

ПРИЗНАКИ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Чудакова Ю.М.¹, Никитина С.Г.², Балакирева Е.Е.²,
Шмарин В.В.^{1,3}, Салимова Т.А.^{1,4}, Мартынов А.В.¹, Шмарина Г.В.^{1,5},
Костюк С.В.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

² ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

³ ФГАОУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это гетерогенная группа нарушений развития психики и нервной системы. Пациенты с РАС характеризуются нарушениями коммуникативной, когнитивной сфер и навязчивым поведением. Патогенез и этиология РАС до сих пор не ясны. Согласно литературным данным, пациенты, страдающие РАС, имеют не только психические, но и соматические нарушения, в том числе и изменения иммунной системы.

Целью настоящей работы было исследование концентраций цитокинов в плазме крови детей с РАС и оценка уровня экспрессии провоспалительных генов в мононуклеарах периферической крови.

В клиническую группу вошел 71 ребенок в возрасте 4–12 лет с диагнозом «РАС» (F84.02). Пациенты набрали более 36 баллов по шкале оценки детского аутизма (CARS). В контрольную выборку вошли 27 условно здоровых детей того же возраста.

В данном исследовании использовались следующие методы: выделение мононуклеаров из гепаринизированной периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина, оценка концентрации цитокинов с использованием коммерчески доступных иммуноферментных наборов, выделение тотальной РНК, обратная транскрипция с использованием случайных гексапраймеров, полимеразная цепная реакция в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green.

Концентрация провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8, IL-17A в плазме периферической крови детей с РАС была статистически значимо повышена в сравнении с контрольной выборкой. При этом концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 у пациентов с РАС была в 3,6 раза ниже в сравнении с контрольной выборкой ($p < 0,001$).

Адрес для переписки:

Чудакова Юлия Михайловна
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени
академика Н.П. Бочкова»
115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1.
Тел.: 8 (915) 472-17-78.
E-mail: julia.chudakova@yandex.ru

Address for correspondence:

Chudakova Yulia M.
Research Centre For Medical Genetics
1 Moskvorechye St
Moscow
115478 Russian Federation
Phone: +7 (915) 472-17-78.
E-mail: julia.chudakova@yandex.ru

Образец цитирования:

Ю.М. Чудакова, С.Г. Никитина, Е.Е. Балакирева,
В.В. Шмарин, Т.А. Салимова, А.В. Мартынов,
Г.В. Шмарина, С.В. Костюк «Признаки иммунных
нарушений у детей с расстройствами аутистического
спектра» // Российский иммунологический журнал,
2024. Т. 27, № 4. С. 819-824.
doi: 10.46235/1028-7221-16837-IAI

© Чудакова Ю.М. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu. M. Chudakova, S. G. Nikitina, E. E. Balakireva,
V. V. Shmarin, T. A. Salimova, A. V. Martynov, G. V. Shmarina,
S. V. Kostyuk “Immune alterations in children with autism
spectrum disorders”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4,
pp. 819-824.
doi: 10.46235/1028-7221-16837-IAI

© Chudakova Yu. M. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16837-IAI

Уровень экспрессии генов NF-κB1, IL1β, IL8 и TNFα на уровне РНК в мононуклеарах периферической крови был значимо повышен в 2,8, 2,5, 4,8 и 4,2 раза у пациентов с РАС в сравнении с контрольной выборкой (все $p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о значимом повышении концентраций провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-8, IL-17A) в плазме крови и понижении концентраций противовоспалительных цитокинов (IL-10) у больных РАС по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: цитокины, мононуклеары, экспрессия, расстройства аутистического спектра, дети, иммунная дисфункция, NF-κB1

IMMUNE ALTERATIONS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Chudakova Yu.M.^a, Nikitina S.G.^b, Balakireva E.E.^b, Shmarin V.V.^{a,c},
Salimova T.A.^{a,d}, Martynov A.V.^a, Shmarina G.V.^{a,e}, Kostyuk S.V.^a

^a Research Centre For Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

^b Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russian Federation

^e P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of mental and nervous system disorders. Patients with ASD are characterized by communication and cognitive impairments and obsessive behavior. The pathogenesis and etiology of ASD are still unclear. According to the literature, patients suffering from ASD have not only mental, but also somatic disorders, including changes in the immune system. The aim of this work was to study the concentration of cytokines in the blood plasma of children with ASD and the level of expression of proinflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells. The clinical group included 71 children aged 4-12 years with a diagnosis of ASD (F84.02). Patients scored more than 36 on the Childhood Autism Rating Scale (CARS). The control sample included 27 apparently healthy children of the same age. The following methods were used in this study: isolation of mononuclear cells from heparinized peripheral blood, Ficoll-Vero-grafin density gradient centrifugation, evaluation of cytokine blocks using commercially available enzyme immunoassay kits, isolation of random total RNA, reverse transcription using hexaprimers, and real-time polymerase chain reaction using intercalating dye SYBR Green. The concentration of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-8, and IL-17A in the peripheral blood plasma of children with ASD was statistically significantly increased compared to the control sample. Moreover, the concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with ASD was 3.6 times lower compared to the control sample ($p < 0.001$). The level of expression of the NF-κB1, IL1β, IL8 and TNFα genes at the RNA level in peripheral blood mononuclear cells was increased by 2.8, 2.5, 4.8 and 4.2 times in patients with ASD compared to the control sample (all $p < 0.01$). The results obtained indicate an increase in the concentration of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-8, IL-17A) in the blood plasma and a decrease in the concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-10) in patients with ASD compared to the control sequence.

Keywords: cytokines, mononuclear cells, expression, autism spectrum disorders, children, immune dysfunction, NF-κB1

Введение

Расстройство аутистического спектра (РАС) – это группа нарушений нервно-психического развития, характеризующаяся трудностями в социальном общении и взаимодействии, а также повторяющимися моделями поведения и интересов. Распространенность заболевания в мире

на 2020 оценивалась как 1 пациент с РАС на 59 человек [5].

Этиология и механизмы патогенеза РАС до сих пор до конца не ясны, так как исследования в этой области осложняются гетерогенностью заболевания. Этиопатогенез РАС связывают с дисфункцией иммунной системы, нарушением активности митохондрий и окислительным

стрессом [6]. Посмертные исследования тканей мозга пациентов с РАС выявили признаки нейровоспаления: активация микроглии, повышение экспрессии генов провоспалительных факторов [7, 14]. Кроме того, в плазме и сыворотке пациентов с РАС было обнаружено повышение концентрации провоспалительных цитокинов, положительно коррелировавшее с выраженностью поведенческих нарушений [8, 12]. Современные исследования показали повышенную частоту встречаемости аллергических и аутоиммунных заболеваний у пациентов с РАС [13, 15].

Характерной особенностью РАС является истощение антиоксидантных систем и развитие хронического оксидативного стресса [1, 6]. На клеточном уровне избыточная продукция свободных радикалов может приводить к активации транскрипционного фактора NF-κB1 и повышению экспрессии провоспалительных цитокинов [10].

Целью данной работы явилось исследование уровня экспрессии провоспалительных цитокинов и транскрипционного фактора NF- B1 в мононуклеарах периферической крови пациентов с тяжелым течением РАС.

Материалы и методы

Пациенты. В исследовании принимали участия пациенты (n = 71) с диагнозом «РАС» (F84.02) в возрасте 4-12 лет, наблюдавшиеся в стационаре ФГБНУ «Научный центр психического здоровья».

Все пациенты были охарактеризованы с использованием международных шкал AMSE (Исследование психического статуса при аутизме) [2], CARS (шкала оценки детского аутизма) [11], SCQ (анкета общения [9]). Для участия в исследовании отбирались пациенты с тяжелым течением РАС, набравшие по шкале CARS более 36 баллов, без нарушений нервной системы известной этиологии (синдром Ретта, туберозный склероз, синдром Мартина—Белл). Контрольная

группа включала 27 условно здоровых детей соответствующего возраста, прошедших физический осмотр, ЭЭГ и анализ крови. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ МГНЦ.

Выделение мононуклеаров периферической крови. Забор венозной крови в количестве 4 мл осуществлялся с использованием пробирок с антикоагулянтом (Li-Нeparin).

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли по стандартной методике, центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (1,077 г/см³) (НПП «ПанЭко», Россия).

Исследование концентрации цитокинов. Забор венозной крови в количестве 4 мл осуществлялся с использованием пробирок с антикоагулянтом (K₃-ЭДТА). В образцах плазмы определяли содержание цитокинов (IL-1β, TNFα, IL-8, IL-17A, IL-10 и IFNγ) с использованием коммерчески доступных иммуноферментных наборов (ООО «Цитокин», Россия).

Оценка уровня экспрессии генов транскрипционных факторов и провоспалительных цитокинов в МПК. Тотальная РНК выделялась с использованием набора RNeasy Mini kit Qiagen (Германия) по стандартной методике. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) с использованием случайных гексапраймеров. ПЦР в реальном времени проводили в трех повторах в амплификаторе Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. В качестве референсного гена был выбран ген *TBP*. Анализ результатов проводили с использованием калибровочной кривой. Использованные в исследовании праймеры представлены в таблице 1.

Статистический анализ данных проводился с использованием MS Excel, Statistica 6.0 и StatGraph с помощью U-критерия Манна—Уитни. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 1. PRIMERS USED IN THE STUDY

Ген Gene	Праймеры Primers	
	F	R
<i>IL1β</i>	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
<i>IL8</i>	GCACCGACTTTGGAGTTGG	GGACCCCTCAAACGACTGT
<i>TNFα</i>	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
<i>NF-κB1</i>	CAGATGGCCCATACCTTCAAAT	CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT
<i>TBP</i>	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTTCGTGGCTCTCT

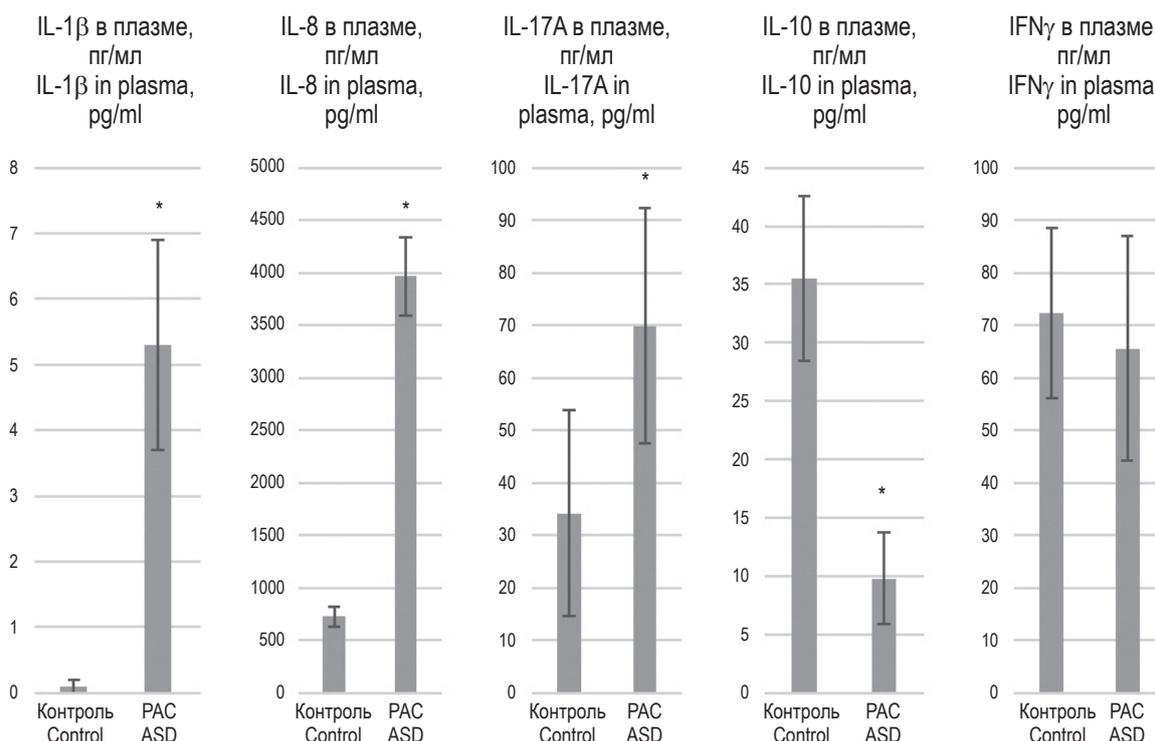


Рисунок 1. Концентрации цитокинов в плазме здорового контроля и пациентов с PAC

Примечание. * – $p < 0,005$ согласно критерию Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Figure 1. Cytokine concentrations in plasma of healthy controls and ASD patients

Note. *, $p < 0.005$ according to the Mann–Whitney test. Data are presented as mean \pm standard deviation.

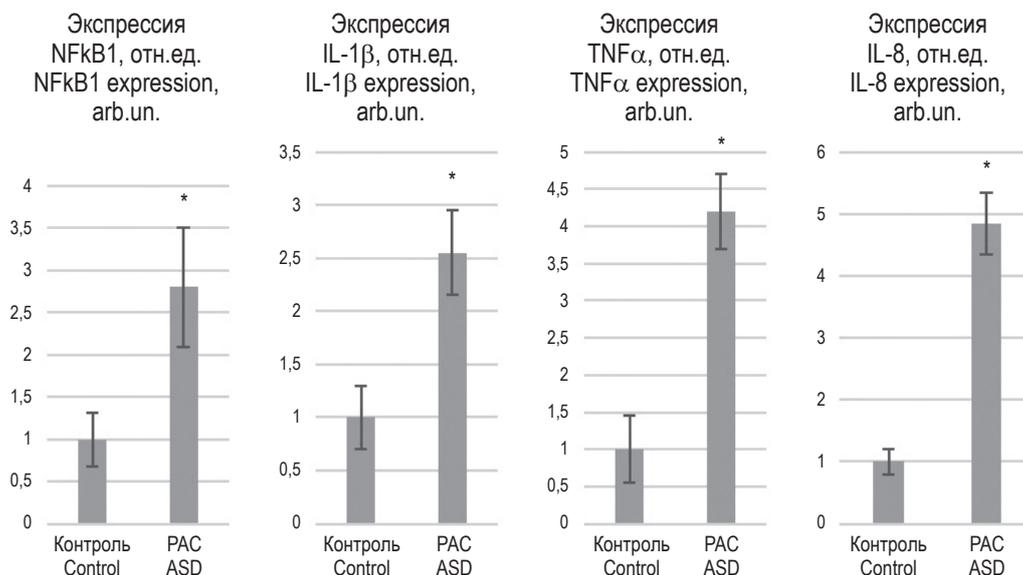


Рисунок 2. Экспрессия NF-κB1 и провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-8 и TNFα в МПК здорового контроля и детей с PAC

Примечание. * – $p < 0,01$ согласно критерию Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Figure 2. Expression of NF-κB1 and pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-8 and TNFα in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and children with ASD

Note. *, $p < 0.01$ according to the Mann–Whitney test. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты исследования концентрации цитокинов в образцах плазмы пациентов с РАС и условно здорового контроля. У детей с РАС уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8, IL-17A были статистически значимо выше соответствующих показателей в контрольной группе. В то же время концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 в группе с РАС была в 3,6 раза ниже, чем у детей из контрольной группы ($p < 0,001$).

Группы детей с РАС и здорового контроля не отличались между собой по уровню IFN γ . Концентрация TNF α в образцах плазмы большинства участников исследования были ниже порога чувствительности метода. Корреляционный анализ не выявил зависимости между значениями показателей тяжести заболевания CARS и уровнем цитокинов.

На рисунке 2 представлены результаты исследования уровней экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B1 и генов провоспалительных

цитокинов IL-1 β , IL-8 и TNF α в МПК пациентов РАС и здорового контроля. Как видно на рисунке, уровень РНК-транскриптов NF- κ B1 у детей с РАС был в 2,8 раза выше соответствующего показателя в контрольной группе ($p < 0,01$). Сходным образом в группе детей с РАС содержание РНК-транскриптов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8 и TNF α в 2,5, 4,8 и 4,2 раза превышало соответствующие параметры в группе контроля (все $p < 0,01$).

Заключение

Полученные нами результаты подтверждают гипотезу о роли иммунной системы в патогенезе РАС. Недавние исследования выявили признаки нарушения целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у пациентов с РАС [4]. Таким образом, есть все основания полагать, что провоспалительные цитокины и МПК с высокой экспрессией провоспалительных факторов могут проникать в ЦНС из системного кровотока и усиливать нейровоспаление за счет активации клеток микроглии [3].

Список литературы / References

1. Никитина С.Г., Ершова Е.С., Чудакова Ю.М., Шмарина Г.В., Вейко Н.Н., Мартынов А.В., Костюк С.Э., Модестов А.А., Рожнова Н.М., Ижевская В.Л., Костюк С.В., Симашкова Н.В. Окислительные повреждения ДНК клеток периферической крови и внеклеточной ДНК плазмы крови как показатель тяжести окислительного стресса при расстройствах аутистического спектра и шизофрении у детей // Психиатрия, 2021. Т. 19. С. 15-25. [Nikitina S.G., Ershova E.S., Chudakova J.M., Shmarina G.V., Veiko N.N., Martynov A.V., Kostuk S.E., Modestov A.A., Rozhnova T.M., Izhevskaya V.L., Kostuk S.V., Simashkova N.V. Oxidative DNA damage of peripheral blood cells and blood plasma cell-free DNA as an indicator of the oxidative stress level in children with autism spectrum disorders and schizophrenia. *Psikhiatriya = Psychiatry*, 2021, Vol. 19, no. 4, pp. 15-25. (In Russ.)]
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), Fifth Edition. *Amer. Psychiatric Pub. Inc.*, 2022. 50 p. Available at: <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>.
3. Arenella M., Matuleviciute R., Tamouza R., Leboyer M., McAlonan G., Bralten J., Murphy D. Immunogenetics of autism spectrum disorder: A systematic literature review. *Brain. Behav. Immun.*, 2023, Vol. 114, pp. 488-499.
4. Cheng Y., Dese S., Martinez A., Worthen R.J., Jope R.S., Beurel E. TNF α disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice. *Brain. Behav. Immun.*, 2018, Vol. 69, pp. 556-567.
5. Chiarotti F., Venerosi A. Epidemiology of autism spectrum disorders: a review of worldwide prevalence estimates since 2014. *Brain Sci.*, 2020, Vol. 10, 274. doi: 10.3390/brainsci10050274.
6. Hallmayer J., Cleveland S., Torres A., Phillips J., Cohen B., Torigoe T., Miller J., Fedele A., Collins J., Smith K., Lotspeich L., Croen L.A., Ozonoff S., Lajonchere C., Grether J.K., Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2011, Vol. 68, pp. 1095-102.
7. Lee A.S., Azmitia E.C., Whitaker-Azmitia P.M. Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain. Behav. Immun.*, 2017, Vol. 62, pp. 193-202.
8. Masi A., Glozier N., Dale R., Guastella A.J. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci. Bull.*, 2017, Vol. 33, pp. 194-204.
9. Moody E.J., Reyes N., Ledbetter C., Wiggins L., DiGuiseppi C., Alexander A., Jackson S., Lee L.-C., Levy S.E., Rosenberg S.A. Screening for Autism with the SRS and SCQ: Variations across Demographic, Developmental and Behavioral Factors in Preschool Children. *J. Autism Dev. Disord.*, 2017, Vol. 47, pp. 3550-3561.
10. Mulero M.C., Huxford T., Ghosh G. NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral Components of Immune System Signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1172, pp. 207-226.
11. Scholper E., van Bourgondien M.E., Wellman G.J., Love S.R. (CARS-2) Childhood Autism Rating Scale. *Pro Ed*, 2010.
12. Siniscalco D., Schultz S., Brigida A.L., Antonucci N. Inflammation and neuro-immune dysregulations in autism spectrum disorders. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, Vol. 11, pp. 1-14.

13. Takada R., Toritsuka M., Yamauchi T., Ishida R., Kayashima Y., Nishi Y., Ishikawa M., Yamamuro K., Ikehara M., Komori T., Noriyama Y., Kamikawa K., Saito Y., Okano H., Makinodan M. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-induced macrophages of individuals with autism spectrum disorder adversely affect neuronal dendrites through the secretion of pro-inflammatory cytokines. *Mol. Autism*, 2024, Vol. 15, 10. doi: 10.1186/s13229-024-00589-2.

14. Velmeshev D., Schirmer L., Jung D., Haeussler M., Perez Y., Mayer S., Bhaduri A., Goyal N., Rowitch D.H., Kriegstein A.R. Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 2019, Vol. 364, pp. 685-689.

15. Xu G., Snetselaar L.G., Jing J., Liu B., Strathearn L., Bao W. Association of food allergy and other allergic conditions with autism spectrum disorder in children. *JAMA Netw. Open*, 2018, Vol. 1, pp. e180279. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2018.0279.

Авторы:

Чудакова Ю.М. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Никитина С.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Балакирева Е.Е. — к.м.н., и.о. руководителя отдела, ведущий научный сотрудник отдела детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Шмарин В.В. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; студент 5-го курса ФГАОУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Салимова Т.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; студентка ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

Мартынов А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Шмарина Г.В. — к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; доцент кафедры биологии медицинского факультета ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Костюк С.В. — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Authors:

Chudakova Yu.M., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Nikitina S.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Child Psychiatry, Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

Balakiyeva E.E., PhD (Medicine), Acting Head of Department, Leading Research Associate, Department of Child Psychiatry, Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

Shmarin V.V., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics; 5th year Student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Salimova T.A., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics; Student, MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russian Federation

Martynov A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Shmarina G.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics; Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Medicine, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Kostyuk S.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Molecular Biology, Research Centre For Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 03.04.2024

Принята к печати 25.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 03.04.2024

Accepted 25.04.2024