

МЕТОД ИММУНОСИГНАТУРЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Бурмистрова А.Л.

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

Резюме. Большой и разнообразный репертуар антител кодирует историю прошлого иммунологического опыта, создавая глобальную сеть системы регуляции организма. В этой статье мы предлагаем использовать пептидный микрочип (метод «иммуносигнатуры») для оценки глобальных индивидуальных паттернов антител и биоинформационный анализ данных для дифференциальной диагностики расстройств аутистического спектра. Пептидный микрочип состоит из 124 000 случайным образом синтезированных антигенных миметиков, ковалентно связанных с поверхностью стеклянного слайда. Капля плазмы тестируется на наличие антител определенной реактивности, путем измерения связывания их с каждым антигенным миметиком микрочипа с помощью флуоресцентного окрашивания вторичными IgG-антителами, и такая реакция учитывается при лазерной активации. Файлы оцифрованных данных интенсивности флуоресценции, которая презентовала реактивность антител плазмы, связавшихся с антигенными миметиками, использовали для биоинформационного анализа. Обработка данных была проведена пакетами проекта Bioconductor для программно-статистической среды R. На этапе предобработки полученных данных, для выравнивания распределений показателей реактивности антител, применяли квантильную нормализацию. Данные по образцам и другую необходимую информацию объединяли в один файл-контейнер класса ExpressionSet. Для сравнения контрольной и опытной групп использовали однофакторный дисперсионный анализ в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). Полученные оценки разности средних значений и статистической значимости *P* использовали далее для построения вулканной диаграммы, для ранжирования и отбора наиболее перспективных показателей реактивности антител. Для дифференциальной диагностики аутизма и оценки диагностической значимости метода иммуносигнатуры была построена тепловая карта. При построении тепловой карты использовали стандартизованные значения логарифмов реактивности антител и результаты иерархического кластерного анализа, проведенного методом Уорда, с использованием в качестве меры сходства корреляции Пирсона. В результате биоинформационного анализа данных было выбрано 73 антитела, реактивность которых имела статистически значимые различия в группах детей с аутизмом и типично развивающихся детей. Эти антитела были использованы для дифференциальной диагностики, ценность которой определяли при построении тепловой карты. Обнаружено, что группа детей с расстройствами аутистического спектра по показателям реактивности антител обладает выраженной гетерогенностью и состоит как минимум из двух подгрупп. Кроме того, 60 антител у детей с аутизмом демонстрировали преимущественно среднюю и низкую реактивность, т.е. эти антитела имели слабую силу связывания с антигенными миметиками, и только 13 антител показывали высокую реактивность. В целом специфичность диагностики расстройств аутистического спектра с помощью метода иммуносигнатуры составила 96,0% (95% ДИ от 82,8 до 99,6%), чувствительность — 78,3% (95% ДИ от 64,9 до 88,2%) и диагностическая эффективность — 82,7%.

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001, Россия, г. Челябинск, ул. Братьев
Кашириных, 129.
Тел.: 8 (351) 799-71-76.
Факс: 8 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Filippova Yulia Yu.
Chelyabinsk State University
454001, Russian Federation, Chelyabinsk,
Bros. Kashirin str., 129.
Phone: 7 (351) 799-71-76.
Fax: 7 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Филиппова, Д.Ю. Нохрин, А.Л. Бурмистрова
«Метод иммуносигнатуры в дифференциальной
диагностике расстройств аутистического спектра:
пилотное исследование» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 2. С. 303–312.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

© Филиппова Ю.Ю. и соавт., 2019

For citation:

Yu. Yu. Filippova, D. Yu. Nokhrin, A. L. Burmistrova
“Immunosignature approach to differential diagnosis of
autism spectrum disorders: a pilot study”, *Medical Immunology*
(Russia)/*Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 303–312. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

Наше пилотное исследование позволяет предложить метод иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики аутизма и, возможно, расширить наше понимание нарушений при расстройствах аутистического спектра.

Ключевые слова: иммуносигнатура, реактивность антител, дифференциальная диагностика, расстройства аутистического спектра, дети, биоинформатика, иммунная сеть

IMMUNOSIGNATURE APPROACH TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS: A PILOT STUDY

Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. A large and diverse repertoire of antibodies encodes the history of past immunological experience, creating a global network of the body's regulation system. In this article, we propose to use a peptide microarray ("immunosignature") for evaluating global individual antibody patterns and bioinformatic data analysis for differential diagnosis of autism spectrum disorders. The peptide microarray consists of 124 000 antigen mimetics with random sequences covalently bound to the surface of the glass slide. A drop of plasma is tested for the presence of antibodies of distinct specificity, by measuring their binding to each antigen mimetic in the microarray detectable by fluorescent staining with secondary IgG antibodies, and this reaction is registered by laser activation assay. For bioinformatic analysis, we used the files of digitalized fluorescence intensity data, which presented the reactivity of plasma antibodies bound to antigen mimetics. Data processing was carried out by packages of the Bioconductor project for the R software environment to perform statistical evaluation. At the stage of primary data processing, the quantile normalization was used in order to equalize the distributions of antibodies' reactivity. The sample data and other necessary information were combined into the discrete ExpressionSet container files. To compare the control and experimental groups, the Welch's one-way ANOVA (for unequal variances) was used. The obtained estimates of the mean value differences and statistical significance of P levels were used further for constructing a volcano diagram, in order of ranking and selecting the most promising antibody reactivity parameters.

For differential diagnosis of autism, and evaluation of diagnostic significance of the immunosignature method, a heatmap was constructed. The standardized values of the logarithms of antibody reactivity, and the results of the hierarchical cluster analysis performed by the Ward method using Pearson correlation, as a measure of similarity were used in constructing the heatmap. As a result of the bioinformatic analysis of the data, 73 antibodies were selected whose reactivity had statistically significant differences in groups of children with autism and normally developing children. These antibodies were used for differential diagnosis, the value of which was determined in the heatmap construction. It was found that the group of children with autism spectrum disorders by the antibody reactivity exhibits marked heterogeneity, and consists of at least two subgroups. In addition, 60 antibodies in children with autism showed predominantly medium and low reactivity, i.e. these antibodies had a weak binding power with antigenic mimetics, and only 13 antibodies showed high reactivity. In general, diagnostic specificity of the autism spectrum disorders using immunosignature approach was 96.0% (95% CI 82.8 to 99.6%), sensitivity was 78.3% (95% CI 64.9 to 88.2%), and diagnostic efficiency was 82.7%. Our pilot study allows us to propose a method of immunosignature for differential diagnosis of autism and, possibly, to expand our understanding of autism spectrum disorders.

Keywords: immunosignature, antibody reactivity, differential diagnosis, autism spectrum disorders, children, bioinformatics immune network

Введение

Все живые системы демонстрируют сложность своей организации, и человек не исключение. Одним из главных регуляторов целостности таких систем выступает иммунная система. Это не случайно, т.к. ее архитектура представлена молекулами, клетками и органами, интегрирующими

большой объем информации — от индивидуальной генетической до извлеченной из жизненного опыта, через сенсинг и процессинг чужеродных антигенов (АГ), в ассоциации с внутренними сигналами (в том числе антителами (АТ)), сообщающими о состоянии организма, что позволяет выстроить адаптационное поведение индивидуума.

Большой и разнообразный репертуар АТ (к чужеродным и аутоАГ) обладает высокой информационной емкостью [22]. В конце XX — начале XXI века возникли горячие дискуссии о происхождении и роли в жизни человека (млекопитающих) АТ к АГ своего организма. Были получены убедительные данные о том, что аутоАТ не являются привилегией аутоиммунных заболеваний и присутствуют у здоровых людей разного возраста в течение жизни, начиная с эмбрионального периода, создавая глобальную сеть системы регуляции организма [17]. Их изучение внесло некоторую ясность по ряду вопросов, в том числе о наличии в организме пренатальных и постнатальных аутоАТ.

Пренатальные аутоАТ появляются рано в онтогенезе, относятся в основном к полиреактивным, каждое аутоАТ связывается со своим специфическим сетом аутоАГ, образуя подгруппы, из которых складываются аутоиммунные паттерны всего организма. Считают, что к ним относятся и антиидиотипические АТ класса IgM, реже IgG и IgA [6, 14]. Именно такие аутоАТ формируют уже в онтогенезе сетовое взаимодействие со многими аутоАГ при низкой аффинности к ним, создавая внутренний образ организма с помощью иммунной системы — иммунологический гомункулус [6], что позволяет иммунной системе контролировать гомеостаз организма.

Постнатальные АТ — их репертуар разнообразен и представлен: 1) моновалентными специфическими АТ (в основном класса IgG), отражающими историю встречи с чужеродным АГ и подготовку иммунной системы к эффективному будущему ответу на патогены, несущие тот же АГ; 2) аутоАТ, контролирующими внутренний гомеостаз, в том числе процессы интеграции, прежде всего иммунной и нервной систем при здоровье, а также при создании нового уровня динамической устойчивости организма во время/после болезни. Изменение условий, в частности действие стрессоров (физических, инфекционных, психо-социальных) является фактором инициации продукции возрастающего количества аутоАТ к сигнальным молекулам, регуляторным пептидам, цитокинам, молекулам адгезии, хемотаксиса, растворимым рецепторам, а также АТ к чужеродным АГ. Весь набор АТ включен в глобальную сеть системы регуляции.

Для изучения индивидуальных профилей пре- и постнатальных аутоАТ относительно недавно была использована новая технология — антигенный микрочип, способный одновременно измерять реактивность сотен антител [14, 15, 20, 21, 22, 26]. Антигенный микрочип состоит из различных АГ, ковалентно связанных с поверхностью стеклянного слайда. Капля сыворотки тестируется на наличие аутоАТ определенной реактивности, путем измерения связывания их с каждым АГ микрочипа с помо-

щью флуоресцентного окрашивания вторичными АТ (IgG, IgA, IgM), и такая реакция учитывается при лазерной активации. На основании данных, полученных при анализе антигенных микрочипов, были сделаны следующие выводы: 1) связывание аутоАТ с АГ на слайде не может дать сведения о стимулах, индуцирующих продукцию этих АТ, не может быть маркером аффинности или специфичности определенных АТ или группы АТ, а, вероятно, отражает поликлональную смесь АТ к различным структурным эпитопам, представленным в каждом АГ; 2) метод антигенных микрочипов позволил продемонстрировать, что индивидуальный профиль АТ отражает организацию персонального иммунного состояния, что может быть использовано для оценки межиндивидуальных различий, в том числе в зависимости от возраста, а также различий, определяемых состояниями здоровье/болезнь и (или) резистентность/чувствительность к определенной патологии [14, 20, 21, 22].

Результаты выводов авторов продемонстрировали необходимость поиска новых подходов, позволяющих идентифицировать не только аутоАТ к новым аутоАГ, но и глобальные паттерны АТ, с параллельным использованием биоинформационного анализа данных.

Одним из решений таких задач является новый метод пептидных микрочипов, названный «иммуносигнатура», в основе которого лежит принцип оценки глобальных индивидуальных паттернов АТ, способных связываться с большим набором (124 000) синтезированных пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, которые, как предполагают, копируют миметики природных АГ, а также аутоАГ и неоАГ собственного организма, возникающие в том числе в ходе активации эпигенетических механизмов, в результате различных процессов деструкции и/или ослабления старых регуляторных механизмов, создающих новые мишени взаимодействия с АТ [29].

Метод иммуносигнатуры был использован для дифференциальной диагностики опухолей различной этиологии [28], болезни Альцгеймера [24, 25], синдрома хронической усталости [27], что позволило нам применить его для диагностики расстройств аутистического спектра (РАС), которые включают гетерогенные изменения, связанные с различными нарушениями/отклонениями нейроразвития. РАС описывается рядом характерных симптомов/дефицитов, формирующих основные коровые домены: трудности социальной коммуникации, ошибочные социальные взаимодействия, ограниченные и/или повторяющиеся поведение и интересы [3, 7, 18]. В то же время исследователи сообщают о недостаточности симптомов в каждом домене, что приводит к формированию нескольких фенотипических

профилей, которые могут свидетельствовать не только о заболевании/дисфункции, но и об индивидуальных особенностях нейроразвития и/или пре- и постнатальной адаптации [2, 3, 18].

Таким образом, несмотря на раннюю диагностику РАС (в возрасте 2–4 лет), гетерогенность симптомов в коровых доменах РАС вызывает необходимость идентификации подгрупп, которая может помочь в диагностике, детекции причинных факторов и механизмов и, в результате, в планировании лечения/психосоциальной реабилитации детей [1].

Цель исследования — использовать и оценить эффективность метода иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики расстройств аутистического спектра.

Материалы и методы

Участники

В исследование включены 24 ребенка с РАС: 21 мальчик и 3 девочки (в возрасте от 3 до 11 лет) и 25 типично развивающихся детей (ТРД) (в возрасте от 4 до 14 лет). Дети с РАС находились на реабилитации в социально-реабилитационном центре «Здоровье», г. Челябинск. Отбор детей проводился врачом-психиатром центра. Для оценки клинико-динамических характеристик состояния были использованы шкалы CARS (Childhood Autism Rating Scale) и CARS-HF (High Functional). В исследование не были включены дети в периоды болезни и ранней ремиссии, после острых респираторно-вирусных заболеваний. У всех родителей получено информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016).

Анализ пептидных микрочипов

Венозная кровь была собрана в пробирки Vacuette, содержащие K₃-ЭДТА. Пробирки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму смешивали с глицерином 1:1, для предотвращения повреждения льдом антител, и замораживали при -70 °С до использования для исследований. У ТРД забор крови осуществляли однократно, у детей с аутизмом — в дублях (с интервалом в 3–6 месяцев).

Реактивность антител плазмы крови детей измеряли с помощью пептидных микрочипов, описанных Leguttki & Johnston (2013), предоставленных Институтом биодизайна Университета штата Аризона, США. Микрочип состоит из твердой фазы с 124 000 случайным образом синтезированных пептидов — антигенными миметиками, ковалентно связанными с предметными стеклами. Антигенные миметики были синтезированы Alta Biosciences (Бирмингем, Великобритания) и нанесены на стек-

ла с использованием бесконтактного пьеза-принтера в компании Applied Microarrays (Аризона, США).

Образцы плазмы крови разводили (1:625) в 3% растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере (БСА/ФСБ). 20 мкл разведенного образца наносили на фильтровальную бумагу 903ТМ и высушивали в течение 2 часов при н.у. Из высушенной фильтровальной бумаги вырезали диски диаметром 6 мм, содержащие исследуемые образцы плазмы крови. Полученные диски помещали на пептидный микрочип, инкубировали на орбитальном шейкере 300 об/мин, 90 мин при 37 °С. Микрочипы отмывали, добавляли вторичные антитела к человеческому IgG с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Калифорния, США) и инкубировали на орбитальном шейкере 300 об/мин, 60 мин при 37 °С. Чипы сканировали с помощью сканера InnoScan 900AL (Innopsys, Франция). Положение, размер и интенсивность флуоресценции (ИФ), которые презентовали реактивность АТ плазмы связавшихся с АГ миметиками, оцифровывались и оценивались с помощью программного обеспечения Marix (Innopsys, Франция). Полученные файлы использовались для биоинформационного анализа.

Биоинформационный анализ данных

Обработка данных была проведена пакетами проекта Bioconductor [9] для программно-статистической среды R (v. 3.3.2, [23]), а также средствами электронной таблицы Microsoft Office Excel 2007 (v. 3.3.6.1, Microsoft Corp.) Работа в среде R осуществлялась из пакета RStudio (v. 1.1.383, RStudio Inc.). На этапе предобработки полученных данных, для выравнивания распределений показателей реактивности АТ, использовали квантильную нормализацию из пакета preprocessCore (v. 1.42.0 [4]). После удаления из матрицы данных информации по фоновой флуоресценции пустых ячеек микрочипов и объединения результатов повторных измерений дублирующих антигенных миметиков путем вычисления медианы была получена итоговая таблица. Она содержала 122 926 строк, представленных уникальными антигенными миметиками, и 71 колонку с кодами образцов, из которых 25 относились к группе сравнения (ТРД — контроль) и 46 — к основной группе детей с РАС. В ячейках этой таблицы содержались нормализованные значения реактивности АТ, которые использовались далее для сравнения двух групп. Итоговую таблицу, данные по образцам и другую необходимую информацию объединяли в один файл-контейнер класса ExpressionSet. Его сборку и дальнейшие с ним операции проводили с использованием средств пакета “Biobase” (v. 2.40.0 [13]).

Для устранения асимметрии распределения показателей реактивности АТ к данным итоговой таблицы в составе файла-контейнера применя-

ли логарифмическое преобразование по основанию два. Сравнение контрольной и опытной групп детей по средним значениям логарифмов реактивности АТ для каждого из 122 926 антигенных миметиков было проведено в пакете “genefilter” (v. 1.62.0 [10]). Для сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). Полученные оценки разности средних значений и статистической значимости Р использовали далее для построения вулканной диаграммы, для ранжирования и отбора наиболее перспективных показателей реактивности АТ. Для дифференциальной диагностики РАС и оценки диагностической значимости метода иммуносигнатуры была построена тепловая карта. Построение вулканного графика и тепловой карты было проведено базовыми средствами среды R (пакет “stats”). При построении тепловой карты использовали стандартизованные значения логарифмов реактивности АТ и результаты иерархического кластерного анализа, проведенного методом Уорда, с использованием в качестве меры сходства корреляции Пирсона. Для полученных значений чувствительности и специфичности диагностики РАС рассчитывали 95%-ный байесовский доверительный интервал (95% ДИ) Джеффриса для частот [5].

Результаты

Данные, получаемые в ходе экспериментов на микрочипах, отличаются рядом особенностей, и прежде всего большим объемом, в связи с этим биоинформационная обработка данных являлась одной из важных частей исследования и включала несколько этапов.

Этап 1. Преобработка

На первом этапе была проведена оценка структуры и качества полученных первичных данных.

На рисунке 1А представлены коробчатые диаграммы показателей реактивности АТ 71 образцов плазмы крови ТРД и детей с РАС, построенные по всем имеющимся данным (уникальные антигенные миметики, повторности антигенных миметиков, пустые ячейки). Видно, что образцы плазмы детей, независимо от наличия/отсутствия заболевания, сильно различались как по медиане, так и по межквартильному размаху. На фоне такой изменчивости обнаружение межгрупповых различий являлось проблематичным. Из опыта микрочиповых исследований экспрессии генов известно, что значительная доля такой изменчивости обусловлена небиологическими различиями образцов (небольшими физическими различиями между чипами, особенностями работы сканера, вариацией лабораторных условий и др.) и может быть устранена различными

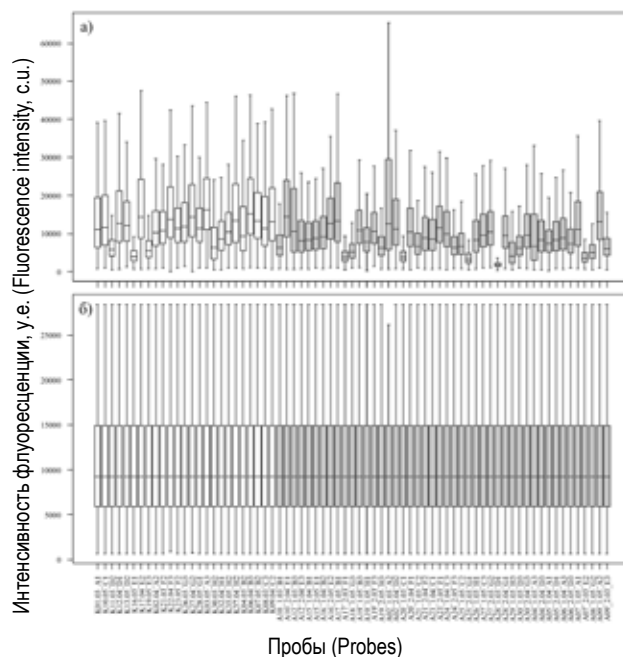


Рисунок 1. Коробчатые диаграммы распределения показателей реактивности антител образцов плазмы крови исследуемых групп детей

Примечание. А) исходное; Б) после квантильной нормализации. Цвета: белый – группа типично развивающихся детей (ТРД), серый – группа детей с расстройствами аутистического спектра (РАС).

Figure 1. Box diagrams of distribution of the antibodies reactivity of blood plasma samples of the children's groups studied

Note. A) the origina; B) after the quantile normalization. Colors: white – a group of typically developing children (TD), gray – a group of children with autism spectrum disorders (ASD).

способами нормализации данных. Нами была проведена квантильная нормализация, которая в настоящее время является наиболее популярным алгоритмом [8, 19]. Из рисунка 1Б видно, что она позволила сделать эмпирические распределения показателей реактивности АТ образцов плазмы крови детей одинаковыми.

После нормализации матрица данных была очищена от не содержащих антигенных миметиков пустых ячеек. Информация по ИФ пустых ячеек микрочипов была важна для повышения эффективности нормализации, поскольку выступала нижним пределом – фоном, который не зависит от биологических различий образцов и вариабельность которого целиком обусловлена неконтролируемой технической изменчивостью. Однако, поскольку в дальнейшем анализе пустые ячейки не использовались, 181 такая строка была удалена из таблицы данных

Далее были обработаны данные по дублирующимся антигенным миметикам. Повторы вносятся производителями микрочипов для возможности внутреннего контроля их качества. В нашем случае таких дублирующих антиген-

ных миметиков было семь с числом повторов от 10 до 276. Для каждого из 71 образцов были рассчитаны медианы показателя реактивности АТ для этих повторностей, и в итоговой таблице данных для каждого из семи антигенных миметиков была оставлена только одна строка, содержащая медианные значения реактивности. В итоге, в результате предобработки данных, была получена таблица из 122 926 строк, представленных уникальными антигенными миметиками, и 71 колонки с кодами образцов.

Этап 2. Сборка файла-контейнера класса ExpressionSet

Параллельное измерение реактивности (ИФ) сотен тысяч разных антител представляет собой сложную задачу. Вычислительно эта проблема аналогична той, которая встречается при параллельных измерениях экспрессии сотен или тысяч генов с помощью генных микрочипов, для которых были разработаны многие передовые методы биоинформационного анализа [14].

Нами был использован специальный класс сложных файлов-контейнеров — ExpressionSet [11], который состоял из трех блоков: 1) анализируемых данных (assayData), представленных полученной в ходе препроцессинга таблицей из 122926 71 ячеек; 2) метаданных, включавших 3 части (описание образцов (phenoData), данные об особенностях чипа и технологии, используемой в эксперименте (featureData), примечание (annotation)); 3) описания эксперимента (experimentData).

После сборки файла-контейнера содержащиеся в нем данные стали доступны для статистической обработки пакетами программ проекта Bioconductor.

Этап 3. Статистический анализ данных

На следующем этапе нами был произведен поиск и отбор показателей реактивности АТ, которые имели статистически значимые различия между исследуемыми группами и могли бы быть использованы для дифференциальной диагностики детей с РАС.

Выбор наиболее важных показателей проводился путем сравнения средних значений показателей реактивности АТ в исследуемых выборках с применением статистических критериев из пакета “genefilter” платформы Bioconductor. Так как эти критерии относятся к параметрическим, а распределения показателей реактивности АТ не являются нормальными, данные предварительно преобразовывали с помощью логарифмирования по степени два.

На рисунке 2 приведены гистограммы распределений показателей реактивности АТ образца K16.03_E1, который относился к группе ТРД и характеризовался одним из самых низких исходных

значений реактивности (на рис. 1А — шестой слева). Видно, что исходное положительно асимметричное распределение (рис. 2А) в результате квантильной нормализации было приведено к другому масштабу с сохранением асимметрии (рис. 2Б), а после логарифмирования приняло почти идеальную симметричную колоколообразную форму, свойственную нормальному распределению.

После логарифмического преобразования данных было проведено сравнение средних значений показателей реактивности АТ в группах ТРД и детей с РАС с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). В результате анализа нами была получена таблица, содержащая для каждого показателя: 1) значение F-критерия, 2) соответствующее ему р-значение, 3) величину разности средних значений в исследуемых группах. Таблица позволила отсортировать показатели в порядке уменьшения значимости различий и/или величины различий с получением наиболее важных из них.

Для визуализации различий по исследуемым показателям между группами ТРД и детей с РАС была построена вулканная диаграмма (volcano plot, рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). В ней по оси абсцисс откладывали разность логарифмов средних значений реактивности в сравниваемых выборках ТРД (контроль — К) и детей с РАС (аутизм — А), а по оси ординат — отрицательное значение десятичного логарифма р-значения, полученного в результате сравнения этих средних значений. Чем дальше от центра диаграммы расположены метки показателей влево или вправо, тем сильнее отличаются групповые средние, а чем выше расположены метки, тем более статистически значимы эти различия, при этом наиболее важные показатели оказываются в верхних углах графика.

Для наглядности на рисунке 3 отчерчены углы, соответствующие значимости различий $p < 0,01$ ($-\lg(0,01) = 2$) и с абсолютной величиной различий средних $|dm| > 0,2$. Видно, что по наиболее важным для дифференциальной диагностики показателям реактивности АТ чаще наблюдались положительные значения разности (К-А) (синие метки на графике) и заметно реже — отрицательные (красные метки) (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). Это свидетельствует о том, что в группе детей с РАС преимущественно наблюдалась низкая реактивность диагностически значимых АТ по сравнению с аналогичными значениями в группе ТРД, а число АТ с значимо высокой реактивностью было малым. Все найденные показатели могут рассматриваться в качестве специфических маркеров РАС.

Тем не менее выбор конкретного числа показателей, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики, не является однознач-

ным. Ввиду большого числа проведенных тестов, полученные р-значения нуждаются в поправках на множественность сравнений, например Бонферрони, Холма и др. Однако, во-первых, использование таких поправок в случае тысяч сравнений делает результаты отбора показателей по скорректированным р-значениям слишком консервативными. Во-вторых, в некоторых ситуациях даже с поправками число статистически значимых различий составляет сотни и тысячи показателей, что заставляет исследователей искусственно снижать их количество до меньших значений, часто «круглых»: 50, 100, 200.

В-третьих, не ясно, как относиться к результатам, когда применение поправок не оставляет статистически значимых показателей, тем не менее предоставляя исследователю некоторое число наиболее перспективных из них. Поэтому интерпретацию результатов статистического сравнения в биоинформатике принято проводить с привлечением средств кластерного графического анализа данных.

Этап 4. Интерпретация результатов анализа

Для визуального отбора наиболее важных показателей реактивности, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики детей с РАС, и оценки их диагностической значимости нами был применен дополнительный метод графического представления данных микрочиповых исследований — тепловая карта (heatmap, рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

Для построения тепловой карты, изображенной на рисунке 4, нами были отобраны 73 антигенных миметика, отличавшиеся от остальных наименьшими р-значениями и образующими на графике отсортированных в порядке увеличения р-значений небольшую ступень.

При построении тепловой карты необходимо было учесть, что значения ИФ (реактивности) для отобранных нами 73 показателей сильно варьировали от сотен тысяч до сотен условных единиц, во много раз превышая величину межгрупповых различий. Поэтому перед построением карты данные были стандартизованы: из значения логарифма показателя реактивности каждого из 71 образцов вычиталось среднее по данному показателю значение, а разность делилась на стандартное отклонение. В результате межгрупповые различия были выражены в единицах стандартного отклонения, и данные по разной реактивности АТ были приведены к единому масштабу.

Тепловая карта представляет собой таблицу из ячеек, отражающих индивидуальные значения показателей реактивности 73 АТ (ось X, подписи соответствуют аминокислотным последовательностям антигенных миметиков, с которыми взаимодействуют АТ плазмы крови) для каждого ребенка (ось Y, К — ТРД, А — дети с РАС). Синий цвет ячейки указывает на низкую реактивность АТ, сла-

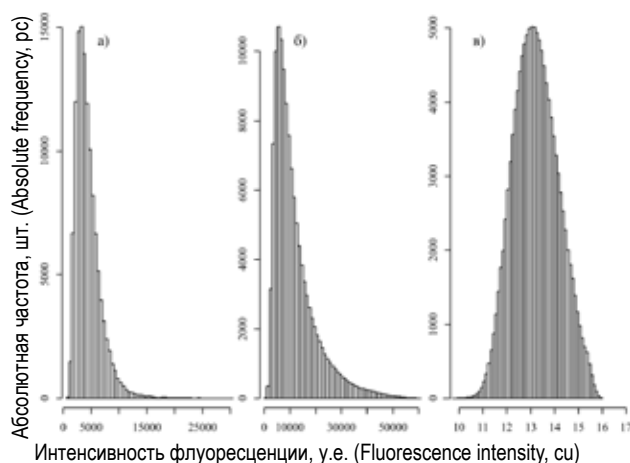


Рисунок 2. Гистограммы распределения показателей реактивности антител образца K16.03_E1

Примечание. А) исходные данные; Б) данные после квантильной нормализации; В) данные после нормализации и логарифмирования по основанию два.

Figure 2. Histograms of distribution of the antibodies reactivity of sample K16.03_E1

Note. A) the original data; B) data after quantile normalization; C) data after normalization and logarithm on the basis of two.

бо связанных с АГ, желтый и красный цвета ячеек указывают на среднюю и высокую реактивность АТ соответственно, т.е. демонстрируют среднюю и высокую силу связывания с антигенными миметиками (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

На левом поле тепловой карты представлена дендрограмма сходства объектов исследования, которая делит группы обследованных детей на два больших кластера: кластер, в который преимущественно вошли ТРД (верхняя часть тепловой карты, участок дендрограммы и коды детей отмечены синим цветом) и кластер детей с РАС (нижняя часть тепловой карты, коды выделены красным цветом). На верхнем поле тепловой карты представлена кластеризация показателей реактивности 73 АТ, отобранных для дифференциальной диагностики групп. Видно, что показатели также образуют два кластера, состоящих из 60 и 13 значений, выделенных синим и красным цветом соответственно. Для наглядности поле тепловой карты расчерчено черными линиями по границам кластеров, образуя 4 квадрата: А, В, С, D (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

Как видно из рисунка 4, для 60 АТ у детей с РАС наблюдалась преимущественно средняя и низкая реактивность (нижний левый квадрат В, область синего и желтого спектра), т.е. эти АТ имели слабую силу связывания с антигенными миметиками, и только 13 АТ показывали высокую реактивность (нижний правый квадрат D, область преимущественно красного цвета). Для группы ТРД, наоборот, было характерно бо-

лее сильное связывание (реактивность) по сравнению с группой детей с РАС для 60 АТ (верхняя левая область карты с преобладанием красного цвета, квадрат А), и только 13 АТ обнаруживали низкую реактивность.

Также из дендрограммы для детей с РАС видно, что эта группа не является однородной и, вероятно, представлена двумя подгруппами, сходными по реактивности 13 специфичных для РАС АТ, но различающимися по соотношению реактивности АТ, характерных для ТРД.

В целом группировка объектов на тепловой карте показывает, что в группу детей с РАС попал только один ребенок из группы ТРД, остальные 24 были классифицированы верно, то есть специфичность диагностики составила 24 из 25 или 96,0% (95% ДИ от 82,8 до 99,6%). В кластер группы типично развивающихся детей ошибочно попало 10 образцов детей с РАС из 46, то есть доля верно классифицированных детей с РАС или чувствительность методики составила 36 из 46 или 78,3% (95% ДИ от 64,9 до 88,2%). Таким образом, общая диагностическая эффективность метода иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики аутизма составила 87,2%.

Обсуждение

РАС определяются как гетерогенная группа нарушений нейроразвития, с большой долей вероятности закладывающихся в эмбриональном периоде, которые проявляются трудностями в социальных взаимодействиях, вербальных и невербальных коммуникациях, стереотипными или повторяющимися моделями поведения [31].

К сожалению, на сегодня подходы к диагностике и методы терапии основных симптомов РАС остаются ограниченными, что определяется недостаточным пониманием этиологии и патогенеза развития этих расстройств. Среди многих теорий, представленных для объяснения причин и следствий развития РАС, дисфункция иммунной системы все чаще презентуется в качестве потенциального механизма в патогенезе аутизма [12, 16, 30], в связи с этим для дифференциальной диагностики РАС нами был предложен метод иммуносигнатуры, основанный на поиске глобальных индивидуальных паттернов АТ, характерных для состояний здоровье/болезнь.

В результате биоинформационного анализа данных было выбрано 73 АТ, показатели реактивности которых имели статистически значимые различия в группах детей с РАС и ТРД и были использованы для дифференциальной диагностики, ценность которой определяли при построении тепловой карты. Обнаружено, что группа детей с РАС по показателям реактивности АТ обладает выраженной гетерогенностью и состоит

как минимум из двух подгрупп, что согласуется с данными ряда авторов [2, 3, 18].

Кроме того, у детей с РАС иммунореактивность АТ в отношении 60 антигенных миметиков значимо ниже, чем у ТРД. Известно, что уровни АТ у детей достигают уровни взрослых в зависимости от изотипов только к 10 годам [12]. Следовательно, полученные данные могут отражать как замедленное/измененное развитие продукции АТ, так и недостаточность комплексного взаимодействия между клетками — участниками гуморального иммунного ответа: дендритными клетками, Т-лимфоцитами, АТ-продуцирующими В-лимфоцитами, а также эффекты растворимых факторов — цитокинов и хемокинов, участвующих в антителообразовании. Работы ряда авторов указывают на субоптимальную гуморальную функцию В-лимфоцитов, отвечающих за продукцию АТ у детей с РАС [12, 16]. Следует подчеркнуть, что факторы иммунной системы — цитокины, хемокины, АТ — на ранних стадиях нейроразвития поступают к плоду и участвуют в формировании пластичности центральной нервной системы и ее функций, так же как ряд нейропептидов проявляет широкий ассортимент эффекторов в отношении развивающейся иммунной системы (ее супрессия или активация). Изменения в каждой из этих комплексных информационных систем способны потенцировать ответы друг друга и других органов и в конечном итоге поведение организма [2, 3, 12].

Наше пилотное исследование позволяет предложить метод иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики РАС с диагностической значимостью 87,2% и, возможно, расширить наше понимание нарушений при аутизме. Дальнейшая траектория исследований будет направлена на увеличение количества обследуемых детей и оценку применения метода иммуносигнатуры в контексте социальных отношений у детей с РАС.

Благодарности

Работа выполнена в рамках договора о сотрудничестве между Челябинским государственным университетом и Алтайским государственным университетом. Авторы выражают глубокую благодарность С.А. Джонстону, директору института биодизайна университета штата Аризона за предоставление пептидных микрочипов, и директору Российско-американского противоракового центра А.И. Шаповалу за помощь в проведении лабораторной части исследования.

Список литературы / References

1. Bakroon A., Lakshminarayanan V. Visual function in autism spectrum disorders: a critical review. *Clin. Exp. Optom.*, 2016, Vol. 99, pp. 297-308.
2. Baron-Cohen S., Belmonte M.K. Autism: a window onto the development of the social and the analytic brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2005, Vol. 28, pp. 109-126.
3. Baron-Cohen S. Editorial Perspective: Neurodiversity – a revolutionary concept for autism and psychiatry. *J. Child. Psychol. Psychiatry*, 2017, Vol. 58, no. 6, pp. 744-747.
4. Bolstad B. preprocessCore: A collection of pre-processing functions. R package version 1.42.0. 2018, <https://github.com/bmbolstad/preprocessCore>.
5. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 2001, Vol. 16, no. 2, pp. 101-117.
6. Cohen I.R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 7, pp. 569-574.
7. DiCicco-Bloom E., Lord C., Zwaigenbaum L., Courchesne E., Dager S.R., Schmitz C., Schultz R.T., Crawley J., Young L.J. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J. Neurosci.*, 2006, Vol. 26, no. 26, pp. 6897-6096.
8. Drăghici S. Statistics and data analysis for microarrays using R and Bioconductor. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2012. 1026 p.
9. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 2004, Vol. 10, no. 5, R80.
10. Gentleman R., Carey V., Huber W., Hahne F. genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments. R package version 1.62.0. 2018, <https://github.com/Bioconductor/genefilter>.
11. Hahne F., Huber W., Gentleman R., Seth Falcon S. Bioconductor case studies. Springer Science & Business Media, 2010. 284 p.
12. Heuer L., Ashwood P., Schauer J., Goines P., Krakowiak P., Hertz-Picciotto I., Hansen R., Croen L.A., Pessah I.N., van de Water J. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Research*, 2008, Vol. 1, no. 5, pp. 275-283.
13. Huber W., Carey V.J., Gentleman R., Anders S., Carlson M., Carvalho B.S., Bravo H.C., Davis S., Gatto L., Girke T., Gottardo R., Hahne F., Hansen K.D., Irizarry R.A., Lawrence M., Love M.I., MacDonald J., Obenchain V., Ole's A.K., Pag'es H., Reyes A., Shannon P., Smyth G.K., Tenenbaum D., Waldron L., Morgan M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Met.*, 2015, Vol. 12, no. 2, pp. 115-121.
14. Madi A., Hecht I., Bransburg-Zabary S., Merbl Y., Pick A., Zucker-Toledano M., Quintana F.J., Tauber A.I., Cohen I.R., Ben-Jacob E. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 34, pp. 14484-14489.
15. Madi A., Bransburg-Zabary S., Kenett D.Y., Ben-Jacob E., Cohen I.R. The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, Vol. 750, pp. 198-212.
16. Meltzer A., van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2016, Vol. 42, no. 1, pp. 284-298.
17. Mouthon L., Lacroix-Desmazes S., Nobrega A., Barreau C., Coutinho A., Kazatchkine M.D. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand. J. Immunol.*, 1996, Vol. 44, no. 3, pp. 243-251.
18. Ousley O., Cermak T. Autism spectrum disorder: defining dimensions and subgroups. *Curr. Dev. Disord. Rep.*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. 20-28.
19. Qiu X., Wu H., Hu R. The impact of quantile and rank normalization procedures on the testing power of gene differential expression analysis. *BMC Bioinformatics*, 2013, Vol. 14, no. 124, pp. 1-10.
20. Quintana F.J., Cohen I.R. The natural autoantibody repertoire and autoimmune disease. *Biomed. Pharmacother.*, 2004, Vol. 58, no. 5, pp. 276-281.
21. Quintana F.J., Hagedorn P.H., Elizur G., Merbl Y., Domany E., Cohen I.R. Functional immunomics: Microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, pp. 14615-14621.
22. Quintana F.J., Merbl Y., Sahar E., Domany E., Cohen I.R. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus*, 2006, Vol. 15, no. 7, pp. 428-430.
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.
24. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 2011, Vol. 70, no. 2, pp. 286-295.
25. Restrepo L., Stafford P., Johnston S.A. Feasibility of an early Alzheimer's disease immunosignature diagnostic test. *J. Neuroimmunol.*, 2013, Vol. 254, no. 1-2, pp. 154-60.
26. Robinson W.H. Antigen arrays for antibody profiling. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, Vol. 10, pp. 67-72.

27. Singh S., Stafford P., Schlauch K.A., Tillett R.R., Gollery M., Johnston S.A., Khaiboullina S.F., de Meirleir K.L., Rawat S., Mijatovic T., Subramanian K., Palotás A., Lombardi V.C. Humoral immunity profiling of subjects with myalgic encephalomyelitis using a random peptide microarray differentiates cases from controls with high specificity and sensitivity. *Mol. Neurobiol.*, 2018, Vol. 55, no. 1, pp. 633-641.
28. Stafford P., Cichacz Z., Woodbury N.W., Johnston S.A. Immunosignature system for diagnosis of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 30, pp. E3072-E3080.
29. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends Biotechnol.*, 2013, Vol. 31, no. 1, pp. 45-51.
30. Wills S., Cabanlit M., Bennett J., Ashwood P., Amaral D., van de Water J. Autoantibodies in autism spectrum disorders (ASD). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, Vol. 1107, pp. 79-91.
31. Zaman S., Yazdani U., Deng Y., Li W., Gadad B.S., Hynan L., Karp D., Roatch N., Schutte C., Nathan Marti C., Hewitson L., German D.C. A search for blood biomarkers for autism: peptoids. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 6, 19164. doi: 10.1038/srep19164.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

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

Поступила 30.06.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 30.06.2018
Accepted 19.09.2018

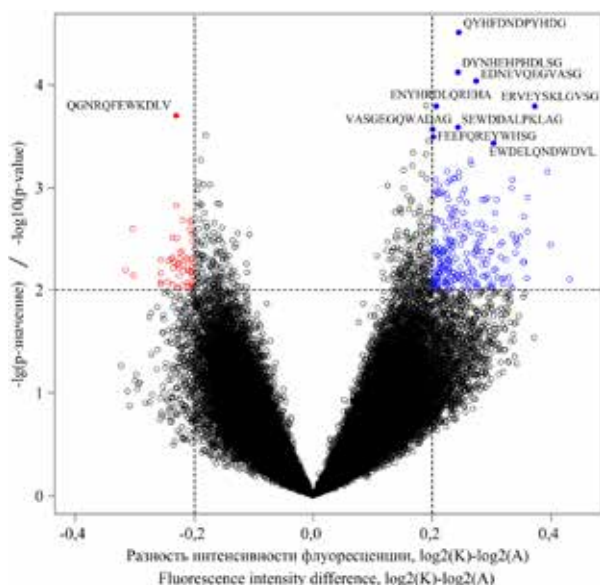


Рисунок 3. Вулканная диаграмма различий между группами детей с аутизмом (А) и типично развивающимися детьми (К) по 122 926 антигенным миметикам (пояснения – в тексте)

Примечание. На рисунке подписаны последовательности аминокислотных остатков 10 антигенных миметиков, по которым наблюдаются наиболее значимые различия. Красным цветом отмечены значения показателей реактивности АТ, значимо повышенные у детей с РАС, синим – у ТРД.

Figure 3. Volcano diagram of the differences between groups of children with autism (A) and typically developing children (K) in 122 926 antigenic mimetics (explanations – in the text)

Note. In the figure, the sequences of amino acid residues of 10 antigenic mimetics are signed, according to which the most significant differences are observed. Red values of the antibodies reactivity, significantly increased in children with ASD, and blue – in TD children.

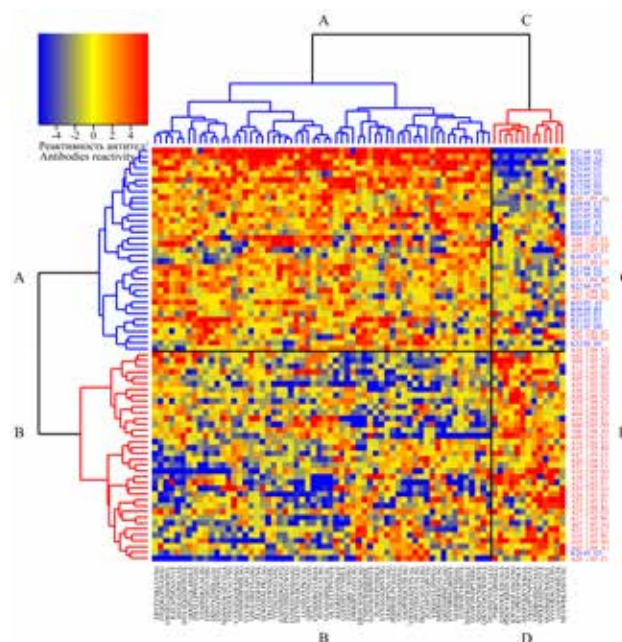


Рисунок 4. Тепловая карта различий между группами детей с РАС и ТРД

Примечание. Тепловая карта представляет собой таблицу из ячеек, отражающих индивидуальные значения показателей реактивности 73 АТ (ось X, подписи соответствуют аминокислотным последовательностям антигенных миметиков, с которыми взаимодействуют АТ плазмы крови) для каждого ребенка (ось Y, К – ТРД, А – дети с РАС). Синий цвет ячейки указывает на низкую реактивность АТ, желтый и красный цвета ячеек указывают на среднюю и высокую реактивность АТ соответственно. На левом поле тепловой карты представлена дендрограмма сходства объектов исследования, которая делит группы обследованных детей на два больших кластера. На верхнем поле тепловой карты представлена кластеризация показателей реактивности 73 АТ, отобранных для дифференциальной диагностики групп. Для наглядности поле тепловой карты расчерчено черными линиями по границам кластеров, образуя 4 квадрата: А, В, С, D.

Figure 4. Heatmap of the differences between groups of children with ASD and TD children

Note. The heatmap is a table of cells reflecting individual values of the reactivity parameters of 73 antibodies (X axis, the signatures correspond to the amino acid sequences of antigenic mimetics with which the blood plasma antibodies interacts) for each child (Y axis, K – TD children, A – children with ASD). The blue color of the cell indicates the low antibodies reactivity, the yellow and red colors of the cells indicate the average and high antibodies reactivity, respectively. In the left field of the heatmap, a dendrogram of the similarity of the research objects is presented, which divides the groups of the children surveyed into two large clusters. On the upper field of the heatmap, clusterization of reactivity parameters of 73 antibodies selected for differential diagnostics of groups is presented. For clarity, the heatmap field is drawn with black lines along the boundaries of clusters, forming 4 squares: A, B, C, D.