

Научная статья
УДК 612.8; 632.938
RZFLUS
doi: 10.17072/1994-9952-2024-3-335-343



Профили экспрессии микроРНК в лейкоцитах крови как маркеры тяжести расстройств аутистического спектра у детей

Анна Сергеевна Алексеева^{1✉}, Юлия Юрьевна Филиппова²,
Александра Леонидовна Бурмистрова³

¹⁻³ Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

^{1✉} 96_anya@mail.ru

² julse@rambler.ru

³ burmal@csu.ru

Аннотация. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это гетерогенная группа нарушений нейроразвития с неизвестной этиологией. Показано, что иммунная дисфункция может быть вовлечена в этиологию и патогенез аутизма. Одними из регуляторов взаимодействий нервной и иммунной систем выступают микроРНК, которые могут рассматриваться как ключевые игроки в патогенезе и биомаркеры для диагностики заболевания. В данной работе был проведен поиск взаимосвязи уровней лейкоцитарной экспрессии микроРНК: микроРНК-155, микроРНК-146а, микроРНК-124, микроРНК-21 и микроРНК-9, с концентрацией цитокинов в плазме крови у детей с РАС для выявления биологических маркеров заболевания и степени его тяжести. Установлено, что у детей с легким течением аутизма уровни экспрессии изученных микроРНК в лейкоцитах крови не отличались от аналогичных значений детей с нормотипичным развитием. В лейкоцитах детей с тяжелым течением расстройств аутистического спектра снижена экспрессия микроРНК-124 и микроРНК-146а по сравнению с нормотипичными детьми, а также микроРНК-146а – по сравнению с детьми с легким течением аутизма. В группе детей с легким течением аутизма выявлены две значимые положительные корреляции между микроРНК-9/IFN γ и микроРНК-124/TNF α на фоне отрицательного взаимодействия между микроРНК-155 и TNF α . У детей с тяжелым течением расстройств аутистического спектра обнаружены четыре значимые отрицательные связи между микроРНК-9/IFN γ ; микроРНК-146а/IFN γ ; микроРНК-146а/IL-6 и микроРНК-155/IL-10. Уровень экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах меньше 0.0035 у.е. с 86.7% чувствительностью и 89.6% специфичностью может свидетельствовать о тяжелом течении аутизма у детей. Таким образом, у детей с тяжелым течением РАС нами выявлены нарушения в уровнях экспрессии важных негативных регуляторов воспаления и участников нейроиммунных взаимодействий – микроРНК-146а и микроРНК-124.

Ключевые слова: микроРНК, микроРНК-146а, лейкоциты, цитокины, расстройства аутистического спектра, дети, диагностика

Для цитирования: Алексеева А. С., Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л. Профили экспрессии микроРНК в лейкоцитах крови как маркеры тяжести расстройств аутистического спектра у детей // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 3. С. 335–343. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-3-335-343>.

IMMUNOLOGY

Original article

MicroRNA expression profiles in blood leukocytes as autism spectrum disorder severity markers in children

Anna S. Alekseeva^{1✉}, Yuliya Yu. Filippova², Aleksandra L. Burmistrova³

¹⁻³ Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

^{1✉} 96_anya@mail.ru

² julse@rambler.ru

³ burmal@csu.ru

Abstract. Autism spectrum disorders are a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders with unknown etiology. Immune dysfunction may be involved in the etiology and pathogenesis of autism. One of the regulators of interactions between the nervous and immune systems are microRNAs, which can be considered as key players in pathogenesis and diagnostic biomarkers. The present study is devoted to a search for the relationship between leukocyte expression of microRNAs: microRNA-155, microRNA-146a, microRNA-124, microRNA-21 and microRNA-9, and the concentration of cytokines in the blood plasma of autistic children, which was carried out to detect biological markers of the disease and its severity. It was found that in children with mild autism, the expression levels of the studied microRNAs in blood leukocytes did not differ from similar values in children with normotypical development. In leukocytes of children with severe autism spectrum disorders, the expression of microRNA-124 and microRNA-146a is reduced compared to normotypical children, and microRNA-146a is reduced compared to children with mild autism. Two significant positive correlations between microRNA-9/IFN γ and microRNA-124/TNF α against the background of a negative interaction between microRNA-155 and TNF α were identified in the group of children with mild autism. Four significant negative relationships between microRNA-9/IFN γ ; microRNA-146a/IFN γ ; miR-146a/IL-6 and miR-155/IL-10 were found in children with severe autism spectrum disorders. The expression level of microRNA-146a in leukocytes less than 0.0035 c.u. with 86.7% sensitivity and 89.6% specificity may indicate severe autism in children. Thus, we have identified disturbances in the expression levels of important negative regulators of inflammation and participants in neuro-immune interactions – microRNA-146a and microRNA-124.

Keywords: microRNAs, microR-146a, leukocytes, cytokines, autism spectrum disorder, child, diagnosis

For citation: Alekseeva A. S., Filippova Yu. Yu., Burmistrova A. L. [MicroRNA expression profiles in blood leukocytes as autism spectrum disorder severity markers in children]. *Bulletin of Perm University. Biology.* Iss. 3 (2024): pp. 335-343. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-3-335-343>.

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) относятся к нарушениям нейроразвития, для которых характерна клиническая и генетическая гетерогенность. Базовые симптомы РАС: недостаточность многих социальных функций, стереотипия и ограниченные интересы, появляются в раннем детстве и прогрессируют в течение взрослой жизни [Eissa et al., 2020].

Этиология РАС неизвестна. Однако, по мнению ряда авторов, она является результатом комплексных взаимодействий и комбинаций генетических aberrаций с влиянием факторов окружающей среды. Среди последних значимую роль играет активация иммунитета матери на ранних сроках беременности в результате инфекции [Liu X. et al., 2023]. В соответствии с этой теорией, иммунная система матери изменяет фетальное окружение плода на воспалительное, что вносит вклад в нарушение сетевых взаимодействий в мозге у потомства матерей с активацией иммунной системы. В дальнейшем это находит отражение в дезорганизации когнитивного развития, aberrациях в активности мозга у потомства и может приводить к психическим нарушениям, включая РАС и шизофрению [Белокоскова и др., 2023; Brown et al., 2014; Vilbo, 2009]. Вместе с тем, пре/перинатальное воспаление в центральной нервной системе (ЦНС) создает условия для формирования хронического воспаления на периферии, которое сохраняется при РАС в течение жизни [Hu et al., 2018]. На сегодня известно, что нейровоспаление опосредовано сложным взаимодействием между клетками ЦНС и периферическими клетками иммунной системы. Одними из ключевых регуляторов этих взаимодействий выступают микроРНК [Slota, Booth, 2019].

МикроРНК относятся к классу малых некодирующих РНК, основными функциями которых являются регулирование экспрессии матричных РНК (мРНК), дестабилизация и регулирование уровней протеинов [Powdrill et al., 2016]. Изменяя локальную генную экспрессию, микроРНК способны контролировать функции клеток, в том числе клеток мозга: нейрогенез, миграцию, нейронную поляризацию, развитие синапса и синаптическую пластичность. Показано, что микроРНК играют важную роль в этиологии и/или поддержании неврологических и иммунных нарушений, а также путей коммуникации иммунной и нервной систем [Foller, Cremer, Véclin, 2014]. На сегодняшний день наиболее важными и хорошо изученными микроРНК в контексте нейровоспаления являются микроРНК-155, микроРНК-146а, микроРНК-124, микроРНК-21 и микроРНК-9. Все они демонстрируют совокупные модулирующие эффекты на иммунную и нервную системы через прямые и непрямые изменения сигналов воспалительных путей [Slota, Booth, 2019; Soreq, Wolf, 2011]. Однако экспрессия этих микроРНК в клетках крови (лейкоцитах) у лиц с РАС изучена недостаточно. Кроме того, остается вопрос, могут ли уровни экспрессии микроРНК в лейкоцитах периферической крови использоваться как персональные биомаркеры в диагностике РАС и степени их тяжести [Бурмистрова и др., 2022].

Цель данной работы – выявление взаимосвязи уровней лейкоцитарной экспрессии микроРНК: микроРНК-155, микроРНК-146а, микроРНК-124, микроРНК-21 и микроРНК-9, с концентрацией цитокинов в плазме крови у детей с РАС для поиска биологических маркеров заболевания и степени его тяжести.

Материал и методика

Дизайн исследования

Исследования выполнены на базе научной лаборатории Инновационных биотехнологий биологического факультета ФГБОУ ВО ЧелГУ. Отбор участников исследования проводился психотерапевтами в рамках Соглашения о сотрудничестве № 92 от 16.04.2016 г. с Комитетом социальной политики города Челябинска и МБУ СО Социально-реабилитационным центром Здоровье.

В исследование включено 126 детей, проживающих в г. Челябинске. Основная группа – 81 ребенок с диагностированными РАС различной степени тяжести: 51 ребенок – с легким течением РАС, 30 детей – с тяжелым течением РАС. Диагноз РАС поставлен психотерапевтами реабилитационного центра Здоровье на основании МКБ-10. Степень тяжести аутизма определяли с помощью рейтинговой шкалы детского аутизма (Childhood Autism Rating Scale, CARS). Группа сравнения («Нормотипичное развитие») – 45 детей, посещающих детские дошкольные учреждения и школы пос. Первомайский Челябинской обл.

Этическая экспертиза

В рамках работы было получено информированное согласие на проведение комплексного обследования и обработку персональных данных. Исследование одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 2 от 27.08.2019 г.) и выполнено с учетом положения Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013) [Бурмистрова и др., 2022].

Методы

Материалом для исследования служили лейкоциты периферической крови. Фракцию клеток получали из венозной крови с К₃ЭДТА центрифугированием в течение 10 мин. при 3000 об/мин, с последующим лизированием осадка эритроцитов раствором NH₄Cl [Бурмистрова и др., 2022].

В лейкоцитах периферической крови была проведена оценка уровней экспрессии: микроРНК-9, микроРНК-21, микроРНК-124-3р, микроРНК-146а-5р и микроРНК-155. Общую РНК выделяли фенол-хлороформным методом с помощью реагента TRIzol («ThermoFisher Scientific», США). Концентрацию и чистоту выделения РНК анализировали на флуориметре Quantus («Promega», США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) микроРНК в кДНК и полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили наборами реагентов: «ОТ-1» и «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с SYBR Green» НПК «Синтол» (Россия), согласно инструкциям производителей, на приборной базе ДТ-прайм («ДНК-технология», Россия) [Бурмистрова и др., 2022]. Экспрессию генов-мишеней нормализовали по «гену домашнего хозяйства» – гену малой ядерной РНК (U6). Первичные нуклеотидные последовательности праймеров по типу «стебель-петля» для ОТ и праймеров для ПЦР-РВ синтезированы НПК «Синтол» согласно данным: микроРНК-9 – Tavakolian S. с соавторами [Tavakolian et al., 2020]; микроРНК-21 – Xu с соавторами [Xu et al., 2012]; микроРНК-124-3р – Liu Y.X. с соавторами [Liu Y.X. et al., 2016]; микроРНК-146а-5р – Zhang R.X. с соавторами [Zhang et al., 2017]; микроРНК-155 и U6, а также параметры программ ОТ и ПЦР-РВ – Yang L.H. с соавторами [Yang et al., 2014]. Уровень мРНК рассчитывали в относительных единицах по методу $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ с учетом эффективности реакции [Livak, Schmittgen, 2001].

Статистический анализ

Статистическая обработка данных выполнена в программах: PAST (v. 3.15) и MedCalc (v. 10.2.0), графические построения выполнены в пакете «corrplot» программно-статистической среды R (v. 3.6.1). Нормальность распределения величин в выборке оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Данные имели непараметрическое распределение. Для приведения значений к нормальному распределению была проведена трансформация Бокса-Кокса. Такой подход дает возможность выявить более «тонкие» различия между группами, т.к. анализу подвергаются как непосредственные значения, так и относительные расстояния между показателями на линейной шкале, тогда как в рамках порядковой статистики рассматриваются не сами значения, а их ранги и нелинейная шкала не позволяет учесть разницу расстояний. После наивной ретрансформации для каждого показателя рассчитывали средние значения и 95% доверительный интервал (ДИ). Для сравнения выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ (one way ANOVA) с апостериорными попарными сравнениями по методу Фримана-Тьюки [Филиппова, Алексеева, Бурмистрова, 2023]. Корреляции между уровнями экспрессии микроРНК в лейкоцитах периферической крови и концентрацией цитокинов в плазме оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена отдельно для каждой исследуемой группы, и визуализировали в виде тепловой карты корреляций. Для оценки диагностической значимости микроРНК в качестве потенциальных маркеров аутизма и его тяжести использовали ROC-анализ, с вычислением площади под ROC-кривой и «точки отсечения». Во всех случаях эффекты считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведено клиническое и лабораторное обследование 45 детей с нормотипичным развитием и 81 ребенка с РАС. Группы детей были сопоставимы по полу (соотношение мальчики:девочки – 4:1). Возраст детей обеих групп варьировал в диапазоне от 3 до 13 лет, тем не менее, медианный возраст детей с нормотипичным развитием (9.0 лет) был значимо выше медианного возраста детей с РАС (6.0 лет). Значимых различий в уровнях экспрессии изученных микроРНК при делении детей согласно возрастной периодизации по ВОЗ (до 6 лет, 7–12 и 13 лет и старше) не обнаружено. Дети с РАС в зависимости от тяжести состояния (согласно CARS) были разделены психотерапевтами на группы с легким (баллы по CARS 29–36) и тяжелым течением (баллы по CARS 36–60).

Экспрессию микроРНК: микроРНК-155, микроРНК-146а, микроРНК-124, микроРНК-21 и микроРНК-9 оценивали в лейкоцитах периферической крови детей с легким/тяжелым течением РАС и нормотипичным развитием. Данные представлены в таблице.

Обнаружено: 1. Уровни экспрессии микроРНК в лейкоцитах крови детей с легким течением РАС не отличались от значений детей с нормотипичным развитием; 2. У детей с тяжелым течением РАС в лейкоцитах периферической крови была значимо снижена экспрессия микроРНК-124, по сравнению с аналогичным показателем группы «Нормотипичное развитие», и микроРНК-146а – как по отношению к значениям нормотипичных детей, так и детей группы «Легкое течение РАС» (таблица).

Уровни экспрессии микроРНК в лейкоцитах у детей с легким течением РАС, тяжелым течением РАС и нормотипичным развитием, М [95%ДИ]

[MicroRNA expression levels in leukocytes of children with a mild ASD, severe ASD and normotypical development, M [95% CI]]

Показатели, у.е.	Нормотипичное развитие n = 45	Легкое течение РАС n = 51	Тяжелое течение РАС n = 30
Возраст, лет	9.0 [4.0-13.0]	6.0 [3.0-13.0]	6.0 [3.0-13.0]
Баллы по CARS	-	32.0 [29.0-36.0]	40.0 [37.0-55.0]
МикроРНК-9	0.54 [0.36; 0.77]	0.55 [0.41; 0.73]	0.49 [0.34; 0.71]
МикроРНК-21	0.12 [0.08; 0.16]	0.13 [0.10; 0.16]	0.12 [0.08; 0.16]
МикроРНК-124	0.13 [0.10; 0.18]	0.13 [0.11; 0.17]	0.09 [0.07; 0.13] $P_{3-1}=0.049$
МикроРНК-146а	0.008 [0.005; 0.012]	0.006 [0.004; 0.008]	0.004 [0.002; 0.006] $P_{3-1}<0.001$ $P_{3-2}=0.002$
МикроРНК-155	0.002 [0.002; 0.004]	0.003 [0.001; 0.005]	0.002 [0.001; 0.003]

Примечание. Данные представлены в виде средних значений и 95% доверительных интервалов. P_{3-1} - различия между показателями групп «Нормотипичное развитие» и «Тяжелое течение РАС». P_{3-2} - различия между показателями групп «Легкое течение РАС» и «Тяжелое течение РАС». Статистически значимыми считались различия при $P \leq 0.05$.

Ранее нами было показано [Филиппова, Алексеева, Бурмистрова, 2023], что дети с РАС имеют различия в уровнях цитокинов в плазме крови в зависимости от тяжести состояния. Дети с легким течением РАС демонстрируют высокие уровни IL-4, что может носить компенсаторный характер. У детей с тяжелым течением РАС в плазме крови установлены значимо высокие уровни основного цитокина Tх1 – IFN γ , и IL-6, на фоне низких уровней важного противовоспалительного цитокина – IL-10 и провоспалительных «цитокинов тревоги»: TNF α и IL-1 β [Филиппова, Алексеева, Бурмистрова, 2023]. Как показано G. Oхenkrug, сдвиг гомеостатического баланса про- / противовоспалительных цитокинов Tх1/Tх2 в сторону Tх1 (прежде всего, повышения уровней IFN γ), на фоне продолжительного действия стрессовых факторов различной природы, приводит к развитию системного хронического воспаления низкой степени тяжести [Oхenkrug, 2011]. На основании полученных результатов, для выявления ассоциации уровней экспрессии микроРНК в лейкоцитах периферической крови с наличием/отсутствием системного хронического воспаления и тяжестью РАС, нами был проведен корреляционный анализ. Результаты анализа представлены на рисунке.

В группе детей с нормотипичным развитием все корреляции между уровнями экспрессии микроРНК и цитокинами плазмы имели слабую силу, статистически значимых взаимодействий не обнаружено (рисунок, А).

При оценке межсистемных связей в группе детей с легким течением РАС установлены две значимые положительные корреляции между: микроРНК-9 и $IFN\gamma$ ($\rho = 0.28$, $P = 0.048$); микроРНК-124 и $TNF\alpha$ ($\rho = 0.29$, $P = 0.044$); и одно отрицательное взаимодействие между микроРНК-155 и $TNF\alpha$ ($\rho = -0.31$, $P = 0.035$) (рисунок, Б).

В группе детей с тяжелым течением аутизма выявлены четыре значимые корреляции средней силы, которые были отрицательными: между микроРНК-9 и $IFN\gamma$ ($\rho = -0.43$, $P = 0.016$); микроРНК-146а и $IFN\gamma$ ($\rho = -0.37$, $P = 0.042$); микроРНК-146а и IL-6 ($\rho = -0.36$, $P = 0.048$); микроРНК-155 и IL-10 ($\rho = -0.46$, $P = 0.011$) (рисунок, В).

	IL-6	IFN γ	IL-1b	TNF α	IL-10	IL-4
miR-9	0.24	0.20	-0.18	-0.22	0.15	0.14
miR-21	0.01	0.09	-0.18	-0.22	0.08	-0.16
miR-124	0.01	0.16	-0.10	-0.12	0.02	-0.15
miR-146a	-0.20	0.08	-0.04	0.08	-0.11	-0.23
miR-155	0.25	-0.05	-0.05	-0.09	-0.12	-0.08

А. Нормотипичное развитие

	IL-6	IFN γ	IL-1b	TNF α	IL-10	IL-4
miR-9	-0.08	0.28	0.06	0.04	0.20	0.08
miR-21	-0.26	0.12	0.26	0.21	-0.10	0.12
miR-124	-0.22	0.13	0.23	0.29	-0.01	0.13
miR-146a	-0.06	-0.06	0.07	0.02	0.09	-0.20
miR-155	0.05	-0.17	-0.18	-0.31	-0.23	-0.15

Б. Легкое течение РАС

	IL-6	IFN γ	IL-1b	TNF α	IL-10	IL-4
miR-9	-0.22	-0.43	0.33	0.08	-0.10	-0.04
miR-21	-0.13	-0.33	0.27	-0.08	0.25	0.01
miR-124	-0.02	-0.29	0.23	-0.11	0.15	0.01
miR-146a	-0.36	-0.37	0.13	0.26	-0.07	-0.32
miR-155	-0.15	0.12	-0.31	-0.08	-0.46	-0.07

В. Тяжелое течение РАС

Структура корреляционных связей между уровнем экспрессии микроРНК в лейкоцитах и концентрацией цитокинов в плазме крови детей с легким/тяжелым течением РАС и нормотипичным развитием.

Цифрами показана сила связи (ρ), а также её направленность – отрицательная и положительная.

Статистически значимые корреляционные взаимодействия ($P \leq 0.05$) показаны серым цветом

[The correlations structure between microRNA expression levels in leukocytes and cytokine levels in blood plasma of children with a mild/severe ASD and normotypical development.

Note: The numbers in the figures show the strength of the association (ρ), as well as its direction – negative and positive. Statistically significant correlations ($p \leq 0.05$) are shown in gray]

Таким образом, у детей с тяжелым течением аутизма микроРНК146а демонстрирует низкие уровни экспрессии в лейкоцитах периферической крови и высокую корреляционную активность с цитокинами плазмы, а именно наличие значимых отрицательных связей с IL-6 и $IFN\gamma$.

Для оценки диагностической значимости экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах периферической крови в качестве маркера тяжести течения РАС у детей был проведен ROC-анализ. Показано, что уровень экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах меньше 0.0035 у.е. (чувствительность: 86.7%, специфичность 89.6%, площадь под ROC-кривой: 0.836 ± 0.0362 , 95%ДИ: 0.760–0.896) может свидетельствовать о тяжелом течении аутизма у детей.

Результаты исследований последних лет свидетельствуют, что иммунная дисрегуляция, в частности дисбаланс про-/противовоспалительного фенотипов иммунных клеток, и хроническое нейровоспаление выступают значимыми характеристиками РАС [Moazz et al., 2019]. Недавно продемонстрировано, что интенсивность воспаления на клеточном уровне, как в ЦНС, так и в клетках врожденной и адаптивной иммунной системы, регулируют микроРНК, прежде всего, микроРНК-9, микроРНК-21, микроРНК-124, микроРНК-146а и микроРНК-155. Авторы подчеркивают, что эти микроРНК имеют перекрестные мишени в нервной и иммунной системах и обеспечивают механизмы коммуникации этих систем в норме и при патологии [Slova, Booth, 2019; Li, Lei, Sun, 2023].

В нашей работе проведена оценка различий в уровнях экспрессии пяти микроРНК: микроРНК-146а, микроРНК-124, микроРНК-21, микроРНК-9 и микроРНК-155, в лейкоцитах периферической крови детей с РАС в зависимости от тяжести состояния и степени выраженности системного воспаления, а также изучен вопрос о возможности использования показателей микроРНК в качестве биологических маркеров для диагностики РАС. Лейкоциты рассматривались нами как итог комплексного взаимодействия микроРНК–мРНК в общей совокупности клеток иммунной системы периферической крови, в определенной точке времени в условиях гомеостаза – нормотипичного развития, и системного хронического воспаления низкой степени тяжести – тяжелое течение РАС (наличие его показано нами ранее [Филиппова и др., 2022]).

В результате работы в группе детей с легким течением РАС, на фоне отсутствия различий в уровнях экспрессии микроРНК с показателями детей с нормотипичным развитием, нами выявлено наличие трех значимых корреляций слабой силы между системами микроРНК лейкоцитов и цитокинов плазмы крови. Положительное взаимодействие микроРНК-9/IFN γ может отражать обнаруженный T. Amado с соавторами эффект усиления экспрессии микроРНК-9 в Tх1 после активации инфекционными и стрессовыми стимулами, который приводит к увеличению выработки IFN γ этими клетками [Amado et al., 2015]. Отрицательная корреляция между уровнями экспрессии микроРНК-155 в лейкоцитах и концентрацией провоспалительного цитокина – TNF α в плазме крови может быть связана с ключевой ролью микроРНК-155 в негативной регуляции сигнальных путей воспалительных иммунных ответов [Saba, Sorensen, Booth, 2014]. Объяснение положительной связи между микроРНК-124 и TNF α носит дискуссионный характер, т.к. в норме микроРНК-124 является важнейшим модулятором воспаления и врожденного иммунитета, который поддерживает противовоспалительный M2 фенотип тканевых резидентных макрофагов и переключение баланса Tх1/Tх2 в сторону Tх2 [Qin et al., 2016; Moazz et al., 2019]. У лиц с РАС изменение экспрессии микроРНК-124 рассматривается авторами в контексте регуляции функций клеток ЦНС, т.к. она экспрессируется во всех нервных клетках всех регионов мозга, за исключением гипофиза, и регулирует синаптическую пластичность и сигнальные молекулы памяти [Han et al., 2020]. Литературные данные о роли микроРНК-124 в иммунной дисфункции при РАС нами не обнаружены. Мы предполагаем, что у детей с легкой степенью тяжести РАС, показанные нами ранее высокие концентрации ИЛ-4 в плазме крови [Филиппова и др., 2022], поддерживают экспрессию микроРНК-9, микроРНК-124, и микроРНК-155 в лейкоцитах на уровне детей с нормотипичным развитием, что приводит к отсутствию в плазме детей с легким течением РАС воспалительного профиля.

В группе детей с тяжелым течением РАС наиболее важные данные, как мы считаем, были получены для микроРНК-146а. Так, в лейкоцитах детей с тяжелым течением РАС уровни экспрессии микроРНК-146а были значимо снижены, по отношению к показателям детей с нормотипичным развитием и лиц с легким течением РАС. Кроме того, микроРНК-146 была задействована в отрицательных корреляциях с основными провоспалительными цитокинами – IFN γ и IL-6, уровни которых в плазме крови были повышены, что отражало состояние системного хронического воспаления низкой степени тяжести у детей с тяжелым течением РАС. Авторами показано [Taganov et al., 2006; Saba et al., 2014], что микроРНК-146а негативно регулирует воспалительные процессы в нейронах, микроглии, астроцитах, таким образом ограничивая воспаление внутри ЦНС, в результате активации транскрипционного фактора NF- κ B. Во врожденном иммунном ответе микроРНК-146а модулирует поляризацию макрофагов в направлении M2 фенотипа через Notch1 путь [Taganov et al., 2006; Saba, Sorensen, Booth, 2014]. Особый интерес представляет отрицательная взаимосвязь микроРНК-146а/IL-6. Во-первых, транскрипция микроРНК-146а и IL-6 проходит под контролем NF- κ B, даже если обе молекулы играют антагонистическую роль в воспалительном процессе. Высказаны предположения, что при физиологических условиях ось микроРНК-146/IL-6 поддерживает функциональный баланс, но в присутствии соответствующих провоспалительных стимулов уровни IL-6 «драматически» увеличиваются, а уровни микроРНК-146а – снижаются [Olivieri et al., 2021]. Более того, нами показано, что уровень экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах меньше 0,0035 у.е. с чувствительностью 86.7% и специфичностью 89.6%, позволяет выделить из общей когорты детей с РАС группу детей с тяжелым течением заболевания.

Заключение

Таким образом, у детей с тяжелым течением РАС нами выявлены нарушения в системе регуляции воспаления (на уровне экспрессии микроРНК): значимое снижение уровней экспрессии важных негативных регуляторов воспаления и участников нейро-иммунных взаимодействий – микроРНК-146а и микроРНК-124. Корреляционные связи между экспрессией микроРНК в лейкоцитах и концентрациями про/провоспалительных цитокинов в плазме крови (прежде всего, отрицательные взаимодействия: микроРНК-146а/IL-6 и микроРНК-146а/IFN γ), вероятно, могут отражать возможные пути, посредством которых системное хроническое воспаление низкой степени тяжести может регулировать цитокиновый потенциал лейкоцитов у детей с тяжелым течением РАС. Наконец, нами продемонстрирована связь между низкими уровнями экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах и тяжестью РАС. При расширении исследований уровни экспрессии микроРНК-146а в лейкоцитах периферической крови могут быть предложены как дополнительные маркеры для диагностики тяжелого течения аутизма у детей. Тем не менее, конкретные механизмы участия изученных нами микроРНК в иммунной дисфункции при РАС требуют более детального изучения, т.к., согласно данным литературы, одна микроРНК может связывать сотни различных мРНК, а единственная мРНК может выступать мишенью многих микроРНК. В результате микроРНК–мРНК формируют комплексные геновые сети, которые регулируют различные биологические функции [Plotnikova, Baranova, Skoblov, 2019].

Список источников

1. Белокосова С.Г. и др. Содержание BDNF и активность каталазы в крови детей с расстройствами аутистического спектра // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23, № 2. С. 119–128. doi: 10.17816/MAJ112295.
2. Бурмистрова А.Л. и др. Лейкоцитарная сигнатура микроРНК в контексте хронического системного воспаления при сосудистой деменции // Российский иммунологический журнал. 2022. Т. 25, № 4. С. 399–404. doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO.
3. Филиппова Ю.Ю., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. Экспрессия цитокинов лейкоцитами в ассоциации с тяжестью аутизма у детей // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 593–598. doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE.
4. Филиппова Ю.Ю. и др. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 11. С. 647–651.
5. Amado T. et al. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells // European journal of immunology. 2015. Vol. 45, № 6. P. 1584–1595. DOI: 10.1002/eji.201545487.
6. Bilbo S.D. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system // Frontiers in behavioral neuroscience. 2009. Vol. 3. Art. 14. DOI: 10.3389/neuro.08.014.2009.
7. Brown A.S. et al. Elevated maternal c-reactive protein and autism in a national birth cohort // Molecular psychiatry. 2014. Vol. 19. P. 259–264. DOI: 10.1038/mp.2012.19.
8. Eissa N. et al. Role of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder and the Emergence of Brain Histaminergic System. Lessons Also for BPSD? // Frontiers in pharmacology. 2020. Vol. 11. Art. 886. DOI: 10.3389/fphar.2020.00886.
9. Follert P., Cremer H., Béclin C. MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability // Frontiers in molecular neuroscience. 2014. Vol. 7. 7:5. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00005.
10. Han D. et al. MiR-124 and the Underlying Therapeutic Promise of Neurodegenerative Disorders // Frontiers in pharmacology. 2020. Vol. 10. Art. 1555. DOI: 10.3389/fphar.2019.01555.
11. Hu C.C. et al. Alterations in plasma cytokine levels in Chinese children with autism spectrum disorder // Autism research. 2018. Vol. 11. P. 989–999. DOI: 10.1002/aur.1940.
12. Li S., Lei Z., Sun T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review // Cell biology and toxicology. 2023. Vol. 39, № 1. P. 53–83. DOI: 10.1007/s10565-022-09761-x.
13. Liu X. et al. Preeclampsia promotes autism in offspring via maternal inflammation and fetal NF κ B signaling // Life science alliance. 2023. Vol. 6, № 8. Art. e202301957. DOI: 10.26508/lsa.202301957.
14. Liu Y.X. et al. MiR-124-3p/B4GALT1 axis plays an important role in SOCS3-regulated growth and chemosensitivity of CML // Journal of hematology & oncology. 2016. Vol. 9, № 1. Art. 69. DOI: 10.1186/s13045-016-0300-3.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ method // Methods. 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
16. Moaaz M. et al. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- β) in children with autism spectrum disorder // Journal of neuroimmunology. 2019. Vol. 337. Art. 577071. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.577071.
17. Olivieri F. et al. MiR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases // Ageing research reviews. 2021. Vol. 70. Art. 101374. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101374.
18. Oxenkrug G. Interferon-gamma - Inducible Inflammation: Contribution to Aging and Aging-Associated Psychiatric Disorders // Aging and disease. 2011. Vol. 2, № 6. P. 474–486. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3295064/> (дата обращения: 27.03.2024)

19. Plotnikova O., Baranova A., Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA–mRNA Interactome // *Frontiers in genetics*. 2019. Vol. 10. Art. 933. DOI: 10.3389/fgene.2019.00933.
20. Powdrill M.H. et al. The role of microRNAs in metabolic interactions between viruses and their hosts // *Current opinion in virology*. 2016. Vol. 19. P. 71–76. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.07.005.
21. Qin Z. et al. MiRNA-124 in Immune System and Immune Disorders // *Frontiers in immunology*. 2016. Vol. 7. Art. 406. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00406.
22. Saba R., Sorensen D.L., Booth S.A. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response // *Frontiers in immunology*. 2014. Vol. 5. Art. 578. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00578.
23. Slota J.A., Booth S.A. MicroRNAs in neuroinflammation: implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications // *Noncoding RNA*. 2019. Vol. 5, № 2. Art. 35. DOI: 10.3390/ncrna5020035.
24. Soreq H., Wolf Y. NeurimmiRs: microRNAs in the neuroimmune interface // *Trends in molecular medicine*. 2011. Vol. 17, № 10. P. 548–555. DOI: 10.1016/j.molmed.2011.06.009.
25. Taganov K.D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103, № 33. P. 12481–12486. DOI: 10.1073/pnas.0605298103.
26. Tavakolian S. et al. Evaluation of microRNA-9 and -192 expression levels as biomarkers in patients suffering from breast cancer // *Biomedical reports*. 2020. Vol. 12, № 1, P. 30–34. DOI: 10.3892/br.2019.1257.
27. Xu X.M. et al. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer // *Oncology letters*. 2012. Vol. 4, № 2. P. 339–345. DOI: 10.3892/ol.2012.714.
28. Yang L.H. et al. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 12. Art. e115293. DOI: 10.1371/journal.pone.0115293.
29. Zhang R.X. et al. Both plasma and tumor tissue miR-146a high expression correlates with prolonged overall survival of surgical patients with intrahepatic cholangiocarcinoma // *Medicine (Baltimore)*. 2017. Vol. 96, № 44. Art. e8267. DOI: 10.1097/MD.00000000000008267.

References

1. Belokoskova S.G., Malsagova E.M., Ivleva I.S., Karpenko M.N., Tsikunov S.G. [BDNF content and catalase activity in the blood of children with autism spectrum disorders]. *Medicinskiy akademičeskij žurnal*. V. 23, No. 2 (2023): pp. 119-128. (In Russ.). doi: 10.17816/MAJ112295.
2. Burmistrova A.L., Alekseeva A.S., Cazaux M.E., Filippova Y.Y. [MicroRNA signature of leukocytes in the context of chronic systemic inflammation in vascular dementia]. *Rossijskij immunologičeskij žurnal*. V. 25, No. 4 (2022): pp. 399-404. (In Russ.). doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO.
3. Filippova Y.Y., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. [Leukocyte cytokine expression is associated with severity of autism in children]. *Rossijskij immunologičeskij žurnal*. V. 26, No. 4 (2023): pp. 593-598. (In Russ.). doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE.
4. Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. [Cytokines and neurotrophic factors in assessing the severity of autism in children]. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostica*. V. 67, No. 11 (2022): pp. 647-651. (In Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-647-651.
5. Amado T., Schmolka N., Metwally H. et al. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *European journal of immunology*. V. 45, No. 6 (2015): pp. 1584-1595. DOI: 10.1002/eji.201545487.
6. Bilbo S.D. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in behavioral neuroscience*. V. 3 (2009): 14. DOI: 10.3389/neuro.08.014.2009.
7. Brown A.S., Sourander A., Hinkka-Yli-Salomaki S. et al. Elevated maternal c-reactive protein and autism in a national birth cohort. *Molecular psychiatry*. V. 19 (2014): pp. 259-264. DOI: 10.1038/mp.2012.19.
8. Eissa N., Sadeq A., Sasse A., Sadek B. Role of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder and the Emergence of Brain Histaminergic System. Lessons Also for BPSD? *Frontiers in pharmacology*. V. 11 (2020): 886. DOI: 10.3389/fphar.2020.00886.
9. Follert P., Cremer H., Béclin C. MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability. *Frontiers in molecular neuroscience*. V. 7 (2014). DOI: 10.3389/fnmol.2014.00005.
10. Han D., Dong X., Zheng D., Nao J. MiR-124 and the Underlying Therapeutic Promise of Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in pharmacology*. V. 10 (2020): 1555. DOI: 10.3389/fphar.2019.01555.
11. Hu C.C., Xu X., Xiong G.L. et al. Alterations in plasma cytokine levels in Chinese children with autism spectrum disorder. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*. V. 11 (2018): pp. 989–999. DOI: 10.1002/aur.1940.
12. Li S., Lei Z., Sun T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. *Cell biology and toxicology*. V. 39, No. 1 (2023): pp. 53-83. DOI: 10.1007/s10565-022-09761-x.
13. Liu X., Liu H., Gu N. et al. Preeclampsia promotes autism in offspring via maternal inflammation and fetal NF κ B signaling. *Life science alliance*. V. 6, No. 8 (2023): e202301957. DOI: 10.26508/lsa.202301957.
14. Liu Y.X., Wang L., Liu W.J. et al. MiR-124-3p/B4GALT1 axis plays an important role in SOCS3-regulated growth and chemo-sensitivity of CML. *Journal of hematology & oncology*. V. 9, No. 1 (2016): 69. DOI: 10.1186/s13045-016-0300-3.

15. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. V. 25, No. 4 (2001): pp. 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
16. Moaaz M., Youssry S., Elfatraty A., El Rahman M.A. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- β) in children with autism spectrum disorder. *Journal of neuroimmunology*. V. 337 (2019): 577071. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.577071.
17. Olivieri F., Prattichizzo F., Giuliani A. et al. MiR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. *Ageing research reviews*. V. 70 (2021): 101374. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101374.
18. Oxenkrug G. Interferon-gamma - Inducible Inflammation: Contribution to Aging and Aging-Associated Psychiatric Disorders. *Aging and disease*. V. 2, No. 6 (2011): pp. 474-486. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3295064/> (accessed 27.03.2024).
19. Plotnikova O., Baranova A., Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Frontiers in genetics*. V. 10 (2019): 933. DOI: 10.3389/fgene.2019.00933.
20. Powdrill M.H., Desrochers G.F., Singaravelu R., Pezacki J.P. The role of microRNAs in metabolic interactions between viruses and their hosts. *Current opinion in virology*. V. 19 (2016): pp. 71-76. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.07.005.
21. Qin Z., Wang P.Y., Su D.F., Liu X. MiRNA-124 in Immune System and Immune Disorders. *Frontiers in immunology*. V. 7 (2016): 406. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00406.
22. Saba R., Sorensen D.L., Booth S.A. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Frontiers in immunology*. V. 5 (2014): 578. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00578.
23. Slota J.A., Booth S.A. MicroRNAs in neuroinflammation: implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Noncoding RNA*. V. 5, No. 2 (2019): 35. DOI: 10.3390/ncrna5020035.
24. Soreq H., Wolf Y. NeurimmiRs: microRNAs in the neuroimmune interface. *Trends in molecular medicine*. V. 17, No. 10 (2011): pp. 548-555. DOI: 10.1016/j.molmed.2011.06.009.
25. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 103, No. 33 (2006): pp. 12481-12486. DOI: 10.1073/pnas.0605298103.
26. Tavakolian S., Goudarzi H., Torfi F., Faghihloo E. Evaluation of microRNA-9 and -192 expression levels as biomarkers in patients suffering from breast cancer. *Biomedical reports*. V. 12, No. 1 (2020): pp. 30-34. DOI: 10.3892/br.2019.1257.
27. Xu X.M., Qian J.C., Deng Z.L. et al. Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncology letters*. V. 4, No. 2 (2012): pp. 339-345. DOI: 10.3892/ol.2012.714.
28. Yang L.H., Wang S.L., Tang L.L. et al. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One*. V. 9, No. 12 (2014): e115293. DOI: 10.1371/journal.pone.0115293.
29. Zhang R.X., Zheng Z., Li K. et al. Both plasma and tumor tissue miR-146a high expression correlates with prolonged overall survival of surgical patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*. V. 96, No. 44 (2017): e8267. DOI: 10.1097/MD.0000000000008267.

Статья поступила в редакцию 11.06.2024; одобрена после рецензирования 13.06.2024; принята к публикации 27.09.2024.

The article was submitted 11.06.2024; approved after reviewing 13.06.2024; accepted for publication 27.09.2024.

Информация об авторах

А. С. Алексеева – ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии;
 Ю. Ю. Филиппова – д-р биол. наук, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии;
 А. Л. Бурмистрова – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии.

Information about the authors

A. S. Alekseeva – Assistant, Department of Microbiology, Immunology and General biology;
 Yu. Yu. Filippova – PhD (Biology), Professor, Department of Microbiology, Immunology and General biology;
 A. L. Burmistrova – PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology.

Вклад авторов:

Алексеева А. С. – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных.
 Филиппова Ю. Ю. – концепция и дизайн исследования, написание текста.
 Бурмистрова А. Л. – написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Contribution of the authors:

Alekseeva A. S. – collection and processing of material, statistical data processing.
 Filippova Yu. Yu. – concept and design of the study, writing the text.
 Burmistrova A. L. – writing the text, editing, approving the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.