

# Наблюдение результатов назначения фолиниевой кислоты пациентам с церебральной фолатной недостаточностью и синдромом Кернса-Сейра

Пилар Куихада-Фрайле,<sup>1</sup> Мар О'Кэллэхэн,<sup>3</sup> Елена Мартин-Эрнандес,<sup>1</sup> Ракель Монтеро,<sup>2,3</sup> Анжел Гарсия-Касорла,<sup>2,3</sup> Ана Мартинес де Арагон,<sup>1</sup> Жорди Мучарт,<sup>3</sup> Игнасио Малага,<sup>4</sup> Рафаэль Пардо,<sup>5</sup> Педро Гарсия-Гонсалес,<sup>5</sup> Кристина Хоу,<sup>3</sup> Хулио Монтойя,<sup>2,6</sup> Соня Эмперадор,<sup>6</sup> Эдуардо Руис-Песини,<sup>2,6</sup> Хоакин Арена,<sup>2,7</sup> Мигель Анхель Мартин,<sup>2,7</sup> Аида Ормасабаль,<sup>2,3</sup> Мерсе Пинеда,<sup>2,3</sup> Мария Т Гарсия-Сильва,<sup>1,2</sup> Рафаэль Артуч<sup>2,3,\*</sup> (автор, ответственный за переписку)

Pilar Quijada-Fraile,<sup>1</sup> Mar O'Callaghan,<sup>3</sup> Elena Martín-Hernández,<sup>1</sup> Raquel Montero,<sup>2,3</sup> Àngels Garcia-Cazorla,<sup>2,3</sup> Ana Martínez de Aragón,<sup>1</sup> Jordi Muchart,<sup>3</sup> Ignacio Málaga,<sup>4</sup> Rafael Pardo,<sup>5</sup> Pedro García-Gonzalez,<sup>5</sup> Cristina Jou,<sup>3</sup> Julio Montoya,<sup>2,6</sup> Sonia Emperador,<sup>6</sup> Eduardo Ruiz-Pesini,<sup>2,6</sup> Joaquín Arenas,<sup>2,7</sup> Miguel Angel Martin,<sup>2,7</sup> Aida Ormazabal,<sup>2,3</sup> Mercè Pineda,<sup>2,3</sup> María T García-Silva,<sup>1,2</sup> and Rafael Artuch,<sup>2,3\*</sup>

## Аннотация

### Актуальность

Синдром Кернса-Сейра (СКС) – синдром, связанный с делецией в митохондриальной ДНК и проявляющийся выраженной церебральной фолатной недостаточностью и рядом других симптомов. Предварительные данные говорят в поддержку идеи о том, что фолиниевая кислота может стать полезной составляющей терапии пациентов с СКС. Нашей целью была оценка клинических показателей и результатов сканирования мозга пациентов с СКС, получающих фолиниевую кислоту.

**Методы:** *Пациенты:* К исследованию привлекли восемь пациентов с диагнозом СКС. Четверо пациентов получали лечение в больнице имени 12 октября (12 de Octubre Hospital), двое – в больнице Сант Жуан де Деу. Двое пациентов отказались придерживаться протокола терапии. *Методы:* Производили сбор клинических и биохимических данных и результатов сканирования мозга (магниторезонансная томография и компьютерная томография) в исходных условиях и в различные моменты после начала терапии. Анализировали концентрацию 5-метилтетрагидрофолата в спинномозговой жидкости с помощью ВЭЖХ и флуоресцентной детекции. Анализировали крупные делеции митохондриальной ДНК с помощью метода Саузерн-блот.

*Протокол терапии:* Длительность периодов последующего наблюдения варьировала от 1 до 8 лет. Пациенты 1-4 получали фолиниевую кислоту перорально в дозировке 1 мг/кг/сутки, а пациенты 6 и 8 – в дозировке 3 мг/кг/сутки.

**Результаты:** При терапии фолиниевой кислотой не было отмечено нежелательных эффектов. При исходном обследовании у всех пациентов наблюдалась церебральная недостаточность 5-метилтетрагидрофолата. Более того, у каждого из трех пациентов, которым после курса терапии фолиниевой кислотой осуществили люмбальную пункцию, было отмечено полное восстановление концентрации 5-метилтетрагидрофолата до нормального уровня. У двух пациентов после назначения фолиниевой кислоты было отмечено улучшение неврологических показателей. У остальных пациентов симптомы заболевания усугубились.

(Продолжение на следующей странице)

*(Начало на предыдущей странице)*

Шестеро пациентов, получавших фолиевую кислоту, подверглись сканированию мозга после курса терапии. У одного пациента была отмечена ремиссия изменений белого вещества. У остальных пациентов отмечены признаки прогрессирования изменений в субкортикальном белом веществе и мозжечке, а также атрофия мозга.

**Заключение:** У четырех пациентов после назначения фолиевой кислоты отмечено прогрессирование заболевания по данным клинического обследования и снимков мозга. Только один пациент, начавший получать терапию на ранней стадии заболевания, продемонстрировал при получении повышенных доз фолиевой кислоты улучшение как в плане неврологических симптомов, так и по результатам анализа снимков мозга. Еще у одного пациента было отмечено улучшение неврологических показателей. По всей видимости, при СКС может быть рекомендовано раннее назначение высоких доз фолиевой кислоты.

**Регистрация исследования:** Eudrac T2007-00-6748-23

**Ключевые слова:** Синдром Кернса-Сейра, делеция митохондриальной ДНК, церебральная фолатная недостаточность, терапия фолиевой кислотой, нейровизуализационные исследования

\* Направляйте корреспонденцию по адресу [rantuch@hsjdbcn.org](mailto:rantuch@hsjdbcn.org)

<sup>2</sup> Центр по исследованию редких заболеваний (CIBERER), Институт здоровья имени Карлоса III, Мадрид, Испания.

<sup>3</sup> Отделения детской неврологии, клинической биохимии, гистопатологии и радиологии, Больница Сант Жуан де Деу, 2, Эсплугес, Барселона 08950, Испания.

Полная информация об авторах представлена в списке, размещенном в конце статьи.

**Рукопись получена:** 14 августа 2014 года; одобрена: 18 декабря 2014 года.

**Перевод на русский язык:** Тимеев Артем Геннадьевич, 25 января 2021 года, Екатеринбург.

#### **Дополнительный материал в электронной форме**

Онлайн-версия настоящей статьи (doi:10.1186/s13023-014-0217-2) содержит дополнительный материал, доступный зарегистрированным пользователям.

#### **Актуальность**

Синдромы, связанные с крупными делециями митохондриальной ДНК (мтДНК), включают в себя три основных фенотипа: синдром Кернса-Сейра (СКС: ORPHA480), синдром Пирсона (ORPHA699), и прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию различных подтипов [1]. Синдром Кернса-Сейра представляет собой мультисистемное заболевание, обычно вызываемое единичными делециями в мтДНК.[2] На протяжении последних десятилетий происходило тщательное исследование клинических особенностей этих синдромов. Делеции мтДНК у пациентов с СКС присутствуют в тканях различных типов, но из всех систем организма заболевание сильнее всего поражает центральную нервную систему (ЦНС).

Одним из органов-мишеней при СКС является сосудистое сплетение. Сосудистое сплетение представляет собой основной орган, осуществляющий активный перенос фолата в ЦНС.[3] В дополнение к этой функции сосудистое сплетение задействовано и в других процессах активного переноса эссенциальных микронутриентов в спинномозговую жидкость (СМЖ), а также участвует в выносе множества экзогенных веществ и продуктов жизнедеятельности из метаболической системы мозга, за пределы СМЖ.[4] В образцах СМЖ, взятых у пациентов с СКС, обнаруживается повышенная концентрация лактата и белка, в большинстве случаев наблюдается значительное снижение концентрации 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF), отмечаются иные биохимические отклонения.[5,6] Было выдвинуто предположение о том, что характерное для СКС повышение концентрации белка в СМЖ и снижение уровней 5-MTHF в значительной степени обусловлено накоплением мутантных копий мтДНК в клетках сосудистого сплетения.[7] Ассоциация

церебральной фолатной недостаточности с СКС была впервые описана в 1983 году.[8,9] Недавно сообщалось о том, что церебральная фолатная недостаточность часто обнаруживается при СКС и других митохондриальных заболеваниях.[10,11] Группа Pineda et al.[5] описала случай, при котором назначение фолиниевой кислоты пациенту с делецией мтДНК и церебральной фолатной недостаточностью дало положительный эффект. Предварительные данные говорят в пользу идеи о том, что назначение фолиниевой кислоты может помочь пациентам с СКС, у которых обнаруживается церебральная фолатная недостаточность, несмотря на отсутствие публикаций о исследованиях с длительным последующим наблюдением за пациентами. В пользу идеи говорит и то, что фолат играет незаменимую роль в церебральном метаболизме, участвуя в сотнях реакций метилирования, а также в метилировании и поддержании стабильности миелиновых оболочек.[5]

Настоящее исследование имело целью определить, как отражается назначение фолиниевой кислоты на клиническом состоянии, снимках мозга и биохимических показателях пациентов с синдромом Кернса-Сейра и церебральной фолатной недостаточностью.

## **Методы**

### **Пациенты**

Дизайн исследования: открытое исследование. Для участия в исследовании мы набрали восемь пациентов, имевших диагнозы «синдром крупной единичной делеции мтДНК» и «церебральная фолатная недостаточность». Пациенту 1 был изначально поставлен диагноз «синдром Пирсона», впоследствии полностью перешедший в фенотип СКС. Все пациенты в ходе исследования соответствовали диагностическим критериям СКС. Информация о некоторых из пациентов ранее публиковалась в научной литературе.[5,11,12] Набор пациентов производился в Больнице им. 12 октября (Мадрид), больнице Сант Жуан де Деу (Барселона) и Центральной больнице Астурии (Овьедо). Пациенты 1-4 получали лечение в Больнице им. 12 Октября, пациенты 6 и 8 – в Больнице Сант Жуан де Деу. Двое пациентов (5 и 7) отказались придерживаться протокола терапии, но их данные отражены в описании исходного состояния пациентов (см. таблицы).

Информация о пациентах, как то: возраст, возраст начала заболевания, возраст при назначении фолиниевой кислоты, результаты клинической оценки с помощью Ньюкаслской шкалы оценки митохондриальных заболеваний, концентрация фолата в СМЖ, клинические признаки и результаты молекулярных исследований (% и размер делеции мтДНК) и данные гистопатологического исследования образцов мышечной ткани, представлена в таблице 1.

### **Методы**

Сбор клинических и биохимических данных, данных сканирования мозга (МРТ либо КТ) осуществлялись при первоначальном обследовании и в различные дни после назначения терапии (таблицы 1, 2, 3). Во время визитов пациентов, запланированных с шестимесячным интервалом, осуществлялся общий и неврологический осмотр. Клинический исход у пациентов в возрасте до 18 лет оценивали с помощью Ньюкаслской педиатрической шкалы оценки митохондриальных заболеваний (НПШМЗ), у пациентов взрослого возраста – с помощью Ньюкаслской шкалы оценки митохондриальных заболеваний (НШМЗ).[13,14] НПШМЗ представляет собой шкалу, разработанную и валидированную для оценки тяжести состояния у детей, страдающих наследственными митохондриальными заболеваниями. Были использованы версии НПШМЗ, соответствующие возрасту пациентов: версия для возрастного диапазона 2-12 лет; версия для диапазона 12-18 лет. Разделы I-III, призванные оценить работу органов, заполнялись для каждого пациента как при первоначальном обследовании, так и в процессе последующего наблюдения. Дополнительные обследования (снятие электроэнцефалограмм, эхокардиограмм, электрокардиограмм, запись зрительных и слуховых вызванных потенциалов) и анализ работы почек и эндокринной системы осуществлялись в зависимости от состояния здоровья пациентов. Длительность периодов последующего наблюдения варьировала от 1 до 8 лет.

**Таблица 1. Возраст, возраст начала заболевания, возраст при назначении фолиниевой кислоты, уровни фолата в СМЖ, клинические признаки, данные молекулярных исследований (% и размер делеции), гистопатологические результаты мышечной биопсии.**

	Пациент 1 <sup>а</sup>	Пациент 2 <sup>а</sup>	Пациент 3 <sup>а</sup>	Пациент 4 <sup>а</sup>	Пациент 5	Пациент 6 <sup>а</sup>	Пациент 7	Пациент 8 <sup>а</sup>
Возраст (лет)	12	16	23	20	42	14	29	16
Возраст начала	0.3	10	10	6	9	9	8	7
Возраст назначения фолиниевой кислоты	8.5	11	17	14	-	13	-	8
Фолат в СМЖ (нмоль/л)	7	5.6	2	6	24	4	1	8
<b>Клинические признаки и возраст</b>								
Балл НПШМЗ <sup>б</sup>	31	7	26	29	100 (в 33 года)**	17	114**	20
Офтальмоплегия и ретинопатия	7 лет	10 лет	10 лет	7 лет	18 лет	9 лет/12 лет	10 лет	9 лет
Мозжечковая атаксия	7 лет		15 лет	7 лет	27 лет	9 лет	8 лет	7 лет
Миопатия	7 лет	10 лет	15 лет	7 лет	12 лет	9 лет	10 лет	8 лет
Нарушение сердечной проводимости	9 лет	11 лет	14 лет	9 лет	30 лет	14 лет	12 лет	
Сахарный диабет			12 лет	12 лет			15 лет	
Нарушение слуха	+	12 лет		14 лет	21 лет		11 лет	9 лет
Иное	Почечный синдром Фанкони в 2 года Экзокринная панкреатическая недостаточность в 3 года Надпочечниковая недостаточность в 7 лет			Кардиостимулятор	Миоклонические подергивания Низкий рост в 9 лет	Низкий рост Почечная недостаточность	Низкий рост Кардиостимулятор в 15 лет	Миоклонические подергивания Парциальные судороги Низкий рост Почечная недостаточность Надпочечниковая недостаточность
Молекулярные исследования: % делеции (размер)	75% 6900	18% 7900	40% 7100	71% 5100	77% 2434	80% 5800	62% 4977	73% 4121
Гистологическое исследование биоптата мышц	-	В норме	Отложения липидов в волокнах	Рваные красные волокна (РКВ), СОХ-негативные	РКВ	-	РКВ	РКВ с частичной недостаточностью СОХ (цитохром С-оксидазы)

(-) не осуществлялось.

<sup>а</sup> Пациент согласился участвовать.

<sup>б</sup> В исходном состоянии (до назначения фолиниевой кислоты).

\*\*У взрослых пациентов балл рассчитывался по шкале НШМЗ.

**Таблица 2. Биохимические данные и характер терапии фолиниевой кислотой, назначенной пациентам с СКС**

Пациент №	Возраст назначения фолиниевой кислоты (лет)	Дозировка фолиниевой кислоты (мг/кг/сутки)	Длительность терапии на момент люмбальной пункции	Фолат в плазме (нг/мл) Норма: 2.6-18.7	Лактат в плазме (ммоль/л) Норма: 0.5-2.3	Уровни в СМЖ до и после терапии		
						5-МТНФ (нмоль/л) Норма: 35-124	Лактат (нмоль/л) Норма: <2.8	Белок (мг/дл) Норма: 15-41
1	8.5	1	0.8	25	3	7→48	5.1/-	115/-
2	11	1	3.7	-	1.5	5.6→60	2.1→1.4	121→142
3	17	1	-	20	1.4	2	3.5	165
4	14	1	-	-	2.5	6	5.7	169
5	-	-	-	5.3	2.3	24	5.9	80
6	13	3	-	-	-	4	4.2	160
7	-	-	-	9.9	3.5	1	3.5	244
8	8	3	1	1.2	2.5	8→82	5.2→1.2	89→117

СМЖ (спинномозговая жидкость, ликвор)

Таблица 3. Результаты сканирования мозга (МРТ либо КТ) до и после назначения фолиевой кислоты и клинический исход

Пациент №	Возраст сканирования (до начала терапии)	Промежуток между сканированием (годы)	Атрофия		Гиперинтенсивный сигнал на T2-взвешенных снимках					Клинический исход по разделам I-III опросника НШМЗ*
			Церебрал.	Мозжечковая	Мозг, субкортикально	Ствол мозга	Базальные ядра	Таламус	Мозжечок	
			До/После	До/После		До/После	До/После	До/После	До/После	
1	8	0.7			+ /++	+/+	+/+		+/+	31/40
2	11	2.7			+ / ++	+/+		+/+		7/14
3	17	3	-/+		+	+/+	-/+	+	-/+	26/54**
4*	14	3	-/+		-/+		+/+		-/+	29/67**
5				+	+	+	+	+	+	Неизвестно
6	13	2				+/+	+/+		-/+	17/22
7			+				+	+	+	Неизвестно
8	8	2			+/-					20/24

\*КТ-сканирование, + (поражение), ++ (прогрессирование), - (отсутствие поражения либо улучшение картины).

\*\*У взрослых пациентов балл рассчитывался по шкале НШМЗ.

**Биохимические методы:** Измеряли концентрацию лактата и фолата в плазме крови с помощью стандартных автоматизированных методик. Люмбальные пункции для забора СМЖ каждый раз осуществляли в соответствии с описанным в литературе протоколом.[15] Концентрацию лактата и общего белка в СМЖ измеряли, используя автоматизированные спектрофотометрические процедуры, а концентрацию 5-MTHF в СМЖ определяли с помощью ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией в согласии с ранее опубликованными процедурами.[15]

### **Генетический анализ**

Изоляцию ДНК пациентов производили из мышечной ткани, за исключением пациента №1, у которого изолировали ДНК из клеток крови. Анализировали крупные делеции митохондриальной ДНК с помощью метода Саузерн-блот.

Осуществляли исследование мозга методом магниторезонансной томографии (МРТ) на аппарате Philips® или General Electric® с полем 1.5 Т по протоколу, включавшему получение T1- и T2-взвешенных изображений, диффузионно-взвешенных изображений (DWI), использование МР-спектроскопии и последовательности инверсии-восстановления с подавлением сигнала жидкости (FLAIR). МРТ-сканированию подвергали всех пациентов, за исключением пациента 4, у которого был установлен искусственный водитель ритма. Этого пациента сканировали на аппарате компьютерной томографии (КТ). Мы оценивали снимки до назначения фолиниевой кислоты и в разные моменты времени после назначения терапии (таблица 3).

### **Протокол терапии**

Пациенты 1-4 получали фолиниевую кислоту перорально в дозировке 1 мг/кг/сутки, пациенты 6 и 8 получали более высокие дозировки (3 мг/кг/сутки, таблица 2). Подбор доз фолиниевой кислоты осуществлялся в соответствии с протоколами терапии тяжелой фолатной недостаточности, представленными в научной литературе.[5,16,17] Люмбальные пункции после инициации терапии производили трем пациентам (пациенты 1, 2 и 8; таблица 2). Остальные пациенты отказались от осуществления люмбальной пункции.

Информированное согласие получали у членов семей пациентов. Проведение исследования было одобрено комитетами по этике больницы Сант Жуан де Деу, больницы им. 12 октября, и центральной больницы Астурии. Клиническое исследование было одобрено и профинансировано Институтом здоровья им. Карлоса III при Испанском Министерстве Здравоохранения (EC07/90272).

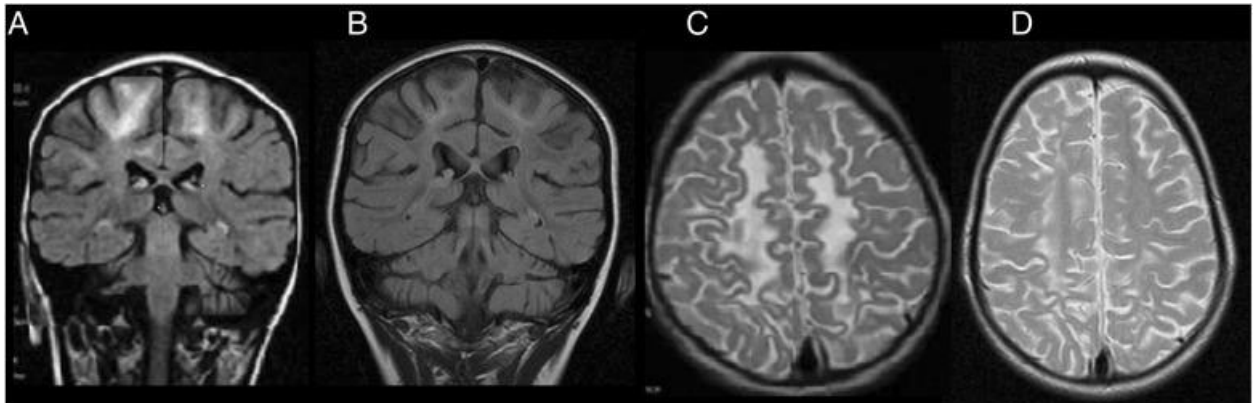
### **Результаты**

Во время терапии фолиниевой кислотой не было отмечено нежелательных явлений. Клинические исходы терапии описаны в таблице 3. У двух пациентов на фоне приема фолиниевой кислоты наступило улучшение неврологической симптоматики (пациенты 6 и 8). У пациента 6 результат оценки по НПШМЗ ухудшился с 17 баллов (в исходном состоянии) до 22 (через 2 года после назначения фолиниевой кислоты). Этот результат был обусловлен небольшими изменениями в эндокринной системе (изменениями концентрации паратиреоидного гормона, вызванными умеренным нарушением функции почек) и асимптоматическими изменениями ЭКГ (раздел II опросника НПШМЗ). У пациента снизилась острота зрения в ночное время из-за развившейся ретинопатии. Любопытно, что некоторые неврологические показатели пациента (раздел III опросника НПШМЗ) остались стабильными, такие, как выраженность птоза и характер движения глаз, а также слабовыраженная миопатия с симметричной слабостью мышц тазового пояса и плечевого пояса. Не было отмечено развития нейропатии. Что примечательно, было отмечено ослабление мозжечковой атаксии и тремора. У пациента 8 результат оценки по НПШМЗ ухудшился с 20 баллов (в исходном состоянии) до 24 (через 2 года после назначения фолиниевой кислоты). Этот результат был связан с прогрессированием потери слуха до тяжелой стадии глухоты, а также с вторичными проблемами коммуникации, проблемами с кормлением через гастростому и изменением показателей успеваемости пациента в специальной школе (раздел I опросника НПШМЗ). За этот же период у пациента был отмечен легкий запор, асимптоматические изменения ЭКГ, легкое нарушение функции почек и анемия (раздел II опросника НПШМЗ). Любопытно, что некоторые неврологические показатели (раздел III опросника НПШМЗ) остались

на прежнем уровне: слабовыраженная миопатия с симметричной слабостью мышц тазового и плечевого поясов (на прежнем уровне) и нейропатия (выраженность осталась умеренной). Неожиданной находкой было то, что у пациента произошло восстановление проводимости зрительного нерва до исходного состояния, по данным исследования зрительных вызванных потенциалов. У него также снизились симптомы атаксии и ослаб тремор и пациент снова смог самостоятельно ходить. Пациент не полностью соответствовал симптоматике СКС перед началом терапии, и только спустя некоторое время стал удовлетворять всем диагностическим критериям (таблица 1). У остальных пациентов заболевание усугубилось. Пациент 1 скончался в возрасте 13 лет. Взрослые пациенты 5 и 7 отказались от терапии и были потеряны для наблюдения.

Биохимические данные представлены в таблице 2. У всех пациентов при первоначальном обследовании была обнаружена тяжелая церебральная недостаточность 5-MTHF, за исключением пациента 5, у которого была выявлена недостаточность средней степени тяжести. Уровни фолата в плазме у всех пациентов были в рамках нормы, за исключением пациента 8. Концентрация белка в СМЖ превышала 100 мг/дл у шести из восьми пациентов. Три пациента согласились на люмбальную пункцию после курса фолиевой кислоты (пациенты 1, 2, 8), и у каждого из них было отмечено восстановление концентрации фолата в СМЖ до нормального уровня. Концентрация белка в СМЖ у пациентов после курса терапии осталась повышенной (таблица 2).

Что касается визуальных исследований нервной системы, то на момент диагностики церебральной фолатной недостаточности основными наблюдаемыми признаками были следующие отклонения на МРТ-снимках: повышенная интенсивность сигнала на T2-взвешенных снимках и DWI-снимках в области субкортикального белого вещества, ствола мозга, базальных ганглий (в пяти из восьми случаев) и таламуса (в четырех случаях из восьми). У пациента 5 была отмечена атрофия мозжечка, у пациента 7 - атрофия мозга (таблица 3). Сканированию мозга подвергались шесть пациентов, получавших фолиевую кислоту. У пациента 8 было отмечено уменьшение отклонений в белом веществе (рисунок 1). У остальных пациентов отмечалось прогрессирование отклонений в субкортикальном белом веществе и мозжечке, и атрофия мозга (дополнительные файлы 1, 2, 3, 4, 5).



**Рисунок 1 (Пациент 8): МРТ с T2-взвешиванием (T2В), фронтальная проекция.** Перед назначением фолиевой кислоты (А) был отмечен аномально интенсивный сигнал, не затрагивающий субкортикальное белое вещество в приблизительно перивентрикулярной области, с улучшением после 2 лет терапии фолиевой кислотой (В). Также перед назначением фолиевой кислоты был отмечен гиперинтенсивный сигнал белого вещества в теменной области в аксиальной проекции МРТ (T2В) снимков (С). После двух лет терапии отмечено снижение аномально высокого сигнала до почти нормального для белого вещества уровня (D).

## Обсуждение

В настоящей статье описывается наблюдение за рядом пациентов с СКС после назначения им фолиевой кислоты. Данное заболевание представляет собой пример нарушения функции сосудистого сплетения, связанного с недостаточным переносом фолата из кровотока в СМЖ, ввиду чего у большинства пациентов развивается тяжелая церебральная фолатная недостаточность. Патофизиология СКС сложна и помимо церебральной фолатной



недостаточности включает в себя иные аспекты, но важность той роли, которую фолат играет в работе мозга, указывает на насущную необходимость применения фолиниевой кислоты при данном заболевании.

Клиническое наблюдение выявило ослабление нескольких неврологических отклонений у пациентов 6 и 8, при этом у всех пациентов, оцененных с помощью Ньюкаслской шкалы, было отмечено прогрессирование заболевания, пусть и крайне слабовыраженное в случае пациентов 6 и 8. Одно из возможных объяснений – в том, что при СКС церебральная фолатная недостаточность поражает мозг, но, вероятно, не периферические ткани в других частях тела. Более того, следует учесть, что пациенты 6 и 8 получали фолиниевую кислоту в повышенной дозировке (3 мг/кг/сутки). Хотя анализ спинномозговой жидкости, взятой у пациентов 1 и 2 (получавших 1 мг/кг/сутки) продемонстрировал достижение нормального диапазона 5-MTHF в СМЖ после курса фолиниевой кислоты, уровни фолата все же были ниже, чем у пациента 8 (таблица 2). Трудно исключить влияние иных факторов на положительные результаты, продемонстрированные в настоящей работе. У двух пациентов измеряли уровни лактата, и они оказались ниже при втором заборе образцов СМЖ, но это наблюдение может носить случайный характер, поскольку при митохондриальных заболеваниях зачастую наблюдаются нормальные значения концентрации лактата. Концентрации общего белка в спинномозговой жидкости повысились после курса фолиниевой терапии, что позволяет предположить, что транспорт молекул через сосудистое сплетение оставался нарушенным. В литературе описано применение фолиниевой кислоты в дозировках от 0.5 до 1.8 мг/кг/сутки при некоторых не-митохондриальных заболеваниях, при которых отмечается церебральная фолатная недостаточность, при этом отмечалось улучшение некоторых неврологических симптомов.[16,17] Вместе с тем базовые патофизиологические механизмы данных клинических состояний могут отличаться от таковых у СКС; следовательно, можно предположить, что различаются и необходимые дозы фолиниевой кислоты.

У пациента 8 восстановилась способность к передвижению и было отмечено ослабление отклонений на снимках МРТ. Терапия пациента была начата раньше, чем терапия других пациентов, за исключением пациента 1, которому терапию назначили в том же возрасте (8.5 лет), но она не привела к улучшению состояния. С другой стороны, у пациента 1 был изначально диагностирован синдром Пирсона; следовательно, у данного пациента наблюдался более тяжелый фенотип, чем у пациента 8. Более того, пациент 8 получал фолиниевую кислоту еще до того, как его состояние стало соответствовать основным клиническим критериям СКС. Об этом пациенте сообщалось в 2006 году,[6] при первоначальном МРТ-сканировании мозга у него были выявлены отклонения в субкортикальном белом веществе, не затрагивающие базальные ядра либо ствол мозга, что указывало на то, что пациент на тот момент находился на ранней стадии заболевания. Эти данные позволяют предположить, что улучшение состояния пациента связано как с ранним началом терапии, так и с повышенной дозировкой фолиниевой кислоты. Это указывает на важность раннего осуществления люмбальной пункции для как можно более ранней диагностики церебральной фолатной недостаточности и назначения терапии. В литературе описаны отдельные случаи улучшения состояния у пациентов с церебральной фолатной недостаточностью на фоне митохондриального заболевания. Один пациент с недостаточностью комплекса I дыхательной цепи митохондрий и церебральной недостаточностью 5-MTHF получал фолиниевую кислоту в дозировке 1.2 мг/кг/сутки. На момент, когда длительность терапии превысила три года, у пациента ослабли симптомы гипотонии и атаксии, и была отмечена ремиссия отклонений миелинизации, замеченных при сканировании мозга.[18] С другой стороны, исходная концентрация 5-MTHF в СМЖ пациента составляла 38.5 нмоль/л, что значительно превышает уровни, наблюдаемые при синдроме Кернса-Сейра.

Картина снимков мозга у наших пациентов соответствует картине, описанной в других публикациях. Классическая картина при СКС включает в себя атрофию мозга и мозжечка и наличие областей повышенной интенсивности субкортикального белого вещества T2-взвешенных снимках[19] с наличием либо отсутствием симметричного вовлечения одной или более областей, включающих в себя ствол мозга, бледный шар, таламус и мозжечок. В основном затрагивается периферия белого вещества мозга, при этом на ранней стадии затрагиваются короткие

ассоциативные субкортикальные волокна («U-волокна»), а перивентрикулярные волокна остаются незатронутыми болезнью.[21] Поражение в первую очередь субкортикального белого вещества – признак, отличающий СКС от других заболеваний белого вещества, таких как лизосомные и пероксисомные заболевания, при которых субкортикальные области затрагиваются лишь на более поздних стадиях.[22] Характерная картина для детей и взрослых лиц молодого возраста, страдающих СКС – сочетание билатеральных областей поражения бледного шара и очагов повышенной интенсивности в субкортикальном белом веществе.[23] Часто отмечаются аномалии субкортикального белого вещества. В то же время в исследовательской литературе не обнаруживаются сообщений о вовлечении базальных ядер, подобном тому, что мы отметили у наших пациентов.[24] Атрофия мозга и/или мозжечка отмечалась у более возрастных пациентов (случаи 3, 4, 5, 7), что согласуется с результатами, опубликованными группой Chu et al.[20]

Из литературы известно, что изменения на МРТ-снимках усугубляются параллельно развитию неврологических симптомов СКС,[25] и мы заметили эту закономерность у пациентов 1, 2, 3, 4. По данным МРТ-сканирования, прогрессирование произошло у всех пациентов, за исключением пациента 8. Однако временные интервалы между сканированиями у всех пациентов различались. Любопытно, что у всех пациентов отмечалась атаксия, за исключением пациента 2. У некоторых пациентов не отмечалось отклонений в области мозжечка на исходных МРТ-снимках, но на последующих снимках отклонения появлялись. Любопытно, что у пациента 6 было отмечено ослабление атаксии после назначения фолиниевой кислоты, но при этом наблюдались признаки прогрессирования на МРТ-снимках. При СКС корреляция мозжечковой атаксии с отклонениями на МРТ-снимках может быть слабовыраженной.[20] Более того, воздействие фолиниевой кислоты на мозг изучено не до конца – вероятно, оно более обширно, чем те изменения, которые отражены на снимках мозга, поскольку при фолатной недостаточности мозг является «органом-мишенью». В остальном прогрессирование нарушений передачи сигнала совпадает с ухудшением неврологических показателей. Следовательно, МРТ-сканирование может быть полезно для оценки прогрессирования заболевания.[26]

Изменение интенсивности сигнала на МРТ-снимках не всегда говорит о нарушенной функции мозга. Вместе с тем диффузионно-взвешенные изображения (DWI), показывающие препятствия на пути диффузии молекул и способные отображать очаги острого ишемического поражения у пациентов, переживших инсульт, могут дать информацию о фактах острой энергетической недостаточности. У наших пациентов были отмечены аномалии на DWI-снимках. Патологические механизмы нарушенной картины диффузии при таких дегенеративных заболеваниях, как митохондриальные заболевания, еще не изучены до конца.[27] Затрагиваемые болезнью области (особенно ствол мозга) более чувствительны к энергетическому голоданию, чем другие области, и повреждение этих областей наблюдается при синдромах с острой недостаточностью энергии, таких как энцефалопатия Вернике и синдром Лея. Патологические особенности, наблюдаемые при СКС при посмертном исследовании тканей мозга, включают в себя области губковидной дегенерации, некроза и глиоза. Эти изменения отмечаются и при иных заболеваниях, например, при болезни Вильсона и болезни Крейтцфельдта-Якоба. Следовательно, отклонения на снимках мозга при СКС могут быть вызваны не только церебральной фолатной недостаточностью.

## **Заключение**

У всех восьмерых пациентов с СКС была выявлена церебральная недостаточность 5-MTHF. На снимках мозга наблюдалась картина нарушений, которая, по данным литературы, является характерной для СКС. У большинства наших пациентов при неврологическом осмотре и на снимках мозга отмечалось прогрессирование заболевания, несмотря на восстановление нормальных уровней 5-MTHF в СМЖ после назначения фолиниевой кислоты. Только один пациент, начавший получать терапию на ранней стадии заболевания, продемонстрировал при получении повышенных доз фолиниевой кислоты улучшение как в плане неврологических симптомов, так и по результатам анализа снимков мозга. Таким образом, при СКС можно

рекомендовать раннее назначение больших доз фолиниевой кислоты, хотя бы с целью улучшения неврологической картины заболевания.

### **Благодарности**

Работа была профинансирована Министерством экономики и финансов и Институтом здоровья имени Карлоса III (ISCIII), Испания (проекты EC07/90272, PI12/01683, PI11/02350). Центр редких заболеваний CIBERER был создан по инициативе ISCIII. Мы выражаем благодарность пациентам и их семьям за сотрудничество в рамках настоящего исследования.

### **Дополнительные файлы**

**Дополнительный файл 1** (215К, pptx): Пациент 1. T2-взвешенные аксиальные МРТ-изображения демонстрируют аномально высокую интенсивность сигнала в области мозжечка (А), бледного шара (В) и субкортикального белого вещества (С).

**Дополнительный файл 2** (276К, pptx): Пациент 2. T2-взвешенные снимки по технологии MultiVane с последовательностью TSE/турбо спин-эхо (T2W-MV) содержат области с повышенной интенсивностью сигнала в дорсальной части ствола мозга (А), а также демонстрируют атрофию бледного шара (В), усыхание субкортикальных областей и гиперинтенсивность белого вещества (С).

**Дополнительный файл 3** (385К, pptx): Пациент 3. DWI-снимки демонстрируют гиперинтенсивность в области ствола мозга (А), левого бледного шара, с ограниченной диффузией (сниженный измеряемый коэффициент диффузии/ИКД) (В), и в субкортикальном белом веществе в режиме FLAIR (С).

**Дополнительный файл 4** (245К, pptx): Пациент 4. Снимки КТ: Наблюдалась сниженная плотность белого вещества в задней черепной ямке (А), базальных ядрах (В) и субкортикальном белом веществе (С).

**Дополнительный файл 5** (217К, pptx): Пациент 6. МРТ с T2-взвешиванием (T2В), аксиальная проекция. Наблюдался аномально интенсивный сигнал в области ствола мозга (А) и бледного шара (В). Такая патология была замечена и в режиме DWI (С, D).

### **Примечания**

#### **Конфликт интересов**

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### **Информация об авторах**

1. Unidad de Enfermedades Mitocondriales-Enfermedades Metabólicas Hereditarias. Dpto. de Pediatría y Radiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. (Отделение митохондриальных заболеваний и наследственных метаболических заболеваний. Департамент педиатрии и радиологии, Больница им. 12 октября, Мадрид, Испания)
2. Centre For research in rare diseases (CIBERER), Institut de Salud Carlos III, Madrid, Spain. (Центр исследования редких заболеваний / CIBERER, институт здоровья им. Карлоса III, Мадрид, Испания)
3. Pediatric Neurology, Clinical Biochemistry, Histopathology and Radiology Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2., Esplugues, Barcelona 08950, Spain. (Отделения детской неврологии, клинической биохимии, гистопатологии и радиологии, Больница Сант Жуан де Деу, Проспект Сант Жуан де Деу, дом 2, Эсплугес, Барселона, 08950, Испания)
4. Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. (Педиатрическая служба, Центральная университетская больница Астурии, Овьедо, Испания)

5. Servicios de Pediatría y Radiología, Hospital de Cabueñes, Asturias, Spain. (Службы педиатрии и неврологии, Больница Кабуэньес, Астурия, Испания)
6. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain. (Департамент биохимии, клеточной и молекулярной биологии, Университет Сарагосы, Арагонский институт медицинских наук, Сарагоса, Испания)
7. Mitochondrial Diseases Laboratory, Hospital 12 de Octubre Research Institute (i + 12), Madrid, Spain (Лаборатория митохондриальных заболеваний, Исследовательский институт «i +12» при Больнице им. 12 октября, Мадрид, Испания)

#### **Вклад авторов**

Авторы PQF, МОС и RA составили рукопись статьи. Авторы EM-H, AGC, IM, RP, MP и MG-S отвечали за клиническое наблюдение за пациентами. Авторы AMA, PGC, JM занимались интерпретацией результатов сканирования мозга. Авторы RM, CJ, AO осуществляли биохимические и гистологические исследования. Авторы JM, SE, ER-P, JA, MAM осуществляли генетический анализ. Все авторы приняли участие в разработке плана исследования, вносили вклад в интерпретацию результатов и редактуру рукописи. Все авторы ознакомились с окончательным вариантом рукописи и одобрили его.

#### **Внесли вклад в исследование:**

Пилар Куихада-Фрайле (Pilar Quijada-Fraile, Email: moc.liamg@adajiuq.ralip).

Мар О'Кэллэхан (Mar O'Callaghan, Email: gro.ncbdjsh@nahgallacom).

Елена Мартин-Эрнандес (Elena Martín-Hernández, Email: gro.dirdam.dulas@zednanrehnitrame).

Раquel Монтеро (Raquel Montero, Email: gro.ncbdjsh@oretnomr).

Анжелс Гарсия-Касорла (Àngels Garcia-Cazorla, Email: gro.ncbdjsh@aicraga).

Ана Мартинес де Арагон (Ana Martínez de Aragón, Email: moc.liamg@7acamna).

Жорди Мучарт (Jordi Muchart, Email: gro.ncbdjsh@tracumj).

Игнасио Малага (Ignacio Málaga, Email: moc.liamg@acuh.airtaideporuen).

Рафаэль Пардо (Rafael Pardo, Email: se.liamtoh@seneubacoruen).

Педро Гарсия-Гонсалес (Pedro García-Gonzalez, Email: se.liamtoh@seneubacoruen).

Кристина Хоу (Cristina Jou, Email: gro.ncbdjsh@uojc).

Хулио Монтойя (Julio Montoya, Email: se.razinu@ayotnomj).

Соня Эмперадор (Sonia Emperador, Email: se.razinu@zitroes).

Эдуардо Руис-Песини (Eduardo Ruiz-Pesini, Email: se.razinu@ziurude).

Хоакин Аренаc (Joaquín Arenas, Email: gro.dirdam.dulas@sanera.niuqaoj).

Мигель Анхель Мартин (Miguel Angel Martin, Email: moc.liamg@o21h.aveunasacmam).

Айда Ормасабаль (Aida Ormazabal, Email: gro.ncbdjsh@labazamroa).

Мерсе Пинеда (Mercè Pineda, Email: gro.ncbdjsh@adenip).

Мария Т Гарсия-Сильва (María T García-Silva, Email: gro.dirdam.dulas@avlisacragm).

Рафаель Артух (Rafael Artuch, Email: gro.ncbdjsh@hcutrar).

#### **Список литературы**

1. Di Mauro S, Bonilla E, Lombes A, Shanske S, Minetti C, Moraes C. Mitochondrial encephalomyopathies. *Neurol Clin.* 1990;8:483–506. [PubMed] [Google Scholar]
2. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med.* 1989;320:1293–1299. doi: 10.1056/NEJM198905183202001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Ramaekers V, Blau N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol.* 2004;46:843–851. doi: 10.1111/j.1469-8749.2004.tb00451.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Spector R, Johanson CE. Choroid plexus failure in the Kearns-Sayre syndrome. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010;7:14. doi: 10.1186/1743-8454-7-14. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Pineda M, Ormazabal A, López-Gallardo E, Nacimiento A, Solano A, Herrero MD, Vilaseca MA, Briones P, Ibáñez L, Montoya J, Artuch R. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by a mitochondrial DNA deletion. *Ann Neurol.* 2006;59:394–398. doi: 10.1002/ana.20746. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Tondo M, Málaga I, O'Callaghan M, Serrano M, Emperador S, Ormazabal A, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Garcia-Silva MT, Martin-Hernandez E, Garcia-Cazorla A, Pineda M, Artuch R. Biochemical parameters to assess choroid plexus dysfunction in Kearns-Sayre syndrome patients. *Mitochondrion.* 2011;11:867–870. doi: 10.1016/j.mito.2011.06.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Tanji K, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Kearns-Sayre syndrome: oncocyctic transformation of choroids plexus epithelium. *J Neurol Sci.* 2000;178:29–36. doi: 10.1016/S0022-510X(00)00354-3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Allen RJ, DiMauro S, Coulter DL, Papadimitriou A, Rothenberg SP. Kearns-Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. *Ann Neurol.* 1983;13:679–682. doi: 10.1002/ana.410130620. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Dougados M, Zittoun J, Laplane D, Castaigne P. Folate metabolism disorder in Kearns-Sayre Syndrome. *Ann Neurol.* 1983;13:687. doi: 10.1002/ana.410130624. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Garcia-Cazorla A, Quadros EV, Nacimiento A, Garcia-Silva MT, Briones P, Montoya J, Ormazabal A, Artuch R, Sequeira JM, Blau N, Arenas J, Pineda M, Ramaekers VT. Mitochondrial diseases associated with cerebral folate deficiency. *Neurology.* 2008;70:1360–1362. doi: 10.1212/01.wnl.0000309223.98616.e4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Serrano M, García-Silva MT, Martin-Hernandez E, O'Callaghan MM, Quijada P, Martinez-Aragón A, Ormazabal A, Blázquez A, Martín MA, Briones P, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Artuch R, Pineda M. Kearns-Sayre syndrome: Cerebral folate deficiency, MRI findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochondrion.* 2010;10:429–432. doi: 10.1016/j.mito.2010.04.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Martín-Hernández E, García-Silva MT, Vara J, Campos Y, Cabello A, Muley R, del Hoyo P, Martín MA, Arenas J. Renal pathology in children with mitochondrial diseases. *Pediatr Nephrol.* 2005;20:1299–1305. doi: 10.1007/s00467-005-1948-z. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

13. Phoenix C, Schaefer AM, Elson JL, Morava E, Bugiani M, Uziel G, Smeitink JA, Turnbull DM, McFarland R. A scale to monitor progression and treatment of mitochondrial disease in children. *Neuromuscul Disord.* 2006;16:814–820. doi: 10.1016/j.nmd.2006.08.006. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Schaefer AM, Phoenix C, Elson JL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial disease in adults: a scale to monitor progression and treatment. *Neurology.* 2006;66:1932–1934. doi: 10.1212/01.wnl.0000219759.72195.41. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Ormazábal A, García-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, Gonzalez V, Fernández-Álvarez E, Pineda M, Campistol J, Artuch R. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: Referente values for a paediatric population. *Clin Chim Acta.* 2006;371:159–162. doi: 10.1016/j.cca.2006.03.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Ramaekers VT, Hausler M, Opladen T, Heimann G, Blau N. Psychomotor retardation, spastic paraplegia, cerebellar ataxia and dyskinesia associated with low 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid: a novel neurometabolic condition responding to folinic acid substitution. *Neuropediatrics.* 2002;33:301–308. doi: 10.1055/s-2002-37082. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
17. Moretti P, Sahoo T, Hyland K, Bottiglieri T, Peters S, del Gaudio D, Roa B, Curry S, Zhu H, Finnell RH, Neul JL, Ramaekers VT, Blau N, Bacino CA, Miller G, Scaglia F. Cerebral folate deficiency with developmental delay, autism, and response to folinic acid. *Neurology.* 2005;64:1088–1090. doi: 10.1212/01.WNL.0000154641.08211.B7. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Ramaekers VT, Weis J, Sequeira JM, Quadros EV, Blau N. Mitochondrial Complex I encephalomyopathy and cerebral 5-Methyltetrahydrofolate deficiency. *Neuropediatrics.* 2007;38:184–187. doi: 10.1055/s-2007-991150. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Schiffmann R, van der Knaap MS. Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology.* 2009;72:750–759. doi: 10.1212/01.wnl.0000343049.00540.c8. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Chu BC, Terae S, Takahashi C, Kikuchi Y, Miyasaka K, Abe S, Minowa K, Sawamura T. MRI of the brain in the Kearns-Sayre syndrome: report of four cases and a review. *Neuroradiology.* 1999;41:759–764. doi: 10.1007/s002340050838. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Barkovich AJ, Good WV, Koch TK, Berg BO. Mitochondrial Disorders: Analysis of their clinical and imaging characteristics. *Am J Neuroradiol.* 1993;14:1119–1137. [PubMed] [Google Scholar]
22. Valanne L, Ketonen L, Majander A, Suomalainen A, Pihko H. Neuroradiologic findings in children with mitochondrial disorders. *Am J Neuroradiol.* 1998;19:360–377. [PubMed] [Google Scholar]
23. Lerman-Sagie T, Leshinsky-Silver E, Waternberg N, Luckman Y, Lev D. White matter involvement in mitochondrial diseases. *Mol Genet Metab.* 2005;84:127–136. doi: 10.1016/j.ymgme.2004.09.008. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Saneto RS, Friedman SD, Shaw DWW. Neuroimaging of mitochondrial disease. *Mitochondrion.* 2008;8:396–413. doi: 10.1016/j.mito.2008.05.003. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Ishikawa Y, Goto Y, Ishikawa Y, Minami R. Progression in a Case of Kearns-Sayre Syndrome. *J Child Neurol.* 2000;15:750. doi: 10.1177/088307380001501107. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

26. Kapeller P, Fazekas F, Offenbacher H, Stollberger R, Schmidt R, Berglöff J, Radner H, Fazekas G, Schafhalter-Zoppoth I. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of progressive cerebral involvement in Kearns Sayre Syndrome. *J Neurol Sci.* 1996;135:125–130. doi: 10.1016/0022-510X(95)00290-I. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

27. Sakai Y, Kira R, Torisu H, Ihara K, Yoshiura T, Hara T. Persistent diffusion abnormalities in the brain stem of three children with mitochondrial diseases. *Am J Neuroradiol.* 2006;27:1924–1926. [PubMed] [Google Scholar]

### **Информация об авторских правах и лицензии**

Авторские права © Quijada-Fraile et al.; лицензиат: BioMed Central. 2014

Настоящая статья является статьей с открытым доступом, распространяемой согласно с положениями и условиями лицензии Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), позволяющей неограниченно использовать, распространять и воспроизводить материал с использованием любого носителя при условии включения надлежащей ссылки на оригинальный материал. На данные, приведенные в настоящей статье, распространяется заявление об отказе от авторских прав (Creative Commons Public Domain Dedication, доступно по адресу <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>), если не указано иное.