РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ БІОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ У ДІТЕЙ З РОЗЛАДАМИ СПЕКТРУ АУТИЗМУ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ГЕНЕТИЧНИМ ДЕФІЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ

МАЛЬЦЕВ Д.В.

Інститут експериментальної і клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця

ВСТУП

Одним із важливих досягнень в психіатрії останніх років є з'ясування асоціації генетичного дефіциту фолатного циклу і розладів спектру аутизму у дітей [26]. Дані історично першого мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Pu D. зі спів. 2013 року, в якому проаналізовано результати 8 випробувань за участю 1672 дітей з розладами спектру аутизму та 6760 здорових дітей, продемонстрував, що патогенний поліморфний варіант MTHFR C677T асоційований з розладами спектру аутизму у дітей [22]. Надалі мета-аналіз рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Mohammad N.S. зі спів. 2016 року, що охоплював дані 1361 дітей з розладами спектру аутизму і 6591 здорових дітей показав, що MTHFR C677T і пов'язана з цим гіпергомоцистеїнемія асоційовані з розладами спектру аутизму у дітей. Додатково було продемонстровано синергізм MTHFR C677T і MTRR A66G в індукції гіпергомоцистеїнемії і підвищенні ризику розвитку розладів спектру аутизму у носія [20]. Результати наступного мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Rai V. 2016 року, що охоплював дані 13 випробувань за участю 1978 дітей з розладами спектру аутизму та 7257 здорових дітей, встановив асоціацію між MTHFR C677T і розладами спектру аутизму у дітей як серед європейців, так й осіб азіатської популяції. MTHFR C677T підвищував ризик розвитку розладів спектру аутизму у всіх 4 застосовуваних генетичних моделях (ORT проти C=1,48; 95 % CI=1,18-1,86; P=0,0007; ORTT+CT проти CC=1,70, 95 % CI=0,96-2,9, p=0,05; ORTT проти CC=1,84, 95 % CI=1,12-3,02, p=0,02; ORCT проти CC=1,60, 95 % CI=1,2-2,1, p=0,003; ORTT проти CT+CC=1,5, 95 % CI=1,02-2,2, p=0,03) [23]. Дані нещодавнього мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Sadeghiyeh T. зі спів. 2019 року, в якому проаналізували результати 25 клінічних досліджень за типом випадок-контроль, виявили асоціацію між MTHFR 677C>T і розладами спектру аутизму в загальній популяції, та MTHFR 1298A>C та розладами спектру аутизму у дітей тільки серед європейців. Зокрема, MTHFR 677C>T підвищував ризик розвитку розладів спектру ау-

тизму у дітей у 5 генетичних моделях (Т проти С: OR=1,483, 95 % CI=1,188-1,850, p≤ 0.001; TT проти CC: OR=1,834, 95 % CI=1,155-2,913, p=0,010; TC проти CC: OR=1,512, 95 % CI=1,101-2,078, p=0,011; TT+TC проти CC: OR=1,632, 95 % CI=1,261-2,113, p≤0,001; TT проти TC+CC: OR=1,427, 95 % CI=1,002-2,032, p= 0,049) [25]. Останній мета-аналіз рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Li Y. зі спів. 2020 року, що охоплює результати 15 випробувань, вказує на асоціацію MTHFR C677T з розладами спектру аутизму у дітей в 5 генетичних моделях (viz, алельна, домінантна, рецесивна, гетерозиготна, гомозиготна). Підгрупний аналіз показав асоціацію як MTHFR C677T, так і MTHFR A1298C з розладами спектру аутизму у дітей [15].

Результати контрольованого клінічного дослідження Haghiri R. зі спів. за участю 103 дітей з розладами спектру аутизму і 130 здорових дітей групи контролю показали тісну асоціацію MTR A2756G і розладів спектру аутизму у дітей. Продемонстровано збільшення ризику розвитку розладів спектру аутизму в 1,6 разів у носіїв MTR A2756G [13].

Таким чином, всі 4 основних поліморфних варіанти генів ензимів фолатного циклу асоційовані з розладами спектру аутизму у дітей, однак поточна доказова база такої асоціації більша у MTHFR C677T і MTHFR A1298C і менша – у MTR A2756G і MTRR A66G.

Mohammad N.S. зі спів., використовуючи модель ANN (artificial neural network) у контрольованому клінічному дослідженні за участю 138 дітей з розладами спектру аутизму та 138 здорових дітей показали, що визначення патогенних поліморфних варіантів генів GCP1I C1561T, SHMT1 C1420T, MTHFR C677T, MTR A2756G, та MTRR A66G з діагностичною метою дозволяє встановити ризик розвитку розладів спектру аутизму у носія з точністю в 63,8% [20].

Різні патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу можуть діяти синергічно, суттєво підвищуючи ризик розвитку розладів спектру аутизму у дітей. Про синергізм між MTHFR C677T і MTRR A66G йшлося в результатах мета-аналізу Mohammad N.S. зі спів. [20]. Натомість Arab A.H. зі спів. у контрольованому клінічному дослідженні за участю 112 дітей з розладами

спектру аутизму та 104 здорових дітей встановили синергічний ефект MTHFR C677T і MTHFR A1298C в формуванні ризику розвитку розладів спектру аутизму у дітей (рис. 1) [5]. Чим більше

кількість патогенних поліморфних варіантів генів фолатного циклу в геномі носія, тим вищий ризик розвитку розладів спектру аутизму у нього.

Рис. 1. Розподіл 677C>T rs1801133 та 1298A>C rs1801131 SNPs у випадках CARS (childhood autism rating scale) <37 та ≥37 (за Arab A.H. зі спів.) [5]

Результати клінічних досліджень демонструють, що патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу здатні призводити до розвитку енцефалопатії з клінічною картиною розладів спектру аутизму принаймні трьома шляхами: (а) метаболічним, тісно пов'язаним з феноменом гіпергомоцистемії та індукцією оксидативного стресу в тканині ЦНС [7, 8, 10], (б) імунозалежним, зумовленим розвитком нейротропних опортуністичних інфекцій, антинейронального автоімунітету та персистуючого системного/інтрацеребрального запалення [18, 19, 21], та (в) генорегуляторним, опосередкованим шляхом дерепресії інших патогенних мутацій/поліморфізмів в геномі носія внаслідок порушення процесів метилювання ДНК [24].

Існує припущення, що як прямі, так й імунозалежні механізми розвитку енцефалопатії пов'язані з порушенням метаболізму, тому важливим видається вивчення профілю біохімічних порушень у дітей з генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованим з розладами спектру аутизму.

Мета роботи: вивчення біохімічних порушень у дітей з генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованим з розладами спектру аутизму, для розуміння механізму формування енцефалопатії й імунodefіциту, а також і пошуку біомаркерів моніторингу стану та мішеней подальших терапевтичних втручань з поперед-

ження і/або зменшення нейротоксичності та імуносупресії.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проаналізовано медичні дані 138 дітей віком від 3 до 8 років з генетичним дефіцитом фолатного циклу, у яких відзначалися розлади спектру аутизму (97 хлопчиків і 41 дівчинка). Усі вони були пацієнтами спеціалізованої нейроімунологічної клініки Vivere (реєстраційне досьє від 22.12.2018 №10/2212-M). Отримання даних для дослідження та обробка матеріалу проводилася згідно договору № 150221 від 15.02.2021р., та висновку комісії біоетичної експертизи (протокол № 140 від 21.12.2020 р. НМУ імені О.О. Богомольця). Діагноз розладів спектру аутизму був виставлений дитячими психіатрами за критеріями DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) та ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems). Патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу визначали методом ПЛР на підставі виявлення заміни нуклеотидів MTHFR C677T у моно формі (27 пацієнтів), а також – у поєднанні з іншими замінами нуклеотидів – MTHFR A1298C, MTRR A66G і/або MTR A2756G (111 осіб). Ці особи склали досліджувану групу (ДГ). До контрольної групи (КГ) віднесли 51 дитину (37 хлопчиків та 14 дівчаток) аналогічного вікового розподілу, які не страждали на гене-

тичний дефіцит фолатного циклу. Аналізували показники біохімічного профілю, які за результатами останніх досліджень вважаються інформативними біомаркерами генетичного дефіциту фолатного циклу, зокрема, – сироваткову концентрацію гомоцистеїну (N=5,2 мкмоль/л), вітамінів B6 (N=8,7-27,2 мкг/л), B12 (N=197-771 пг/мл), D3 (N=30-60 нг/мл), фолієвої кислоти, або вітаміну B9 (N=3,89-26,8 нг/мл), креатиніну (1-3 роки N=21-36 мкмоль/л; 3-5 років N=27-42 мкмоль/л; 5-8 років N=28-52 мкмоль/л), креатинфосфокінази (загальної) (N=39-308 Од/л) та лактатдегідрогенази (N=135-225 Од/л).

Статистичну обробку матеріалу проводили шляхом порівняльного і структурного аналізів. Для визначення вірогідності відмінностей між показниками у групах спостереження використовували параметричний Т-критерій Ст'юдента з показником довірчої ймовірності p та непараметричного критерію – числа знаків Z за Урбахом Ю.В. Для вивчення асоціацій між патогенними поліморфними варіантами генів фолатного циклу та параметрами біохімічного профілю за-

стосовували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та 95 % довірчий інтервал (95 % CI). Для проведення статистичних розрахунків користувалися програмою Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для пацієнтів ДГ був характерним такий патерн біохімічних порушень: гіпергомоцистеїнемія, зниження сироваткових концентрацій вітамінів B6, B12, D3 та фолієвої кислоти, гіперкреатинінемія, підвищення сироваткової концентрації креатинфосфокінази та лактатдегідрогенази, що суттєво відрізняло їх від осіб КГ (рис. 2). Зокрема, підвищення концентрації гомоцистеїну за межі референтних значень в сироватці крові дітей ДГ на момент обстеження мало місце у 88 %, зниження сироваткової концентрації вітаміну B6 – у 76 %, вітаміну B12 – у 79 %, вітаміну D3 – у 72 %, фолієвої кислоти – у 69 %, гіперкреатинінемія – в 65 %, підвищення сироваткових концентрацій креатинфосфокінази – в 57 % та лактатдегідрогенази – в 79 % випадків.

Рис. 2. Результати структурного аналізу показників біохімічного профілю серед пацієнтів ДГ (n=138) та КГ (n=51)

Як видно з рис. 2, відзначалася вірогідна відмінність в структурному розподілі пацієнтів з досліджуваними порушеннями біохімічного статусу в ДГ і КГ. Як ми й очікували, гіпергомоцистеїнемія була найтиповішою ознакою осіб ДГ і зустрічалася в 5 разів частіше. Знижена сироваткова концентрація вітамінів B6 і B12 мала місце втричі

частіше, а низька концентрація вітаміну D3 – вдвічі частіше в ДГ, ніж в контрольній. Підвищена сироваткова концентрація креатинфосфокінази зустрічалася рідше, ніж зміни інших досліджуваних показників, однак зустрічалася вп'ятеро частіше, ніж в КГ. Результати структурного і порівняльного аналізів вказують на те, що досліджувані біохімічні

порушення є типовими розладами для дітей з генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованим з аутизмом, і не є характерними для здорових дітей.

В табл. 1 порівняні середні величини досліджуваних показників біохімічного профілю в ДГ і КГ.

Таблиця 1

Середні величини ($X \pm m$) досліджуваних показників біохімічного профілю у пацієнтів ДГ (n=138) і КГ (n=51)

Показник	ДГ ($X \pm m$)	КГ ($X \pm m$)	T-критерій	Число знаків Z
Гомоцистеїн, мкмоль/л	9,63±0,36	3,42±0,11	p 0,05	Z Z0,05
Вітамін В12, пг/мл	112,64±25,12	337,78±38,47	p 0,05	Z Z0,05
Вітамін В6, мкг/л	6,32±0,24	18,11±1,72	p 0,05	Z Z0,05
Вітамін D3, нг/мл	13,98±1,37	35,65±2,94	p 0,05	Z Z0,05
Фолієва кислота, пг/мл	2,97±0,46	17,19±2,99	p 0,05	Z Z0,05
Креатинін, мкмоль/л	69,13±4,31	32,36±2,12	p 0,05	Z Z0,05
Креатинфосфокіназа, ОД/л	314,12±29,76	52,17±19,53	p 0,05	Z Z0,05
Лактатдегідрогеназа, ОД/л	378,47±29,78	178,24±17,83	p 0,05	Z Z0,05

Таким чином, сироваткова концентрація гомоцистеїну, креатиніну, креатинфосфокінази та лактатдегідрогенази вірогідно більша, а сироваткова концентрація вітамінів В6, В12, D3 і фолієвої кислоти – вірогідно менша у пацієнтів з генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованим з розладами спектру аутизму, ніж у здорових дітей.

Подібні дані щодо більшості досліджуваних біохімічних показників вже продемонстровані в інших клінічних дослідженнях, однак досі не було здійснено комплексного аналізу біохімічного профілю в таких випадках. Проведені наукові роботи стосувалися вивчення лише окремих показників метаболізму без зв'язку з іншими індикаторами, часто – й без уточнення діагнозу генетичного дефіциту фолатного циклу, а тільки з урахуванням клінічних проявів розладів спектру аутизму, які можуть мати гетерогенне походження.

Відомо, що гіпергомоцистеїнемія є основним біохімічним порушенням при генетичному дефіциті фолатного циклу у людей [7, 12]. Результати мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Guo B.Q. зі спів. 2020 року, що охоплював 31 випробування за участю 3304 дітей, включаючи 1641 пацієнтів з розладами спектру аутизму, продемонстрували, що гіпергомоцистеїнемія асоційована з розладами спектру аутизму (Hedges's $g=0,56$; 95 % CI=0,36-0,76, $P<0,001$) [12]. Нейротоксичні ефекти гомоцистеїну наразі добре вивчені [7], і з ними пов'язані прямі дисметаболічні механізми розвитку енцефалопатії, які зазвичай призводять до певних клінічних результатів [12]. За нашими спостереженнями, більше патогене-

тичне значення мають імунотоксичні ефекти гомоцистеїну та індукованого цим агентом оксидативного стресу, що призводять до порушення розвитку імунної системи організму дитини з формуванням специфічної форми імунodefіциту [1, 2, 3]. Цей імунodefіцит відповідальний за розвиток імунної дисрегуляції та реалізацію імунноопосередкованих та імунозапальних шляхів нейронального пошкодження в формуванні енцефалопатії, яка проявляється затримкою психомовленнєвого розвитку дитини з проявами розладів спектру аутизму [18, 21]. Це підтверджується клінічною ефективністю деяких імунотерапевтичних втручань [19].

Результати мета-аналізу контрольованих клінічних досліджень, підготовленого Wang Z. зі спів. у 2020 році, що охоплювали результати 34 випробувань за участю 20580 дітей, вказують, що знижена сироваткова концентрація вітаміну D, є характерною ознакою дітей з розладами спектру аутизму (mean difference (MD): -7.46 ng/mL, 95 % CI: -10.26; -4.66 ng/mL, $p<0,0001$, $I^2=98$ %) [27]. Відповідно до цього, дані систематичного огляду та мета-аналізу контрольованих клінічних досліджень Li B. зі спів. 2020 року, що включає результати 5 випробувань за участю 349 осіб, вказують, що суплементация препаратами вітаміну D з приводу дефіциту цього нутрієнту в сироватці крові допомагає вірогідно знизити виразність проявів гіперактивності (pooled MD: -3.20; 95 % CI: [-6.06, -0.34]) з низькою гетерогенністю ($I^2=10$ %, $p=0,33$) у дітей з розладами спектру аутизму [14].

Результати контрольованого клінічного дослідження Yekta . зі спів. за участю 118 дітей продемонстрували вірогідне підвищення сиро-

ваткової концентрації гомоцистеїну та зниження – вітаміну B12, однак не фолієвої кислоти у дітей з розладами спектру аутизму і синдромом дефіциту уваги та гіперактивності у порівнянні зі здоровими особами [28]. Дані контрольованого клінічного дослідження Belardo A. зі спів. за участю 120 пацієнтів свідчать про вірогідне зниження сироваткових концентрацій вітамінів B6 і B12, а також – фолієвої кислоти у дітей з розладами спектру аутизму порівняно зі здоровими дітьми [6].

Результати контрольованих клінічних досліджень Lv M.N. зі спів. [17] та Al-Mosalem O.A. зі спів. [4], проведених незалежно один від одного, вказують на вірогідне підвищення сироваткової концентрації та активності креатинфосфокінази у дітей з розладами спектру аутизму порівняно зі здоровими особами. Дані контрольованого клінічного дослідження El-Ansary A. зі спів. свідчать, що підвищення сироваткової концентрації лактатдегідрогенази і креатинфосфокінази є біомаркерами розладів спектру аутизму у дітей поряд з деякими іншими показниками метаболічного профілю [9].

В 2018 році Li Y.J. зі спів. провели систематичний огляд результатів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень, присвячених мікронутритивним порушенням, що відзначаються у дітей з розладами спектру аутизму. Результати 7 таких досліджень вказують, що суплементация препаратами вітаміну B6 неефективна щодо корекції розладів психічного статусу у дітей з аутизмом. Дані двох інших випробувань показали, що застосування метильної форми вітаміну B12 призводить до деякого покращення з боку показників психічного статусу у дітей з розладами спектру аутизму. Результати трьох досліджень із застосування препаратів вітаміну D3 свідчать про недостатню ефективність цього підходу щодо корекції психічних розладів у дітей з аутизмом. Дані ще одного випробування показали користь від призначення фолієвої кислоти при розладах спектру аутизму у дітей [16].

Важливим є питання щодо патогенетичної значимості виявлених біохімічних порушень у дітей з розладами спектру аутизму, асоційованих з генетичним дефіцитом фолатного циклу. Наразі говорять про прямі нейротоксичні впливи, як, наприклад, у гомоцистеїну [7]. Дефіцит вітамінів може порушувати обмін речовин в ЦНС, зокрема – впливати на метаболізм нейротрансмітерів. Як зазначають Gevi F. зі спів., дефіцит вітаміну B6 сповільнює трансформацію збуджуючої амінокислоти глутамату у гальмівний нейромедіатор гамма-аміномасляну кислоту, що може мати важливу роль в індукції симптомів гіперактивності та гіперзбудливості у дітей з розладами спектру аутизму [11].

Також біохімічні порушення можуть негативно впливати на розвиток імунної системи, сприяючи формуванню стану імунodefіциту, який здатен опосередковувати ряд імунозалежних ускладнень, задіяних у патогенезі енцефалопатії у дітей з розладами спектру аутизму [18, 21].

Також є важливим питання щодо походження виявлених біохімічних порушень. Наразі встановлено, що механізм біохімічного дисбалансу у дітей з розладами спектру аутизму є складним і багатокомпонентним. Так, деякі порушення є прямим наслідком наявності патогенних поліморфних варіантів генів циклу фолієвої кислоти, тобто безпосередньо пов'язані з дисфункцією ензимів фолатного циклу. Зокрема, йдеться про феномен гіпергомоцистеїнемії [12]. Інші порушення можуть мати непрямий механізм розвитку. Наприклад, дефіцит ряду вітамінів пояснюють як порушенням всмоктування нутрієнтів у тонкій кишці у зв'язку з розвитком персистуючого ентероколіту у дітей з розладами спектру аутизму, так і поведінковими порушеннями, що передбачають обмеження харчового раціону через вибірковість у їжі при розладах спектру аутизму [20]. Ознаки мітохондріальної дисфункції, що включають підвищення сироваткової концентрації креатиніну, лактатдегідрогенази і креатинфосфокінази, є наслідком оксидативного стресу, що розвивається як через пряму дію гомоцистеїну на ферменти антиоксидантної системи, так і – непрямий вплив обумовленої біохімічними порушеннями імунної дисрегуляції, що асоційована з посиленням вироблення прооксидантних сполук [8, 21].

Отже, при генетичному дефіциті фолатного циклу у дітей з розладами спектру аутизму відзначається специфічний патерн біохімічних порушень, що відрізняється від біохімічного профілю здорових дітей, і може мати суттєве практичне значення.

Важливими є питання щодо спряженості порушень показників біохімічного профілю з патогенними поліморфними варіантами генів циклу фолієвої кислоти та відмінності в асоціаціях між різними генотипами дефіциту фолатного циклу і тими чи іншими біохімічними розладами. Дані вивчення зв'язку порушень досліджуваних біохімічних показників (OR; 95 % CI) з результатами генетичного тестування серед пацієнтів ДГ наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Результати вивчення асоціації порушень досліджуваних біохімічних показників (OR; 95 % CI) з комбінацією виявлених поліморфізмів генів ДГ (n=138)

Генотип	Гомоцистеїн	B12	B6	D3	Фолієва кислота	Креатинін	КФК	ЛДГ
MTHFR C677T	4,094; 1,851-9,051	2,841; 1,235-6,533	2,506; 1,110- 5.6601,110-	2,402; 1,068-5,401	2,367; 1,056-5,304	2,882; 1,257-6,609	3,267; 1,399-7,626	2,917; 1,2686,707
MTHFR C677T + MTHFR A1298C	5,444; 2,314-12,807	5,464; 2,320-12,872	4,992; 2,132-11,685	4,958- 2,124-11,577	4,516; 1,949-10,463	5,464; 2,320-12,872	3,857; 1,669-8,911	6,612; 2,762-15,831
MTHFR C677T+ MTRR A66G	4,737; 2,080-10,788	3,111; 1,340-7,223	2,917; 1,268-6,707	3,182; 1,362-7,431	3,598; 1,530-8,462	3,857; 1,669-8,911	3,231; 1,384-7,541	3,947; 1,780-8,756
MTHFR C677T +MTR A2756G	4,334; 1,945-9,660	3,947; 1,780-8,756	3,750; 1,701-8,265	4,737; 2,080-10,788	3,553; 1,623-7,775	3,947; 1,780-8,756	3,801; 1,708-8,461	3,725; 1,672-8,300
MTHFR C677T+ MTHFR A1298C+ MTRR A66G	6,629; 2,629- 16,718	6,261; 2,500-15,682	5,392; 2,209-13,166	7,292; 2,831-18,782	5,367; 2,179-13,218	4,911; 1,944-12,403	5,612; 2,143-14,698	4,819; 1,917-12,114
MTHFR C677T+ MTHFR A1298C+ MTR A2756G	6,432; 2,606-15,870	5,404; 2,380-12,272	5,765; 2,514-13,217	6,125; 2,649-14,163	5,921; 2,554-13,727	5,224; 2,295-11,895	4,644; 2,073-10,401	5,573; 2,424-12,811
MTHFR C677T+ MTRR A66G+ MTR A2756G	6,176; 2,570-14,842	4,871; 2,100-11,297	5,412; 2,315-12,651	5,828; 2,462-13,793	5,701; 2,406-13,508	5,701; 2,406-13,508	5,729; 2,341-14,023	3,947; 1,780-8,756
MTHFR C677T + MTHFR A1298C + MTR A2756G + MTRR A66G	7,206; 3,026-17,157	7,212; 2,861-18,177	6,657; 2,677-16,555	5,641; 2,316- 13,740	6,044; 2,456-14,873	4,583; 1,942-10,816	6,509; 2,614-16,205	6,111; 2,475-15,091

Як показують дані табл. 2, всі досліджувані генотипи асоційовані з характерним патерном біохімічних змін, про який ішлося вище, а не тільки з відхиленнями рівнів окремих біохімічних показників. Очікувана частота тих чи інших біохімічних порушень при наявності певного генотипу збільшується від 2 до 7 разів залежно від біохімічного показника та патогенного поліморфного варіанту гену ензиму циклу фолієвої кислоти. Це свідчить про комплексний характер виявлених біохімічних порушень. Для кожного досліджуваного генотипу, здебільшого характерні спряжені відхилення рівнів різних біохімічних показників, що дозволяє говорити про характерні відмінності біохімічного статусу залежно від генотипу (генотип-асоційовані біохімічні профілі). Так, для генотипу MTHFR C677T частота порушень показників біохімічного статусу збільшується в 2-4 рази, тоді як для геноти-

пу MTHFR C677T + MTHFR A1298C – в 3-6 разів. Продемонстровано неоднаковий вплив різних патогенних поліморфних варіантів генів на виразність досліджуваних біохімічних порушень. Так, для MTHFR A1298C притаманна тісніша асоціація з відхиленнями у рівнях досліджуваних біохімічних показників порівняно з MTRR A66G і MTR A2756G. Показано також, що накопичення патогенних поліморфних варіантів генів ензимів циклу фолієвої кислоти асоційовано з виразнішими змінами у біохімічному профілі (кумулятивний ефект). Відповідно до цього, найважчим з точки зору порушень біохімічного статусу є генотип MTHFR C677T + MTHFR A1298C + MTR A2756G + MTRR A66G, а найлегшим – MTHFR C677T. Гомоцистеїн з-поміж інших досліджуваних біохімічних показників тісніше асоційований з генетичним дефіцитом фолатного циклу, і зміни у його сироватковій концентрації краще від-

повідать відмінностям у генетичному дефекті пацієнта. Цю особливість можна пов'язати з прямим зв'язком феномену гіпергомоцистеїнії з метаболічним блоком, що формується при дефіциті фолатного циклу, тоді як, наприклад, на сироватковій концентрації вітамінів очікувано впливають й деякі інші чинники, такі як якість всмоктування в тонкій кишці та дієтичні особливості.

ВИСНОВКИ

Для дітей із генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованого з розладами спектру аутизму, характерний специфічний патерн біохімічних змін, що не є типовим для здорових дітей, і може пояснювати патогенез імунodefіциту та енцефалопатії. Відзначаються гіпергомоцистеїнія, дефіцит деяких вітамінів групи В та ознаки мітохондріальної дисфункції. Механізм розвитку цих біохімічних порушень може бути складним і багатокомпонентним, однак всі досліджувані біохімічні відхилення тісно асоційовані саме з патогенними поліморфними варіантами генів ензимів фолатного циклу, а їх виразність залежить як від виду патогенного поліморфного варіанту гену, так – й від кількості і композиції патогенних замін нуклеотидів в генотипі пацієнта. Найсприятливішим в біохімічному плані є генотип MTHFR C677T, тоді як найважчим є генотип із комбінацією поліморфізмів MTHFR C677T + MTHFR A1298C + MTR A2756G + MTRR A66G. Отримані дані дозволяють краще зрозуміти патогенез хвороби. Виявлений патерн біохімічних порушень може бути використаний в діагностичному процесі як при скринінгу генетичного дефіциту фолатного циклу, так і при оцінці важкості стану й проведенні клінічного моніторингу дітей з розладами спектру аутизму. Крім того, зазначені порушення можуть бути об'єктом терапевтичних втручань з метою корекції біохімічного статусу пацієнта та послаблення проявів імуносупресії та психічних порушень.

Джерела фінансування. Дослідження виконувалося як фрагмент науково-дослідної роботи на замовлення МОЗ України (№ держреєстрації 0121U107940).

ЛІТЕРАТУРА

1. Мальцев Д.В. Иммунодефицит, обусловленный генетически детерминированным нарушением фолатного цикла, у детей с расстройствами аутистического спектра // *Имунологія та алергологія: наука і практика*. – 2019. – № 1. – С. 4–22.
2. Мальцев Д.В. Оценка иммунного статуса у детей с расстройством аутистического спектра, ассоциированным с генетическим дефицитом фолатного цикла // *Лікарська справа*. – 2018. – №1-2. – С. 11–23.
3. Мальцев Д.В. Расширенный клинико-лабораторный фенотип при генетически детерминированном нарушении фолатного цикла у детей с расстройствами спектра аутизма // *Международный неврологический журнал*. – 2018. – №5 (99). – С. 13–25.
4. Al-Mosalem O.A., El-Ansary A., Attas O., Al-Ayadhi L. Metabolic biomarkers related to energy metabolism in Saudi autistic children // *Clin. Biochem.* – 2009. – Vol. 42(10-11). – P. 949–957.
5. Arab A.H., Elhawary N.A. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants Confer Potential Vulnerability to Autism Spectrum Disorder in a Saudi Community // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* – 2019. – Vol. 15. – P. 3569–3581.
6. Belardo A., Gevi F., Zolla L. et al. The concomitant lower concentrations of vitamins B6, B9 and B12 may cause methylation deficiency in autistic children // *J. Nutr. Biochem.* – 2019. – Vol. 70. – P. 38–46.
7. Bhatia P., Singh N. Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 29(6). – P. 522–528.
8. Chen L., Shi X.J., Liu H. et al. Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109) // *Transl. Psychiatry.* – 2021. – Vol. 11(1). – P. 15.
9. El-Ansary A., Hassan Wail M., Daghestani M. et al. Preliminary evaluation of a novel nine-biomarker profile for the prediction of autism spectrum disorder // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15(1). – e0227626.
10. Frustaci A., Neri M., Cesario A. et al. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52(10). – P. 2128–2141.
11. Gevi F., Belardo A., Zolla L. A metabolomics approach to investigate urine levels of neurotransmitters and related metabolites in autistic children // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* – 2020. – Vol. 1866(10). – P. 165859.
12. Guo B.Q., Li H.B., Ding S.B. et al. Blood homocysteine levels in children with autism spectrum disorder: An updated systematic review and meta-analysis // *Psychiatry Res.* – 2020. – Vol. 291. – P. 113283.
13. Haghiri R., Mashayekhi F., Bidabadi E., Salehi Z. Analysis of methionine synthase

- (rs1805087) gene polymorphism in autism patients in Northern Iran // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. – 2016. – Vol. 76(4). – P. 318–323.
14. Li B., Xu Y., Zhang X. et al. The effect of vitamin D supplementation in treatment of children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Nutr. Neurosci.* – 2020. – Vol. 7. – P. 1–11.
 15. Li Y., Qiu S., Shi J. et al. Association between MTHFR C677T/A1298C and susceptibility to autism spectrum disorders: a meta-analysis // *BMC Pediatr.* 2020. – Vol. 20(1). – P. 449.
 16. Li Y.J., Li Y.M., Xiang D.X. et al. Supplement intervention associated with nutritional deficiencies in autism spectrum disorders: a systematic review // *Eur. J. Nutr.* – 2018. – Vol. 57(7). – P. 2571–2582.
 17. Lv M.N., Zhang H., Shu Y. et al. The neonatal levels of TSB, NSE and CK-BB in autism spectrum disorder from Southern China // *Transl. Neurosci.* – 2016. – Vol. 7(1). – P. 6–11.
 18. Mead J., Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD // *Immunol. Lett.* – 2015. – Vol. 163(1). – P. 49–55.
 19. Melamed I.R., Heffron M., Testori A., Lipe K. A pilot study of high-dose intravenous immunoglobulin 5% for autism: Impact on autism spectrum and markers of neuroinflammation // *Autism Res.* – 2018. – Vol. 11(3). – P. 421–433.
 20. Mohammad N.S., Shruti P.S., Bharathi V. et al. Clinical utility of folate pathway genetic polymorphisms in the diagnosis of autism spectrum disorders // *Psychiatr. Genet.* – 2016. – Vol. 26(6). – P. 281–286.
 21. Noriega D.B., Savelkoul H.F. Immune dysregulation in autism spectrum disorder // *Eur. J. Pediatr.* – 2014. – Vol. 173(1). – P. 33–43.
 22. Pu D., Shen Y., Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis // *Autism Res.* – 2013. – Vol. 6(5). – P. 384–392.
 23. Rai V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility // *Metab. Brain Dis.* – 2016. – Vol. 31(4). – P. 727–735.
 24. Rai V. Strong Association of C677T Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene With Nosyndromic Cleft Lip/Palate (nsCL/P) // *Indian. J. Clin. Biochem.* – 2018. – Vol. 33(1). – P. 5–15.
 25. Sadeghiyeh T., Dastgheib S.A., Mirzaee-Khoramabadi K. et al. Association of MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms with susceptibility to autism: A systematic review and meta-analysis // *Asian J Psychiatr.* – 2019. – Vol. 46. – P. 54–61.
 26. Wan L., Li Y., Zhang Z., Sun Z. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases // *Transl. Psychiatry.* – 2018. – Vol. 8(1). – P. 242.
 27. Wang Z., Ding R., Wang J. et al. The Association between Vitamin D Status and Autism Spectrum Disorder (ASD): A Systematic Review and Meta-Analysis // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 13(1). – E86.
 28. Yekta ., Alpay M., Tufan A.E. et al. Comparison of serum B12, folate and homocysteine concentrations in children with autism spectrum disorder or attention deficit hyperactivity disorder and healthy controls // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* – 2019. – Vol. 15. – P. 2213–2219.

РЕЗЮМЕ

РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ БІОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ У ДІТЕЙ З РОЗЛАДАМИ СПЕКТРУ АУТИЗМУ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ГЕНЕТИЧНИМ ДЕФІЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ

Мальцев Д.В.

Інститут експериментальної і клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця

Обґрунтування. Результати останніх мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень вказують на асоціацію генетичного дефіциту фолатного циклу з розладами спектру аутизму у дітей.

Мета дослідження: вивчення біохімічних порушень у дітей з генетичним дефіцитом фолатного циклу, асоційованим з розладами спектру аутизму, для розуміння механізму формування енцефалопатії й імунodefіциту, а також – пошуку біомаркерів моніторингу стану та мішеней подальших терапевтичних втручань з попередження і/або зменшення нейротоксичності та імуносупресії.

Матеріали і методи. Досліджувану групу (ДГ) склали 138 дітей з діагнозом розладів спектру аутизму (DSM-IV-TR та ICD-10), у яких відзначався генетичний дефіцит фолатного циклу (MTHFR C677T + MTHFR A1298C і/або MTR A2756G і/або MTRR A66G; ПЛР). Контрольна група (КГ) включала 51 здорову дитину відповідного вікового і гендерного розподілу. Аналізували показники біохімічного профілю, зокрема сироваткову концентрацію гомоцистеїну, вітамінів В6, В12, D3, фолієвої кислоти, креатиніну, креатинфосфокінази (КФК) та лактатдегідрогенази (ЛДГ).

Результати та їх обговорення. Для пацієнтів ДГ характерний специфічний патерн біохімічних порушень (р 0,05; Z Z0,05). Відзначаються гіпергомоцистеїнемія, дефіцит деяких вітамінів групи В, вітаміну D3 та ознаки мітохондріальної дисфункції. Підвищення концентрації гомоцистеїну в сироватці крові дітей ДГ на момент обстеження мало місце у 88 %, знижен-

ня сироваткової концентрації вітаміну В6 – в 76 %, вітаміну В12 – в 79 %, вітаміну D3 – в 72 %, фолієвої кислоти – в 69 %, гіперкреатинінемія – в 65 %, підвищення сироваткових концентрації КФК – в 57 % та ЛДГ – в 79 % випадків.

Розрахунки відношення шансів (OR) та 95 % довірчого інтервалу (95 % CI) вказують, що всі досліджувані генотипи асоційовані з характерним патерном біохімічних змін. Очікувана частота тих чи інших біохімічних порушень при наявності певного генотипу збільшується від 2 до 7 разів, залежно від виду біохімічного показника, типу, композиції та кількості патогенних поліморфних варіантів генів ензимів циклу фолієвої кислоти з феноменом генотип-асоційованих патернів та кумулятивним ефектом.

Висновки. Для генетичного дефіциту фолатного циклу, асоційованого з розладами спектру аутизму у дітей, характерний специфічний патерн біохімічних змін, що не є типовим для здорових дітей, і може бути залученим до патогенезу імунodefіциту та енцефалопатії. Це може бути використано в діагностичному процесі при скринінгу генетичного дефіциту фолатного циклу, оцінці важкості стану й проведенні клінічного моніторингу дітей з розладами спектру аутизму. Зазначені порушення можуть бути об'єктом терапевтичних втручань з метою корекції біохімічного статусу пацієнта та послаблення проявів імуносупресії та психічних порушень.

Ключові слова: гомоцистеїн, вітаміни групи В, вітамін D3, фолієва кислота, креатинін, КФК, ЛДГ.

РЕЗЮМЕ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОХИМИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ СПЕКТРА АУТИЗМА, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА

Мальцев Д.В.

Институт экспериментальной и клинической медицины НМУ имени А.А. Богомольца

Обоснование. Результаты последних мета-анализов рандомизированных контролируемых клинических исследований указывают на ассоциацию генетического дефицита фолатного цикла и расстройств спектра аутизма у детей.

Цель исследования: изучение биохимических нарушений у детей с генетическим дефицитом фолатного цикла, ассоциированным с расстройствами спектра аутизма, для понимания механизма формирования энцефалопатии и иммунодефицита, а также – поиска биомаркеров мониторинга состояния и мишеней дальнейших терапевтических вмешательств по предупреждению и/или уменьшению нейротоксичности и иммуносупрессии.

Материалы и методы. Исследуемую группу (ДГ) составили 138 детей с диагнозом расстройств спектра аутизма (DSM-IV-TR и ICD-10), у которых отмечался генетический дефицит фолатного цикла (MTHFR C677T + MTHFR A1298C и/или MTR A2756G и/или MTRR A66G; ПЦР). Контрольная группа (КГ) включала 51 здорового ребенка соответствующего

возрастного и гендерного распределения. Анализировали показатели биохимического профиля, в частности – сывороточную концентрацию гомоцистеина, витаминов В6, В12, D3, фолієвої кислоти, креатинина, креатинфосфокиназы (КФК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Результаты и их обсуждение. Для пациентов ДГ характерен специфический паттерн биохимических нарушений ($p < 0,05$; $Z > 20,05$). Отмечаются гипергомоцистеинемия, дефицит некоторых витаминов группы В, витамина D3 и признаки митохондриальной дисфункции. Повышение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови детей ДГ на момент обследования имело место в 88 %, снижение сывороточной концентрации витамина В6 – в 76 %, витамина В12 – в 79 %, витамина D3 – в 72 %, фолієвої кислоти – в 69 %, гиперкреатининемия – в 65 %, повышение сывороточных концентраций КФК – в 57 % и ЛДГ – в 79 % случаев.

Расчеты отношения шансов (OR) и 95 % доверительного интервала (95 % CI) указывают, что все исследуемые генотипы ассоциированы с характерным паттерном биохимических изменений. Ожидаемая частота тех или иных биохимических нарушений при наличии определенного генотипа увеличивается от 2 до 7 раз в зависимости от вида биохимического показателя, типа, композиции и количества патогенных полиморфных вариантов генов ферментов цикла фолієвої кислоти с феноменом генотип-ассоциированных паттернов и кумулятивным эффектом.

Выводы. Для генетического дефицита фолатного цикла, ассоциированного с расстройствами спектра аутизма у детей, характерен специфический паттерн биохимических изменений, который не является типичным для здоровых детей, и может быть вовлечен в патогенез иммунодефицита и энцефалопатии. Это может быть использовано в диагностическом процессе при скрининге генетического дефицита фолатного цикла, оценке тяжести состояния и проведении клинического мониторинга детей с расстройствами спектра аутизма. Указанные нарушения могут быть объектом терапевтических вмешательств с целью коррекции биохимического статуса пациента и ослабления проявлений иммуносупрессии и психических нарушений.

Ключевые слова: гомоцистеин, витамины группы В, витамин D3, фолієвая кислота, креатинин, КФК, ЛДГ.

SUMMARY

THE RESULTS OF THE STUDY OF BIOCHEMICAL PROFILE INDICATORS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS ASSOCIATED WITH GENETIC DEFICIENCY OF THE FOLATE CYCLE

Maltsev D.

Institute of Experimental and Clinical Medicine at the O'Bogomolets NMU

Backgrounds. The results of recent meta-analyses of randomized controlled clinical trials indicate an association of genetic folate deficiency with autism spectrum disorders in children.

The aim of the study: to study the biochemical disorders in children with genetic deficiency of the folate cycle associated with autism spectrum disorders, to understand the mechanism of encephalopathy and immunodeficiency, as well as to find biomarkers for monitoring and targets of further therapeutic interventions to prevent and/or reduce neurotoxicity and immunosuppression..

Materials and methods. The study group (DG) consisted of 138 children diagnosed with autism spectrum disorders (DSM-IV-TR and ICD-10), who had a genetic deficiency of the folate cycle (MTHFR C677T + MTHFR A1298C and/or MTR A2756G and/or MTRR A66G; PCR). The control group (CG) included 51 healthy children of the appropriate age and gender distribution. Biochemical profile parameters were analyzed, including serum homocysteine, vitamins B6, B12, D3, folic acid, creatinine, creatine phosphokinase (CPK) and lactate dehydrogenase (LDH).

Results and discussion. Patients with DG are characterized by a specific pattern of biochemical disorders ($p < 0.05$; $Z > 0.05$). Hyperhomocysteinemia, deficiency of some B vitamins, vitamin D3 and signs of mitochondrial dysfunction are noted. An increase in the concentration of homocysteine in the serum of children DG at the time of the examination occurred in 88 %, a decrease in serum concentrations of vitamin B6 – 76 %, vitamin B12 – 79 %, vitamin D3 – 72 %, folic acid – 69 %, hypercreatininemia

– in 65 %, increased serum concentrations of CPK – in 57 % and LDH – in 79 % of cases.

Calculations of the odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) indicate that all genotypes studied are associated with a characteristic pattern of biochemical changes. The expected frequency of certain biochemical disorders in the presence of a certain genotype increases from 2 to 7 times depending on the type of biochemical indicator, type, composition and number of pathogenic polymorphic variants of folic acid cycle enzyme genes with genotype-associated patterns and cumulative effect.

Conclusions. Genetic folate deficiency associated with autism spectrum disorders in children is characterized by a specific pattern of biochemical changes that is not typical of healthy children and may be involved in the pathogenesis of immunodeficiency and encephalopathy. It can be used in the diagnostic process in screening for genetic deficiency of the folate cycle, assessing the severity of the condition and conducting clinical monitoring of children with autism spectrum disorders. These disorders can be the object of therapeutic interventions to correct the biochemical status of the patient and reduce the manifestations of immunosuppression and mental disorders.

Key words: homocysteine, B vitamins, vitamin D3, folic acid, creatinine, CPK, LDH.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

• **Мальцев Дмитро Валерійович**
Інститут експериментальної і клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, зав. лабораторією імунології і молекулярної біології
Адреса: 01601, просп. Перемоги, 34, Київ, Україна
Тел.: (068)100-85-95
E-mail: dmaltsev@ukr.net

• **Мальцев Дмитрий Валерьевич**
Институт экспериментальной и клинической медицины НМУ имени А.А. Богомольца, зав. лабораторией иммунологии и молекулярной биологии
Адрес: 01601, просп. Победы, 34, г. Киев, Украина
Тел.: (068) 100-85-95
E-mail: dmaltsev@ukr.net

• **Maltsev Dmytro**
Experimental and Clinical Medicine Institute at the O.O. Bohomolets National Medical University
Address: 34 Peremohy ave., Kyiv 01601, Ukraine
Tel.: (068) 100-85-95
E-mail: dmaltsev@ukr.net

Стаття надійшла до редакції 27.03.2021 р.