

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л.

ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ АУТИЗМА У ДЕТЕЙ

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», 454001, Челябинск, Россия

В связи с неуклонным ростом числа детей с аутизмом и высокой гетерогенностью клинических групп, диагностика данных расстройств и их тяжести является актуальной проблемой современной медицины. В ходе работы обследованы 126 детей от 3 до 13 лет с типичным нейроразвитием и детей с тяжелой и легкой степенью расстройств аутистического спектра (РАС). Степень тяжести определена согласно рейтинговой шкале детского аутизма (CARS). В плазме крови проведена оценка уровня некоторых про-/противовоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов (фактора роста нервов бета и нейротрофического фактора мозга) методом иммуноферментного анализа. Связи между показателями в каждой группе обследованных оценены с помощью критерия Спирмена и визуализированы в виде тепловой карты корреляций. Статистическая обработка данных проведена в программно-статистической среде R. Выявлены значимо высокие уровни IL-4 в плазме крови и уменьшение числа значимых корреляций внутри/между системами у детей с легкой степенью тяжести аутизма по сравнению с нейротипичными детьми. Такие данные, вероятно, могут выступать отражением теории о том, что для части детей с РАС характерно замедленное развитие мозга, как вариант эволюционной нормы. Напротив, у детей с тяжелой степенью РАС, показаны высокие системные уровни IL-6 и IFN γ на фоне низких значений IL-10, IL-1 β , TNF α и NGF β , поддержанных практически полным отсутствием внутри/и межсистемных взаимодействий. Это может служить показателем дезадаптации иммунной и нервной систем при тяжелом аутизме, отражающимся на патогенезе заболевания. Таким образом, комплекс показателей: высоких уровней ключевых провоспалительных цитокинов – IL-6 и IFN γ , низких значений IL-10, NGF β и дезинтеграция цитокиновой и нервной систем на периферии, могут быть предложены в качестве подхода для индикации степени тяжести состояния у детей с РАС.

Ключевые слова: цитокины; мозг-выделенный нейротрофический фактор; фактор роста нервов бета; расстройства аутистического спектра; дети; диагностика.

Для цитирования: Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 647-651.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-647-651>

Для корреспонденции: Филиппова Юлия Юрьевна, канд. биол. наук, доц. каф. микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета; e-mail: julse@rambler.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 12.09.2022

Принята к печати 12.10.2022

Опубликовано 14.11.2022

Filippova Yu. Yu., Devyatova E. V., Alekseeva A. S., Burmistrova A. L.

CYTOKINES AND NEUROTROPHIC FACTORS IN THE SEVERITY ASSESSMENT OF CHILDREN AUTISM

Chelyabinsk state university, Chelyabinsk, Russia

Due to the steady increase in the number of children with autism and the high heterogeneity of clinical groups, the diagnosis of these disorders and their severity is an urgent problem in modern medicine. In the course of the work, 126 children from 3 to 13 years old with typical neurodevelopment and with severe and mild autism spectrum disorders (ASD) were examined. Disease severity was determined according to the Childhood Autism Rating Scale (CARS). The levels of pro-/anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors (nerve growth factor beta and brain-derived neurotrophic factor) in blood plasma were assessed by enzyme immunoassay. Associations between indicators in each group of patients were assessed using the Spearman test and visualized as a heatmap of correlations. Statistical data processing was carried out in the R software. Significantly high levels of IL-4 in blood plasma and a decrease in the number of significant correlations within/between systems were revealed in children with mild autism compared with children with typical neurodevelopment. Such data can probably reflect the theory that some children with ASD are characterized by slow brain development, as a variant of the evolutionary norm. On the contrary, in children with severe ASD, high systemic levels of IL-6 and IFN γ are shown against the background of low values of IL-10, IL-1 β , TNF α and NGF β , supported by the almost complete absence of intra/ and intersystem interactions. This may act as an indicator of maladaptation of the immune and nervous systems in severe autism, which contributes to the pathogenesis of the disease. Thus, a set of indicators: high levels of key pro-inflammatory cytokines – IL-6 and IFN γ , low levels of IL-10, NGF β and disintegration of the cytokine and nervous systems in the periphery can be proposed as an approach to indicate the severity of the condition in children with ASD.

Key words: cytokines; brain-derived neurotrophic factor; nerve growth factor beta; autism spectrum disorders; children; diagnosis.

For citation: Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. Cytokines and neurotrophic factors in the severity assessment of children autism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 647-651 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-647-651>

For correspondence: Filippova Yu.Yu., Cand. Sci. Biol., Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology; e-mail: julse@rambler.ru

Information about authors:

Filippova Yu.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5041-6444>;
Devyatova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0932-3637>;
Alekseeva A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2524-8569>;
Burmistrova A.L., <https://orcid.org/0000-0001-6462-9500>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 12.09.2022
Accepted 12.10.2022
Published 14.11.2022

Введение. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это группа расстройств нейробиологического происхождения, характеризующихся проблемами в общении и социальных навыках, а также повторяющимся поведением [1]. РАС отличаются высокой гетерогенностью и вариабельностью тяжести клинических симптомов, что затрудняет понимание патогенеза, который, скорее всего, является полиэтиологическим, и поиск информативных биомаркеров аутизма и тяжести течения данной патологии [2]. В 2018 г. К. Олжа с соавт. [3] предложена гипотеза, что формирование фенотипов РАС может быть связано с дисрегуляцией взаимодействия иммунной системы, синаптогенных факторов роста (таких, как фактор роста нервов бета – NGF β , и нейротрофический фактора мозга – BDNF) и их сигнальных путей. Эта концепция основывается, прежде всего, на данных многочисленных исследований о наличии нейровоспаления при РАС [4-6]. Важно, что оно поддерживается и/или находит отражение в изменении уровней цитокинов в периферической системе [7]. Авторами показано, что нейровоспаление может оказывать влияние на функцию мозга с помощью различных механизмов, в том числе: 1) через непосредственную индукцию синтеза NGF в месте воспаления, в том числе нейрональными и глиальными клетками мозга [8]; 2) через модуляцию BDNF, посредством стимуляции выработки глюкокортикоидов и нейротрансмиттеров, таких, как глутамат и гамма-аминомасляная кислота [9, 10].

NGF и BDNF в норме обеспечивают пре- и постнатальное развитие мозга, модулируя рост и дифференцировку нейронов, а также воздействуя на синаптическую и структурную пластичность [2, 8, 11]. Они являются ключевыми молекулами в сложной сети двунаправленных сигналов между нервной и иммунной системами [8, 12, 13]. Дисбаланс их продукции может способствовать развитию и поддержанию хронического воспаления [12, 13].

Системное воспаление, высокие уровни NGF и BDNF были показаны рядом авторов у лиц с аутизмом [14, 15]. Однако, до сих пор не известно, лежит ли дисбаланс цитокинов и нейротрофических факторов в основе патофизиологии РАС, его отдельных клинических фенотипов, или они являются только маркерами генетических, эпигенетических и экологических факторов, и какова значимость данных маркеров [16].

Цель данной работы – изучение плазменных уровней некоторых цитокинов и нейротрофинов, а также корреляционных связей между ними, для оценки степени тяжести расстройств аутистического спектра у детей.

Материал и методы. В работе представлены результаты обследования 81 ребенка с расстройствами аутистического спектра (РАС), проходивших немедикаментозную реабилитацию в СРЦ «Здоровье» г. Челябинск. Соотношение по полу составило 4:1 (мальчики:девочки), возраст детей от 3 до 13 лет (медиана – 6,0 лет). Диагностика и оценка степени тяжести состояния осуществлялась психотерапевтами центра с помощью рейтинговой шкалы детского аутизма (Childhood Autism Rating Scale, CARS). В зависимости от тяжести состояния, дети с аутизмом были разделены на 2-е группы: 51 ребёнок с легкой или умеренной степенью аутизма (средний балл CARS 32,0 \pm 1,5) и 30 лиц с тяжелым аутизмом (средний балл CARS 39,0 \pm 3,4). Контрольную группу составили 45 детей с нормотипичным нейроразвитием соответствующего пола, в возрасте 4-13 лет (медиана – 9,0 лет), находившиеся на обучении в дошкольных и школьных учреждениях пос. Первомайский Челябинской области. В группах сравнения не было различий по соматическим заболеваниям, в том числе, аллергопатологиям и заболеваниями со стороны желудочно-кишечного тракта. Очаги хронической инфекции отсутствовали. Законными представителями всех детей было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена Этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 2 от 27.08.2019 г.).

Комплекс лабораторных обследований включал определение в плазме крови детей уровней некоторых цитокинов: IL-6, IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-4 («Вектор-Бест», Новосибирск), BDNF («R&D Systems» США) и NGF β («RayBiotech», США), методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа. Учет результатов проводили на планшетном фотометре Multiscan EX (Финляндия).

Статистическая обработка данных выполнена в программно-статистической среде R (v. 3.6.1). В связи с ненормальностью распределения данных, были использованы непараметрические методы анализа. В каждой группе для всех показателей рассчитывали медиану и интерквартильный диапазон. Сравнение групп проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса с попарны-

ми сравнениями по Коноверу-Инману. Связь признаков оценивали определением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты визуализировали в виде тепловой карты корреляций. Различия и зависимости считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. По результатам нашего исследования в группе детей с легкой степенью тяжести аутизма уровни иммунорегуляторного цитокина – IL-4 в плазме крови были значимо выше, чем в группе детей с типичным нейроразвитием (см. таблицу).

Статистически значимых различий как в уровнях остальных цитокинов, так и в уровнях нейротрофических факторов: BDNF и NGFβ, не выявлено (см. таблицу).

При оценке внутри-/межсистемных взаимодействий в группе детей с легким аутизмом установлены две значимые положительные связи внутри цитокиновой системы: TNFα и IL-1β ($p=0,512$, $p<0,001$); IL-1β и IL-4 ($p=0,303$, $p=0,029$); и два положительных межсистемных взаимодействия: между BDNF и IL-6 ($p=0,270$, $p=0,049$); а также между NGFβ и IL-1β ($p=0,294$, $p=0,034$) (см рисунок, а).

В группе детей с тяжелой степенью аутизма статистически значимые изменения были характерны для 6 из 8-ми показателей, включенных в работу. Так, при тяжелом аутизме у детей содержание в плазме крови провоспалительных цитокинов: IL-6 и IFNγ было значимо выше, а TNFα, IL-1β, противовоспалительного цитокина – IL-10, и NGFβ – ниже, по сравнению с их концентрацией как у детей с типичным нейроразвитием, так и у детей с легкой степенью тяжести РАС (см. таблицу). В группе детей с тяжелым аутизмом выявлены только две значимые положительные внутрицитокиновые связи: TNFα и IL-1β ($p=0,379$, $p=0,043$); IFNγ и IL-4 ($p=0,366$, $p=0,049$) (см. рисунок, б). Значимых корреляций между нейротрофинами и цитокинами не обнаружено.

В группе детей с типичным нейроразвитием было показано наибольшее число значимых внутри- и межсистемных корреляций. Внутри цитокиновой системы – одна положительная между TNFα и IL-1β ($p=0,791$, $p<0,001$); и три отрицательные, в основе которых лежали взаимодействия IL-6: с TNFα ($p=-0,506$, $p<0,001$); с IL-1β ($p=-0,314$, $p=0,036$); и с IL-10 ($p=0,415$, $p=0,005$). В положительных связях между системами были задействованы BDNF и IL-1β ($p=0,376$, $p=0,011$); и NGFβ и IL-10 ($p=0,314$, $p=0,036$) (см. рисунок, в).

Обсуждение. В проведенном нами исследовании была предпринята попытка установить наличие/отсутствие взаимосвязи между важными показателями нейромунных взаимодействий – цитокинами и нейротрофинами на периферии и тяжестью течения РАС у детей. Установлено, что у детей с легкой формой течения РАС плазменные уровни всех исследуемых цитокинов и нейротрофинов не отличаются от значений нейротипичных детей, за исключением значимо высоких уровней иммунорегуляторного цитокина – IL-4. Хотя P. Goines и P. Ashwood [16] было показано, что IL-4 был повышен в плазме крови во втором триместре беременности и амниотической жидкости у матерей детей с РАС, физиологически, в мозге, IL-4 в значительной степени играет нейротрофическую роль. Он активируется во время воспаления центральной нервной системы, индуцируя альтернативную активацию глиальных клеток и защищая их от апоптоза, тем самым выполняет регуляторную функцию. Важно отметить, что, несмотря на наличие значимых внутри-/межсистемных взаимодействий средней силы у детей с легкой степенью тяжести аутизма, у них происходит перестройка и снижение значимых связей (уменьшение числа связей между цитокинами). Такие данные, вероятно, могут выступать отражением теории «гетерохронии развития» о том, что у части детей РАС является не столько патологией, сколько замедленным развитием мозга, как результат расширения границ нормы при эволюции вида *Homo sapiens* [17, 18].

Обнаруженное нами повышение системных уровней некоторых провоспалительных цитокинов (IL-6 и IFNγ) и снижение концентрации противовоспалительного цитокина – IL-10 у детей с тяжелой формой аутизма, может отражать наличие у данных детей хронического низкоуровневого воспаления; а практически полное отсутствие значимых связей между цитокинами и нейротрофинами (нами установлены только 2 положительные корреляции внутри цитокиновой системы) – о дезинтеграции двунаправленного взаимодействия нервной и иммунной систем.

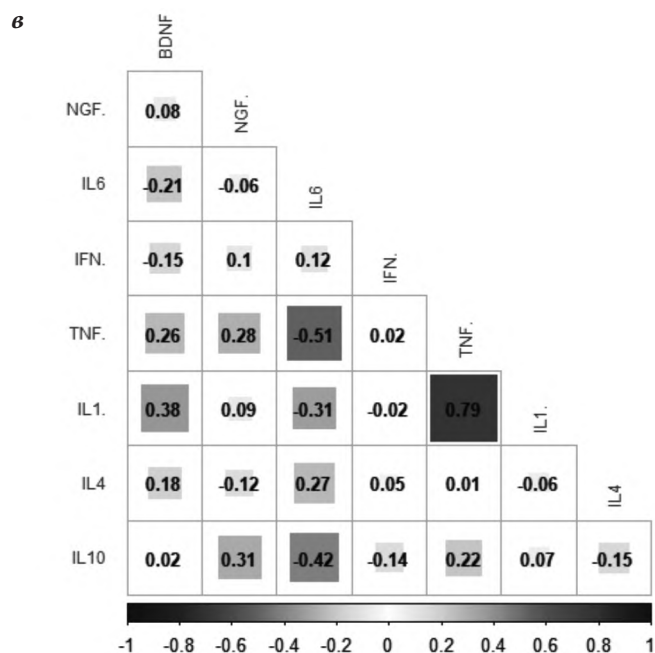
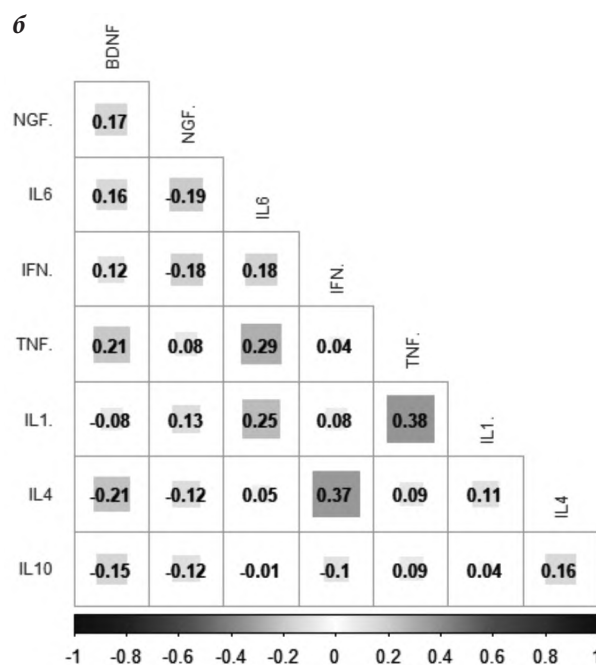
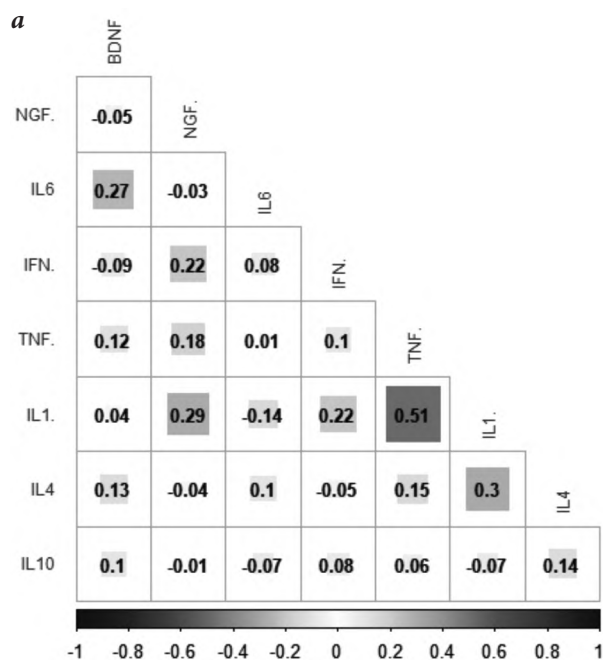
На фоне хронического воспаления нами установлено значимое снижение уровней NGFβ в плазме крови детей с тяжелым аутизмом. Полученные данные носят дискуссионный характер. Так, рядом авторов были описаны значительные увеличения синтеза NGF в воспаленных тканях у пациентов и на животных моделях воспалительных заболеваний (при ревматоидном артрите, системной красной волчанке и др.) [8], в том числе и в сыворотке детей с аутизмом [15] и подгруппе детей с РАС с регрессом [19]. С другой стороны, D. Rodrigues и соавт. [22] не обнаружили значимых различий в периферических уровнях ни одного из нейротрофических

Содержание некоторых цитокинов и нейротрофических факторов (пкг/мл) в плазме крови детей с разной степенью тяжести аутизма, Me (25%-75%)

Показатель	Легкий аутизм	Тяжелый аутизм	Нормотипичное развитие
IL-6	1,80 (0,47-3,06)	3,95*/** (2,39-6,22)	2,09 (0,89-3,19)
IFNγ	9,91 (8,87-11,35)	14,84*/** (12,58-15,92)	11,13 (9,22-12,65)
TNFα	2,81 (2,37-3,78)	1,37*/** (1,09-1,69)	2,46 (1,58-4,08)
IL-1β	3,45 (2,63-4,25)	1,89*/** (1,66-2,09)	3,07 (2,08-4,36)
IL-10	7,46 (6,21-10,35)	5,69*/** (3,20-8,71)	9,68 (4,06-13,53)
IL-4	2,72* (2,37-3,11)	2,27 (2,0-2,57)	2,22 (1,87-2,55)
BDNF	11777,0 (4405,0-24420,0)	12550,0 (9550,0-19020,0)	12870,0 (6903,0-21700,0)
NGFβ	9,31 (6,32-16,68)	5,92*/** (0,72-12,10)	7,88 (4,54-15,38)

Примечание. * – значимые различия между детьми с аутизмом и детьми с типичным нейроразвитием ($p \leq 0,05$); ** – значимые различия между детьми с легкой и тяжелой формами аутизма ($p \leq 0,05$).

IMMUNOLOGY



Корреляционные связи между показателями цитокинов и нейротрофинов плазмы крови у детей с разной степенью тяжести аутизма.

a – легкий аутизм; *б* – тяжелый аутизм; *в* – типичное нейроразвитие. Цифрами показана сила связи (r), а также её направленность – отрицательная и положительная. Темным цветом выделены статистически значимые корреляции.

факторов между лицами с РАС и контролем [20]. Несмотря на то, что NGF на периферии вырабатывается большим числом клеток, включая иммунные, его синтез четко контролируется во всех областях организма, иннервируемых чувствительными и симпатическими нейронами, и строго ограничен очагом воспаления, поскольку изменение концентрации NGF глубоко модифицирует физиологию организма [8, 21]. Важно отметить, что NGF обладает множеством эффектов, которые могут быть как провоспалительными, так и противовоспалительными. Это очевидное противоречие можно объяснить, рассматривая NGF как часть эндогенного механизма, который, активируя иммунные ответы, также

активирует пути, необходимые для подавления воспалительной реакции и ограничения повреждения тканей [8]. G. Prencipe и соавт. [22] продемонстрировали, что NGF является частью регуляторной петли в моноцитах: воспалительные стимулы, активируя провоспалительный ответ через толл-подобные рецепторы (TLR), усиливают экспрессию рецептора NGF – тирозинкиназы A. В TLR-активированных моноцитах NGF снижает продукцию воспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-8), индуцируя высвобождение противовоспалительных медиаторов (IL-10 и антагониста рецептора IL-1). Вероятно, обнаруженные нами низкие уровни NGF β в плазме крови детей с тяжелым аутизмом на фоне высоко-

ких уровней провоспалительных цитокинов, могут косвенно свидетельствовать о нарушении петли обратной регуляции хронического воспаления на периферии.

Заключение. Таким образом, комплекс показателей: высокие уровни ключевых провоспалительных цитокинов – IL-6 и IFN γ , низкие значения IL-10 и NGF β , а также дезинтеграция цитокиновой и нервной систем на периферии, могут быть предложены в качестве подхода для индикации степени тяжести состояния у детей с РАС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Xu N., Li X., Zhong Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 531518.
2. Skogstrand K., Hagen C.M., Borbye-Lorenzen N., Christiansen M., Bybjerg-Grauholm J., Bækvad-Hansen M. et al. Reduced neonatal brain-derived neurotrophic factor is associated with autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry.* 2019; 9(1): 252.
3. Ohja K., Gozal E., Fahnestock M., Cai L., Cai J., Freedman J.H. et al. Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. *Neuromolecular Med.* 2018; 20(2): 161-73.
4. Toscano C.V.A., Barros L., Lima A.B., Nunes T., Carvalho H.M., Gaspar J.M. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: Exercise as a “pharmacological” tool. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021; 129: 63-74.
5. Matta S.M., Hill-Yardin E.L., Crack P.J. The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav. Immun.* 2019; 79: 75-90.
6. 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; 6(3): 148-55.
7. Yirmiya R. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(2): 181-213.
8. Minnone G., De Benedetti F., Bracci-Laudiero L. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(5): 1028.
9. Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front. Cell Neurosci.* 2014; 22: 430.
10. Galic M.A., Riazi K., Pittman Q.J. Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol.* 2012; 33: 116–25.
11. Park H., Poo M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14(1): 7-23.
12. Skaper S.D. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology.* 2017; 151(1): 1-15.
13. Jin Y., Sun L.H., Yang W., Cui R.J., Xu S.B. The Role of BDNF in the Neuroimmune Axis Regulation of Mood Disorders. *Front. Neurol.* 2019; 10: 515.
14. Pancheva R., Georgieva M. Autism spectrum disorders: neurotrophins enter the dance. *Biomedical Reviews.* 2014; 25: 93-9.
15. Mostafa G.A., Meguid N.A., Shehab A.A.S., Elsaied A., Maher M. Plasma levels of nerve growth factor in Egyptian autistic children: Relation to hyperserotonemia and autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* 2021; 358: 577638.
16. Goines P.E., Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicol. Teratol.* 2013; 36: 67-81.
17. Baron-Cohen, S. Editorial perspective: neurodiversity – a revolutionary concept for autism and psychiatry. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 2017; 58(6): 744-7.
18. Crespi B. Developmental heterochrony and the evolution of autistic perception, cognition and behavior. *BMC Med.* 2013; 11: 119.
19. Gomez-Fernandez A., de la Torre-Aguilar M.J., Gil-Campos M., Flores-Rojas K., Cruz-Rico M.D., Martin-Borreguero P. et al. Children With Autism Spectrum Disorder With Regression Exhibit a Different Profile in Plasma Cytokines and Adhesion Molecules Compared to Children Without Such Regression. *Front. Pediatr.* 2018; 6: 264.
20. Rodrigues D.H., Rocha N.P., Sousa L.F., Barbosa I.G., Kummer A., Teixeira A.L. Circulating levels of neurotrophic factors in autism spectrum disorders. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2014; 35(5): 380-4.
21. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 239.
22. Prencipe G., Minnone G., Strippoli R., De Pasquale L., Petrini S., Caiello I. et al. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA. *J. Immunol.* 2014; 192(7): 3345-54.