

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ В АССОЦИИ С ТЯЖЕСТЬЮ АУТИЗМА У ДЕТЕЙ

Филиппова Ю.Ю., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это сложные нарушения развития нервной системы с неизвестной этиологией, высокой клинической гетерогенностью и выраженными aberrациями иммунной системы. Доказательства связи между иммунной дисфункцией и поведенческими чертами подчеркивают необходимость детального изучения функциональной активности популяций иммунных клеток для поиска механизмов патогенеза и потенциальных мишеней для терапии при РАС. Целью данного исследования было: определить уровни экспрессии IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ и TNF α в лейкоцитах периферической крови детей с легкими и тяжелыми симптомами РАС. В исследование был включен 81 ребенок с РАС (77,8% мальчиков) и 45 детей с типичным нейроразвитием (ТРД, 71,1% мальчиков). По шкале оценки детского аутизма 51 ребенок (63,0%) имел легкие симптомы аутизма (средний балл CARS 32,0 \pm 1,5) и 30 детей – тяжелые симптомы РАС (средний балл CARS 39,0 \pm 3,4). Экспрессию цитокинов в лейкоцитах периферической крови определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции с SYBRGreen. В ходе статистического анализа для приведения данных к нормальному распределению, показатели трансформировали по Боксу–Коксу. Значимость различий между группами оценивали в ходе однофакторного дисперсионного анализа с апостериорными попарными сравнениями методом Данна. Установлено, что в лейкоцитах детей с РАС, не зависимо от тяжести состояния (легкое/тяжелое течение), значимо снижена экспрессия провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-18 и IL-2, по сравнению с аналогичными показателями ТРД. У детей с легким течением РАС обнаружена низкая экспрессия TNF α , по сравнению с ТРД. У детей с тяжелым течением РАС значимо повышены уровни экспрессии IFN γ – основного цитокина Th1-лимфоцитов, без повышения экспрессии важного цитокина Treg-лимфоцитов – IL-10. Активация Th1 адаптивного иммунного ответа без компенсации цитокинами Treg-лимфоцитов, численность которых снижена при РАС, может приводить к усилению воспаления, в том числе в ЦНС, и коррелирует с тяжестью клинических симптомов РАС. Несмотря на обширные данные, свидетельствующие об дисрегуляции иммунной системы, необходимы дальнейшие исследования для выявления взаимосвязи между функционированием клеток иммунной системы и патобиологией РАС.

Ключевые слова: цитокины, лейкоциты, экспрессия, расстройства аутистического спектра, дети, иммунная дисфункция

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный
университет»
454001, Россия, г. Челябинск,
ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Yuliya Yu. Filippova
Chelyabinsk State University
129 Bratiev Kashirinykh St
Chelyabinsk
454001 Russian Federation
Phone: +7 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Филиппова, А.С. Алексеева, А.Л. Бурмистрова
«Экспрессия цитокинов лейкоцитами в ассоциации
с тяжестью аутизма у детей» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 593-598.
doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

© Филиппова Ю.Ю. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu. Yu. Filippova, A. S. Alekseeva, A. L. Burmistrova
“Leukocyte cytokine expression is associated with severity
of autism in children”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 593-598.
doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

© Filippova Yu. Yu. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

LEUKOCYTE CYTOKINE EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH SEVERITY OF AUTISM IN CHILDREN

Filippova Yu.Yu., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder with unknown etiology, high clinical heterogeneity and marked aberrations of the immune system. Evidence for an association between immune dysfunction and behavioral traits highlights the need for a study of the immune cell functional activity in order to search for pathogenesis mechanisms and potential targets for therapy at ASD. The purpose: to determine the expression levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ and TNF α in peripheral blood leukocytes of children with mild and severe ASD. The study included 81 children with ASD (77.8% boys) and 45 children with typical neurodevelopment (TDC, 71.1% boys). According to the Childhood Autism Rating Scale, 51 children (63.0%) had mild autistic symptoms (CARS score 32.0 \pm 1,5) and 30 children had severe ASD symptoms (CARS score 39.0 \pm 3,4). Cytokines expression in leukocytes was determined by quantitative PCR with SYBRGreen. The data were transformed using Box–Cox transformation. The differences between groups were assessed by one-way ANOVA and Dunn’s test for multiple comparisons. In leukocytes of children with ASD, regardless of the severity, the expression of IL-1 β , IL-18 and IL-2, was significantly reduced compared to TDC. Moreover, in children with mild ASD, low expression of TNF α , compared with TDC was found. In children with severe ASD, the expression of the main cytokine of Th1 – IFN γ , was significantly increased, without an increased expression of an important cytokine of Treg – IL-10. Activation of the Th1 adaptive immune response without compensation by cytokines of Treg, the number of which is reduced in ASD, can lead to increased inflammation, even in the central nervous system, and correlates with the severity of ASD clinical symptoms. Despite extensive immunological evidence suggesting immune system dysregulation, further research is required to clarify the relationship between immune system cell function and ASD pathology.

Keywords: cytokines, leukocytes, expression, autism spectrum disorders, children, immune dysfunction

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) – это сложные нарушения развития нервной системы с неизвестной этиологией, высокой клинической гетерогенностью и выраженными aberrациями иммунной системы [6].

В течение нескольких десятилетий исследования в популяциях людей и на животных моделях продемонстрировали доказательства нарушений в функционировании врожденной и адаптивной иммунной систем при РАС, включая активацию иммунных клеток, продукцию аутоантител, дисбаланс цитокинов и хемокинов как в мозге, так и на периферии [10]. Согласно теории материнской иммунной активации (МИА), инфекции и некоторые эпигенетические процессы могут вызывать сильный провоспалительный ответ матери во время беременности, что потенциально увеличивает риск развития РАС у плода [7]. Более того, авторами было показано, что повышенная активация Th1-лимфоцитов и нарушение балан-

са Т-эффекторных/Т-регуляторных клеток связана с более выраженными поведенческими нарушениями при РАС [5, 6]. Доказательства связи между иммунной дисфункцией и поведенческими чертами подчеркивают необходимость дальнейшего изучения функциональной активности популяций иммунных клеток, для поиска механизмов патогенеза и потенциальных мишеней для терапии при РАС [8].

Цель исследования – определить уровни экспрессии IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ и TNF α в лейкоцитах периферической крови детей с легким и тяжелым течением РАС.

Материалы и методы

Набор детей с РАС проводили в МБУ СО социально-реабилитационный центр «Здоровье» г. Челябинск. Критериями включения в группу РАС были: диагнозы по МКБ-10: F84.0 – Ранний детский аутизм, F84.1 – Атипичный аутизм и F83,1 – Задержка психоречевого развития с

аутистически подобным поведением; отсутствие выявленных генетических нарушений и тяжелых соматических патологий; отсутствие аллергических реакций и острых респираторно-вирусных инфекций на момент обследования. При оценке тяжести состояния на основе рейтинговой шкалы оценки детского аутизма (CARS) из 81 человека (77,8% мальчиков) в возрасте 3-14 лет (медианный возраст 6,0 лет), 51 ребенок (63,0%) имел легкие симптомы аутизма (средний балл CARS $32,0 \pm 1,5$) и 30 детей (37,0%) – тяжелые симптомы РАС (средний балл CARS $39,0 \pm 3,4$).

Контрольную группу составили 45 детей (71,1% мальчиков) с типичным нейроразвитием (ТРД) в возрасте 4-13 лет (медианный возраст 9,0 лет), не имеющих тяжелых соматических заболеваний и психопатологий; с отсутствием аллергических реакций и острых респираторно-вирусных инфекций на момент обследования. Группы были сопоставимы по полу, но возраст ТРД был значимо выше, чем у детей с РАС. Набор в исследование осуществлялся после подписания родителями или законными представителями детей информированного согласия.

В качестве материала для исследования использовали 4 мл венозной крови, собранной после ночного голодания между 08:00–09:00 часами утра в пробирки с консервантом К₃ЭДТА. Получение фракции лейкоцитов из цельной крови, выделение общей РНК, оценку ее количества и качества осуществляли стандартными методами, как описано ранее [1]. Уровень экспрессии мРНК цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 IFN γ и TNF α определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием реактивов для количественной ПЦР с SYBRGreen («Синтол», Москва) на приборе ДТ-прайм («ДНК-диагностика», Москва). Программа для амплификации, а также праймеры для мРНК цитокинов и гена домашнего хозяйства (GAPDH) были взяты из статьи Plotnikova и соавт. [9]. Относительные уровни экспрессии генов цитокинов рассчитывали с использованием метода прямого сравнения результатов реакции для целевого и контрольного генов: 2- $\Delta\Delta$ CT.

В ходе статистического анализа для приведения данных к нормальному распределению, показатели трансформировали по Боксу–Коксу. Для вычисления среднего значения и 95% доверительного интервала (ДИ) проводили наивную ретрансформацию. Значимость различий между группами оценивали в ходе однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с апостериорными попарными сравнениями методом Данна. Двумерные корреляции между

уровнями экспрессии цитокинов в лейкоцитах периферической крови и концентрацией цитокинов в плазме крови оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Все расчеты выполнены в программе PAST v. 4.09.

Результаты и обсуждение

Хотя РАС не являются классическими иммуноопосредованными расстройствами, данные литературы убедительно свидетельствуют о нарушении двунаправленных взаимодействий между иммунной и центральной нервной системами (ЦНС) при РАС, что приводит к хроническому слабовыраженному воспалению, как в ЦНС, так и на периферии [3]. Ранее нами также было показано, что дети с тяжелым течением РАС (согласно CARS) демонстрировали высокие уровни IFN γ и IL-6 в плазме крови, что может отражать наличие у них системного хронического низкоуровневого воспаления [2].

В настоящем исследовании нами предпринята попытка оценить влияние воспалительного окружения на цитокиновую функцию лейкоцитов периферической крови или их возможный вклад в системный воспалительный потенциал у детей, в зависимости от наличия/отсутствия РАС и его тяжести.

Профили экспрессии мРНК цитокинов: IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-2, TNF α , IFN γ , IL-4 и IL-10, в лейкоцитах периферической крови детей с РАС и ТРД представлены в таблице 1.

Оценка зависимости между уровнями экспрессии цитокинов в лейкоцитах и их концентрацией в плазме у всех обследованных групп детей показала, что уровни экспрессии IL-6 ($r = 0,205$; $p = 0,021$), IFN γ ($r = 0,175$; $p = 0,044$), IL-1 β ($r = 0,195$; $p = 0,028$) и IL-4 ($r = 0,369$; $p = 0,012$) имеют значимые корреляции между плазмой и лейкоцитами. Такие результаты, как продемонстрировано Kutuk M.O. и соавт. [4], могут, вероятно, говорить о вкладе лейкоцитов в системный воспалительный потенциал.

При анализе уровней экспрессии установлено, что в лейкоцитах детей с РАС, не зависимо от тяжести состояния (легкое/тяжелое течение), значимо снижена экспрессия провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-18 и IL-2, по сравнению с аналогичными показателями ТРД. Кроме того, у детей с легким течением РАС обнаружена низкая экспрессия TNF α по сравнению с ТРД (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА, М (95% ДИ)

TABLE 1. PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES CYTOKINE EXPRESSION WITH DIFFERENT SEVERITY AUTISM SPECTRUM DISORDERS AT CHILDREN, M (95% CI)

Показатель, у. е. Indicator, с. у.	ТРД TDC (n = 45)	Легкое течение РАС Mild ASD (n = 51)	Тяжелое течение РАС Severity ASD (n = 30)	one-way ANOVA	
				F (df ₁ -df ₂)	p
IL-6	5,05 (3,06-8,23)	7,80 (5,06-11,45)	9,28 (4,91-15,99)	0,525 (2-123)	0,593
IL-1β	5,35 (3,35-8,35)	2,15* (1,41-3,16)	2,13* (1,37-3,15)	8,259 (2-123)	< 0,001
IL-18	0,04 (0,02-0,09)	0,01* (0,006-0,020)	0,01* (0,005-0,030)	4,354 (2-123)	0,015
TNFα	0,66 (0,49-0,89)	0,40* (0,30-0,54)	0,51 (0,36-0,74)	3,087 (2-123)	0,049
IFNγ	11,55 (7,24-17,23)	18,80 (13,14-25,34)	31,51* ** (23,32-40,86)	8,01 (2-123)	< 0,001
IL-2	6,46 (4,70-8,56)	3,03* (2,19-4,29)	3,08* (1,98-4,60)	3,419 (2-123)	0,036
IL-4	1,40 (1,10-1,79)	1,28 (0,96-1,68)	1,19 (0,83-1,75)	0,645 (2-123)	0,527
IL-10	11,23 (9,09-13,68)	9,00 (7,41-10,76)	11,35 (8,46-14,82)	1,963 (2-123)	0,145

Примечание. ТРД – дети с типичным нейроразвитием, РАС – расстройства аутистического спектра; * – значимые различия между показателями ТРД и детей с РАС ($p \leq 0,05$); ** – значимые различия между показателями детей с легким и тяжелым течением аутизма ($p \leq 0,05$).

Note. TDC, typical neurodevelopment children; ASD, autism spectrum disorders; *, significant differences between the indicators of TDC and children with ASD ($p \leq 0.05$); **, significant differences between the indicators of children with mild and severe autism ($p \leq 0.05$).

Тяжесть симптомов по шкале CARS у детей с РАС нашла отражение только в уровнях экспрессии IFNγ, которые в лейкоцитах периферической крови детей с тяжелым течением РАС были значимо повышены, как по сравнению с ТРД, так и по сравнению с детьми с легким течением РАС (табл. 1). В уровнях экспрессии IL-4, IL-6, и IL-10 значимых различий между группами не обнаружено (табл. 1).

При дополнительной оценке влияния возраста на экспрессию цитокинов лейкоцитами в каждой группе детей (согласно классификации ВОЗ: до 6 лет, 7-12 и > 13 лет) значимых разли-

чий не обнаружено, что согласуется с данными Kutuk M.O. и соавт. [4].

Заключение

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать о значительной дисрегуляции цитокиновой функции лейкоцитов периферической крови у детей с РАС, которая имеет выраженные отличия в зависимости от тяжести симптомов РАС и, вероятно, может быть отражением наличия/отсутствия воспалительного потенциала на периферии.

Так, у детей с легким течением РАС, нами не обнаружено повышения уровней провоспалительных цитокинов в плазме крови, что, видимо, поддерживается низкими уровнями экспрессии основных провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-18, TNF α и IL-2 в лейкоцитах.

У детей с тяжелым течением РАС, напротив, показано системное низкоуровневое воспаление, которое обусловлено, прежде всего, высокими концентрациями в плазме крови IFN γ и IL-6, на фоне низких значений противовоспалительного цитокина – IL-10. Профиль экспрессии цитокинов лейкоцитами детей с тяжелым течением РАС продемонстрировал высокие уровни IFN γ – основного цитокина Th1-лимфоцитов, на фоне низких значений экспрессии провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-18 и IL-2, без повышения экспрессии важного цитокина Treg-лимфоцитов – IL-10. Согласно данным литературы, активация Th1 адаптивного иммунного ответа без компенсации цитокинами Treg-лимфоцитов, численность которых снижена при

РАС, может приводить к усилению воспаления, в том числе в ЦНС, и коррелирует с тяжестью клинических симптомов РАС [5, 6]. Кроме Th1-лимфоцитов, продуцентами IFN γ могут выступать естественные киллеры, численность которых по данным Nie Z.K. и соавт. также повышена у детей с РАС [8].

Высокие концентрации IL-6 в плазме крови детей с тяжелым течением РАС могут быть ассоциированы не только с экспрессией данного цитокина лейкоцитами периферической крови (уровни экспрессии которого не имеют значимых различий между группами), но и его продукцией другими клетками организма, прежде всего, эндотелием сосудов.

Несмотря на обширные данные, свидетельствующие о дисрегуляции иммунной системы, необходимы дальнейшие исследования, для выявления взаимосвязи между функционированием популяций иммунных клеток и патобиологией РАС [4].

Список литературы / References

1. Бурмирова А.Л., Алексеева А.С., Казо М.Е., Филиппова Ю.Ю. Лейкоцитарная сигнатура микроРНК в контексте хронического системного воспаления при сосудистой деменции // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 399-404. [Burmistrova A.L., Alekseeva A.S., Cazaux M.E., Filippova Yu.Yu. MicroRNA signature of leukocytes in the context of chronic systemic inflammation in vascular dementia. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 399-404. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO.
2. Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмирова А.Л. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей // Клиническая лабораторная диагностика, 2022. Т. 67, № 11. С. 647-651. [Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. Cytokines and neurotrophic factors in assessing the severity of autism in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, Vol. 67, no. 11, pp. 647-651. (In Russ.)]
3. Dipasquale V., Cutrupi M.C., Colavita L., Manti S., Cuppari C., Salpietro C. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: role of high mobility group box 1 protein. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 3, pp. 148-155.
4. Kutuk M.O., Tufan E., Gokcen C., Kilicaslan F., Karadag M., Mutluer T., Yektas C., Coban N., Kandemir H., Buber A., Coskun S., Acikbas U., Guler G., Topal Z., Celik F., Altintas E., Giray A., Aka Y., Kutuk O. Cytokine expression profiles in Autism spectrum disorder: A multi-center study from Turkey. *Cytokine*, 2020, Vol. 133, 155152. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155152.
5. Li X., Chauhan A., Sheikh A.M., Patil S., Chauhan V., Li X.M., Ji L., Brown T., Malik M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.*, 2009, Vol. 207, pp. 111-116.
6. Masi A., Glozier N., Dale R., Guastella A.J. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci. Bull.*, 2017, Vol. 33, no. 2, pp. 194-204.
7. Meltzer A., van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 284-298.
8. Nie Z.Q., Han D., Zhang K., Li M., Kwon H.K., Im S.H., Xu L., Yang J., Li Z.W., Huang X.W., Wen J., Shu-Jun Y., Yin F., Shen C., Ashwood P., Kang C.Y., Cao X. TH1/Treg ratio may be a marker of autism in children with immune dysfunction. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2023, Vol. 101, 102085. doi: 10.1016/j.rasd.2022.102085.

9. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 430, pp. 51-55.

10. Singh R., Kisku A., Kungumaraj H., Nagaraj V., Pal A., Kumar S., Sulakhiya K. Autism spectrum disorders: a recent update on targeting inflammatory pathways with natural anti-inflammatory agents. *Biomedicines*, 2023, Vol. 11, no. 1, 115. doi: 10.3390/biomedicines11010115.

Авторы:

Филиппова Ю.Ю. — д.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Алексеева А.С. — аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Alekseeva A.S., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023