УДК 616.89

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ДЕТЕЙ С АУТИСТИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ И ТРУДНОСТЯМИ В ОБУЧЕНИИ: ДИАГНОСТИКА ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МИКРОЧИПОВ

Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Куринная О. С., Сильванович А. П., Юров Ю. Б.

ФБГУ Научный центр психического здоровья РАМН, Москва; ФБГУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздравсоцразвития», Москва; НОЦ «Нейробиологическая диагностика наследственных психических заболеваний детей и подростков», Московский городской психолого-педагогический университет, Москва, Россия, y_yurov@yahoo.com

Генетические нарушения встречаются с высокой частотой у детей с аутистическими расстройствами. Расстройства аутистического спектра предполагают нарушения в трех областях: в сфере социальных взаимодействий, в коммуникативной сфере, в крайне ограниченных, повторяющихся и стереотипных паттернах поведения, интересах и видов занятий. Эти дети нуждаются в проведении генетической диагностики для определения возможных этиологических факторов и патогенетических механизмов заболевания с последующей коррекцией психологических и поведенческих нарушений. Молекулярное кариотипирование с использованием ДНК-микрочипов – одна из наиболее современных технологий диагностики геномных и хромосомных нарушений при аутизме. В практике клинической психологии и медицинской генетики мы применяем методы высокоразрешающей сравнительной геномной гибридизации на хромосомных препаратах (HRCGH) и молекулярное кариотипирование (array CGH) на ДНК микрочипах. При обследовании 100 детей с аутизмом, трудностями в обучении и врожденными пороками развития методом HRCGH выявлены перестройки генома в 46 % случаев. При помощи метода молекулярного кариотипирования обследовано 50 детей с аутизмом. В 44 случаях из 50 (88 %) были выявлены различные аномалии и вариации генома (CNV – copy number variations). В 34 случаях из 44 (52 %) имелись несбалансированные геномные перестройки. Они включали делеции, дупликации, субтеломерные перестройки, а также сочетанные геномные нарушения. Эти данные позволяют предположить, что нарушения генома, не выявляемые обычными методами анализа хромосом, часто встречаются у детей с аутизмом. Наши данные демонстрируют, что метод HRCGH может быть использован для прескрининга перед проведением молекулярного кариотипирования. Насколько нам известно, данное исследование микроаномалий генома детей с аутизмом неясной этиологии является первым в России. Исследования геномных и хромосомных нарушений у детей с аутистическими расстройствами и трудностями в обучении необходимы для проведения дифференциальной нейробиологической диагностики и научно-обоснованной медицинской и психологической коррекции нарушений психики.

Ключевые слова: аутизм, генетическая диагностика, геном, ДНК-микрочип, клиническая психология, молекулярное кариотипирование, психологическая коррекция, сравнительная геномная гибридизация, хромосомные нарушения.

GENETIC ASPECTS OF PSYCHOLOGICAL AND BEHAVIORAL DISFUNCTIONS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS AND LEARNING DIABILITY: DIAGNOSIS OF CHROMOSOMAL AND GENOMIC ABNORMALITIES USING DNA MICROARRAYS

Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Kurinnaya O. S., Silvanovich A. P., Yurov Y. B.

National Research Center of Mental Health, RAMS, Moscow, Russia; Institute of Paediatrics and Paediatric Surgery, Ministry of Health, Moscow, Russia; Moscow City University of Psychology and Education, y_yurov@yahoo.com

Genetic disorders occur with high frequency in children with autism spectrum disorders (ADS). ADSs involve disturbances in three areas: violations in the sphere of social interaction, qualitative impairments in communication field, is extremely limited, repetitive and stereotyped patterns of behavior, interests and occupations. Genetic testing allows us to identify possible etiologic factors and pathogenetic mechanisms of the disease in order to elaborate methods of correction of mental and behavioral disorders. Molecular karyotyping using DNA microarrays is one of modern technologies for diagnosis of genomic and chromosomal abnormalities in children with autism. In the practice of clinical psychology and medical genetics, we use high resolution comparative genomic hybridization (HRCGH) and molecular karyotyping (array CGH). In a study of 100 children with autism, learning difficulties and congenital malformations by HRCGH we identified genomic rearrangements in 46% of cases. Using array CGH we

examined 50 children with autism. In 44 cases out of 50 (88%) were identified different genomic abnormalities and genomic variations (CNV - copy number variations). In 23 cases out of 44 (52%) were found unbalanced genomic rearrangements, including deletions and duplications. These data suggest that genomic abnormalities which are not detectable by common methods of chromosome analysis are often discovered by molecular cytogenetics. To our knowledge, this study of genomic microaberrations in children with idiopathic autism of unknown etiology is the first one in Russia. Studies of genomic and chromosomal abnormalities in children with ADS and learning difficulties are necessary for differential diagnosis and neurobiological evidence-based medical and psychological correction.

Keywords: autism, genetic diagnostics, genome, DNA microarray, medical psychology, molecular karyotyping, psychological correction, comparative genomic hybridization, chromosome abnormalities.

Введение. Аутизм – одно из наиболее распространенных психических расстройств детского возраста, наблюдаемое у 0,7–3 % детей [6]. Согласно критериям DSM-IV [7], расстройства аутистического спектра предполагают нарушения в трех областях: в сфере социальных взаимодействий (неспособность устанавливать отношения со сверстниками, отсутствие социальной и эмоциональной взаимности); качественные нарушения в коммуникативной сфере (задержка или полное отсутствие разговорной речи, неспособность начинать или поддерживать разговор с другими людьми); крайне ограниченные, повторяющиеся и стереотипные паттерны поведения, интересы и виды занятий. Эти дети нуждаются в коррекции психологических и поведенческих нарушений. Многие дети с расстройствами аутистического спектра также имеют интеллектуальные нарушения различной тяжести. Около 75 % таких больных нуждаются в социальной и образовательной поддержке в течение всей жизни.

Этиология расстройств аутистического спектра и умственной отсталости во многих случаях сложна и не определяется единой причиной, поэтому выявление множества генов и генных сетей, которые могут оказывать влияние на возникновение таких расстройств, значимо для лучшего понимания лежащих в основе поведенческих и когнитивных нарушений нейробиологических механизмов [10]. Расстройства аутистического спектра, сопряженные с умственной отсталостью или задержкой психического развития, являются частой причиной обращения к генетической диагностике [9]. Генетические нарушения встречаются с высокой частотой у детей с расстройствами аутистического спектра и умственной отсталостью. При этих расстройствах встречаются как цитогенетически видимые хромосомные аномалии, так и субмикроскопические вариации числа копий генома и моногенные мутации. Идентификация генов, влияющих на возникновение заболевания, позволяет выявить лежащий в его основе механизм нарушения развития. Определение функции гена может помочь в анализе нарушений развития и функционирования мозга. Однако один и тот же ген может оказывать влияние на множество процессов, происходящих в различных частях мозга. Таким образом, с точностью определить нарушение, приводящее к конкретному расстройству, возможно, только выявив сеть генов, связанных между собой и взаимовлияющих друг на друга. В настоящее время

молекулярно-цитогенетическая диагностика стала неотъемлемой частью медицинской генетики и клинической психологии при оказании высокотехнологичной медицинской помощи детям, страдающим умственной отсталостью, аутизмом, врожденными пороками и микроаномалиями развития, которая позволяет выявлять различные генные и хромосомные нарушения [8].

Молекулярное кариотипирование с использованием ДНК-микрочипов – одна из наиболее современных технологий диагностики геномных и хромосомных нарушений при аутизме и умственной отсталости. В практике клинической психологии и медицинской генетики мы применяем методы высокоразрешающей сравнительной геномной гибридизации (HR CGH) и серийной сравнительной геномной гибридизации (array CGH), специально разработанные для проведения анализа микроаномалий генома (дупликации, делеции и другие микроперестройки). Эти аномалии или вариации числа копий ДНК представляют собой делеции или дупликации какого-либо участка генома. Размер их варьирует от нескольких тысяч до миллиона пар нуклеотидов и даже целой хромосомы (трисомии, моносомии); они могут включать один или множество генов. Подобные изменения в некоторых регионах хромосом могут быть доброкачественными и не проявляться фенотипически, однако вариации числа копий, являющиеся причинными факторами аутизма, чаще всего не обнаруживаются в контрольных группах [9]. Предполагается, что большая часть генов, ассоциированных с когнитивными расстройствами, скорее оказывает влияние на предрасположенность к заболеванию, чем является его непосредственными и единственными причинами; каждый отдельный ген может играть относительно небольшую роль. Возможность связать вместе совокупность действия генов зависит от знания их функций. Большое значение имеют компьютерные программы, позволяющие провести биоинформатический анализ большого объема данных. В настоящее время эта область биоинформатики активно развивается [10]. Технология array CGH позволяет обнаружить различные геномные заболевания и повышает эффективность молекулярной диагностики генетических аномалий в группах детей с пороками развития, умственной отсталостью и аутизмом с 4–5 % до 40–50 % [1,2,5]. При умственной отсталости с аутистическими расстройствами (наиболее частых формах нарушения психики у детей) применение молекулярно-цитогенетической диагностики позволило показать, что от 20 до 40 % случаев связаны с нарушениями генома, проявляющимися на хромосомном (микроскопическом и субмикроскопическом) уровне [3]. Таким образом, анализ нарушений генома у детей с аутистическими расстройствами значим для коррекции психологических и поведенческих нарушений, открывая новое направление исследований в коррекционной и медицинской психологии.

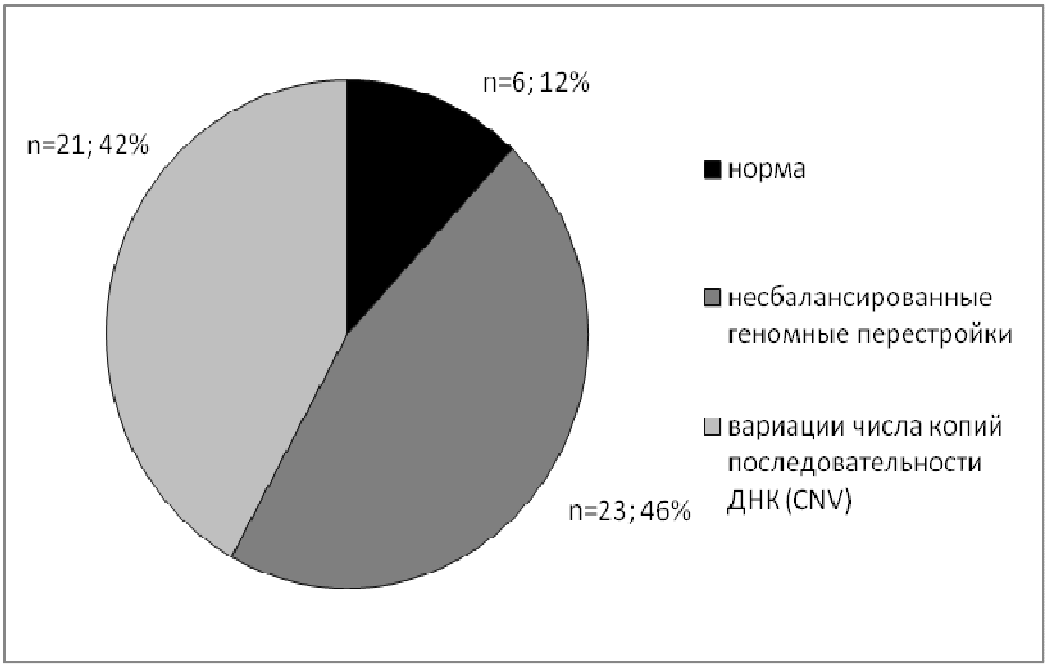
Цель исследования. Целью работы явилось определение частоты и спектра геномных и хромосомных нарушений у детей с аутистическими расстройствами с применением технологий сравнительной геномной гибридизации на хромосомах in situ и на ДНК микрочипах для разработки генетических методов нейробиологической диагностики и психологической коррекции нарушений психики у детей с аутизмом.

Результаты исследования и их обсуждение. В данной работе проведены цитогеномные исследования 150 детей с недифференцированными формами аутизма. Эта когорта больных детей была отобрана в ходе проведения комплексного клинико-психологического, цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования более чем 1000 детей с идиопатическим аутизмом и умственной отсталостью. Предварительный генетический анализ был проведен с применением различных диагностических тестов на наиболее частые генные и хромосомные синдромы, ассоциированные с аутистическими расстройствами [1]. При обследовании методом HRCGH на хромосомных препаратах 100 детей с трудностями в обучении и врожденными пороками развития выявлены перестройки генома в 46 % случаев. Они включали делеции (29 случаев; 63 %), дупликации (7 случаев; 15 %), субтеломерные перестройки (7 случаев; 15 %), а также сочетанные нарушения (3 случая; 7 %), предположительно связанные с субтеломерными перестройками (рис. 1А).

Более эффективной технологией обнаружения геномных микроаномалий является серийная CGH (array CGH) на ДНК микрочипах или молекулярное кариотипирование. На рисунке 2 представлен пример обследования детей с помощью этого метода с использованием ДНК микрочипа и экспериментального протокола, описанного ранее [1,3]. Использование метода array CGH показало, что картина генетических нарушений у больных с недифференцированным аутизмом может быть более сложной, чем казалось ранее. Мы оценили частоту встречаемости и сложность геномных вариаций, обследовав этим методом 50 детей с аутизмом (рис. 1Б).

Рис.1. Результаты исследования детей с идиопатическим аутизмом и умственной отсталостью с применением сравнительной геномной гибридизации (HR CGH) на хромосомах (А) и серийной сравнительной геномной гибридизации (array CGH) на ДНК микрочипах (Б)

(А)



(Б)

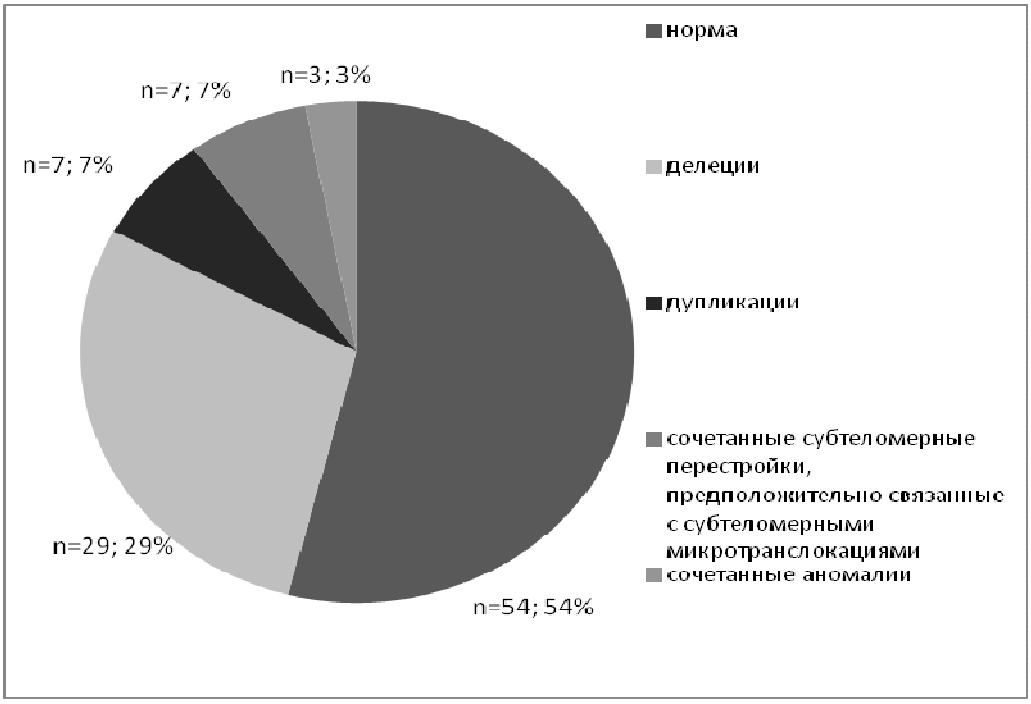
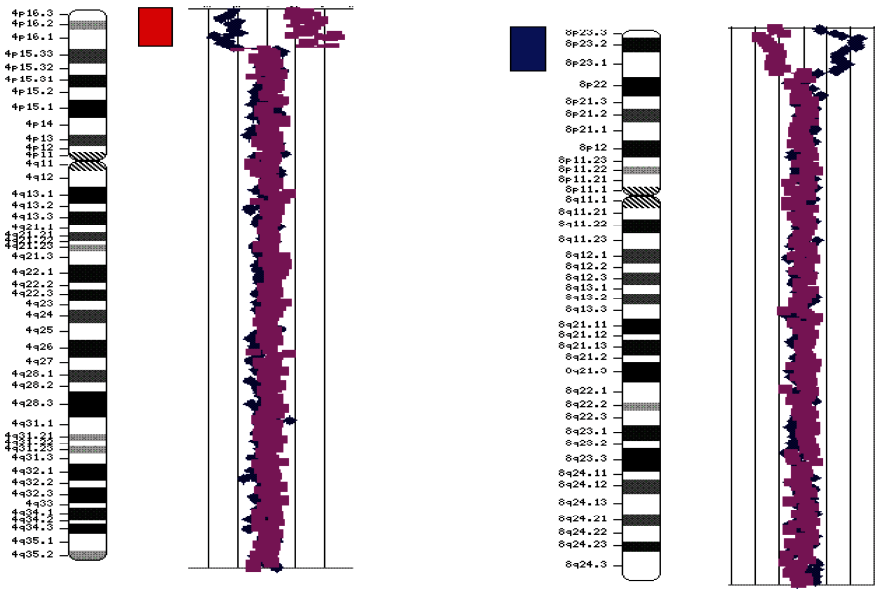


Рис. 2. Результаты обследования при помощи метода array CGH: диаграммы, обозначающие хромосомы 4 (слева) и 8 (справа). Слева обозначена область делеции (потеря генетического материала короткого плеча хромосомы 4), справа – область дупликации (удвоения генетического материала в коротком плече хромосомы 8)



Методом array CGH в 44 случаях из 50 (88 %) были выявлены различные геномные аномалии и вариации (CNV – copy number variations). В 23 случаях из 44 (52 %) имелись несбалансированные геномные перестройки. Они включали делеции, дупликации, субтеломерные перестройки, а также сочетанные геномные нарушения. Большие терминальные делеции (размер 4,7–6,1 млн пар нуклеотидов) обнаружены в 4 случаях (del4pter/dup8pter; del7qter; del10qter; dup19pter). 3 случая были связаны с дупликацией (1 мальчик) и делецией (2 девочки) участка Xq28 (включая гены, контролирующие экспрессию генов в нейронах мозга). В одном случае выявлена небольшая делеция участка 2qter (<1 млн пар нуклеотидов). Остальные нарушения представляли собой более сложные перестройки в виде множественных мелких делеций и дупликаций (<0,3 млн пар нуклеотидов), расположенных на большом расстоянии от теломер. Среди них в 2х случаях наблюдалось рекуррентное совпадение делеций в 9qter и 21qter. В 4-х случаях обнаружены следующие вариации числа копий размером от 0,1 до 0,3 млн пар нуклеотидов: del1pter/del5pter; del4qter/del5qter; del1pter/del4pter/del20qter; dup16pter/del6pter. Наконец, в одном случае выявлена конституциональная геномная нестабильность, проявляющаяся в виде множественных делеций и дупликаций (размер от 1 до 2,5 млн пар нуклеотидов), включающих несколько субтеломерных регионов (1pter; 16pter; 20qter; 22qter). Эти данные позволяют предположить, что небольшие (<1 млн пар нуклеотидов) комплексные вариации числа копий последовательностей ДНК часто встречаются у детей с умственной отсталостью и расстройствами аутистического спектра.

Таким образом, использование новейших методов сканирования генома, основанных на сравнительной геномной гибридизации, позволяет с большей эффективностью определять

точки разрыва при хромосомных аномалиях и выявлять микроперестройки хромосом. Серийная CGH (array CGH) позволяет также обнаружить новые геномные заболевания и, в отличие от методов кариотипирования, в несколько раз повышает эффективность молекулярной диагностики генетических аномалий в группах детей с аутизмом, пороками развития и умственной отсталостью (от 3–4 % до 40–50 %) [1,2,5]. При умственной отсталости с аутистическими расстройствами (наиболее частых формах нарушения психики у детей) применение молекулярно-цитогенетической диагностики позволило показать, что от 20 до 50 % случаев связаны с нарушениями генома, проявляющимися на хромосомном (микроскопическом и субмикроскопическом) уровне [3]. Выявленные в работе вариации числа копий представляют собой делеции или дупликации какого-либо участка ДНК. Как было уже отмечено, размер их варьирует от нескольких тысяч до миллионов пар нуклеотидов, и они могут включать от одного до нескольких десятков генов. Подобные и вариации генома могут не проявляться фенотипически. Однако вариации числа копий (CNV), являющиеся, по-видимому, в ряде случаев причинными факторами аутизма, чаще всего не обнаруживаются в контрольных группах [9].

Заключение. Таким образом, исследования геномных и хромосомных нарушений у детей с аутизмом с использованием новейших геномных технологий значимы не только для нейробиологической диагностики и поиска этиологических факторов заболевания, но также для разработки научно обоснованных методов медицинской и психологической коррекции нарушений психики.

Список литературы

1. Ворсанова С. Г., Юров И. Ю., Соловьев И. В., Юров Ю. Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. – М.: Медпрактика, 2008. – 300 с.

2. Ворсанова С. Г., Юров И. Ю., Соловьев И. В., Юров Ю. Б. Молекулярная цитогенетика в диагностике хромосомных и генных болезней у детей // Росс. вестн. перинатол. и педиатр. – 2006. – Т. 51. – № . – С. 23-29.

3. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Воинова В. Ю., Куринная О. С., Саприна Е. А., Колотий А. Д., Кешишян Е. С., Юров Ю. Б. Диагностика сложных случаев геномных заболеваний и хромосомных аномалий у детей с использованием серийной сравнительной геномной гибридизации (array CGH): необходимость использования новейших методов молекулярной диагностики. Сложные диагностические случае в практике детского врача / Под ред. А. Д. Царегородцева, В. В. Длина. – М.: Пресс-Арт, 2010. – С. 116-132.

4. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б. Генетические механизмы нарушения психики: хромосомные и геномные болезни // Электронный журнал. Психологическая наука и образование PSYEDU.ru. – 2010. – №5.
5. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б. Современные достижения в молекулярно-цитогенетической диагностике наследственных болезней //Клин. лаб. диагн. – 2005. – Т. 11. – С. 21-29.
6. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting // Brain Res. – 2011. – №22. – P. 1342-1380.
7. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR // Washington, DC: American Psychological Association (APA), 2000.
8. Iourov I. Yu., Vorsanova S. G., Yurov Yu. B. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases // Current genomics. – 2008. – Vol. 9. – №7. – P .452–465.
9. Smith S.D., Grigorenko E., Willcutt E., Pennington B.F., Olson R.K., DeFries JC. Etiologies and molecular mechanisms of communication disorders // J Dev Behav Pediatr. – 2010. – Vol.31. – №7. – P. 555-563.
10. Yurov Y. B., Vorsanova S. G., Iourov I.Y., et al. Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy // J Med Genet. – 2007. – № 44. – P. 521-525.

Рецензенты:

Алфимова Маргарита Валентиновна, доктор психологических наук, в.н.с. лаборатории клинической генетики ФГБУ "Научный Центр Психического Здоровья" РАМН, г. Москва.

Троицкая Любовь Анатольевна, доктор психологический наук, профессор кафедры нейро- и патопсихологии факультета клинической и специальной психологии ГБОУ ВПО г. Москвы "Московский городской психолого-педагогический университет", г.Москва.