

22. Czeizel A. The activities of the Hungarian Center for Congenital anomaly Control // World Health Stat Q. – 1988. – Vol. 41. №3-4. – P.219-227.

23. EUROCAT Working Group. Surveillance of congenital anomalies in Europe 1980-1999 // EUROCAT Report 8. – Belfast: University of Ulster. – 2002. – 7 p.

24. Harris H. The principles of human biochemical genetics, 4th ed. – North-Holland, Amsterdam, Oxford, 1980. – 473 p.

25. Neilsen J., Wohlert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence

study in Arhus, Denmark // Hum. Genet. – 1991. – Vol. 87. №1. – P.81-83.

26. Preimplantation Genetic Diagnosis / Ed. J. Harper. – 2nd edition. – Cambridge University Press, 2009. – 294 p.

27. Prevalence of Genetic Conditions / Birth Defects [Электронный ресурс] // Kansas City: University of Kansas Medical Center, 2012. – Режим доступа: <http://www.kumc.edu/gcc/prof/prevalnc.html>.

28. Reed S.C. A test for heterozygous deleterious recessives // J. Hered. – 1954. – Vol. 45. – P.17-18.

**Информация об авторе:** Микитенко Дмитрий Александрович – к.м.н., доцент, Украина, Киев, 03037, ул. Максима Кривоноса, 19-а, Клиника репродуктивной медицины «НАДИЯ», Лаборатория молекулярной диагностики, e-mail: mikitenko@ukr.net

© ГОРИНА А.С., GOETZE S., КОЛЕСНИЧЕНКО Л.С. – 2013  
УДК 577.112.3:616.89

## НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНА ТРАНСПОРТЕРА СЕРОТОНИНА У ДЕТЕЙ С АУТИЗМОМ, СИНДРОМОМ ДЕФИЦИТА ВНИМАНИЯ И ГИПЕРАКТИВНОСТИ И ИХ КОМОРБИДНОСТИ

Анна Сергеевна Горина<sup>1</sup>, Simon Goetze<sup>2</sup>, Лариса Станиславовна Колесниченко<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Sick Children Hospital, Toronto, Canada, президент – М. J. Haddad; <sup>2</sup>Клиника медицинского факультета Университета Генриха Гейне, Дюссельдорф, Германия, кафедра молекулярной биологии, зав. – Dr. S. Goetze;

<sup>3</sup>Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра химии и биохимии, зав. – д.м.н., проф. Л.С. Колесниченко)

**Резюме.** Серотонинергическая система мозга играет важную роль в проявлении симптомов аутизма (синдрома Каннера) и синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ). Определялись содержание серотонина и 5-ОИУК в СМЖ, а также частота и перенос аллелей гена обратного транспортера серотонина (СЕРТ) у детей с аутизмом, сочетанным с СДВГ. У детей с СДВГ отмечено повышение в 2,3 раза частоты длинной аллели СЕРТ ( $p < 0,001$ ) и преобладание переноса длинной аллели от гетерозиготных родителей ( $p < 0,01$ ). Сходные отклонения имеют место и у детей с аутизмом, но в меньшей степени (в 2 раза,  $p < 0,001$ ). При сочетанности аутизма и СДВГ указанные отклонения выражены в наибольшей степени (в 3,6 раза,  $p < 0,001$ ). Среди родителей повышение частоты длинной аллели обнаружено только у родителей детей с СДВГ или аутизмом, сочетанным с СДВГ (в 1,2-1,3 раза,  $p < 0,05-0,01$ ). Это позволяет предположить, что СДВГ характеризуется, наряду с преимущественным наследованием длинной аллели СЕРТ, существует генетическая предрасположенность к повышенной частоте этой аллели. Аналогично повышенной частоте длинной аллели, понижение концентрации серотонина и 5-ОИУК в СМЖ имеет место как при СДВГ, так и при аутизме, но особенно (на 40-47%,  $p < 0,001$ ) выражено у детей с СДВГ и аутизмом, сочетанным с СДВГ.

**Ключевые слова:** аутизм, синдром дефицита внимания и гиперактивности, обратный транспортер серотонина, серотонин, 5-ОИУК, аллели.

## INHERITANCE OF SEROTONIN TRANSPORTER GENE IN CHILDREN WITH AUTISM ATTENTION DEFICIT AND HYPERACTIVITY DISORDER AND THEIR COMORBIDITY

A.S. Gorina<sup>1</sup>, S. Goetze<sup>2</sup>, L.S. Kolesnichenko<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Sick Children Hospital, Toronto, Canada; <sup>2</sup>Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany; <sup>3</sup>Irkutsk State Medical University, Russia)

**Summary.** Brain serotonergic system plays important role in symptoms of autism (Kanner syndrome) and Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD). We determined concentrations of 5-HT and 5-HIAA in CSF and also frequency and transmission of alleles of 5-HT transporter gene (SERT) in children with autism combined with ADHD. In children with ADHD there was a 2.3-fold increase in frequency of the long allele of SERT ( $p < 0,001$ ) and preferential transmission of the long allele from heterozygous parents ( $p < 0,01$ ). Similar changes occurred also in children with autism but to a lesser degree (2-fold,  $p < 0,001$ ). These changes are most pronounced in children having autism combined with ADHD (3,6-fold,  $p < 0,001$ ). Among parents, an increase in frequency of the long allele was observed only in parents of children having ADHD or autism combined with ADHD (1,2-1,3-fold,  $p < 0,05-0,01$ ). This allows hypothesizing that ADHD is characterized not only by preferential inheritance of the long allele but by genetic predisposition to the increased frequency of the long allele. Similarly to the increased frequency of the long allele, a decrease in CSF concentration of 5-HT and 5-HIAA occurs both in ADHD and autism but is more pronounced (by 40-47 percent,  $p < 0,001$ ) in children with ADHD and autism combined with ADHD.

**Key words:** Autism, Attention Deficit and Hyperactivity Disorder, serotonin transporter, 5-HT, 5-HIAA, alleles.

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) и аутизм (синдром Каннера) являются самыми распространенными и сложными с точки зрения ранней диагностики, этиологии и лечения заболеваниями нервно-психическими заболеваниями у детей. Частота СДВГ и аутизма в последние десятилетия растет. В настоящее время их встречаемость в разных странах составляет 132-140 на 1000 детей для СДВГ и 8,2-9,2 случая на 1000

детей для аутизма [10]. Аутизм – гетерогенный первичный синдром развития, с характерной триадой нарушения поведения: социальным дефицитом, нарушением языка и коммуникации и повторяющимися стереотипными движениями. Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – расстройство развития, начинающееся в детском возрасте и проявляющееся в трудности концентрации и поддержания внимания,

гиперактивности, импульсивности, нарушениях обуче-  
ния, памяти и обработки информации.

Серотонин, как нейротрансмиттер, ассоциируется с подавлением агрессии и страха [8]. При нейрональной активности большинство серотонина транспортируется из синаптической щели обратно в нейрон с помощью мембранного транспортера (СЕРТ), оставшийся серотонин попадает в СМЖ. При аутизме способность к синтезу серотонина понижена, и симптомы (агрессивное и антисоциальное поведение) ассоциируются с понижением конечного метаболита серотонина – 5-ОИУК в СМЖ [2].

Нарушения активности СЕРТ имеют генетическую природу. Обычно рассматриваются две аллели гена СЕРТ. Промотор длинной содержит 16 повторяющихся последовательностей, короткой – только 14 повторов. Укороченная версия промотера ассоциируется с пониженной экспрессией СЕРТ. У детей с аутизмом может наследоваться преимущественно короткая аллель [7] или, напротив, длинная [3]. Среди возможных причин противоречия – гетерогенность аутизма как заболевания, и малый объем исследовавшихся групп пациентов. Также недостаточно исследована сочетанность аутизма с другими расстройствами, в частности СДВГ. Целью настоящего исследования был анализ наследования аллелей СЕРТ на больших группах детей с СДВГ и с аутизмом, в том числе аутизмом, сочетанным с СДВГ.

### Материалы и методы

Исследовались 537 детей из Клиники медицинского факультета Университета Генриха Гейне, Дюссельдорф, Германия и Sick Children Hospital, Торонто, Канада (средний возраст 6,71±2,68 лет, 316 мальчика и 221 девочки) и их родители. Диагноз аутизма и СДВГ определялся согласно международной классификации психических заболеваний МКБ-10. Группа сравнения состояла из 229 здоровых детей и их родителей. Средний возраст группы сравнения – 6,27±2,26 лет (108 мальчиков и 121 девочка). Исследования были проведены с соблюдением международных стандартов и биоэтических норм, в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и получением добровольного информированного согласия родителей.

ДНК извлекалась из клеток цельной крови с использованием PicoPure® DNA Extraction Kit (Invitrogen, USA). Аллели определялись с помощью ПЦР в реальном времени с использованием системы TaqMan для дискриминации аллелей (Applied Biosystems, USA). Для амплификации участка, содержащего промотер, использовались два набора праймеров. Первый набор состоял из праймеров 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATTGC-3' и 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCCAC-3', амплифицирующих фрагмент 484/528 bp. Второй набор праймеров, 5'-TGAATGCCAGCACSTAACCC-3' и 5'-TCTGGTGCCACCTAGACGC-3' предназначался для амплификации фрагмента 406/450 в образцах, которые не удавалось амплифицировать по первому фрагменту. При выборе праймеров пользовались базой данных GenBank. Проводилась амплификация образцов объема 75 мкл, содержащих около 400 нг ДНК, 0,5 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждой dNTP, 2 единицы Taq полимеразы (AmpliTaq; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl и 0,001% (масса/объем) желатина. Образцы ам-

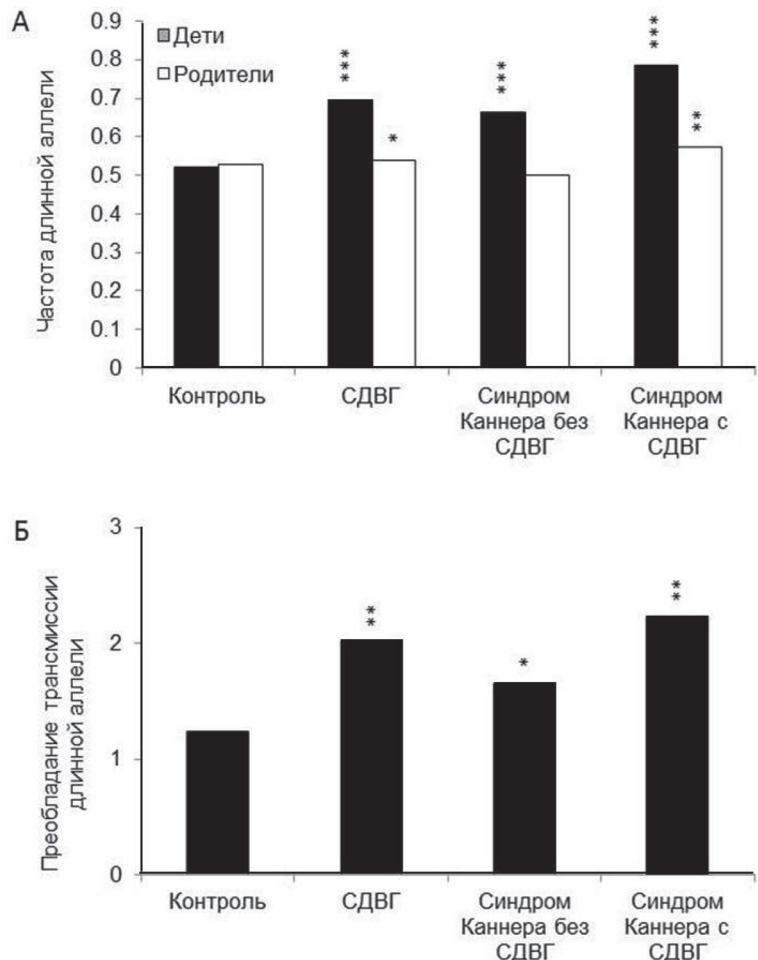
плифицировались на 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), с первоначальной денатурацией в течение 2 мин при 95°C, последующими 40 циклами амплификации (денатурация в течение 15 с при 95°C, отжиг в течение 30 с при 57°C, элонгация в течение 60 с при 75°C) и финальной элонгацией в течение 10 мин при 72°C.

Образцы СМЖ отбиралась методом люмбальной пункции и подвергались стандартной обработке и хранению (при -70 °C). Серотонин и 5-ОИУК разделялись на системе высокопроизводительной жидкостной хроматографии с переключением колонок (HPLC-725 CAP, Tosoh Corp., Япония) и измерялись методом селективной флуориметрической детекции с использованием флуориметра Шимадзу RF-10AXL (Япония). Использовались реактивы фирм Beckman и Sigma (США).

Данные представлялись как среднее ± стандартная ошибка. Для сравнения средних применялся критерий Стьюдента, корреляция определялась по Пирсону, анализ частоты аллелей с использованием критерия  $\chi^2$ . Анализ передачи аллели от гетерозиготных родителей проводился методом TDT (Transfer Disequilibrium Test).

### Результаты и обсуждение

Трио (родители-ребенок) были генотипированы на полиморфизм по короткой и длинной аллели гена СЕРТ. У детей в группе сравнения и у их родителей (рис. 1) частота длинной аллели не отличалась статистически от частоты короткой. При аутизме частота длинной аллели была в 2,0 раза выше частоты короткой ( $\chi^2=39,67$ ,  $df=1$ ,  $p<0,001$ ), при СДВГ – в 2,3 раза у детей ( $\chi^2=60,21$ ,



Обозначение: А – частота длинной аллели у детей и их родителей; Б – преобладание трансмиссии длинной аллели от гетерозиготных родителей. Статистически значимые отличия от контрольной группы: \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$ .

Рис. 1. Частотный анализ аллелей гена СЕРТ при СДВГ, синдроме Каннера и их сочетанности.

df=1, p<0,001) и в 1,2 раза у их родителей ( $\chi^2=5,09$ , df=1, p<0,05), а при сочетанности аутизма и СДВГ – в 3,6 раза у детей ( $\chi^2=55,62$ , df=1, p<0,001) и в 1,3 раза у родителей ( $\chi^2=7,14$ , df=1, p<0,01). Преимущественный перенос длинной аллели от гетерозиготных родителей наблюдался у детей с аутизмом ( $\chi^2=5,29$ , df=1, p<0,05), в большей степени при СДВГ ( $\chi^2=6,91$ , df=1, p<0,01) и особенно при сочетанности аутизма с СДВГ ( $\chi^2=7,51$ , df=1, p<0,01).

Понижение серотонина и 5-ОИУК в СМЖ при СДВГ и аутизме (табл. 1) согласуется с полученными нами ранее данными на меньшей группе пациентов

руется со стереотипным поведением и агрессией [6]. Согласуется с нашими данными и низкая серотонинергическая активность при СДВГ [13].

Повышение частоты длинной аллели СЕРТ у детей и преобладание трансмиссии длинной аллели от гетерозиготных родителей наиболее выражено при СДВГ и особенно при сочетанности СДВГ и аутизма, и в этих группах была повышена частота длинной аллели у родителей. Это позволяет предположить генетическую предрасположенность к повышенной частоте этой аллели при СДВГ. Повышенная частота и преимущественный перенос длинной аллели при СДВГ подтверждается данными литературы [9]. При аутизме возможно повышение частоты как длинной аллели [11], так и короткой [7].

Таблица 1

Концентрации серотонина и 5-ОИУК в спинномозговой жидкости (СМЖ) (нмоль/л) у детей с синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) и синдрома Каннера, дифференцированных по сочетанности с СДВГ, М±m

	Контроль (n=229)	Каннер без СДВГ (n=365)	Каннер с СДВГ (n=172)	СДВГ (n=397)
Серотонин, нмоль/л	0,51±0,02	0,32±0,01***	0,25±0,02***	0,27±0,01***
5-ОИУК, нмоль/л	89,41±1,71	81,94 ± 2,91	64,51±1,83***	52,97±2,51***
Коэффициент корреляции $r_2$	0,561***	0,503***	0,498***	0,561***

Примечания: Статистически значимые отличия от контрольной группы, статистическая значимость корреляции: \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001.

[1] и особенно выражено при сочетанности аутизма с СДВГ. Снижение серотонина и 5-ОИУК в СМЖ при аутизме подтверждается другими авторами [2] и ассоции-

руется со стереотипным поведением и агрессией [6]. Согласуется с нашими данными и низкая серотонинергическая активность при СДВГ [13].  
Повышение частоты длинной аллели СЕРТ у детей и преобладание трансмиссии длинной аллели от гетерозиготных родителей наиболее выражено при СДВГ и особенно при сочетанности СДВГ и аутизма, и в этих группах была повышена частота длинной аллели у родителей. Это позволяет предположить генетическую предрасположенность к повышенной частоте этой аллели при СДВГ. Повышенная частота и преимущественный перенос длинной аллели при СДВГ подтверждается данными литературы [9]. При аутизме возможно повышение частоты как длинной аллели [11], так и короткой [7].  
Преимущественный перенос при аутизме длинной аллели от гетерозиготных родителей частично подтверждается данными литературы [3], но возможен и преимущественный перенос короткой аллели [7]. Различные аллели взаимосвязаны с различными симптомами аутизма: преобладание длинной ассоциируется со стереотипным поведением и агрессивностью [5], а короткой – с нарушениями речи [7]. Преобладание длинной аллели СЕРТ может объяснять снижение в СМЖ содержания серотонина и 5-ОИУК. Однако корреляция между преобладанием длинной аллели и уровнем 5-ОИУК в СМЖ может отсутствовать [12].  
Полиморфизм промотора гена СЕРТ определяет только уровень экспрессии СЕРТ, тогда как уровень серотонина и серотонинергическая активность в ЦНС зависят и от других факторов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Горина А.С., Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., Михнович В.И. Изменения содержания триптофана и его метаболитов у детей с ранним детским аутизмом // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. №5. – С.19-24.
- Adamsen D., Meili D., Blau N., et al. Autism associated with low 5-hydroxyindolacetic acid in CSF and the heterozygous SLC6A4 gene Gly56Ala plus 5-HTTLPR L/L promoter variants // Molecular Genetics and Metabolism. – 2011. – Vol. 102. №3. – P.368-373.
- Arbelle S., Benjamin J., Golin M., et al. Relation of shyness in grade school children to the genotype for the long form of the serotonin transporter promoter region polymorphism // American Journal of Psychiatry. – 2003. – Vol. 160. №4. – P.671-676.
- Chiao J.Y., Blizinsky K.D. Culture-gene coevolution of individualism-collectivism and the serotonin transporter gene // Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences. – 2010. – Vol. 277. №1681. – P.529-537.
- Hessl D., Tassone F., Cordeiro L., et al. Briefreport: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X syndrome--moderating secondary genes in a "single gene" disorder // Journal of Autism and Developmental Disorders. – 2008. – Vol. 38. №1. – P.184-189.
- Kim S.J., Cox N., Courchesne R., Lord C., et al. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder // Molecular Psychiatry. – 2002. – Vol. 7. №3. – P.278-288.
- Kistner-Griffin E., Brune C.W., Davis L.K., et al. Parent-

of-origin effects of the serotonin transporter gene associated with autism // American Journal of Medical Genetics. B Neuropsychiatric Genetics. – 2011. – Vol. 156. №2. – P.139-144.

8. Popova N.K. From genes to aggressive behaviour: the role of serotonergic system. // Bioessays. – 2006. – Vol. 28. №5. – P.495-503.

9. Retz W., Freitag C.M., Retz-Junginger P., et al. A functional serotonin transporter promoter gene polymorphism increases ADHD symptoms in delinquents: interaction with adverse childhood environment // Psychiatry Research. – 2008. – Vol. 158. №2. – P.123-131.

10. Thurm A., Swedo S.E. The importance of autism research // Dialogues on Clinical Neurosciences. – 2012. – Vol. 14. №3. – P.219-222.

11. Yirmiya N., Pilowsky T., Nemanov L., et al. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism // American Journal of Medical Genetics. – 2001. – Vol. 105. №4. – P.381-386.

12. Zalsman G., Huang Y.Y., Oquendo M.A., et al. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression // American Journal of Psychiatry. – 2006. – Vol. 163. №9. – P.1588-1593.

13. Zepf F.D., Gaber T.J., Baumann D., et al. Serotonergic neurotransmission and lapses of attention in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: availability of tryptophan influences attentional performance // International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2010. – Vol. 13. №7 – P.933-941.

**Информация об авторах:** Горина Анна Сергеевна – н.с., к.б.н.; Goetze Simon – зав. кафедрой, д.м.н.; Колесниченко Лариса Станиславовна – д.м.н., проф., заведующая кафедрой, 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 1, тел.: 8 (3952) 24-36-61, e-mail: kolesnichenkols@mail.ru