеток периферической крови. При ДА окислительный стресс значительно менее выражен, чем при АА и ШД. Иными словами, при тяжелом течении аутизма, так же как и при ШД, происходит накопление окислительных повреждений в моноклеарах периферической крови. Подобные нарушения наблюдали на выборке взрослых больных шизофренией [18].

В условиях окислительного стресса клетки с высоким уровнем окислительных нерепарируемых повреждений ДНК гибнут, пополняя пул внеклеточной ДНК (вкДНК) фрагментами окисленной вкДНК [23]. Исследовали концентрацию внеклеточной ДНК и уровень окисленных оснований в составе вкДНК плазмы крови детей с диагнозом РАС, детской шизофренией и здоровых детей. На рис. 3А представлены результаты измерения концентрации вкДНК в образцах плазмы пациентов с РАС, шизофренией в детском возрасте и здоровых детей из контрольной выборки. Обнаружили статистически значимое повышение уровня вкДНК в плазме в группах 1 (ДА), 2 (АА) и группе 3 (ШД) по сравнению со здоровыми детьми из контрольной группы ($p < 0,001$, рис. 3А); кроме того, статистически значимое различие было достигнуто и при сравнении значений концентрации в группе 1 и в группе 2 ($p < 0,01$), а также в группе 1 и группе 3 ($p < 0,01$). Во 2-й группе АА (тяжелая форма РАС) среднее значение концентрации вкДНК было приблизительно в 3,5 раза выше, чем тот же показатель у здоровых людей ($p < 0,001$), в группе 3 ШД значение концентрации вкДНК было приблизительно в 3,2 раза выше, чем тот же показатель у здоровых людей ($p < 0,001$). Вероятно, более низкие значения концентрации в выборке детей, больных шизофренией, по сравнению с выборкой детей с тяжелой степенью аутизма обусловлены более высокой активностью компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока на фоне повышенного уровня повреждения ДНК лимфоцитов крови и накоплением в циркуляции устойчивых к нуклеазному гидролизу фрагментов внеклеточной ДНК [23, 24]. У пациентов группы 1 (легкая и средняя тяжесть РАС) увеличение концентрации вкДНК по сравнению с нормальным исходным уровнем было менее выраженным ($p = 0,0096$).

Как мы уже отмечали, в условиях окислительного стресса способны окисляться все основания внеклеточной циркулирующей ДНК, но наиболее быстро и эффективно окисляется гуанозин, продуктом окисления которого становится 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) [22, 23]. Определили уровень 8-OHdG в составе вкДНК детей, больных аутизмом

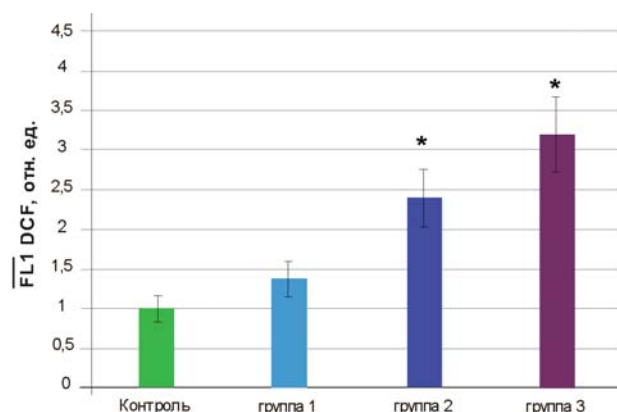


Рис. 1. Уровень активных форм кислорода в лимфоцитах периферической крови детей с диагнозом РАС, детской шизофрении и здоровых детей

Контроль — контрольная группа здоровых детей; группа 1 — с ДА; группа 2 — с АА; группа 3 — с ШД; * различия с контрольной группой достоверны, $p < 0,01$

Fig. 1. The level of reactive oxygen species in peripheral blood lymphocytes of children diagnosed with ASD, childhood-onset schizophrenia and healthy children
Control — a control group of healthy children; group 1 — CA; group 2 — AA; group 3 — COS; * differences with the control group are significant, $p < 0.01$

и шизофренией. Анализ содержания маркера окисления вкДНК — 8-OHdG — в образцах проводился методом дот-блот-гибридизации на фильтрах. Количество 8-OHdG в составе вкДНК повышается в 3,3–3,7 раза ($p < 0,01$) в группе 3, пациентов с ШД, и в 2,5–3 раза ($p < 0,01$) в группе 2, пациентов с АА (с тяжелым течением РАС); в группе 1, пациентов с ДА (легкой и средним течением РАС), различий с контролем не наблюдается (рис. 3 Б).

Основная причина обогащения вкДНК маркером окисления 8-OHdG — это преимущественная гибель

клеток с высоким уровнем окисления клеточной ДНК и увеличение содержания ГЦ-богатых последовательностей в составе вкДНК по сравнению с ядерной ДНК [23]. Также в окисленную фракцию вкДНК вносит вклад митохондриальная ДНК с повышенным содержанием 8-OHdG [21]. Повышение содержания 8-OHdG в составе вкДНК может свидетельствовать об окислительном стрессе в организме.

И шизофрения, и РАС рассматриваются как сложные и неоднородные психические расстройства в континууме РАС и шизофрении с началом в детском возрасте

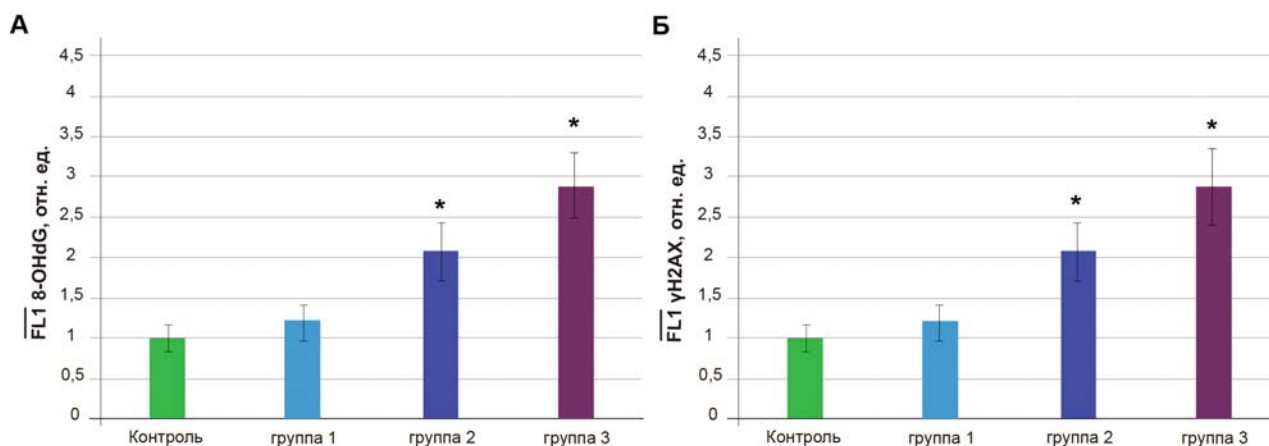


Рис. 2. Уровень 8-OHdG в лимфоцитах (А) и уровень γ H2AX в ядрах лимфоцитов (Б) периферической крови детей с ДА, АА, ШД и здоровых детей

Контроль — контрольная группа здоровых детей; группа 1 — ДА; группа 2 — АА; группа 3 — ШД; * различия с контрольной группой достоверны, $p < 0,01$. Тест Краскела–Уоллиса показал достоверное различие между анализируемыми группами (для А и Б), $p < 0,01$

Fig. 2. The level of 8-OHdG in lymphocytes (A) and the level of γ H2AX in the nuclei of lymphocytes (B) in the peripheral blood of children with CA, AA, COS and healthy children

Control — control group of healthy children; group 1 — CA; group 2 — AA; group 3 — COS; * differences with the control group are significant, $p < 0.01$. The Kruskal–Wallis test showed a significant difference between the analyzed samples (for A and B), $p < 0.01$

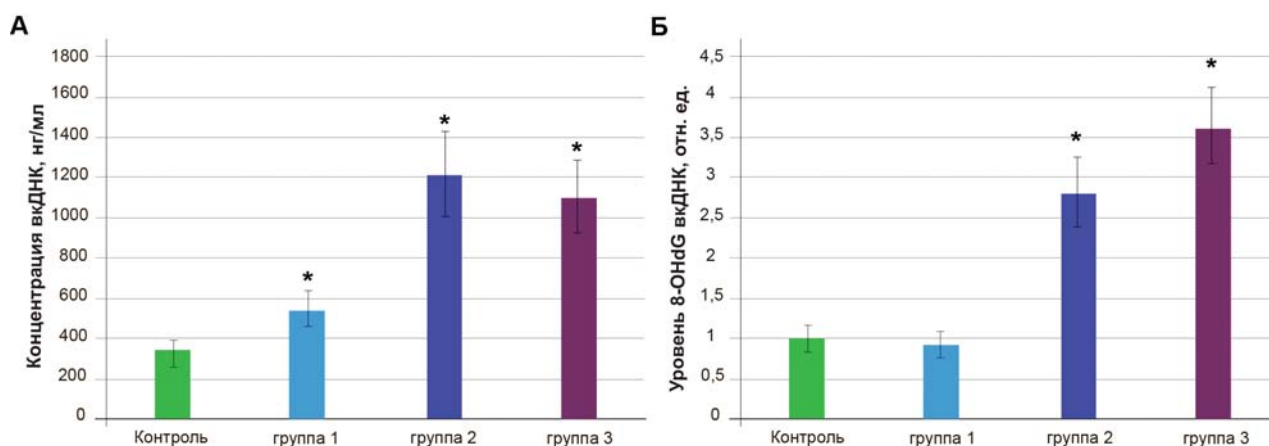


Рис. 3. Концентрация внеклеточной ДНК (А) и содержание 8-OHdG в образцах внеклеточной ДНК (Б) плазмы периферической крови детей с диагнозом РАС, шизофренией у детей и здоровых детей

Контроль — контрольная группа здоровых детей; группа 1 — ДА (легкая и средняя форма течения РАС); группа 2 — АА (тяжелая форма течения РАС); группа 3 — ШД; * различия с контрольной группой достоверны, $p < 0,01$

Fig. 3. Concentration of extracellular DNA (A) and content of 8-OHdG in extracellular DNA samples (B) of peripheral blood plasma of children diagnosed with ASD, childhood-onset schizophrenia and healthy children

Control — a control group of healthy children; group 1 — CA (mild and moderate forms); group 2 — AA (severe form); group 3 — COS; * differences with the control group are significant, $p < 0.01$

[13]. Гетерогенность шизофрении и РАС связана с широким спектром биологических путей, задействованных в патогенезе этих заболеваний. Одним из факторов, объединяющим эти биологические пути, по-видимому, считается окислительный стресс [4, 23, 25]. До сих пор нет определенного мнения о том, является ли окислительный стресс причиной заболевания или же он возникает вторично под влиянием экзогенных факторов окружающей среды (отрыв от матери, переезд, инфекции, отдельные вакцины и др.). Тем не менее признано, что окислительный стресс играет существенную роль в патогенезе как шизофрении, так и РАС [4, 25]. Кроме того, необходимо отметить, что фрагменты окисленной вкДНК могут сами быть факторами стресс-сигнализации, индуцируя синтез свободных радикалов клетками крови и эндотелия [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Окислительно-восстановительный дисбаланс может способствовать развитию как шизофрении, так и аутизма (ДА, АА) у детей на различных уровнях и с помощью различных механизмов [4, 25]. Однако важно отметить, что окислительный стресс имеет разную выраженность при РАС, протекающих в тяжелой форме при АА и в легкой/средней форме — при ДА. При ДА уровень окислительных повреждений ДНК лимфоцитов имеет тенденцию к повышению, но не достигает уровня достоверности; уровень окислительных повреждений вкДНК не отличается от контроля и даже несколько снижен. Это может свидетельствовать об активации антиоксидантных систем в клетках и компенсированном окислительном стрессе. При АА и еще в большей степени при ШД уровень окислительных повреждений ДНК клеток и вкДНК значительно повышен, что свидетельствует о развитии системного окислительного стресса, который не компенсируется антиоксидантной системой организма. Это может быть связано или со снижением антиоксидантной системы, или с высоким уровнем синтеза свободных радикалов клетками крови. При этом уровень 8-OHdG в составе вкДНК и ДНК ядер клеток периферической крови может служить маркером некомпенсированного окислительного стресса, что важно не только для диагностики тяжести течения патологического процесса, но и для разработки систем базовой психотропной терапии с подключением антиоксидантных препаратов.

По-видимому, патологический апоптоз, обусловленный окислительным стрессом, можно рассматривать как «второй удар», накладывающийся на физиологический апоптоз в кризовые, уязвимые к стрессу, периоды онтогенеза. С ним связан тяжелый прогноз при АА (АДП) и особенно при ШД. При ДА (ИП) окислительный стресс не выходит за пределы контрольных значений, патологический апоптоз не прослеживается; процесс обратимый, прогноз благоприятный, что подтверждено данными проведенного клинико-биологического исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Психические расстройства и расстройства поведения (F00–F99). Класс V МКБ-10, адаптированный для использования в Российской Федерации. Под общ. ред. Б.А. Казаковцева, В.Б. Голланда. М.: Минздрав России; 1998:512 с.
Mental disorders and behavioural disorders (F00–F99). (Klass V MKB-10, adaptirovannyj dlja ispol'zovaniya v Rossijskoj Federacii). Pod obshch. red. Kazakovceva BA, Gollanda VB. M.: Minzdrav Rossii; 1998:512 p. (In Russ.).
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013:992 p.
3. Upthegrove R, Khandaker GM. Cytokines, Oxidative Stress and Cellular Markers of Inflammation in Schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci.* 2020;44:49–66. doi: 10.1007/7854_2018_88 PMID: 31115797
4. Thorsen M. Oxidative stress, metabolic and mitochondrial abnormalities associated with autism spectrum disorder. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;173:331–354. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.04.018 Epub 2020 May 15. PMID: 32711815
5. Emiliani FE, Sedlak TW, Sawa A. Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story. *Curr Opin Psychiatry.* 2014;27(3):185–190. doi: 10.1097/YCO.0000000000000054 PMID: 24613987; PMCID: PMC4054867
6. McGrath JJ, Mortensen PB, Visscher PM, Wray NR. Where GWAS and epidemiology meet: opportunities for the simultaneous study of genetic and environmental risk factors in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2013;39(5):955–959. doi: 10.1093/schbul/sbt108 Epub 2013 Aug 1. PMID: 23907349; PMCID: PMC3756798
7. Abdul F, Sreenivas N, Kommu JVS, Banerjee M, Berk M, Maes M, Leboyer M, Debnath M. Disruption of circadian rhythm and risk of autism spectrum disorder: role of immune-inflammatory, oxidative stress, metabolic and neurotransmitter pathways. *Rev Neurosci.* 2021;May 27. doi: 10.1515/revneuro-2021-0022 Epub ahead of print. PMID: 34047147
8. Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Rodríguez-Quiroga A, Arango C. Oxidative Stress and Inflammation in Early Onset First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;20(6):435–444. doi: 10.1093/ijnp/pyx015 PMID: 28575316; PMCID: PMC5452799
9. Alameda L, Fournier M, Khadimallah I, Griffa A, Cleusix M, Jenni R, Ferrari C, Klausner P, Baumann PS, Cuenod M, Hagmann P, Conus P, Do KQ. Redox dysregulation as a link between childhood trauma and psychopathological and neurocognitive profile in patients with early psychosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(49):12495–12500. doi: 10.1073/

- pnas.1812821115 Epub 2018 Nov 19. PMID: 30455310; PMCID: PMC6298080
10. Башина ВМ, Горбачевская НЛ, Ключник ТП, Симашкова НВ, Якупова ЛП, Даниловская ЕВ, Туркова ИЛ. Маркеры критических периодов онтогенеза и их связь с психическими расстройствами у детей. XII Съезд психиатров России. М., 1995:361–363. Bashina VM, Gorbachevskaya NL, Klushnik TP, Simashkova NV, Yakupova LP, Danilovskaya EV, Turkova IL. Markers of critical periods of ontogenesis and their relationship with mental disorders in children. 12th Congress of Russian Psychiatrists. M., 1995:361–363. (In Russ.).
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 PMID: 32677958; PMCID: PMC7364812
12. Koga M, Seritella 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 Epub 2015 Nov 15. PMID: 26589391
13. Simashkova NV, Boksha IS, Klyushnik TP, Iakupova LP, Ivanov MV, Mukaetova-Ladinska EB. Diagnosis and Management of Autism Spectrum Disorders in Russia: Clinical-Biological Approaches. *J Autism Dev Disord*. 2019;49(9):3906–3914. doi: 10.1007/s10803-019-04071-4 PMID: 31124027
14. Schopler E, Reichler R, Rochen Renner B. The childhood autism rating scale. Western Psychological Services; 1988.
15. Opler LA, Kay SR, Lindenmayer JP, Fiszbein A. Structured Clinical Interview Positive and Negative Syndrome Scale (SCI-PANSS). *Multi-Health Systems Inc*. 1999;4:15 p.
16. Bush G, Fink M, Petrides G, Dowling F, Francis A. Catatonia. I. Rating scale and standardized examination. *Acta Psychiatr Scand*. 1996;93(2):129–136. doi: 10.1111/j.1600-0447.1996.tb09814.x PMID: 8686483
17. Nasrallah H, Morosini P, Gagnon DD. Reliability, validity and ability to detect change of the Personal and Social Performance scale in patients with stable schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2008;161(2):213–224. doi: 10.1016/j.psychres.2007.11.012 Epub 2008 Oct 11. PMID: 18848731
18. 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 PMID: 29682166; PMCID: PMC5845523
19. Weyemi U, Dupuy C. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutat Res*. 2012;751(2):77–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.04.002 Epub 2012 May 8. PMID: 22580379
20. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 2010;704(1–3):152–159. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.005 Epub 2010 Jan 8. PMID: 20060490; PMCID: PMC3074954
21. Cossarizza A, Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Gibellini L, Bertocelli L, Nasi M, Pinti M. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1790–1797. doi: 10.1038/nprot.2009.189 PMID: 20010930
22. Rodriguez GP, Song JB, Crouse GF. In vivo bypass of 8-oxodG. *PLoS Genet*. 2013;9(8):e1003682. doi: 10.1371/journal.pgen.1003682 Epub 2013 Aug 1. PMID: 23935538; PMCID: PMC373121.
23. Ermakov AV, Konkova MS, Kostyuk SV, Izevskaya VL, Baranova A, Veiko NN. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:649747. doi: 10.1155/2013/649747 Epub 2013 Mar 6. PMID: 23533696; PMCID: PMC3606786
24. Жесткова ЕМ, Ершова ЕС, Мартынов АВ, Захарова НВ, Костюк ГП, Вейко НН, Костюк СВ. Концентрация циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме периферической крови больных с острыми психозами эндогенной и экзогенной этиологии. *Психиатрия*. 2021;19(3):6–14. <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-3-6-14>
25. Jestkova EM, Ershova ES, Martynov AV, Zakharova NV, Kostyuk GP, Veiko NN, Kostyuk SV. Concentration of circulating cell-free DNA in the peripheral blood plasma of patients with acute endogenous and exogenous etiology psychoses. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2021;19(3):6–14. (In Russ.). <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-3-6-14>
25. Ermakov EA, Dmitrieva EM, Parshukova DA, Kazantseva DV, Vasilieva AR, Smirnova LP. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:8881770. doi: 10.1155/2021/8881770 PMID: 33552387; PMCID: PMC7847339
26. 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 Epub 2017 Aug 22. PMID: 28904740; PMCID: PMC5585687

Сведения об авторах

Светлана Геннадьевна Никитина, младший научный сотрудник, отдел детской психиатрии, Научный центр психического здоровья, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7775-1692>

nikitina.svt@mail.ru

Елизавета Сергеевна Ершова, кандидат биологических наук, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

es-ershova@rambler.ru

Юлия Михайловна Чудакова, научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0299-426X>

julia.chudakova@yandex.ru

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

sakmarariver@yahoo.com

Наталья Николаевна Вейко, доктор биологических наук, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1847-0548>

satelit32006@yandex.ru

Андрей Владимирович Мартынов, кандидат биологических наук, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6697-8306>

avlamar@mail.ru

Светлана Эдмундовна Костюк, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3659-3608>

lanak28@gmail.com

Александр Андреевич Модестов, студент, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1531-7161>

sasha56.modestov@yandex.ru

Татьяна Михайловна Рожнова, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра медицинской генетики, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3323-5303>

stm-i@yandex.ru

Вера Леонидовна Ижевская, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7246-5144>

izhevskaya@med-gen.ru

Светлана Викторовна Костюк, доктор биологических наук, заведующая лабораторией, лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6336-9900>

svet-vk@yandex.ru

Наталья Валентиновна Симашкова, профессор, доктор медицинских наук, заведующая отделом детской психиатрии, Научный центр психического здоровья, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8809-3429>

simashkovanv@mail.ru

Information about the authors

Svetlana G. Nikitina, Junior Researcher, Department of Child Psychiatry, Mental Health Research Centre, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7775-1692>

nikitina.svt@mail.ru

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

es-ershova@rambler.ru

Julia M. Chudakova, Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0299-426X>

julia.chudakova@yandex.ru

Galina V. Shmarina, Cand. of Sci. (Med.), 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, <https://orcid.org/0000-0003-1847-0548>

satelit32006@yandex.ru

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

avlamar@mail.ru

Svetlana E. Kostuk, Laboratory Assistant-Researcher, Molecular Biology Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3659-3608>

lanak28@gmail.com

Alexandr A. Modestov, Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1531-7161>

sasha56.modestov@yandex.ru

Tatyana M. Rozhnova, Cand. of Sci. (Med.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3323-5303>

stm-i@yandex.ru

Vera L. Izhevskaya, Dr. of Sci. (Med.), Prof., Deputy Director for Research, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7246-5144>

izhevskaya@med-gen.ru

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

svet-vk@yandex.ru

Nataliya V. Simashkova, Dr. of Sci. (Med.), Prof., Head of the Department, Department Child Psychiatry, Mental Health Research Centre, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8809-3429>

simashkovanv@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

There is no conflict of interests.

Дата поступления 29.07.2021 Received 29.07.2021	Дата рецензии 08.09.2021 Revised 08.09.2021	Дата принятия 14.09.2021 Accepted for publication 14.09.2021
--	--	---