

**ИММУНОДЕФИЦИТ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ
ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ НАРУШЕНИЕМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА,
У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА***МАЛЬЦЕВ Д.В.*

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

Актуальность. Расстройства психики аутистического спектра встречаются в 1% случаев среди детей современной человеческой популяции. Эта тяжелая инвалидизирующая патология является актуальной проблемой психиатрии, которая до сих пор не нашла своего решения. В последние десятилетия утвердилось представление о генетической гетерогенности синдрома расстройств психики аутистического спектра у людей. Frye R.E. в недавнем фундаментальном обзоре, посвященном этой проблеме, рассматривает генетические нарушения ферментов фолатного цикла и митохондриальную патологию как основу расстройств аутистического спектра у детей [16]. Помимо этого, мутации гена синтазы оксида азота позиционируются как причина аутистических расстройств в некоторых семьях [11]. Тем не менее, все чаще описывают раритетные причины расстройств аутистического спектра. Так, Biamino E. с соавт. сообщили недавно о новой 3q29 делеции, ассоциированной с аутизмом, интеллектуальным снижением, другими психическими расстройствами и ожирением [5].

Полиморфизмы ферментов фолатного цикла рассматриваются как весомая причина генетической предрасположенности к развитию аутистического нарушения психики [41]. Помимо этого, полиморфизмы генов ферментов цикла фолиевой кислоты сегодня связывают с такими осложнениями: гипергомоцистеинемией, сердечно-сосудистыми катастрофами [7] и деменцией в третьей части жизни [28, 36], пороками развития плода, прежде всего – нервной системы [31, 48], и патологией беременности, в том числе – множественными эпизодами спонтанных абортов [57], высоким риском развития некоторых опухолей, в том числе – рака толстой и прямой кишки [20, 40], гепатоцеллюлярной карциномы [42], рака молочной железы [58], шейки матки [2] и яичников [58], а также более тяжелым течением другой генетической патологии, включая синдром Дауна [52], в связи с нарушением метилирования ДНК. Связь дефицита ферментов фолатного цикла с аутизмом не достаточно хорошо обоснована, причем наличие самих полиморфизмов генов, равно как и гипергомоцистеинемия, – недостаточное усло-

вие для развития психических расстройств у ребенка. Исчерпывающее объяснение психиатрического феномена исключительно метаболическим синдромом, обусловленной генетически детерминированной дисфункцией ряда ферментов цикла фолиевой кислоты, на сегодняшний день не представляется возможным. Накопленные доказательства позволяют усмотреть недостающее звено патогенеза расстройств аутистического спектра, ассоциированных с первичным фолатным дефицитом, в иммунозависимой патологии. Так, продемонстрирована связь таких расстройств с некоторыми локусами гистосовместимости, подобно ряду аутоиммунных и аллергических синдромов. У таких детей описаны различные формы первичных иммунодефицитов, а исследования, посвященные некоторым первичным иммунным дисфункциям, указывают на повышенный риск развития аутизма [44,45]. Имеются неединичные сообщения о появлении аутизма у взрослых и детей после перенесенных эпизодов нейроинфекций, преимущественно – оппортунистического спектра [14,18]. Более того, результаты ряда клинических испытаний указывают на пользу от применения иммунотерапии у пациентов с расстройствами аутистического спектра [10]. Все эти весомые аргументы заставляют обратить более пристальное внимание на роль иммунозависимых механизмов в патогенезе указанных психических нарушений.

Как известно, цикл фолиевой кислоты реализуется благодаря деятельности трех ключевых ферментов: метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), метионинсинтазы-редуктазы (MTRR) и метионинсинтазы (MTR). Этот цикл функционирует в неразрывной связи с циклом метионина, в результате которого синтезируется продукт, получивший название гомоцистеин (рис. 1). Показано, что этот метаболит оказывает токсическое воздействие на эндотелий сосудов, вызывая состояние эндотелиальной дисфункции, и нейроны ЦНС, индуцируя синаптический дисбаланс и гибель клеток.

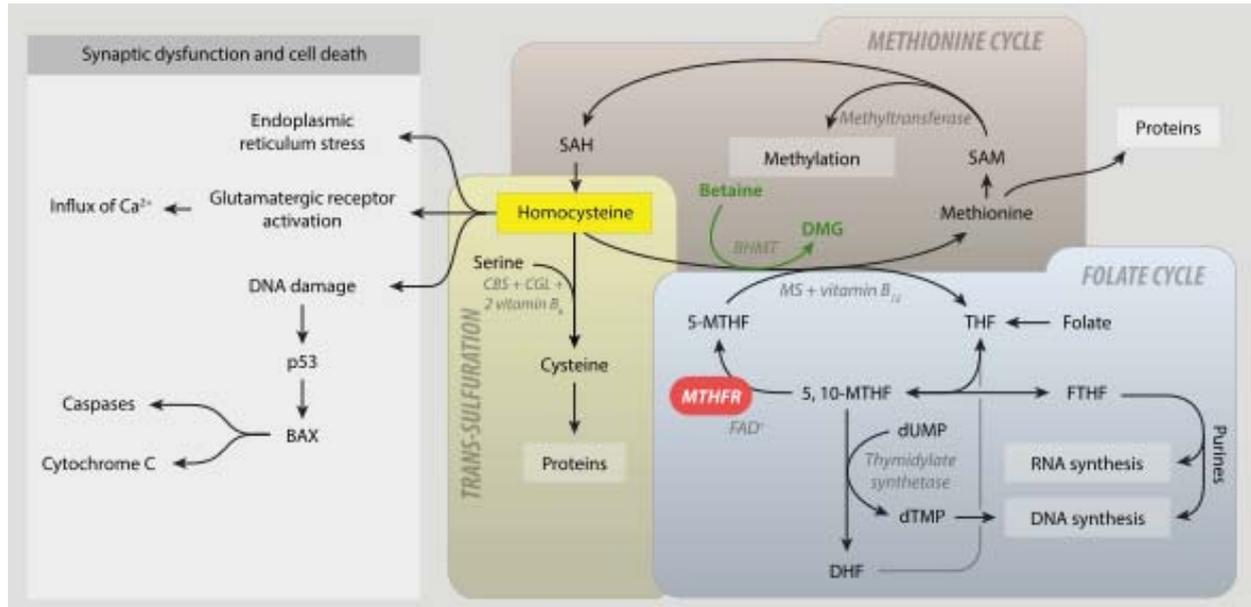


Рис. 1. Схематическое изображение взаимосвязанных биохимических циклов фолиевой кислоты и метионина в свете гомоцистеиновой теории

При полиморфизмах в генах ферментов фолатного цикла создаются условия для аномально повышенной выработки гомоцистеина – феномена, получившего название гипергомоцистеинемии, с которым сегодня связывают прогрессирование сердечно-сосудистой патологии в третьей части жизни и нарушение развития нервной системы во время внутриутробного периода онтогенеза. На данный момент описаны два полиморфизма в гене MTHFR, связанные с заменой цитозина на тимин в кодоне 677 (677 C>T) и аденина на цитозин в кодоне 1298 (1298 A>C). В генах MTRR и MTR известны полиморфизмы, обусловленные за-

меной аденина на гуанозин (A>G). Указанные полиморфизмы бывают в гетеро- и гомозиготном состоянии. Гетерозиготные полиморфизмы обозначаются MTHFR 677 C/T, MTHFR 1298 A/C, MTRR A/G и MTR A/G, а гомозиготные – MTHFR 677 T/T, MTHFR 1298 C/C, MTRR G/G и MTR G/G (табл. 1). У одного человека может обнаруживаться от 1 до 4 полиморфизмов в генах фолатного цикла в различном состоянии. Метаболические нарушения усугубляются по мере накопления генетических поломок. В среднем каждый из полиморфизмов в генах ферментов фолатного цикла содержится в геноме, по крайней мере, 30% представителей современной человеческой популяции.

Таблица 1

Разнообразие и клиническое значение полиморфизмов генов фолатного цикла у людей

Ген	Полиморфизм	Аллель нейтральный	Аллель риска	Проявления генотипа с аллелями риска
MTHFR	MTHFR: 677 C>T	C/C	C/T, T/T Частота – 30-40%	Снижение функциональной активности фермента, 3-кратное повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний в молодом возрасте, тромбоэмболии. Невынашивание беременности, поздний гестоз, преэклампсия, отслойка плаценты. Антенатальная гибель плода, задержка и дефекты развития плода. Увеличение риска развития колоректальной аденомы в 3 раза при генотипе T/T. Риск развития РМЖ. Усиление побочных эффектов химиотерапии
	MTHFR: 1298 A>C	A/A	A/G, G/G Частота – 20-30%	Снижение функциональной активности фермента. Рост уровня гомоцистеина в крови. Повышение риска развития синдрома Дауна. Нарушение развития плода – незаращение нервной трубки

Ген	Полиморфизм	Аллель нейтральный	Аллель риска	Проявления генотипа с аллелями риска
MTR	MTHFR: 1298 A>C	A/A	A/G, G/G Частота – 20-30%	Снижение функциональной активности фермента. Рост уровня гомоцистеина в крови. Повышение риска развития синдрома Дауна. Нарушение развития плода – незаращение нервной трубки
MTRR	MTRR: 66 A>G	A/A	A/A, G/G Частота – 20-30%	Снижение функциональной активности фермента. Рост уровня гомоцистеина в крови. Дефекты развития нервной трубки. Усиливает патологический эффект, ассоциированный с полиморфизмами гена MTHFR

Цель исследования: провести комплексную оценку иммунного статуса у детей с расстройствами аутистического спектра, ассоциированными с генетически детерминированным дефицитом фолатного цикла.

Материалы и методы. В проспективном контролируемом одноцентровом исследовании принимали участие 78 детей с диагнозом расстройств психики аутистического спектра и/или детского церебрального паралича. Набор детей в исследуемую группу производился в период между 2010 и 2015 годами включительно. Это были пациенты из различных регионов Украины в возрасте от 2 до 10 лет, 47 мальчиков и 31 девочка. Выявление полиморфизмов генов фолатного цикла осуществляли методом полимеразной цепной реакции в трех центрах: Neurological Research Institute (USA), Харьковском генетическом центре и коммерческой лаборатории Синево. Контрольную группу составили 34 здоровых ребенка с похожим возрастным и гендерным распределением. Все пациентам проводилось комплексное иммунологическое обследование в Институте иммунологии и аллергологии НМУ имени А.А. Богомольца, которое помимо общего анализа крови, включало изучение субпопуляционного состава лимфоцитов с использованием лазерной проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр Epics XI, США) и метода непрямой иммунофлуоресценции с моноклональными антителами к CD-маркерам с двумя или тремя метками (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3–CD19+, CD3–CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+) (реактивы Beckman Coulter, США). Фагоцитоз оценивали по данным латекс-теста с определением показателя фагоцитоза, фагоцитарного индекса, количества активных фагоцитов и фагоцитарной ёмкости крови, а также по активности ферментов миелопероксидазы (цитофлуориметрия) и НАДФ-оксидазы (НСТ-тест). Сывороточные концентрации иммуноглобулинов основных классов (M, G, A) устанавливали по результатам простой радиальной иммунодиффузии по Манчини. Концентрацию классов IgE, IgD и субклассов IgG (IgG1, IgG2,

IgG3, IgG4) в сыворотке крови измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ВекторБЕСТ, РФ). Помимо этого, производилась диагностика реактивированной вирусной инфекции по результатам количественной ПЦР сыворотки крови с видоспецифическими праймерами герпесвирусов (вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, вируса варицелла-зостер, Эпштейна-Барр вируса, цитомегаловируса, вирусов герпеса 6 и 7 типов), вирусов кори и краснухи. Также осуществлялись серологические тесты путем проведения твердофазного иммуноферментного анализа для идентификации вирус-специфических IgM и IgG в сыворотке крови. Оценивали также сывороточные концентрации известных биомаркеров генетического дефицита фолатного цикла – гомоцистеина, фолиевой кислоты, витаминов B12 и B6. Все дети проходили МРТ головного мозга в конвенционных режимах (T1- и T2-взвешенный, FLAIR) на томографах с величиной магнитной индукции не менее 1,5 Тл.

Статистический анализ полученной информации обработан методами структурного и сравнительного анализов при помощи электронной программы Microsoft Excel. С целью установления достоверности отличий результатов применяли T-критерий Стьюдента с расчетом коэффициента доверительной вероятности p (параметрический критерий) и число знаков Z по Урбаху (непараметрический критерий). Для изучения связи между полиморфизмами генов фолатного цикла и показателями иммунного статуса использовали критерий хи-квадрат (2) Пирсона, сравнивая полученное значение с табличным при заданном числе степеней свободы и уровнях достоверности p=0,05 и p=0,01. При фактических значениях от 5 до 9 применяли дополнительно поправку Йейтса, а при менее 5 – точный тест Фишера. Расчетная формула приведена ниже:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Результаты исследования и их обсуждение. Генетические исследования. Результаты анализа генетических тестов указывают, что у преимущественного большинства детей исследуемой группы отмечалось 2-4 полиморфизма в генах ферментов фолатного цикла (88% случаев), а соотношение гомо- и гетерозиготных форм можно представить как 1,2 к 1,0. Лишь в 12% случаев – имела место один полиморфизм, причем преимущественно – в гомозиготном состоянии (рис. 2). У таких детей обычно имела место комбинация с другими генетическими нарушениями, которые влияют на психическое развитие ребенка, а именно – с синдромами Лея (1 случай), Ретта (1 случай) и Дауна (1 случай), а также – гемохроматозом (1 случай) и мутациями гена синтазы оксида азота (2 случая). В целом преобладали замены нуклеотидов в гене MTHFR (56% случаев), однако тесной ассоциации с каким либо одним генетическим нарушением не отмечалось.



Рис. 2. Структура исследуемой группы (n=78) по количеству полиморфизмов генов ферментов фолатного цикла

Анализ биомаркеров. Ранее Schoendorfer N.C. с соавт. в контролируемом испытании продемонстрировали нарушения процессов метилирования у детей с картиной тяжелого детского церебрального паралича, выявив достоверное повышение сывороточной концентрации гомоцистеина и метилмалоновой кислоты и снижение содержания уратов по сравнению со здоровыми детьми [47]. Анализ результатов изучения биомаркеров в исследуемой группе показал феномен гипергомоцистеинемии в 88% случаев ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$), однако отмечалась значительная флуктуация уровня сывороточной концентрации указанного метаболита, в том числе – и в зависимости от особенностей диеты ребенка. Необходимы были серийные исследования на протяжении нескольких недель для формирования правильного суждения о наличии гипергомоцистеинемии. Сывороточная концентрация фолиевой кислоты оказалась повышенной в 64%, а пониженной – в 21% случаев. Повышение содержания витамина В12 также имело место в 64%, а витамина В6 – лишь в 43% случаев. Действительно, именно гипергомоцистеинемия была наиболее чувствительным биохимическим маркером генетически детерминированного нарушения фолатного цикла (рис. 3). Скрининг на гомоцистеин может быть информативным инструментом для первичного отбора кандидатов на соответствующее генетическое обследование среди детей с расстройствами аутистического спектра, однако в некоторых случаях нормальное содержание гомоцистеина не исключало наличие нескольких полиморфизмов в генах фолатного цикла.

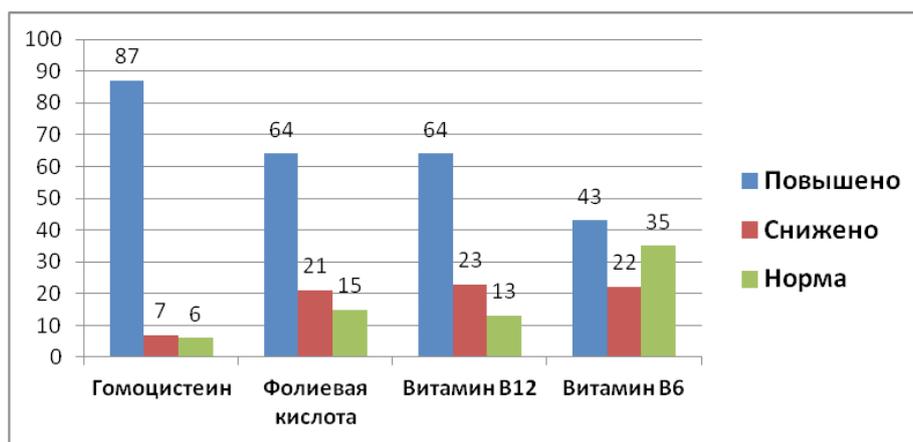


Рис. 3. Уровни сывороточных концентраций исследуемых биомаркеров среди детей с генетически детерминированным нарушением фолатного цикла (n=78)

Оценка микробной нагрузки. У пациентов исследуемой группы встречались, прежде всего, аномально частые, длительные, тяжелые вирусные инфекции. Эти инфекционные эпизоды были вызваны оппортунистическими микроорганизмами и нередко имели осложнен-

ное течение. Врожденная цитомегаловирусная инфекция с поражением ЦНС зарегистрирована в 17% случаев (рис. 4). Диагноз подтверждался результатами ПЦР сыворотки крови и ликвора, а в некоторых случаях – по появлению специфических IgM. Такие дети, как правило, имели

діагноз дитячого церебрального параліча із-за наявності рухових порушень, хоча при більш глибокому аналізі додатково відзначалися ознаки розладів аутистичного спектра. Розлади психічного розвитку відзначалися вже з народження, і аутизм нерідко

комбінувався з порушенням інтелектуального розвитку. Раніше зв'язок розладів аутистичного спектра з пренатально перенесеною цитомегаловірусною інфекцією продемонстрували Engman M.L. з соавт. [14].

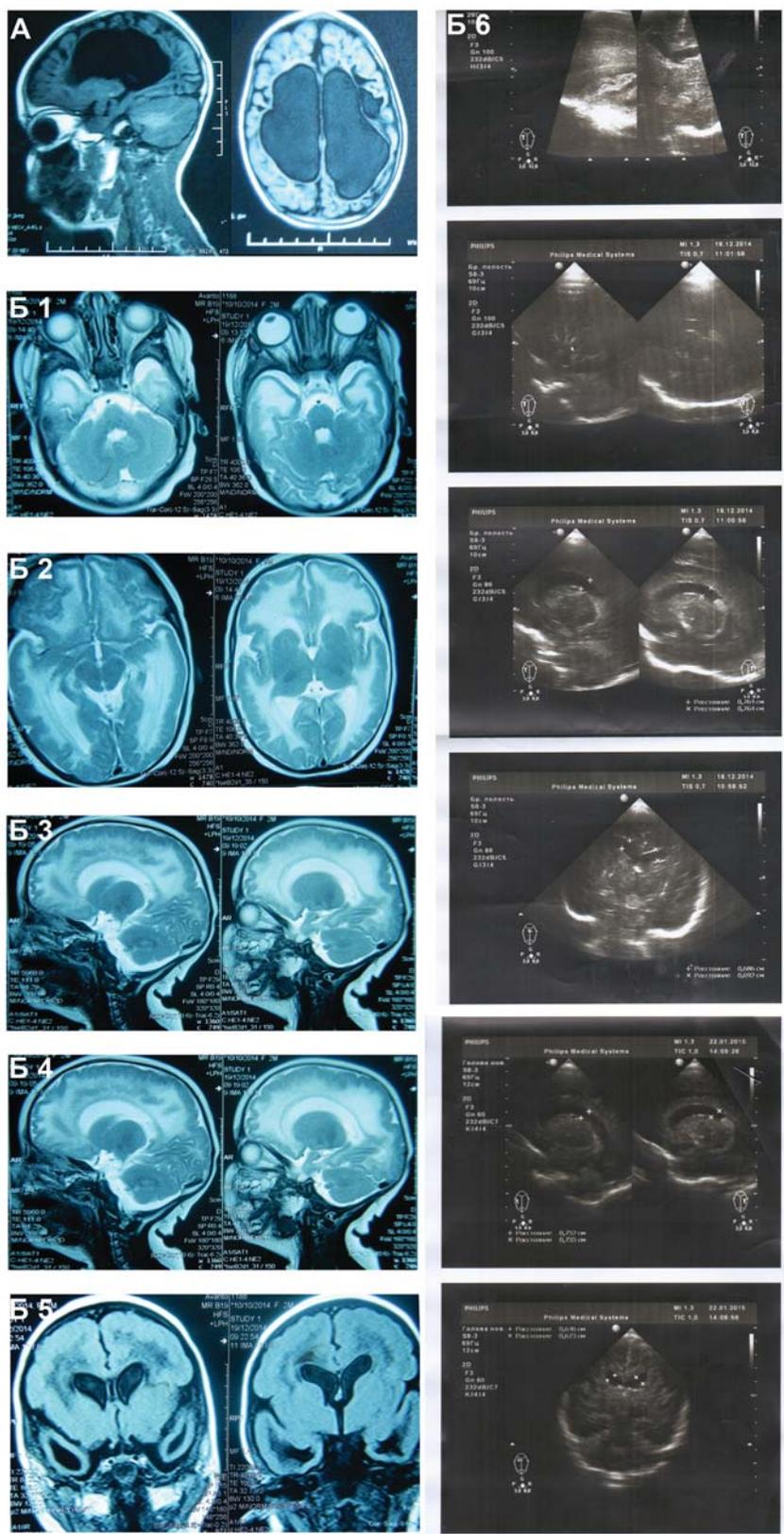


Рис. 4. Признаки вродженої цитомегаловірусної інфекції у дітей з генетичними порушеннями фолатного циклу (А - тяжільний порок розвитку ЦНС з вентрикуломегалією і гіпогенезією півкуль великого мозку, ймовірно – внаслідок зараження вірусом в ранній період внутрішньоматеринного онтогенезу; Б – комплекс класических ознак пізнього антенатального інфікування цитомегаловірусом: кисти в полюсах височних долей (1), лейкоенцефалопатія (2, 3, 4), агенезія мозолистого тіла (5), вентрикуломегалія (2, 3, 4) і васкулопатія стріатних артерій при ЕхоЕГ (6); власні спостереження)

Подострый склерозирующий панэнцефалит, вызванный вирусами кори и/или краснухи, зарегистрирован в 21% случаев, как правило, без инициального периода типичных высыпаний. Это прогрессирующее поражение ЦНС было вызвано как естественным заражением указанными вирусами, так и вакцинацией живой аттенуированной вакциной против кори, краснухи и эпидемического паротита. В зависимости от текущей стадии патологического процесса дети с такими неврологическими поражениями наблюдались с диагнозом изолированных аутистических расстройств при небольшой длительности болезни или же детского церебрального паралича в позднюю стадию. У таких детей помимо прогрессирующего течения отмечался начальный период нормального развития и аутистический регресс вскоре после заражения вирусами. Как правило, первые признаки регресса регистрировались спустя 2-4 недели после вакцинации, однако эпизод естественного заражения обычно оставался неидентифицированным из-за отсутствия экзантемы. Диагноз подтверждали на основании персистенции специфических IgM или аномально повышенной концентрации IgG,

которая в сотни и тысячи раз превышала верхнюю границу нормы.

Реактивированные постнатальные герпесвирусные инфекции, вызванные лимфотропными герпесвирусами (CMV, EBV, HHV-6, HHV-7) были наиболее характерным проявлением инфекционного синдрома (78% случаев). Диагноз подтверждали на основании результатов ПЦР сыворотки крови. У многих детей имела место картина мононуклеозоподобного синдрома, и почти в половине таких случаев в анамнезе отмечались эпизоды органических поражений, включая энцефалит, гепатит, панкреатит, пневмонит. В 56% случаев в сыворотке крови обнаруживалась ДНК сразу 3-4 герпесвирусов разных видов.

Тяжелое течение ротавирусной инфекции, после эпизода которой отмечался аутистический регресс ребенка, зарегистрировано в 12% случаев. Начало аутистического регресса после эпизода гриппа имело место лишь в 4% случаев. Упорно рецидивирующая пиогенная кокковая инфекция верхних дыхательных путей имела место в 32% случаев. Диагноз подтверждали микробиологическим методом. Хронический кандидоз диагностирован в 17% случаев (рис. 5).

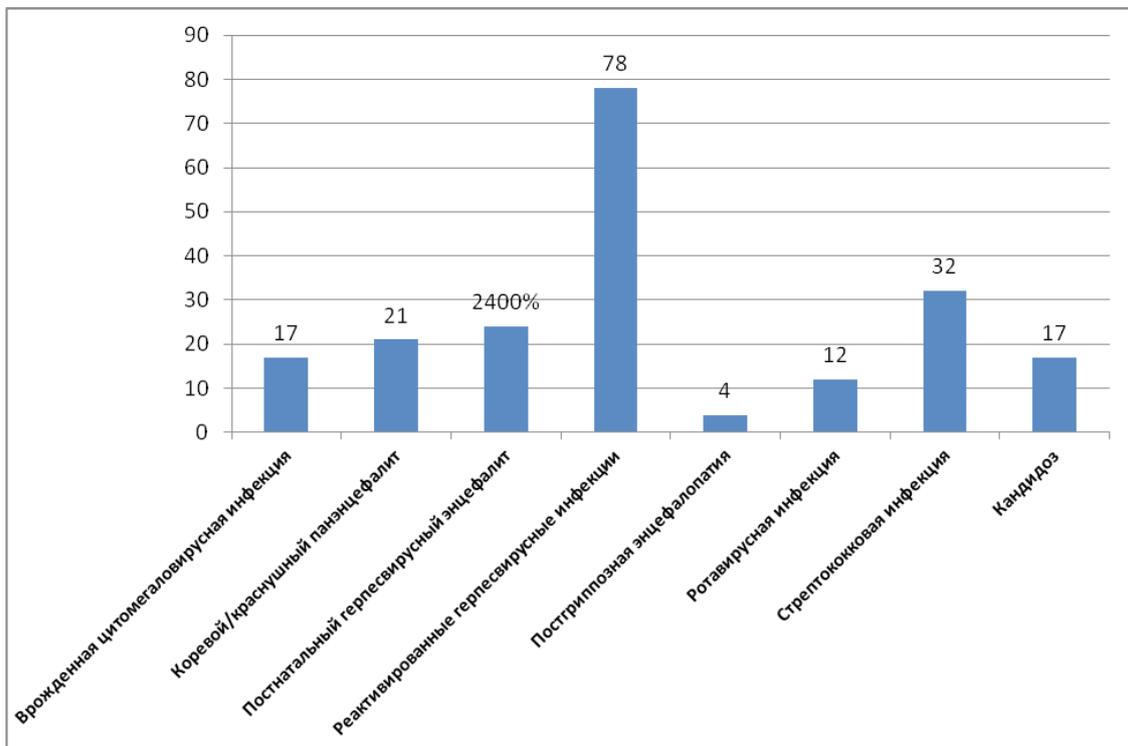


Рис. 5. Структура инфекционного синдрома у пациентов с генетическим дефицитом фолатного цикла (n=78)

Есть основания полагать, что вирусные инфекции, зарегистрированные у детей исследуемой группы, и были повреждающим фактором, индуцирующим аутистические расстройства психики. Благодаря множественным сообщениям хорошо известна возможность развития

аутизма после эпизода нейроинфекционного поражения. Так, Ghaziuddin M. с соавт. сообщили о появлении аутизма после перенесенного височного долевого энцефалита, вызванного простым вирусом герпеса 1 типа [18]. Marques F. с соавт. описали развитие аутизма в результа-

те перенесенного энтеровирусного энцефалита [27]. Известен также ряд случаев развития расстройств аутистического спектра после коревого энцефалита не только у детей, но и у взрослых [21].

Ранее неоднократно сообщали об аномальной микробной нагрузке у детей с аутистическим спектром, хотя исчерпывающего объяснения этот факт так и не получил. Так, Binstock T. выделил субгруппу детей с аутизмом с так называемыми интрамоноситарными патогенами – вирусом кори, цитомегаловирусом, вирусом герпеса 6 типа, *Yersinia enterocolitica*. Для таких детей было характерно угнетение гемопоэза, нарушение периферического иммунитета, повышение проницаемости гематоэнцефалитического барьера и демиелинизация [6]. Engman M.L. с соавт. установили в контролируемом исследовании, что у пациентов с аутизмом чаще отмечалась врожденная цитомегаловирусная инфекция, чем у психически здоровых лиц [14]. Nicolson G.L. с соавт. в другом контролируемом исследовании, используя ПЦР сыворотки крови, показали аномально частое обнаружение микоплазмы пневмонии, хламидии пневмонии и вируса герпеса 6 типа у детей с аутизмом [33]. Продемонстрировано также аномально высокое напряжение иммунной памяти к вирусу варицелла зостер у детей с расстройствами аутистического спектра в исследовании по типу случай-контроль [17]. Mora M. с соавт. показали аномально высокие титры антител в вирусу простого герпеса 2 типа, которые были ассоциированы с антителами к мозговым антигенам (77% - против миндалевидного тела, 70% - против хвостатого ядра, 47,5% - против мозжечка и ствола мозга, 45% - против гиппокампов, 40% - против мозолистого тела и 17,5% - против коры полушарий большого мозга) у детей с аутизмом в контролируемом исследовании [30]. Singh V.K. с соавт. выявили ассоциацию высокой сероположительности к вирусу кори и вирусу герпеса 6 типа и большого титра аутоантител к основному белку миелина и белку филаментов аксонов нейронов у детей с аутизмом [50].

Действительно, у детей исследуемой группы, помимо внутриклеточных инфекций, отмечалась повышенная продукция антимозговых антител, преимущественно – против основного белка миелина и нейронспецифической энтолазы (около 70% случаев), а также признаки аутоенсибилизации нейтрофилов к антигенам мозга (34% случаев). Связь хронических вирусных инфекций и аутоенсибилизации к мозговым антигенам, например, из-за механизма молекулярной мимикрии, хорошо известна. Повидимому, генетический дефицит фолатного цикла способствовал как снижению резистентности к внутриклеточным патогенам, так и ин-

дукции аутоиммунных реакций, что указывает на нарушение иммунного статуса у таких пациентов.

Оценка иммунного статуса. В результате оценки иммунного статуса установлено, что почти все дети с генетическим дефицитом фолатного цикла были иммуноскомпрометированными лицами, причем отмечались некоторые однотипные нарушения иммунитета. Основой выявленного иммунодефицита было резко сниженное количество клеток субпопуляций лимфоцитов с фенотипом CD3–CD16+CD56+, получившие название естественных киллеров (natural killers, NK), и фенотипом CD3+CD16+CD56+, или естественных киллерных Т-клеток (natural killer T-cell, NKT) в периферической крови. Эти миноритарные субпопуляции крайне важны в осуществлении противовирусного и антиопухолевого иммунитета, что в значительной мере может объяснить избирательное нарушение противовирусной резистентности у детей исследуемой группы, равно как и повышенную склонность к развитию неоплазий, причем преимущественно – вирус-индуцированных форм онкологической патологии, у пациентов с первичным дефицитом ферментов фолатного цикла. Помимо этого, дефицит NK- и NKT-клеток ассоциирован с повышенной склонностью к развитию аутоиммунных осложнений [46] и гиперчувствительности замедленного типа [22], что согласуется с неоднократно зафиксированным феноменом аномально повышенной продукции аутоантител к мозговым антигенам и непереносимости многих пищевых аллергенов у детей с аутистическим спектром. Дефицит NK- и NKT-клеток также объясняет частое развитие побочных эффектов после вакцинаций, особенно – при введении живой аттенуированной вакцины против кори, краснухи и эпидемического паротита. Указанная форма клеточного иммунодефицита отмечалась среди участников исследуемой группы в 91% случаев, т.е. являлась специфическим признаком, в то время как среди здоровых детей контрольной группы признаки аналогичного иммунологического фенотипа имели место лишь в 27% случаев, причем обычно отмечалось незначительное снижение количества клеток ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Помимо этого, гораздо реже среди детей с аутистическим спектром отмечались другие нарушения иммунного статуса: снижение количества CD8+ Т-лимфоцитов (23%), CD4+ Т-клеток (12%), CD19+ В-лимфоцитов (9% случаев). Таким образом, только в 23% случаев был тотальный дефицит всех основных противовирусных субпопуляций лимфоцитов: Т-киллеров, естественных киллеров и естественных киллерных Т-лимфоцитов, причем именно у таких детей отмечалась наибольшая вирусная нагрузка на

момент вступлення в дослідження. Преимущественно имел место избирательный дефицит противовирусных клеток врожденного иммунитета, а количество CD8+ Т-лимфоцитов нередко оказывалось компенсаторно повышенным, что способствовало некоторому уменьшению вирусной нагрузки на организм ребенка. Такую форму иммунодефицита можно было легко идентифицировать в общем анализе крови, зафиксировав аномально малое количество клеток с фенотипом больших гранулярных лимфоцитов. Только у каждого десятого участника исследуемой группы было тотальное снижение всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов,

что отражалось в виде лимфопении в общем анализе крови. Нарушения отмечались и в гуморальном звене иммунитета. Дисиммуноглобулинемия, включающая изолированные и комбинированные дефициты отдельных классов и субклассов иммуноглобулинов, выявлена в 43% случаев, однако чаще всего была неглубокой и носила транзиторный характер. Гипоиммуноглобулинемия зарегистрирована лишь в 17% случаев. Дефицит миелопероксидазы фагоцитов отмечался в 35% случаев и комбинировался с нарушениями в других звеньях иммунитета в вариательной манере (рис. 6).

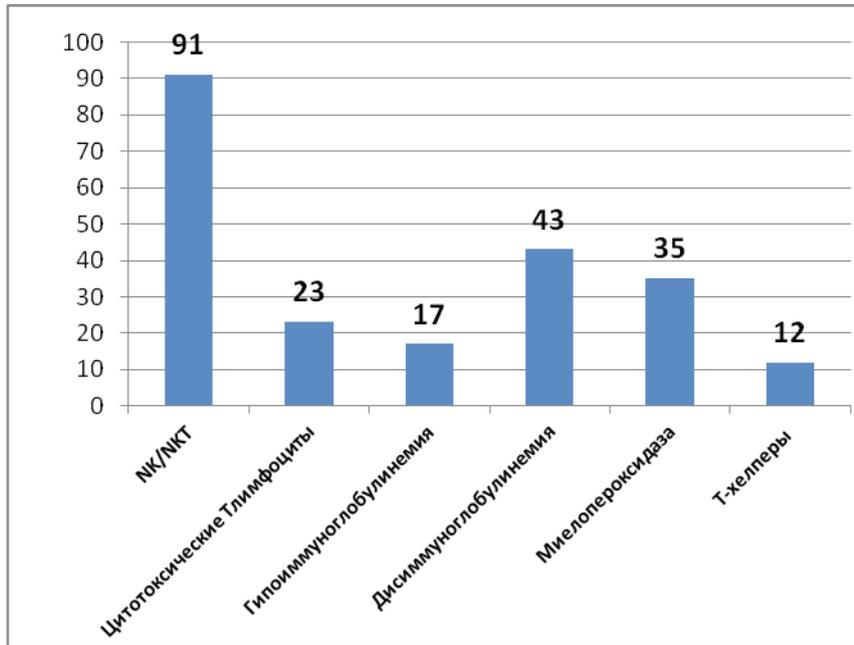


Рис. 6. Структура нарушений в иммунном статусе у детей с генетически детерминированным нарушением фолатного цикла (n=78)

На основании данных анализа иммунного статуса можно выделить основные иммунологические фенотипы у детей с генетически детерминированным дефицитом фолатного цикла. Основным иммунологическим фенотипом был дефицит противовирусного звена врожденного иммунитета: дефицит NK- и/или NKT-клеток. Этот фенотип отмечался почти у всех детей исследуемой группы. В 62% таких случаев отмечалось резкое снижение количества лимфоцитов обеих субпопуляций. Изолированные дефициты NK- и NKT-клеток отмечались редко – в 13% и 16% случаев соответственно, а тотальный дефицит противовирусных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, как указывалось выше, выявлялся лишь в 23% случаев, т.е. реже, чем у каждого третьего ребенка (рис. 7).

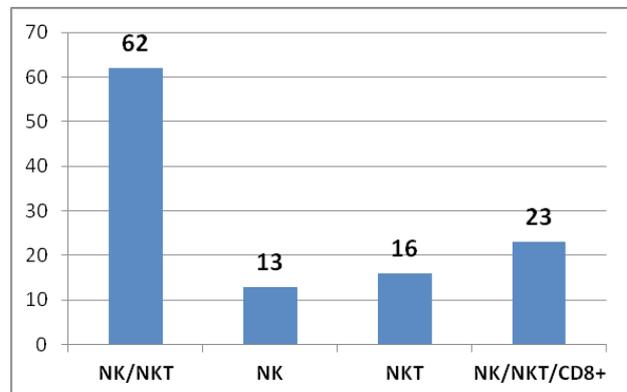


Рис. 7. Структура нарушений противовирусного иммунитета у детей с генетическим дефицитом фолатного цикла (n=78)

Результаты расчета критерия хи-квадрат для оценки связи между наличием полиморфизмов генов фолатного цикла и нарушением показателей иммунного статуса у пациентов исследуемой и контрольной групп приведены в табл. 2 и 3. Как видно из данных табл. 3, дефицит NK и NKT-клеток были тесно ассоциированы с наличием полимор-

физмов в генах ферментов фолатного цикла ($p=0,01$), а также продемонстрирована менее выраженная, но статистически значимая связь изучаемых генетических нарушений с дефицитом цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих корецепторную молекулу CD8, и дефицитом микробицидного фермента фагоцитов миелопероксидазы ($p=0,05$).

Табл. 2

Исходные данные для расчета критерия хи-квадрат Пирсона по дефициту NK/NKT-клеток при сравнении пациентов исследуемой (n=78) и контрольной (n=34) групп

	Дефицит NK и/или NKT-клеток	Нет дефицита NK и/или NKT-клеток	Всего
Полиморфизмы генов фолатного цикла	71	7	78
Нет полиморфизмов генов фолатного цикла	9	25	34
Всего	80	32	112

Табл. 3

Результаты расчета критерия хи-квадрат по отношению к показателям иммунного статуса при сравнении пациентов исследуемой (n=78) и контрольной (n=34) групп

Дефицит клетки/фактора	2	Статистическая значимость*
NK и/или NKT-клетки	51,1	$p=0,01$
NK-клетки	27,2	$p=0,01$
NKT-клетки	23,1	$p=0,01$
CD8+ Т-лимфоциты	4,6	$p=0,05$
CD4+ Т-лимфоциты	2,7	Статистически не значимо
Миелопероксидаза	4,4	$p=0,05$
IgM	2,1	Статистически не значимо
IgG	2,9	Статистически не значимо
IgA	3,1	Статистически не значимо
IgE	3,1	Статистически не значимо
Гипоиммуноглобулинемия	3,3	Статистически не значимо
Дисиммуноглобулинемия	3,7	Статистически не значимо

Примечание. * - 2 = 3,841 при $p=0,05$ и 6,635 при $p=0,01$

Тем не менее, изолированный дефицит клеток-киллеров имел место в 19% случаев, так как более, чем у половины участников исследуемой группы, отмечался расширенный иммунологический фенотип (54%), при котором наряду с выраженным и стойким дефицитом NK- и NKT-клеток отмечались менее глубокие и преимущественно транзиторные нарушения в других звеньях иммунитета, а именно – дефицит CD8+ Т-лимфоцитов, различные виды дисиммуноглобулинемии и дефицит миелопероксидазы фагоцитов. За счет подобных комбинаций могла видоизменяться клиническая картина инфекционного синдрома. Если для дефицита NK- и NKT-клеток снижается резистентность преимущественно к внутриклеточным микроорга-

низмам, что предопределяет развитие оппортунистических вирусных инфекций, то в случае присоединения дисиммуноглобулинемии дополнительно регистрировались рецидивирующие пиогенные бактериальные инфекции верхних дыхательных путей, чаще всего – вызванные *Str. pyogenes*, пневмококком и золотистым стафилококком. В то же время, при дефиците миелопероксидазы имели место эпизоды рецидивирующего кандидоза. В случае комбинации дефицита NK- и NKT-клеток с гипоиммуноглобулинемией отмечался фенотип общего переменного иммунодефицита (17% случаев), причем у таких детей отмечались в анамнезе эпизоды глубоких бактериальных инфекций, включая пневмонию, пиелонефрит и септицемию. Необ-

ходимо подчеркнуть, что в каждом десятом случае регистрировался фенотип, напоминающий тяжелый комбинированный иммунодефицит, за счет наложения глубокой лимфопении и гипили дисиммуноглобулинемии (рис. 8). У таких детей отмечались эпизоды врожденной цитомегаловирусной инфекции с грубыми пороками развития нервной системы или постнатальные

эпизоды вирусных энцефалитов с тяжелыми резидуальными симптомами. Это были дети, которым выставляли диагноз детского церебрального паралича, хотя при более глубоком анализе у них также обнаруживались признаки расстройств аутистического спектра. Как правило, в их геноме находилось сразу 4 полиморфизма генов фолатного цикла.

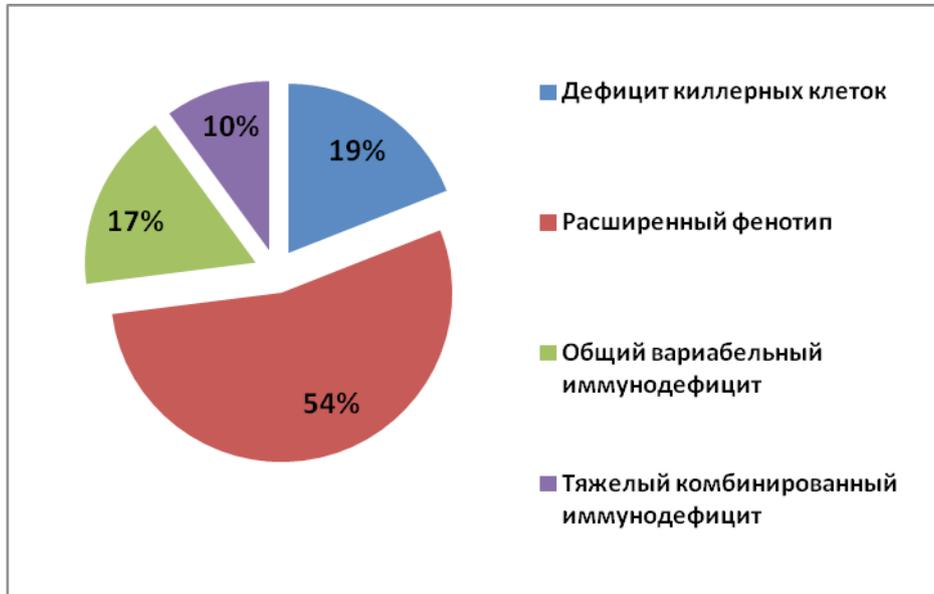


Рис. 8. Структура иммунологических фенотипов у детей с генетическим дефицитом фолатного цикла (n=78)

Все эти данные позволяют нам прийти к выводу, что генетический дефицит фолатного цикла приводит к развитию особой формы первичного иммунодефицита с переменным иммунологическим фенотипом, но преимущественным вовлечением NK- и NKT-клеток, что предопределяет резкое снижение резистентности к внутриклеточным микроорганизмам, опухолям и склонность к развитию аутоиммунных реакций и реакций гиперчувствительности замедленного типа. Мы предлагаем этот первичный иммунодефицит называть как иммунодефицит, ассоциированный с генетическим нарушением фолатного цикла.

Ранее неоднократно сообщалось об обнаружении различных форм иммунодефицитов неуточненного происхождения у детей с аутистическим спектром. Так, Santaella M.L. с соавт. показали, что избирательный дефицит IgA встречается среди пациентов с расстройствами аутистического спектра в 10,3 %, тогда как в контрольной группе здоровых детей – лишь в 1,6 % случаев [45]. Russo A.J. с соавт. продемонстрировали тесную связь между расстройствами аутистического спектра и дефицитом миелопероксидазы нейтрофилов [44]. Reinert P. с соавт. описали 20 случаев коревого подострого склерозирующего энцефалита с прогрессирующими психическими нарушениями у паци-

ентов с избирательным клеточным дефицитом к вирусу кори [43]. Juopouchi H. с соавт. показали ассоциацию расстройств аутистического спектра у детей с избирательным дефицитом специфических антиполисахаридных антител и дисфункцией моноцитов [23]. Известна также ассоциация PANDAS и синдрома Туретта с избирательным дефицитом IgA [25], а рефрактерных эпилепсий у детей – с дефицитами субклассов IgG [39]. В свете выявленных нами иммунологических данных, представляется очевидным, что, по крайней мере в части представленных случаев, указанные иммунные нарушения были лишь фрагментами более широкого фенотипа иммунодефицита, ассоциированного с генетическими нарушениями фолатного цикла.

Ранее в экспериментальных и клинических исследованиях сообщали про разнообразные нарушения иммунного статуса у пациентов с верифицированным дефицитом фолиевой кислоты и фолатного цикла. Так, van der Weyden M.B. с соавт. установили угнетение метаболизма лимфоцитов при фолатном дефиците, включающее нарушение деоксинуклеотидного метаболизма и тимидилатного цикла [55]. Partearroyo T. с соавт. показали, что дисбаланс фолиевой кислоты и витамина B12 нарушают цитотоксичность естественных киллеров, активность В-лимфоцитов и лимфопротифера-

цію [35]. Courtemanche С. с соавт. продемонстрували, що фолатний дефіцит приводить к угнетению пролиферации первичных CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов [8]. Abe I. с соавт. показали, что дефицит фолиевой кислоты приводит к уменьшению количества естественных киллеров, Т-лимфоцитов и В-клеток, но не базофилов и гранулоцитов [1]. Troen А.М. с соавт. установили, что неметаболизированная фолиевая кислота в сыворотке крови приводит к угнетению цитотоксичности естественных киллеров у женщин в постменопаузальный период [54]. А Bhatnagar N. с соавт. описали панцитопению при тяжелом фолатном дефиците [4]. Все эти разрозненные и несистематизированные данные являются отражением настойчивых попыток идентификации специфической иммунной дисфункции при фолатном дефиците. Наши результаты согласуются с накопленными ранее доказательствами о существовании первичного иммунодефицита, ассоциированного с генетическим дефицитом фолатного цикла.

Клинический фенотип. Вооружившись взаимосвязанными данными, полученными при изучении иммунного статуса и микробной нагрузки, можно лучше понять причины гетерогенности клинического фенотипа генетического дефицита фолатного цикла. Расстройства аутистического спектра наблюдались почти у всех детей исследуемой группы, что было связано с критериями отбора, хотя в целом аутизм не является облигатным проявлением нарушений в генах цикла фолиевой кислоты. Как известно, особенностью многих случаев аутизма является широкий клинический фенотип, который включает некоторые симптомы, напрямую не связанные с поражением нервной системы. Так, Juopouchi Н. с соавт. в контролируемом испытании помимо психических расстройств выявили склонность к пиогенным инфекциям (12/39), пищевую аллергию замедленного типа (5/8), резистентную к лечению эпилепсию (4/8), хронические гастроинтестинальные симптомы (5/8) у детей с расстройствами аутистического спектра [23]. В соответствии с этими данными, мы также констатируем факт широкого клинического фенотипа у детей с аутистическим спектром, ассоциированным с генетическим дефицитом фолатного цикла.

Помимо психических расстройств, в 46% случаев отмечались признаки височной медианной эпилепсии, связанной с височным медианным склерозом (рис. 9). В трети таких случаев клинические эпилептические приступы не регистрировались, однако отмечалась эпилептиформная активность на ЭЭГ. Ранее Monge-Galindo L. с соавт. в лонгитудинальном исследовании, охватывавшем 19 лет, продемонстрировали связь височного медианного склероза с

расстройствами аутистического спектра у детей [29]. Как известно, на сегодняшний день такие нарушения связывают с инфекцией, вызванной вирусами герпеса 6 и 7 типов [13], которые часто выявлялись в реактивированном состоянии у детей исследуемой группы. Помимо этого, имеются сообщения об аномально высоких титрах аутоантител к антигенам гиппокампов и миндалевидных тел у детей с расстройствами аутистического спектра [30].

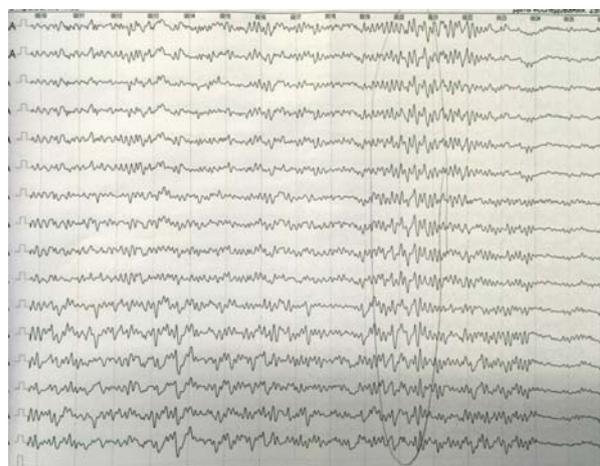
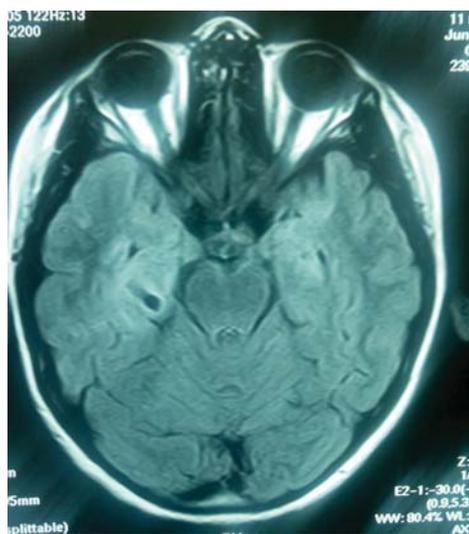


Рис. 9. МР-картина двустороннего склероза гиппокампов и связанная с этим эпилептиформная активность на ЭЭГ (обведено; собственное наблюдение)

Проявления PANDAS имели место в 27% случаев. Этот ассоциированный со стрептококковой инфекцией аутоиммунный синдром включает гиперкинезы по типу тиков, дистонии, хореоформных нарушений, которые сочетались с разным по тяжести обсессивно-компульсивным синдромом [26]. Как указывалось выше, стрептококковая инфекция отмечалась в 32% случаев и была ассоциирована с комбинацией дефицита NK/NKT-клеток и гуморальными нарушениями иммунитета. Ранее уже сообщали о нередких случаях повышенного титра аутоан-

тител к антигенам подкорковых узлов у детей с аутистическим спектром [30].

Двигательные расстройства отмечались лишь в 20% случаев, обычно – у детей с иммунологическими фенотипами общего вариабельного иммунодефицита или тяжелого комбинированного иммунодефицита (рис. 10). Такие пациенты переносили врожденную цито-

мегаловирусную инфекцию или постнатальный энцефалит, вызванный лимфотропными герпесвирусами. При генетическом исследовании обычно отмечалось сразу 3-4 полиморфизма в генах фолатного цикла, что, по нашему мнению, и предопределяло тяжелый клинический фенотип болезни.

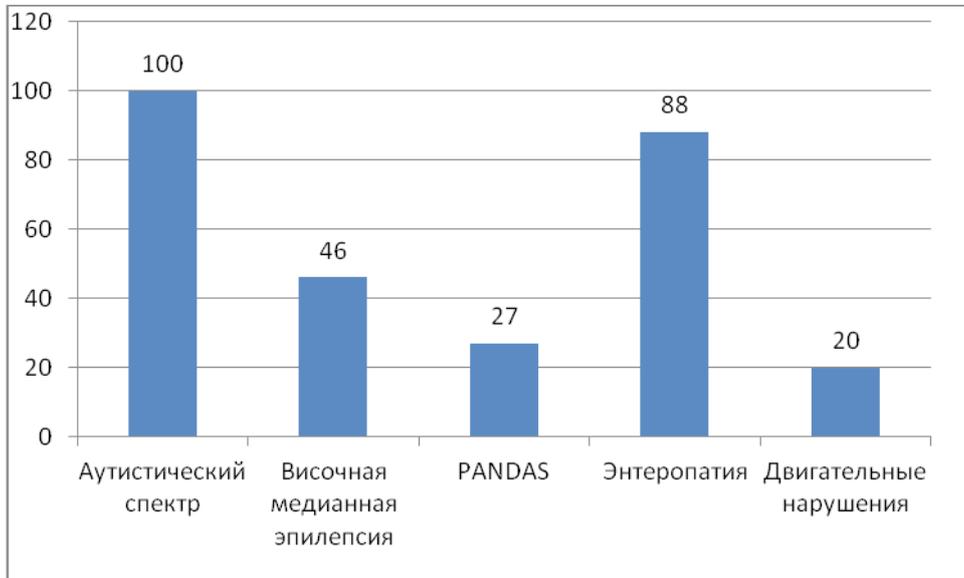


Рис. 10. Гетерогенный клинический фенотип у детей с генетическим нарушением фолатного цикла (n=78)

Кишечный синдром имел место в 88% случаев, однако его тяжесть не коррелировала с выраженностью психических нарушений. В некоторых случаях этот кишечный синдром полностью соответствовал картине энтеропатии с наличием непереваренной пищи в стуле и дефицитарными анемиями. У таких детей, как правило, отмечались признаки целиакии (31% случаев) или гиперчувствительности к казеину коровьего молока (27% случаев) – феномены, неоднократно описанные при первичных иммунодефицитах, включая дефицит НКТ-клеток [19]. Помимо этого, у таких детей отмечались гуморальные нарушения в иммунном статусе, включая дефицит IgA, при котором также неоднократно сообщали о повышенной склонности к глютенной энтеропатии [15]. Однако у большинства детей имела место картина колита с персистирующими запорами. Russo A.J. с соавт. описали особое лимфопролиферативное поражение кишечника у детей с аутистическим спектром [44], которое по патоморфологическим признакам напоминает нодулярную лимфоидную гиперплазию кишечника, встречающуюся при многих первичных иммунодефицитах [37]. По-видимому, именно эти нарушения и были основой для развития кишечного синдрома. В 12% случаев имели место признаки цитомегаловирусного энтероколита, преимущественно

– среди детей с врожденной цитомегаловирусной инфекцией. В случае гуморального компонента в фенотипе иммунодефицита отмечались эпизоды лямблиоза кишечника (36% случаев). В 17% случаев зафиксирован кандидоз кишечника, преимущественно – среди детей с дефицитом миелопероксидазы. Нельзя было сбрасывать со счетов рецидивирующие гельминтные инвазии (48% случаев), которые можно объяснить не только поведенческими нарушениями, но и наличием глубокого дефицита IgE. Таким образом, кишечный синдром был гетерогенным по происхождению, что требовало дифференцированного подхода к назначению лечебных вмешательств.

Механизм поражения головного мозга. Данные МР-томограмм головного мозга указывали на наличие признаков лейкоэнцефалопатии почти у всех детей исследуемой группы (96% случаев). Эта лейкоэнцефалопатия широко варьировала – от диффузного нарушения миелинизации белого вещества (рис. 10А), минув обширную перивентрикулярную демиелинизацию (рис. 10Б), до ограниченных зон задержки миелинизации/демиелинизации в перивентрикулярных зонах теменных долей полушарий большого мозга (рис. 10В,10Г). Именно эти почти симметричные очаги нарушенной миелинизации в перивентрикулярных зонах теменных

долей были наиболее характерными признаками, отмечавшимися почти у всех детей. Такие зоны по локализации и нейровизуализационными проявлениями очень напоминали участки задержки миелинизации, описанные ранее как характерный признак врожденной цитомегаловирусной инфекции у людей [38], однако отмечались и при реактивированных инфекциях, вызванных другими герпесвирусами. Ранее о демиелинизации как об одном из основных механизмов поражения мозга при расстройствах аутистического спектра заявил Binstock T. [6].

На сегодняшний день хорошо известна способность герпесвирусов индуцировать демиелинизацию при развитии моно- или мультифокального лейкоэнцефалита [24]. Наличие дефицита NK- и NKT-клеток, отмечающееся у детей с генетическими нарушениями фолатного цикла, по-видимому, является предрасполагающим условием для развития вирус-индуцированной демиелинизации. Кроме того, следует учитывать аутоиммунный компонент лейкоэнцефалопатии, так как у большинства детей отмечался аномально высокий титр антител к основному белку миелина, а, по крайней мере, в трети случаев имела место повышенная сенсibilизация нейтрофилов к указанному мозговому антигену. Кроме этого, имеются данные о повышенной склонности к демиелинизации при дефиците фолатного цикла. Так, Strunk T. с соавт. описали подострую лейкоэнцефалопатию после применения малых доз метотрексата при гетерозиготном полиморфизме MTHFR 677 C>T, хотя метотрексат обычно вызывает поражение миелина при применении в высоких дозах и лишь у отдельных пациентов [51]. Недавно Tran T. с соавт. изучили полиморфизм MTHFR 677 C>T как генетическое нарушение, предрасполагающее к появлению феномена гиперинтенсивных теней в белом веществе полушарий большого мозга [53]. Обширность лейкоэнцефалопатии была связана с клиническим фенотипом, так как при изолированном вовлечении перивентрикулярных зон теменных долей отмечались только аутистические расстройства, тогда как при распространении нарушений миелинизации в другие отделы мозга имели место дополнительные двигательные проявления и признаки нарушения интеллекта.

Помимо лейкоэнцефалопатии, следует учитывать случаи врожденной цитомегаловирусной нейроинфекции с пороками развития ЦНС, перенесенные эпизоды постанатальных герпесвирусных энцефалитов, наличие височного медианного склероза, подострого коревого/краснушного склерозирующего панэнцефалита, постгриппозной энцефалопатии. В случае PANDAS обычно отмечались MP-признаки гипертрофии базальных ганглиев. Также следует

помнить о неклассифицированных аутоиммунных реакциях, включая продукцию аутоантител к антигенам коры головного мозга, о которых сообщали ранее в контексте расстройств аутистического спектра у детей [30, 50].

Выводы. Таким образом, есть основания выделить новую форму первичного иммунодефицита – иммунодефицит, ассоциированный с генетическим нарушением фолатного цикла. Эта иммунная дисфункция имеет вариабельный иммунологический фенотип, однако дефицит NK- и NKT-клеток является наиболее типичным признаком болезни. По-видимому, именно эти клетки наиболее чувствительны к метаболическому дефекту, опосредованному полиморфизмами генов фолатного цикла. Преимущественное вовлечение NK- и NKT-клеток предопределяет избирательное и резкое снижение резистентности к внутриклеточным микроорганизмам, включая оппортунистические вирусы, склонность к индукции аутоиммунных реакций и гиперчувствительности замедленного типа. По сути, данный иммунодефицит позволяет объяснить ключевые особенности клинико-лабораторного фенотипа многих детей с аутистическим спектром, для которого характерны аномальная микробная нагрузка, вызванная интрацеллюлярными патогенами, разнообразные отклонения в иммунном статусе, плохая переносимость вакцинаций, аномально высокая продукция антимозговых аутоантител и развитие реакций гиперчувствительности замедленного типа, например, к пищевым антигенам. Иммунодефицит позволяет объединить в общий фенотип на первый взгляд разрозненные синдромы, которые часто последовательно развиваются у детей с аутистическим спектром, включая инфекционные поражения, лейкоэнцефалопатию, PANDAS, височную медианную эпилепсию и кишечные нарушения. Хотя, по-видимому, имеются и прямые метаболические воздействия, многие клинические проявления, отмечающиеся у детей с дефицитом фолатного цикла, связаны не с прямым токсическим воздействием гомоцистеина и других продуктов на нервные клетки, а с развитием иммунозависимых осложнений, опосредованных иммунодефицитом, включая нейроинфекционные поражения и индукцию аутоиммунных реакций к антигенам нервной ткани.

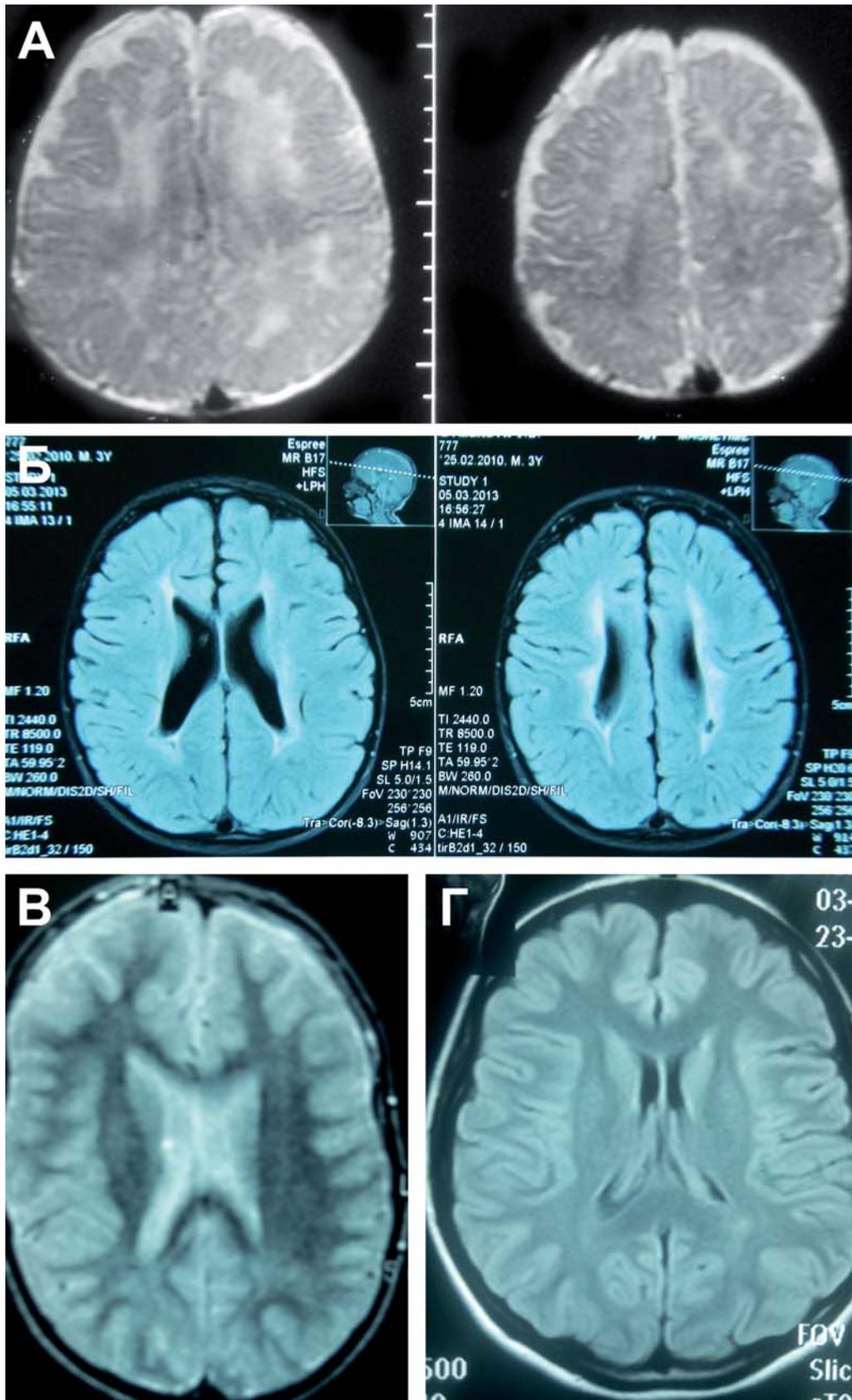


Рис. 10. Гетерогенність проявлень лейкоенцефалопатії у дітей з генетичним порушенням фолатного циклу (А - незрілість головного мозку та дифузне порушення мієлінізації; Б - обширна перивентрикулярна демієлінізація, нагадуюча лейкодістрофію; В – виражена білатеральна демієлінізація в темних долях перивентрикулярно, дизгенезія мозку, деформація жовчужкової системи, Г – ограничене двостороннє порушення мієлінізації в темних долях перивентрикулярно; власні спостереження).

Ранее установлена связь полиморфизмов генов фолатного цикла с некоторыми аутоиммунными болезнями, в патогенезе которых преобладают клеточные иммунопатологические реакции, включая рассеянный склероз [32] и ревматоидный артрит [12]. Важен факт, что эти же аутоиммунные поражения преобладают у пациентов с первичными дефицитами НК- и НКТ-клеток [34, 56]. Кроме того, выявлена связь полиморфизмов генов фолатного цикла со злокачественными новообразованиями, которые являются, как известно, характерными проявлениями первичных дефицитов НК- и НКТ-клеток. Таким образом, полученные данные позволяют найти недостающее звено в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и неопластических поражений у пациентов с генетическим дефицитом фолатного цикла, которым является первичный иммунодефицит, связанный с преимущественным поражением киллерных клеток.

На данный момент известен другой иммунодефицит, при котором метаболический дефект присутствует во всех клетках организма, однако клинически значимое нарушение формируется лишь в некоторых субпопуляциях лимфоцитов, что предопределяет развитие именно иммунной дисфункции, а не классической метаболической генетической болезни. Речь идет о первичном дефиците аденозиндезаминазы, при котором развивается избирательный дефицит Т-лимфоцитов, хотя мутантный ген экспрессируется во многих клетках организма человека [3].

Кроме этого, уже известен и хорошо охарактеризован первичный иммунодефицит, вызванный не классическими менделевскими мутациями, а полиморфизмами гена, кодирующего компонент иммунной системы. Так, при наследственном дефиците маннозосвязывающего лектина имеют место комбинации полиморфизмов структурных генов и промоторного участка, которые приводят к аномально слабой выработке указанного фактора иммунитета. В клинической картине этого иммунодефицита также преобладают инфекционные, аллергические, аутоиммунные и онкологические поражения [9].

Таким образом, в клинической иммунологии уже описаны и изучены похожие формы первичных иммунодефицитов, которые позволяют легче понять природу новой иммунодефицитной болезни, связанной с генетически детерминированным нарушением деятельности ферментов фолатного цикла.

Следует указать, что с генетическим дефицитом фолатного цикла сегодня связывают и некоторые другие нарушения психики, включая большую депрессию, биполярное расстройство и шизофрению. Полученные нами данные по-

зволяют предположить иммунозависимый компонент патогенеза в таких случаях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abe, I., Shirato, K., Hashizume, Y. (2013), "Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats" *Environ Health Prev. Med.*, vol. 18(1), pp. 78–84.
2. Badiga, S., Johanning, G.L., Macaluso, M., et al. (2014), "A lower degree of PBMC L1 methylation in women with lower folate status may explain the MTHFR C677T polymorphism associated higher risk of CIN in the US post folic acid fortification era" *PLoS One*, vol. 9(10), e110093.
3. Baffelli, R., Notarangelo, L.D., Imberti, L., et al. (2015), "Diagnosis, Treatment and Long-Term Follow Up of Patients with ADA Deficiency: a Single-Center Experience" *J. Clin. Immunol.*, vol. 35(7), pp. 624–637.
4. Bhatnagar, N., Wechalekar, A., McNamara, C. (2012), "Pancytopenia due to severe folate deficiency" *Intern. Med. J.*, vol. 42(9), pp. 1063–1064.
5. Biamino, E., Di Gregorio, E., Belligni, E.F. (2015), "A novel 3q29 deletion associated with autism, intellectual disability, psychiatric disorders, and obesity" *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet.* [Epub ahead of print].
6. Binstock, T. (2001), "Intra-monocyte pathogens delineate autism subgroups" *Med. Hypotheses*, vol. 56(4), pp. 523–531.
7. Borges, M.C., Hartwig, F.P., Oliveira, I.O., Horta, B.L. (2016) "Is there a causal role for homocysteine concentration in blood pressure? A Mendelian randomization study" *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 103(1), pp. 39–49.
8. Courtemanche, C., Elson-Schwab, I., Mashiyama, S.T. (2004), "Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes in vitro" *J. Immunol.*, vol. 173(5), pp. 3186–3192.
9. Darton, T.C., Jack, D.L., Johnson, M., et al. (2014), "MBL2 deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children" *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20(12), pp. 1337–1342.
10. DeGiudice-Asch, G., Simon, L., Schmeidler, J. (1999), "Brief report: a pilot open clinical trial of intravenous immunoglobulin in childhood autism" *J. Autism Dev. Disord.*, vol. 29(2), pp. 157–160.
11. Delorme, R., Betancur, C., Scheid, I. (2010), "Mutation screening of NOS1AP gene in a

- large sample of psychiatric patients and controls" *BMC Med. Genet*, vol. 11, pp. 108.
12. *Dimitroulas, T., Sandoo, A., Hodson, J., et al.* (2015), "Associations between asymmetric dimethylarginine, homocysteine, and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism (rs1801133) in rheumatoid arthritis" *Scand. J. Rheumatol.* [Epub ahead of print].
 13. *Donati, D., Akhyani, N., Fogdell-Hahn, A., et al.* (2003), "Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections" *Neurology*, vol. 61(10), pp. 1405–1411.
 14. *Engman, M.L., Sundin, M., Miniscalco, C.* (2015), "Prenatal acquired cytomegalovirus infection should be considered in children with autism" *Acta Paediatr*, vol. 104(8), pp. 792–795.
 15. *Fahl, K., Silva, C.A., Pastorino, A.C., et al.* (2014) "Autoimmune diseases and auto antibodies in pediatric patients and their first-degree relatives with immunoglobulin A deficiency" *Rev. Bras. Reumatol.* [Epub ahead of print].
 16. *Frye, R.E.* (2015), "Metabolic and mitochondrial disorders associated with epilepsy in children with autism spectrum disorder" *Epilepsy Behav*, vol. 47, pp. 147–157.
 17. *Gentile, I., Zappulo, E., Bonavolta, R.* (2014), "Exposure to Varicella Zoster Virus is higher in children with autism spectrum disorder than in healthy controls. Results from a case-control study" *In Vivo*, vol. 28(4), pp. 627–631.
 18. *Ghaziuddin, M., Al-Khouri, I., Ghaziuddin, N.* "Autistic symptoms following herpes encephalitis" *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*, vol. 11(3), pp. 142–146.
 19. *Grose, R.H., Thompson, F.M., Cummins, A.G.* (2008), "Deficiency of 6B11+ invariant NK T-cells in celiac disease" *Dig. Dis. Sci*, vol. 53(7), pp. 1846–1851.
 20. *Hanks, J.* (2013) "The association between MTHFR 677C>T genotype and folate status and genomic and gene-specific DNA methylation in the colon of individuals without colorectal neoplasia" *Am. J. Clin. Nutr*, vol. 98(6), pp. 1564–1574.
 21. *Hiroshi, H., Seiji, K., Toshihiro, K., Nobuo, K.* (2003), "An adult case suspected of recurrent measles encephalitis with psychiatric symptoms" *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, vol. 105(10), pp. 1239–1246.
 22. *Inaoka, M.* (2005), "Innate immunity and hypersensitivity syndrome" *Toxicology*. vol. 209(2), pp. 161–163.
 23. *Jyonouchi, H., Geng, L., Streck, D.L., Toruner G.A.* (2012), "Immunological characterization and transcription profiling of peripheral blood (PB) monocytes in children with autism spectrum disorders (ASD) and specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD): case study" *J. Neuroinflammation*, vol. 9, pp. 4.
 24. *Kamei, A., Ichinohe, S., Onuma, R., et al.* (1997), "Acute disseminated demyelination due to primary human herpesvirus-6 infection" *Eur. J. Pediatr*, vol. 156(9), pp. 709–712.
 25. *Kawikova, I., Grady, B.P., Tobiasova, Z. et al.* (2010), "Children with Tourette's syndrome may suffer immunoglobulin A dysgammaglobulinemia: preliminary report" *Biol. Psychiatry*, vol. 67(7), pp. 679–683.
 26. *Macerollo, A., Martino, D.* (2013), "Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections (PANDAS): An Evolving Concept" *Tremor Other Hyperkinet. Mov. (NY)*, tre-03-167-4158-7.
 27. *Marques, F., Brito, M.J., Conde, M.* (2014), "Autism spectrum disorder secondary to enterovirus encephalitis" , vol. 29(5), pp. 708–714.
 28. *Miller, A.L.* (2003), "The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases" *Altern Med Rev*, vol. 8(1), pp. 7–19.
 29. *Monge-Galindo, L., Prez-Delgado, R., Lopez-Pisn, J.* (2010), "Mesial temporal sclerosis in paediatrics: its clinical spectrum. Our experience gained over a 19-year period" *Rev. Neurol*, vol. 50(6), pp. 341–348.
 30. *Mora, M., Quintero, L., Cardenas, R.* (2009) "Association between HSV-2 infection and serum anti-rat brain antibodies in patients with autism" *Invest. Clin.*, vol. 50(3), pp. 315–326.
 31. *Morales de Mach n, A., M ndez, K., Sol s, E., et al.* (2015), "C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mothers of children affected with neural tube defects" *Invest. Clin.* vol. 56(3), pp. 284–295.
 32. *Naghibalhossaini, F., Ehyakonandeh, H., Nikseresht, A., Kamali, E.* (2015), "Association Between MTHFR Genetic Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population" *Int. J. Mol. Cell. Med*, vol. 4(2). pp. 87–93.
 33. *Nicolson, G.L., Gan, R., Nicolson, N.L., Haier J.* (2007) "Evidence for Mycoplasma ssp., Chlamydia pneumoniae, and human herpes virus-6 coinfections in the blood of patients with autistic spectrum disorders" *J. Neurosci Res*, vol. 85(5), pp. 1143–1148.

34. O'Keeffe, J., Gately, C.M., Counihan, T., et al. (2008). "T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to alpha-galactosylceramide are impaired" *J. Neurol. Sci.*, vol. 275(1-2), pp. 22–28.
35. Partearroyo, T., beda, N., Montero, A. (2013), "Vitamin B(12) and folic acid imbalance modifies NK cytotoxicity, lymphocytes B and lymphoproliferation in aged rats" *Nutrients.* vol. 5(12), pp. 4836–4848.
36. Peng, Q., Lao, X., Huang, X., et al. (2015), "The MTHFR C677T polymorphism contributes to increased risk of Alzheimer's disease: evidence based on 40 case-control studies" *Neurosci Lett*, vol. 586, pp. 36–42.
37. Pia cik, M., Ryzewska, G., Pawlik, M., et al. (2007), "Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of the gastrointestinal tract in patient with selective immunoglobulin A deficiency and sarcoid-like syndrome – case report" *Adv. Med. Sci.*, vol. 52, pp. 296–300.
38. Pinillos-Pisón, R., Llorente-Cereza, M.T., López-Pisón, J. (2009), "Congenital infection by cytomegalovirus. A review of our 18 years' experience of diagnoses" *Rev. Neurol.*, vol. 48(7), pp. 349–353.
39. Plebani, A., Duse, M., Tiberti, S. (1988), "Intravenous gamma-globulin therapy and serum IgG subclass levels in intractable childhood epilepsy" *Monogr. Allergy*, vol. 23, pp. 204–215.
40. Promthet, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T. et al. (2012), "Risk factors for rectal cancer and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in a population in Northeast Thailand" *Asian. Pac. J. Cancer Prev*, vol. 13(8), pp. 4017–4023.
41. Pu, D., Shen, Y., Wu, J. (2013), "Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis" *Autism Res*, vol. 6(5), pp. 384–392.
42. Qi, X., Sun, X., Xu, J., et al. (2014), "Associations between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk in Chinese population" *Tumour. Biol.*, vol. 35(3), pp. 1757–1762.
43. Reinert, P., Moulías, R., Goust, J.M. (1972), "Demonstration of cellular immunity deficiency limited to measles virus in 20 cases of subacute sclerosing leukoencephalitis" *Arch. Fr. Pédiatr*, vol. 29(6), pp. 655–665.
44. Russo, A.J., Kringsman, A., Jepson, B., Wakefield, A. (2009), "Low serum myeloperoxidase in autistic children with gastrointestinal disease" *Clinical and Experimental Gastroenterology*, vol. 2, pp. 85–94.
45. Santaella, M.L., Varela, Y., Linares, N., Disdier, O.M. (2008), "Prevalence of autism spectrum disorders in relatives of patients with selective immunoglobulin A deficiency" *P. R. Health. Sci J*, vol. 27(3), pp. 204–208.
46. Schleinitz, N., Vély, F., Harlé, J.N., Vivier, E. (2010), "Natural killer cells in human autoimmune diseases" *Immunology*, vol. 131(4), pp. 451–458.
47. Schoendorfer, N.C., Obeid, R., Moxon-Lester, L. (2012), "Methylation capacity in children with severe cerebral palsy" *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 42(7), pp. 768–776.
48. Scott, J.M. (1994), "Folic acid metabolism and mechanisms of neural tube defects" *Ciba Found Symp*, vol. 181, pp. 180–187.
49. Singh, A., Pandey, S., Pandey, L.K., Saxena, A.K. (2015), "In human alleles specific variation of MTHFR C677T and A1298C associated "risk factor" for the development of ovarian cancer" *J. Exp. Ther. Oncol*, vol. 11(1), pp. 67–70.
50. Singh, V.K., Lin, S.X., Yang, V.C. (1998), "Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism" *Clin. Immunol. Immunopathol*, vol. 89(1), pp. 105–108.
51. Strunk, T., Gottschalk, S., Goepel, W. (2003), "Subacute leukoencephalopathy after low-dose intrathecal methotrexate in an adolescent heterozygous for the MTHFR C677T polymorphism" *Med. Pediatr. Oncol*, vol. 40(1), pp. 48–50.
52. Sukla, K.K., Jaiswal, S.K., Rai, A.K., et al. (2015). "Role of folate-homocysteine pathway gene polymorphisms and nutritional cofactors in Down syndrome: A triad study" *Hum. Reprod*, vol. 30(8), pp. 1982–1993.
53. Tran, T., Cotlarciuc, I., Yadav, S., et al. (2015), Candidate-gene analysis of white matter hyperintensities on neuroimaging *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. [Epub ahead of print].
54. Troen, A.M., Mitchell, B., Sorensen, B. (2006), "Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women " *J. Nutr*, vol. 136(1), pp. 189–194.
55. Van der Weyden, M.B., Hayman, R.J., et al. (1991), "Folate-deficient human lymphoblasts: changes in deoxynucleotide metabolism and thymidylate cycle activities" *Eur. J. Haematol*, vol. 47(2), pp. 109–114.
56. Villanueva, J., Lee, S., Giannini, E.H., et al. (2005), Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome *Arthritis Res. Ther*, vol. 7(1). R30–37.

57. Yang, Y., Luo, Y., Yuan, J., et al. (2015), "Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation" Arch. Gynecol. Obstet. [Epub ahead of print].
58. Zhang, X.F., Liu, T., Li, Y., Li, S. (2015), "Association between MTHFR 677C/T and 1298A/C gene polymorphisms and breast cancer risk" Genet. Mol. Res, vol. 14(4), pp. 16425–16430.

РЕЗЮМЕ

Иммунодефицит, обусловленный генетически детерминированным нарушением фолатного цикла, у детей с расстройствами аутистического спектра

Мальцев Д.В.

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

Актуальность. Генетический дефицит ферментов фолатного цикла рассматривается сегодня как одна из распространенных причин расстройств аутистического спектра у детей, однако связь между генетическими поломками и компонентами клинического фенотипа охарактеризована недостаточно. Имеется ряд доказательств участия иммунной системы в патогенезе таких расстройств, включая ассоциацию с иммунодефицитами, случаи развития аутизма после нейроинфекций и аутоиммунных энцефалитов, эффективность иммунотерапии.

Цель исследования: провести комплексную оценку иммунного статуса у детей с расстройствами аутистического спектра, ассоциированными с генетически детерминированным дефицитом фолатного цикла.

Материалы и методы. В проспективном контролируемом одноцентровом исследовании принимали участие 78 детей с диагнозом расстройств психики аутистического спектра и/или детского церебрального паралича. Это были пациенты из различных регионов Украины в возрасте от 2 до 10 лет, 47 мальчиков и 31 девочка. Контрольную группу составили 34 здоровых ребенка с похожим возрастным и гендерным распределением. Проводили идентификацию полиморфизмов генов фолатного цикла (ПЦР), комплексное иммунологическое обследование, диагностику инфекций (ПЦР, серологические тесты, микробиологический метод), определение биомаркеров (биохимические методы). С целью установления достоверности отличий результатов применяли Т-критерий Стьюдента с расчетом коэффициента доверительной вероятности p (параметрический критерий) и число знаков Z по Урбаху (непараметрический критерий). Для изучения связи между полиморфизмами генов фолатного цикла и показателями иммунного статуса использовали критерий хи-квадрат (χ^2) Пирсона.

Результаты исследования. Дефицит НК- или /НКТ-клеток отмечался в исследуемой группе в 91% случаев, т.е. являлась специфическим признаком, в то время как среди здоровых детей контрольной группы признаки аналогичного иммуннофенотипа имели место лишь в 27% случаев, причем обычно отмечалось незначительное снижение

количества клеток ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Дефицит НК и НКТ-клеток были тесно ассоциированы с наличием полиморфизмов в генах ферментов фолатного цикла ($\chi^2 = 51,1$; $p = 0,01$), а также продемонстрирована менее выраженная, но статистически значимая связь с дефицитом цитотоксических Т-лимфоцитов ($p = 0,05$) и миелопероксидазы ($p = 0,05$). Показана аномально сниженная резистентность пациентов исследуемой группы к вирусным агентам: лимфотропным герпесвирусами, вируса кори и краснухи, ротавирусам, которую можно объяснить выявленным иммунодефицитом. Показан расширенный клинический фенотип, включающий помимо аутистических расстройств, другие иммунозависимые поражения: височный медианный склероз и височную медианную эпилепсию (46%), PANDAS (27%) и кишечный синдром (88% случаев). Лейкоэнцефалопатия, особенно – вовлечение перивентрикулярных зон теменных долей, связанная с нейроинфекциями и аутоиммунными реакциями, была основной формой поражения ЦНС (96% случаев).

Выводы. Есть основания выделить новую форму первичного иммунодефицита – иммунодефицит, ассоциированный с генетическим нарушением фолатного цикла. Этот иммунодефицит имеет вариабельный иммунологический фенотип, однако дефицит НК- и НКТ-клеток является наиболее типичным признаком болезни. Преимущественное вовлечение НК- и НКТ-клеток предопределяет избирательное и резкое снижение резистентности к внутриклеточным микроорганизмам, включая оппортунистические вирусы, склонность к индукции аутоиммунных реакций к мозговым антигенам и гиперчувствительности замедленного типа.

Ключевые слова: фолатный цикл, полиморфизмы, НК-клетки, иммунодефицит, аутизм.

РЕЗЮМЕ

Імунодефіцит, обумовлений генетично детермінованим порушенням фолатного циклу, у дітей з розладами аутистичного спектру

Мальцев Д.В.

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

Актуальність. Генетичний дефіцит ферментів фолатного циклу розглядається сьогодні як одна з поширених причин розладів аутистичного спектру у дітей, однак зв'язок між генетичними поломками і компонентами клінічного фенотипу охарактеризований недостатньо. Є ряд доказів участі імунної системи в патогенезі таких розладів, включаючи асоціацію з імунодефіцитами, випадки розвитку аутизму після нейроінфекцій і аутоімунних енцефалітів, ефективність імунотерапії.

Мета дослідження: провести комплексну оцінку імунного статусу у дітей з розладами аутистичного спектру, асоційованими з генетично детермінованим дефіцитом фолатного циклу.

Матеріали і методи. У проспективному контрольованому одноцентровому дослідженні брали участь 78 дітей з діагнозом розладів психіки аутистичного спектру і/або дитячого церебрального параличу. Це були пацієнти з різних регіонів України віком від 2 до 10 років, 47 хлопчиків і 31 дівчинка. Контрольну групу склали 34 здорових дитини зі схожим віковим

і гендерним розподілом. Проводили ідентифікацію поліморфізмів генів фолатного циклу (ПЛР), комплексне імунологічне обстеження, діагностику інфекцій (ПЛР, серологічні тести, мікробіологічний метод), визначення біомаркерів (біохімічні методи). З метою встановлення достовірності відмінностей результатів застосовували Т-критерій Стьюдента з розрахунком коефіцієнта довірчої ймовірності p (параметричний критерій) і число знаків Z за Урбахом (непараметричний критерій). Для вивчення зв'язку між поліморфізмами генів фолатного циклу і показниками імунного статусу використовували критерій χ^2 -квадрат (χ^2) Пірсона.

Результати дослідження. Дефіцит NK- і/або NKT-клітин відзначався в досліджуваній групі в 91% випадків, тобто був специфічною ознакою, в той час як серед здорових дітей контрольної групи аналогічний імунотип мав місце лише в 27% випадків, причому зазвичай відзначалося незначне зниження кількості клітин ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Дефіцит NK і NKT-клітин були тісно асоційовані з наявністю поліморфізмів в генах ферментів фолатного циклу ($\chi^2 = 51,1$; $p = 0,01$), а також продемонстровано менш виражений, але статистично значущий зв'язок з дефіцитом цитотоксичних Т-лімфоцитів ($p = 0,05$) і мієлопероксидази ($p = 0,05$). Показана аномально знижена резистентність пацієнтів досліджуваної групи до вірусних агентів: лімфотропних герпесвірусів, вірусу кору і краснухи, ротавірусів, яку можна пояснити виявленим імунодефіцитом. Показаний розширений клінічний фенотип, який включає, окрім аутистичних розладів, інші імунозалежні ураження: скроневий медіанний склероз і скроневу медіанну епілепсію (46%), PANDAS (27%) і кишковий синдром (88% випадків). Лейкоенцефалопатія, особливо – залучення перивентрикулярних зон тім'яних часток, пов'язана з нейроінфекціями і аутоіммунними реакціями, була основною формою ураження ЦНС (96% випадків).

Висновки. Є підстави виділити нову форму первинного імунодефіциту – імунодефіцит, асоційований з генетичним порушенням фолатного циклу. Цей імунодефіцит має варіабельний імунологічний фенотип, однак дефіцит NK- і NKT-клітин є найбільш типовою ознакою хвороби. Переважне залучення NK- і NKT-клітин зумовлює вибіркоче і різке зниження резистентності до внутрішньоклітинних мікроорганізмів, включаючи опортуністичні віруси, схильність до індукції аутоіммунних реакцій до мозкових антигенів і гіперчутливості уповільненого типу.

Ключові слова: фолатний цикл, поліморфізми, NK-клітини, імунодефіцит, аутизм.

SUMMARY

IMMUNODEFICIENCY DUE TO GENETICALLY DETERMINED DISTURBANCE OF FOLATE CYCLE IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Maltsev D.V.

Institute of Experimental and Clinical Medicine
O'Bogomolets NMU

Backgrounds. cycle enzymes is considered today as one of the common causes of autism spectrum disorders in children, but the relationship between the genetic components of failures and clinical phenotype was characterized insufficiently. There is some evidence of immune system involvement in the pathogenesis, including

association with immunodeficiencies, cases of autism after neuroinfections and autoimmune encephalitis, the effectiveness of immunotherapy.

The aim: To conduct a comprehensive assessment of the immune status in children with autism spectrum disorders associated with genetically determined deficiency of folate cycle.

Materials and methods. In a prospective, controlled, single-center study involved 78 children diagnosed with autism spectrum disorders and/or cerebral palsy. These were patients from different regions of Ukraine in age from 2 to 10 years old, 47 boys and 31 girls. Control group consisted of 34 healthy children with the same age and gender distribution. The identification of polymorphisms of folate cycle (PCR), a complex immunological investigation, diagnosis of infection (PCR, serological tests, microbiological method), determination of biomarkers (biochemical methods) were performed. In order to establish the reliability of the results of the differences used Student's T-test with the calculation of a confidence factor of the probability p (parametric test) and the number of signs Z by Urbach (nonparametric). To study the relationship between polymorphisms of folate cycle genes and the immune status using the chi-square Pearson (χ^2).

Study results. The deficiency of NK- and/or NKT-cells was observed in the study group in 91% of cases, while among the control group of healthy children of similar signs immunophenotype occurred only in 27% of cases, and usually there was a slight decrease in the number of cells ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Deficiency of NK and NKT-cells were closely associated with the presence of polymorphisms in the genes of enzymes of folate cycle ($\chi^2 = 51,1$; $p = 0,01$), as well as demonstrated less pronounced but statistically significant association with a deficiency of cytotoxic T lymphocytes ($p = 0,05$) and myeloperoxidase ($p = 0,05$). Shown abnormally reduced resistance to viral agents: lymphotropic herpesviruses, measles and rubella, rotavirus, which can be explained by the immune deficiency. Showed extensive clinical phenotype, comprising the addition of autistic disorders, other immunodependent lesions: mesial temporal sclerosis and temporal mesial epilepsy (46%), PANDAS (27%) and bowel syndrome (88%). Leukoencephalopathy, especially – involving periventricular areas of the parietal lobes, associated with neuroinfections and autoimmune reactions, have been the main form of CNS involvement (96%).

Conclusions. There is reason to highlight the new form of primary immunodeficiency – immunodeficiency, associated with a genetic folate cycle disorder. It has a variable immunological phenotype, but the deficiency of NK- and NKT-cells is the most common symptom of the disease. Preferential involvement NK- and NKT-cells determines the selectivity and a sharp decrease in resistance to intracellular microorganisms, including opportunistic viruses, propensity to induce autoimmunity to brain antigens and delayed-type hypersensitivity.

Key words: folate cycle, polymorphisms, NK-cells, immunodeficiency, autism.