



Обзорная статья

# Аутоантитела к фолатному рецептору альфа при расстройствах аутистического спектра: диагностика, терапия и профилактика

Natasha Bobrowski-Khoury (Наташа Бобровски-Хури)<sup>1</sup>, Vincent T. Ramaekers (Винсент Рамакерс)<sup>2</sup>, Jeffrey M. Sequeira (Джеффри М. Секейра)<sup>3</sup> и Edward V. Quadros (Эдвард Квадрос)<sup>3,\*</sup>

1 Школа постдипломного образования, Медицинский центр САНИ-Даунстейт, Бруклин, Нью-Йорк 11203, США; [natasha.bobrowski-khoury@downstate.edu](mailto:natasha.bobrowski-khoury@downstate.edu) (School of Graduate Studies, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY 11203, USA)

2 Центр исследования аутизма, Льежский университет, Льеж 4000, Бельгия; [vramaekers@skynet.be](mailto:vramaekers@skynet.be) (The Autism Center, University of Liège, 4000 Liège, Belgium)

3 Факультет медицины, Медицинский центр САНИ-Даунстейт, Бруклин, Нью-Йорк 11203, США; [jeffrey.sequeira@downstate.edu](mailto:jeffrey.sequeira@downstate.edu) (Department of Medicine, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY 11203, USA)

\* Автор, ответственный за переписку: [edward.quadros@downstate.edu](mailto:edward.quadros@downstate.edu)

**Аннотация:** Фолатная недостаточность и аутоиммунная дисфункция фолатного рецептора являются факторами, вносящими значительный вклад в развитие бесплодия, осложнений при беременности и нарушений развития плода, в том числе нарушений, приводящих к структурным и функциональным патологиям мозга. Фортификация фолиевой кислотой пищевых продуктов и назначение фолиевой кислоты во время беременности снизили частоту развития дефектов нервной трубки (ДНТ) в процессе внутриутробного развития, но эти меры, скорее всего, не позволяют предотвращать развитие осложнений, возникающих при наличии у человека аутоантител к фолатному рецептору (FRab). При беременности эти антитела способны блокировать перенос фолата в ткани плода, а у детей они могут блокировать перенос фолата в мозг. Эти антитела часто наблюдаются при беременностях, отягощенных развитием дефектов нервной трубки, а также у пациентов, страдающих расстройствами нервно-психического развития, такими как синдром церебральной фолатной недостаточности (ЦФН) и расстройства аутистического спектра (РАС). У пациентов с этими двумя состояниями назначение фолиевой кислоты приводило к улучшению по некоторым из основных показателей, измененных при РАС. Таким пациентам с большой вероятностью поможет раннее тестирование на наличие аутоантител к фолатному рецептору и раннее вмешательство. В настоящем обзоре описывается, как были впервые обнаружены FRab у женщин, перенесших беременность с развитием дефектов нервной трубки у плода, а также рассказывается об ассоциации FRab с субфертильностью и преждевременными родами. Аутоантитела к фолатному рецептору альфа (FRa) обнаруживаются примерно у 70% детей с диагнозом РАС, и у значительного количества таких детей оральный прием фолиевой кислоты приводит к общему улучшению показателей речи, владения языком, и социальных взаимодействий. Диагностика аутоиммунной патологии фолатного рецептора посредством обнаружения в сыворотке аутоантител к фолатному рецептору (FRa) может предоставить врачам маркер, позволяющий назначать терапию и, возможно, предотвращать патологические последствия аутоиммунного нарушения работы фолатного рецептора.

**Ключевые слова:** расстройства аутистического спектра; фолатный рецептор альфа; фолаты; беременность; развитие мозга; развитие плода.



[Проверить  
обновления статьи](#)

**Формат цитирования:** Bobrowski-Khoury, N.; Ramaekers, V.T.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. Folate Receptor Alpha Autoantibodies in Autism Spectrum Disorders: Diagnosis, Treatment and Prevention. J. Pers. Med. 2021, 11, 710. <https://doi.org/10.3390/jpm11080710>

Научные редакторы: Ричард Фрай, Ричард Боулс, Шеннон Роуз и Дэниел Россиньол (Richard E. Frye, Richard Boles, Shannon Rose and Daniel Rossignol)

Рукопись получена: 27 июня 2021 года

Принята: 21 июля 2021 года

Опубликована: 24 июля 2021 года

**Комментарий издателя:** Издательство MDPI придерживается нейтральности в отношении утверждений о границах юрисдикций в публикуемых картах, а также в отношении утверждений о принадлежности авторов к институтам.



**Авторские права:** © 2021 (авторы). Лицензиат: MDPI, Базель, Швейцария. Настоящая статья является статьей с открытым доступом, распространяемой в соответствии с положениями и условиями лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Перевод:** Тимеев Артем Геннадьевич, Екатеринбург, для моего друга-психиатра Артема Гилева Андреевича, Москва ([сайт](#))

## 1. Актуальность

Термином «фолат» описывают метаболически активные формы фолиевой кислоты (В9). Фолат представляет собой незаменимый витамин группы В, необходимый для осуществления базовых процессов метаболизма, в том числе синтеза, репарации и метилирования ДНК, а также воздействующий на синтез и метаболизм моноаминовых нейромедиаторов. Будучи одним из питательных веществ в составе зеленolistных овощей, фолат легко всасывается в начальном отделе тонкой кишки после расщепления полиглутаматов до моноглутаматов. Активные формы фолата способствуют осуществлению реакций переноса одноуглеродных остатков, а также вносят вклад в синтез пуринов, пиримидинов и аминокислот [1]. Одна из наиболее подробно описанных ролей фолата - его участие в переносе одноуглеродных групп в процессе превращения гомоцистеина в метионин. Эта реакция критически важна для поддержания внутриклеточных уровней S-аденозилметионина, вещества, необходимого для реакций метилирования. Фолат также состоит во взаимозависимых отношениях с витамином В12, поскольку для конверсии этих витаминов в физиологически доступные формы, способные принимать участие в метаболических реакциях, оба витамина должны присутствовать в организме в достаточных количествах. Если фолат и В12 недоступны в достаточном объеме, клеточный метаболизм и репликация останавливаются [2,3]. Это представляет наибольший риск в период внутриутробного и неонатального развития, поскольку недостаток фолата в данный период может приводить к сбоям в развитии мозга, а это может вызвать структурные отклонения, проявляющиеся в виде симптомов ЦФН. Сниженная концентрация фолата в спинномозговой жидкости (СМЖ) является характерным признаком синдрома ЦФН, впервые описанного Рамакерсом и Блау (Ramaekers and Blau) [4]. В редких случаях причиной развития ЦФН могут быть мутации гена FRA [5-7], но все же наиболее частая причина, приводящая к снижению уровней фолата в СМЖ – наличие антител к фолатному рецептору (FRab), способных блокировать перенос фолата через сосудистое сплетение [8,9]. Недавно было опубликовано сообщение об обнаружении мутаций гена *C1C*, кодирующего транскрипционный фактор, у детей, страдающих синдромом ЦФН. Мутации гена *C1C* снижают экспрессию FRA, уменьшая перенос фолата через сосудистое сплетение [10]. У пациентов с PAC не выявлено нарушений в гене, кодирующем FRA, но у большинства детей с PAC обнаруживаются антитела к FRA и отмечаются сниженные уровни фолата в спинномозговой жидкости [11, 12]. Вышесказанное служит умозрительным (a priori) подтверждением того, что FRA является главным переносчиком фолата в мозг у человека при наличии физиологических концентраций фолата в организме.

## 2. Потребность в фолате в период беременности

За время, прошедшее после открытия роли фолата в предотвращении мегалобластной анемии и расщепления позвоночника, прием фолиевой кислоты в период беременности и обогащение продуктов питания фолиевой кислотой стали одними из наиболее распространенных в мире методов для коррекции и предотвращения фолатной недостаточности. Базовая потребность в фолате в период беременности повышается на 75-100% (примерно на 300-400 мкг в сутки), поскольку фолат играет критически важную роль в росте и развитии эмбриона/плода, особенно на начальных стадиях развития [13]. В связи с этим врачи обычно рекомендуют женщинам помимо фолата, поступающего с диетой, принимать фолиевую кислоту дополнительно как перед зачатием, так и в течение беременности. Для предупреждения фолатной недостаточности во время беременности в течение первого триместра принимают не менее 0.4 мг/сутки фолиевой кислоты [14,15]. В связи с тем, что недавно были открыты антитела FRab, способные блокировать транспорт фолата, женщинам, у которых обнаруживаются эти антитела, может потребоваться дополнительное назначение фолиевой кислоты для того, чтобы обеспечить плод достаточным количеством фолата [16,17].

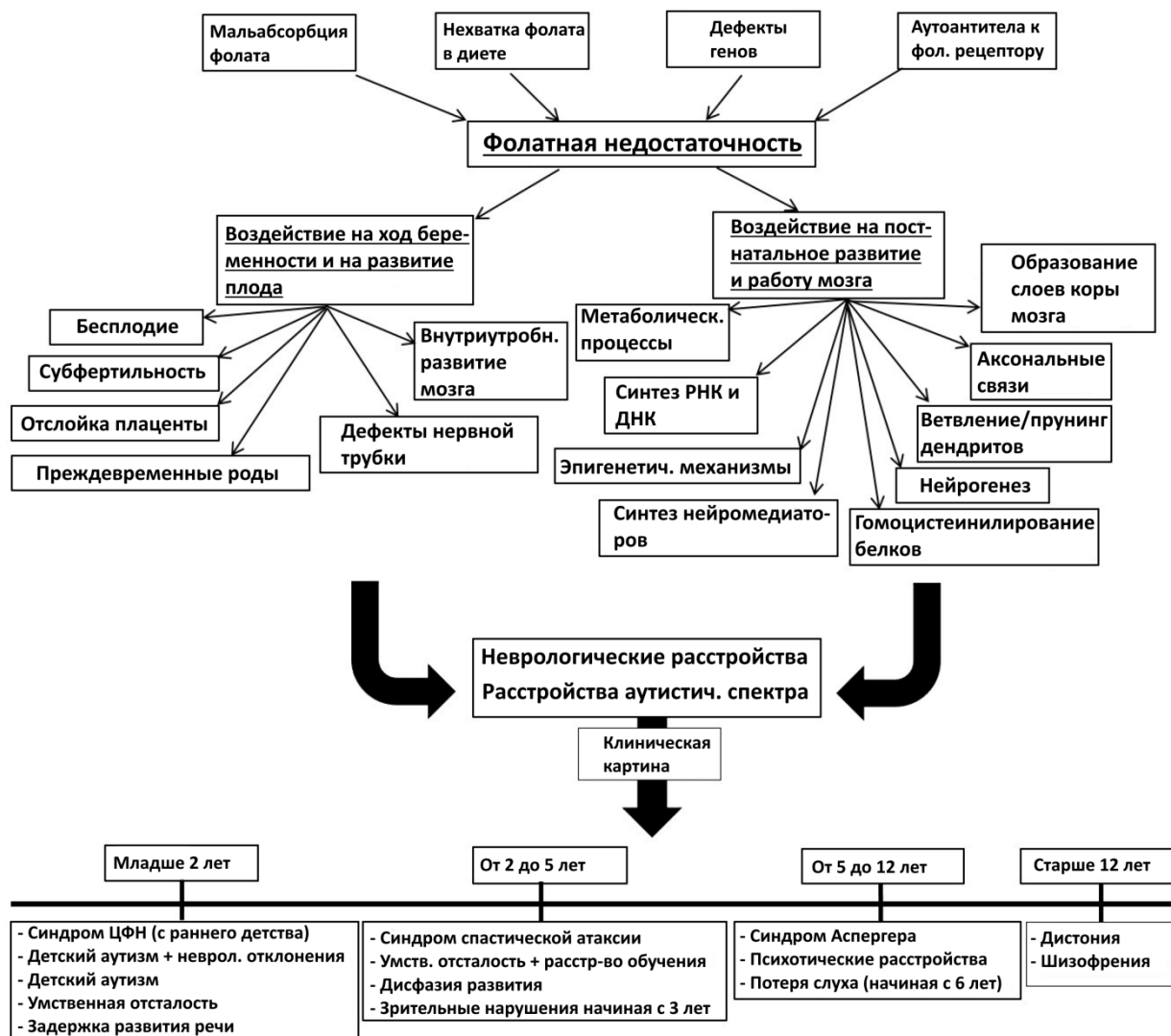
## 3. Фолат и развитие мозга плода

Важность фолата для развития мозга на эмбриональной и фетальной стадиях внутриутробного развития была продемонстрирована с помощью генетически-модифицированных животных моделей, а также с помощью диетических модификаций, вызывающих состояния фолатной недостаточности [18,19]. При проведении манипуляций, негативно отражающихся либо на переносе фолата, либо на концентрации фолата в крови, происходит значительное отклонение показателей эмбрионального и фетального развития. При создании мышиных моделей с помощью нокаута таких генов, как ген FOLR1, кодирующий фолатный рецептор альфа (FRa), новорожденные мышата гибнут, при этом у них отмечается изменение формы глазниц и мордочки, выявляются врожденные пороки сердца и/или дефекты нервной трубки [20]. Смерть мышат при нокауте гена FOLR1 можно предотвратить, вводя достаточное количество фолиевой кислоты (N5-формилтетрагидрофолата, восстановленной формы фолата). Причина драматических изменений – в том, что в организме мыши, подвергшейся нокауту гена, нарушен перенос фолата на ранних стадиях нейруляции, затрагивая те области, в которых потом наблюдаются отклонения [21]. При моделировании фолатной недостаточности на грызунах отмечается снижение количества прогениторных клеток (клеток-предшественников) и усиление апоптоза, что может приводить к бесплодию либо резорбции эмбрионов, либо к порокам развития плода [22]. Отклонения в поведении отмечаются у крысят, рожденных от самок с недостаточностью фолата [23], а также от самок, которых в период беременности держали на диете с недостаточным количеством доноров метильных групп [24]. В животной модели, в которой крысы подвергались воздействию антител к крысиному фолатному рецептору в ходе беременности, была отмечена резорбция эмбрионов, а также нарушения формирования черепно-лицевой области и мозга [25]. При введении антител в пониженных концентрациях животные рожали детенышей в срок, без внешних отклонений у детенышей. Вместе с тем у детенышей отмечались серьезные отклонения в поведении [23,26]. Введение фолиевой кислоты и дексаметазона перед введением антител позволяло предотвратить развитие этого поведенческого фенотипа [27]. Результаты описанных исследований представляют собой убедительные доказательства патологического воздействия антител к FRa, и защитного воздействия фолиевой кислоты.

#### **4. Фолат и развитие мозга новорожденного**

После родов крайне важно обеспечить адекватное содержание фолатов в диете ребенка. В то время как при эмбриогенезе фолат требуется для быстрого деления клеток, при постнатальном развитии он необходим для дифференциации и пролиферации нейрональных клеток-предшественников [28]. Еще только предстоит полностью описать механизмы действия фолата, однако воздействие фолатной недостаточности на модельных животных в период раннего постнатального развития указывает на важную роль фолата в предотвращении отклонений развития и когнитивных нарушений [23,27]. Исследователи также сообщали о том, что при моделировании фолатной недостаточности на крысах снижение уровней фолата в мозге животных сопровождалось изменениями показателей нейронального возбуждения и поддержания нейрональной активности [29]. Другие исследователи сообщали о повышении уровней белка p53 и о признаках накопления гомоцистеина в нейронах и астроцитах [30]. В длительной перспективе у животных были отмечены отклонения двигательной функции и когнитивных способностей. Следовательно, фолат необходим и для поддержания работы нейронов. В связи с этим необходимо продолжать исследование механизмов фолатного метаболизма в нейронах и вспомогательных клетках мозга. На настоящий момент установлена связь фолата с процессами репарации и дифференциации нервных клеток после повреждения, формирования миелина и поддержания нейрональной пластичности [30-32]. На рисунке 1 в общих чертах показано, как фолатная недостаточность сказывается на внутриутробном и постнатальном развитии мозга с указанием последствий, которые способствуют развитию неврологических отклонений.

## Воздействие фолатной недостаточности на плод и развитие мозга



**Рисунок 1.** Воздействие фолатной недостаточности на плод и развитие мозга. Целый ряд причин может приводить к развитию как системной, так и фетальной фолатной недостаточности. Аутоантитела к фолатному рецептору способны блокировать перенос фолата в плод, а также в мозг как плода, так и младенца. Помимо фолатной недостаточности, свой вклад в развитие патологии может вносить иммуноопосредованное воспаление. Это многосторонним образом сказывается на развитии мозга и его работе.

### 5. Фолатные рецепторы: экспрессия и функции

В организме человека существует четыре гена, которые кодируют фолатные рецепторы (таблица 1). Из этих рецепторов наиболее подробно описан фолатный рецептор альфа (FR $\alpha$ ). Будучи внеклеточными рецепторами, FR $\alpha$ , FR $\beta$ , FR $\gamma$  и FR $\delta$  служат транспортерами, перенося фолат в различные ткани соответственно имеющимся потребностям [33,34]. Рецептор FR $\alpha$  также способен действовать в качестве транскрипционного фактора [33]. Другими транспортерами фолата являются переносчик восстановленных фолатов (RFC), для работы которого требуется наличие высоких (микромольных) локальных концентраций биологически активных восстановленных форм фолата, и протон-сопряженный транспортер фолатов (PCFT), который способен переносить фолаты и фолиевую кислоту только в кислой среде и служит основным транспортером, обеспечивающим абсорбцию фолата в кишечнике [35].

**Таблица 1.** Переносчики фолата.

Белок	Ген	Хромосома	ГФИ-якорь?	Локализация	Кофакторы?	Публикации
FR $\alpha$	FOLR1	11q13.3	Да	Печень, почки, матка, плацента, сосудистое сплетение, пигментный эпителий сетчатки	LRP2	[33,35–38]
FR $\beta$	FOLR2	11q13.4	Да	Плацента, селезенка, костный мозг, тимус, макрофаги	Н/Д	[33,35–39]
FR $\gamma$	FOLR3	11q13.4	Н/Д	Секреторные гранулы нейтрофильных гранулоцитов	Н/Д	[33,35–39]
FR $\delta$	FOLR4	11q14	Да	Ооциты	Н/Д	[33,35–39]
RFC	SLC19A1	21q22.3	Нет	Печень, почки, плацента, сосудистое сплетение, кишечный тракт	Витамин Д, тиаминпирофосфат	[34,40]
PCFT	SLC46A1	17q11.2	Нет	Печень, почки, сосудистое сплетение, плацента, кишечный эпителий, опухолевые ткани человека	Протонный градиент	[34,40]

## 6. Роль FR $\alpha$ в переносе фолата от матери к плоду

Высокая потребность в фолате в период беременности подразумевает наличие гомеостатических механизмов, которые обеспечивают передачу необходимого количества фолата плоду на всем протяжении внутриутробного развития. Принято считать, что перенос фолата рецептором FR $\alpha$ , наиболее подробно описанным членом семейства фолатных транспортеров, осуществляется с помощью транслокации/эндоцитоза голорецептора после связывания с фолатом [35]. FR $\alpha$  экспрессируется на поверхности всех эпителиальных клеток, в том числе клеток сосудистого сплетения. Отмечается высокая экспрессия рецептора репродуктивными тканями, в том числе тканями плаценты и плода. В попытке выяснить механизмы плацентарного переноса фолатов в ходе беременности группа Yasuda et al. [14] осуществляла манипуляции, влияющие на осмолярность, концентрацию ингибиторов фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы C, и концентрацию <sup>3</sup>H-фолиевой кислоты в *in-vitro* культуре мембранных везикул щеточной каемки, и установила, что FR $\alpha$ , RFC и PCFT способны переносить различные формы фолатов, но при этом около 60% фолата связывается с FR $\alpha$ . Авторы также отметили, что у крыс линии Wistar потребность в фолате возрастала в период беременности, и при этом повышалась мРНК-экспрессия фолатных транспортеров.

## 7. Роль FR $\alpha$ в переносе фолата в мозг

FR $\alpha$  считается основным транспортером, переносящим фолат в мозг. Вместе с тем ученые сталкиваются с затруднениями при попытках исследовать процесс переноса фолата рецептором FR $\alpha$  через гематоэнцефалический барьер. Описание механизма, который, возможно, отвечает за перенос фолата через сосудистое сплетение в ткани мозга, было представлено Grapp et al. [42]. В ходе экспериментов с использованием иммортализованной линии Z310n клеток сосудистого сплетения крысы в питательной культуре, а также с использованием мышинной модели, авторы определили, что транспорт фолатов подразумевает перенос фолатов внутри экзосом от базолатеральной поверхности сосудистого сплетения в паренхиму мозга, расположенную вдоль апикальной поверхности. Альтернативные транспортеры, такие как RFC и PCFT, могут играть роль в переносе лишь при нарушении экспрессии FR $\alpha$  и сбое FR $\alpha$ -опосредованного переноса, при условии наличия достаточного количества фолата вблизи рецептора [43]. Перенос фолата через эпителиальный слой сосудистого сплетения – механизм, который, как считается, сохранился во всех типах тканей, экспрессирующих FR $\alpha$  [44].

## 8. Аутоантитела к фолатному рецептору: их роль в нарушении переноса фолатов

При некоторых состояниях наблюдается сбой процессов использования фолатов, причем этот сбой не связан с недостатком фолатов в диете, а, скорее всего, вызывается нарушением фолатного транспорта вследствие генетических либо метаболических отклонений. Одна из недавно выявленных причин нарушения фолатного транспорта – аутоиммунное расстройство, при котором выявляются аутоантитела к рецептору FRa, способные нарушать перенос фолата в ткани плода; наличие этого состояния ассоциировано со снижением репродуктивной функции, трудностями с зачатием, с выкидышами и развитием дефектов нервной трубки у плода [16,17,45,46].

В младенческом и раннем детском возрасте эти антитела могут блокировать перенос фолата в мозг. Приблизительно в 70% случаев у детей, которым был поставлен диагноз церебральной фолатной недостаточности либо диагностировано расстройство аутистического спектра, отмечается низкий уровень фолата в СМЖ и наблюдается терапевтический ответ при назначении фолиевой кислоты [47,48]. Большинство аутоантител принадлежат к классу IgG, и, следовательно, способны с легкостью преодолевать плаценту и оказывать влияние на плод. Было обнаружено два отдельных типа антител. Антитела одного типа связываются с активным сайтом рецептора FRa, с тем же, с которым связывается фолат, и, как следствие, блокируют связывание фолата с рецептором (блокирующие антитела). Антитела другого типа связываются с антигенным сайтом, не участвующим в связывании фолата рецептором (связывающие антитела), однако они могут вызывать иммунную реакцию и воспаление и приводить к потере функции рецептора. В большинстве случаев выявляются антитела либо одного, либо обоих типов [49,50]. Таким образом, блокирование переноса фолатов и активация воспаления являются неотъемлемой частью патологического процесса [44].

## **9. Патологическое воздействие антител к фолатному рецептору**

Наличие аутоантител к фолатному рецептору может приводить к нарушению фолатного транспорта, при этом сниженное потребление фолата клетками может сказываться на развитии плода, особенно на развитии его центральной нервной системы. Также отмечена корреляция наличия антител к фолатному рецептору с развитием дефектов нервной трубки при беременности [16]. В менее тяжелых случаях у некоторых из детей, подвергшихся воздействию выработанных в организме матери аутоантител к FRa в период внутриутробного развития, развивается низкофункциональный аутизм с наличием либо отсутствием неврологических нарушений. Проведенные недавно исследования демонстрируют ассоциацию аутоантител к фолатному рецептору у детей с наличием расстройств аутистического спектра [11,51,52].

## **10. Диагностика аутоиммунной патологии фолатного рецептора**

Ранними признаками развития церебральной фолатной недостаточности в тех случаях, когда потенциальной причиной является недостаток фолата в организме матери либо наличие у матери аутоантител к фолатному рецептору, служат уровни фолата в образцах сыворотки крови матери, а также уровни гомоцистеина и аутоантител к фолатному рецептору в организме матери в период беременности. Аутоантитела к фолатному рецептору, наравне с недостатком фолатов в диете беременной матери, могут способствовать развитию фолатной недостаточности у плода. В таких случаях развитию патологии способствует блокировка переноса фолата через ткани плаценты, а также воспаление, вызванное наличием антител, как показано в исследовании, в ходе которого крыс подвергали воздействию антител к крысиному фолатному рецептору во время беременности [26, 27]. Наличие аутоантител к фолатному рецептору в крови младенца может указывать на блокировку переноса фолата в мозг через сосудистое сплетение, приводящую к церебральной фолатной недостаточности [51, 52]. Следовательно, возникает необходимость выявления аутоантител к фолатному рецептору в образцах крови беременных матерей и их детей, поскольку такой тест позволит либо установить факт аутоиммунного поражения фолатных рецепторов, либо исключить такое поражение.

Методика определения титра антител в сыворотке крови хорошо отработана. В литературе описано два отдельных типа антител (IgG и/или IgM) [50]. Эти антитела могут быть блокирующего и/или связывающего типа. Оба типа антител, вступая во взаимодействия антиген-антитело, могут запускать иммунную реакцию, вызывающую местное воспаление, а это может нарушать перенос фолата белком FR (фолатным рецептором). Измерение титров антител обоих типов можно осуществить в лаборатории согласно методикам, описанным ниже.

#### **11. Измерение блокирующих антител**

Измерение блокирующих антител к FRa производится с помощью функционального радиолигандного анализа. Образец сыворотки пациента (200 мкл) подкисляют добавлением 300 мкл 0.1 М глицина/HCl pH 2.5/0.5% Triton X-100/10 mM ЭДТА, и добавляют к 12.5 мг угольных гранул в отдельной пробирке (250 мкл 5% угля/1% декстрана в 0.1 М Na PO<sub>4</sub> pH 7.4/0.5% Triton X-100/10 mM ЭДТА, подвергнутых центрифугированию и сбору надосадочного слоя) для удаления эндогенного фолата, после чего значение pH надосадочной жидкости доводят до нейтрального, используя 40 мкл 1 М двухосновного NaPO<sub>4</sub>, перед использованием в целях анализа. Анализ осуществляют, добавляя очищенную апо-форму человеческого FRa (40 нг) к обработанной сыворотке и подвергая инкубации в течение ночи при температуре 4° С. На следующий день добавляют меченую тритием <sup>3</sup>H-фолиевую кислоту (700 пг) (Moravek), и инкубируют на протяжении 20 минут при комнатной температуре. Несвязавшуюся <sup>3</sup>H-фолиевую кислоту удаляют с помощью угля, покрытого декстраном (200 мкл), а количество <sup>3</sup>H-фолата, связавшегося с FRa, определяют, подсчитывая значения активности образца на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Снижение связывания <sup>3</sup>H-фолиевой кислоты с апо-формой человеческого FRa, в сравнении со связыванием в образце отрицательного контроля, позволяет оценить концентрацию блокирующих антител в образце [50]. Блокирующие антитела могут принадлежать к типу IgG либо IgM; значения концентрации выражают в виде числа пикомолей заблокированной <sup>3</sup>H-птероилглутаминовой, то есть фолиевой, кислоты) на 1 мл сыворотки, при этом титр может варьировать: «>0.2 до 0.5» (низкий титр), «>0.5 до 1.0» (средний титр) до «>1.0» (высокий титр).

#### **12. Измерение связывающих антител**

Связывание аутоантитела типа IgG с фолатным рецептором-альфа (FRa) оценивают с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА, англ. ELISA). Рецептор FRa, добытый очищением из молока человека (1 мкг в 100 мкл) добавляют в каждую лунку планшета ELISA для ковалентного связывания белка с поверхностями лунок, покрытыми малеиновым ангидридом (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). После блокирования иных сайтов связывания внесением нормальной сыворотки крови коз (200 мкл) с инкубацией в течение ночи для предотвращения неспецифического связывания со стенками лунок в лунки вносят образцы сыворотки (4 и 8 мкл) (отрицательный контроль, положительный контроль и сыворотка пациента), добавляют по 100 мкл свежей сыворотки коз, и инкубируют при 4°С в течение ночи для связывания аутоантител против FRa со стенками лунок. После промывки лунок для удаления несвязавшихся белков производят детекцию специфического аутоантитела типа IgG, для начала инкубируя содержимое с вторичным антителом IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (в разведении 1:6000) (Vector Labs) на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Промывают лунки для удаления несвязавшегося вторичного антитела, затем в целях детекции производят инкубацию вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой, с раствором Ultra TMB (Thermo Fisher) на протяжении 10 минут. В результате реакции раствор принимает синий окрас. Производят преобразование в желтый окрас, добавляя по 100 мкл 1.0 М HCl, затем измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 450 нм, используя планшетный ELISA-спектрофотометр. Во втором наборе лунок содержатся IgG человека, взятые в известных количествах и присоединившиеся к поверхностям лунок, предварительно покрытых белком А. Эти лунки используют для построения стандартной (калибровочной) кривой [50]. Значения выражают в пикомолях антител типа IgG на мл сыворотки, при этом титры подразделяют на «от >0.1 до 0.5» (низкий титр); «от >0.5 до 2.0» (средний титр) и «>2.0» (высокий титр).



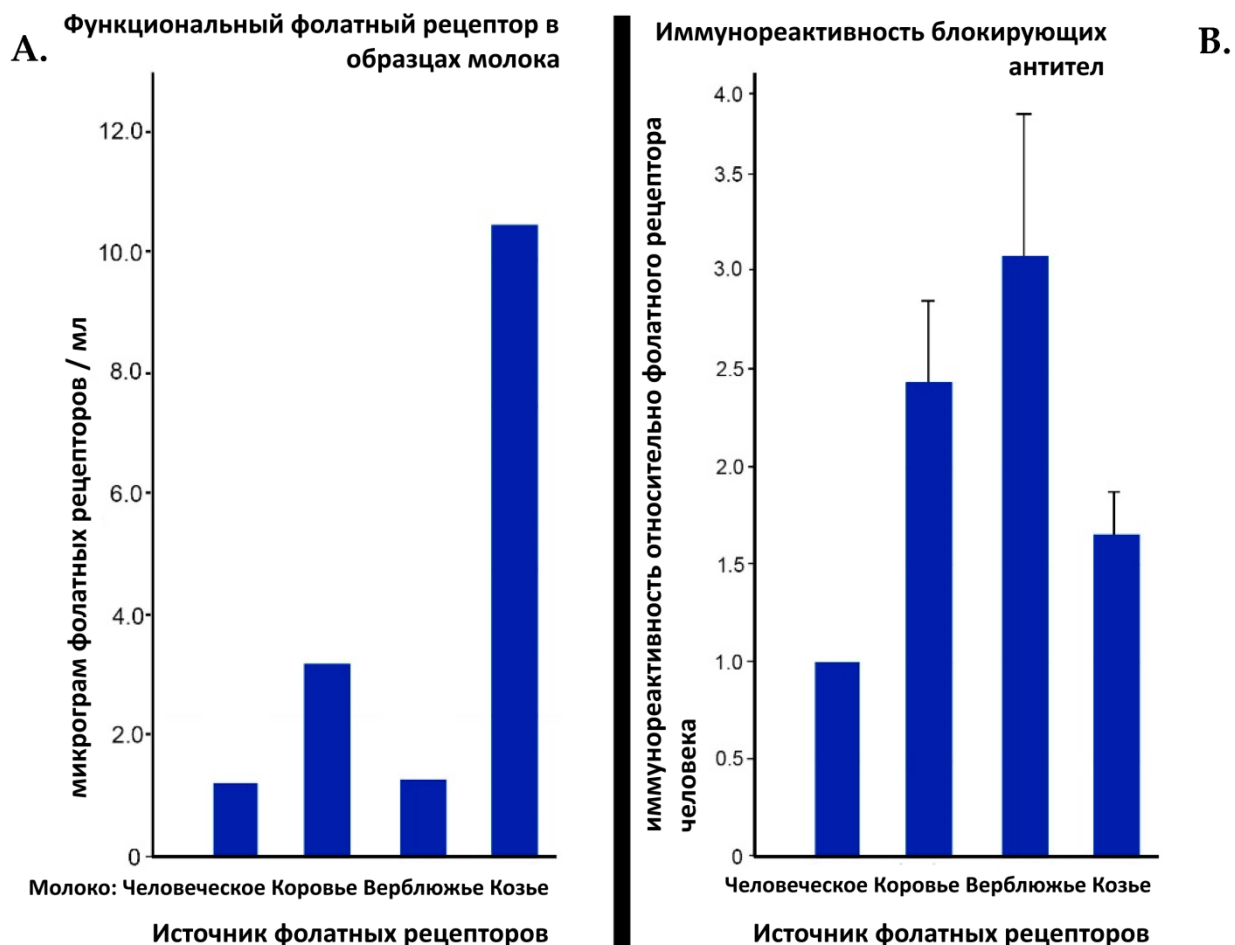
Помимо прочих критериев, для подтверждения диагноза аутоиммунного поражения фолатного рецептора используются описанные выше анализы. С поправкой на фоновый сигнал, считают, что проба на наличие блокирующего антитела оказалась положительной, если значение составляет от 0.2 пикомоль и выше, а положительной пробой на наличие связывающего антитела считают пробу со значением от 0.1 пикомоль и выше. В связи с тем, что фолатный рецептор-альфа представляет собой периферический мембранный белок, следует считать титр антител, выявляемый в сыворотке, отражением избыточного количества антител, попадающих в кровоток после того, как антигены, связанные с клеточными мембранами, были насыщены. Согласно наблюдениям, титр антител может со временем колебаться у одного и того же человека, при этом уровни могут варьировать от «низкого титра» до «среднего титра» либо достигать неизмеримых значений. Хотя причина описанных изменений титра антител не установлена, возможно, что здесь играют роль такие факторы, как изменения антигена (рецептора FR), прикрепленного к клеткам, присутствие в кишечнике антигена (FR), поступившего с молоком, и наличие особой популяции В-лимфоцитов.

### **13.   Терапия аутоиммунной патологии FR $\alpha$ при расстройствах аутистического спектра**

Расстройства аутистического спектра являются наиболее распространенным типом расстройств развития, причем распространенность РАС в последнее десятилетие продолжала повышаться. В научных публикациях приводится оценка общемировой распространенности от ВОЗ, согласно которой РАС развиваются у одного из 162 детей [53]. Распространенность расстройств в США и в Канаде, как сообщается, составляет один случай на 50 человек, и, согласно прогнозу, этот показатель в ближайшие несколько лет станет выше [54]. Несмотря на то, что клинический фенотип РАС может возникать под воздействием множества генетических и эпигенетических факторов, а также под воздействием факторов внешней среды, в его развитии также может играть значимую роль и недостаток нутриентов, таких как фолат. Антитела к фолатным рецепторам и церебральная фолатная недостаточность часто обнаруживаются при расстройствах аутистического спектра. Подход к терапии аутоиммунных реакций против FR $\alpha$  при расстройствах аутистического спектра основан на данных, полученных нами ранее при исследовании синдрома ЦФН с дебютом в младенческом возрасте и низкофункционального аутизма, сопровождаемого неврологическими отклонениями [11]. У таких детей через три-шесть месяцев после назначения фолиевой кислоты повторный анализ СМЖ демонстрировал достижение нормальных уровней 5-метилтетрагидрофолата [11,51]. Супплементация большими дозами d,l-фолиевой кислоты (лейковорином) (0.5-2 мг/кг массы тела, или 0.25-1.0 мг в виде левофолината), в один или два приема в сутки, приводит к повышению концентрации 5-метилтетрагидрофолата более чем в 100 раз по сравнению с физиологическими концентрациями фолата в плазме. Несмотря на то, что аутоантитела блокируют транспортную цепочку, обеспечивающую перенос фолата через сосудистое сплетение с помощью FR $\alpha$ , благодаря значительному повышению концентрации 5-метилтетрагидрофолата и фолиевой кислоты в плазме крови возникает возможность переноса достаточных количеств 5-метилтетрагидрофолата и фолиевой кислоты в ткани мозга с помощью переносчика восстановленных фолатов-1 (RFC-1) – трансмембранного белка, переносящего фолаты через гематоэнцефалический барьер и обладающего большой емкостью и малой аффинностью. Мы считаем, что в таких ситуациях важно удостовериться в том, что уровень витамина D у пациента находится в пределах нормы, поскольку транскрипция гена, кодирующего RFC-1, зависит от наличия витамина D в клетках микроциркуляторных сосудов гематоэнцефалического барьера [40].

Другим важным терапевтическим вмешательством является переход на диету с исключением животного молока и молочных продуктов, которые можно заменить растительными молочными продуктами (например, соевым, миндальным, рисовым, кокосовым молоком). Несмотря на то, что было осуществлено множество исследований безказеиновой/безглютеновой диеты, пока что не получено окончательных данных о том, полезны ли эти диетические вмешательства при РАС. Максимальная длительность многих исследований достигала лишь 3 месяцев, хотя некоторые исследования с участием малого количества пациентов длились от 1 до 2

лет, и полученные результаты указывали на улучшение некоторых из основных симптомов аутизма [55-58]. Был сделан вывод о том, что пробное использование безглютеновой/безказеиновой диеты должно длиться не менее 6 месяцев для достижения положительного терапевтического ответа в восприимчивой части популяции пациентов с РАС. Согласно одной из выдвинутых гипотез, вклад в развитие аутизма вносят опиоидные пептиды, образующиеся из молочного казеина [59]. В связи с тем, что коровье молоко содержит растворимую форму белка FRa, на 91% гомологичную человеческому FRa, мы осуществили анализ связывания человеческих аутоантител к FRa с различными антигенами FRa, выделенными из тканей плаценты человека; из человеческого молока; из молока коров, коз и верблюдов. Аутоантитело проявило наиболее сильную перекрестную реактивность с растворимым белком FRa, полученным из молока коров и верблюдов (рисунок 2). Задавшись целью определить, вносит ли вклад FRa, содержащийся в молоке, в развитие аутоиммунной патологии, мы изучили воздействие диеты с исключением молока на детей, у которых были обнаружены антитела к FRa. Пациентов с синдромом ЦФН, ассоциированным с наличием антител к FRa и выявленным в младенчестве, распределяли в группы, одна из которых получала диету с исключением коровьего молока, а другая – обычную диету, включающую молоко. У детей, получавших нормальную диету, на протяжении 6-12 месяцев исследования наблюдалось повышение титров антител к FRa по сравнению с исходным уровнем. У детей, из чьей диеты было исключено молоко, через 3-6 месяцев было отмечено значительное снижение титров антител к FRa, причем после разрешения употреблять молоко уровни антител вновь повысились. В этих исследованиях подтвердилось снижение уровней антител к FRa при переходе на диету с жестким исключением молока животных [55]. В этой группе пациентов, страдавших синдромом ЦФН с дебютом в младенческом возрасте, некоторые участники также страдали низкофункциональным аутизмом с неврологическими отклонениями и такие пациенты продемонстрировали терапевтический ответ при переводе на безмолочную диету. Эти результаты позволяют предположить, что, попадая в организм людей, обладающих предрасположенностью, растворимый антиген FRa, источником которого являются продукты на основе молока коров и иных животных, вызывает в кишечнике иммунную реакцию. В ходе этой реакции образуются клоны В-лимфоцитов, вырабатывающие антитела, которые попадают в кровообращение, вступают в перекрестную реакцию с человеческим FRa, присоединенным к поверхности клеток сосудистого сплетения, и блокируют перенос фолата из кровотока в спинномозговую жидкость [44,60]. У детей с расстройствами аутистического спектра часто наблюдается дисфункция щитовидной железы. Экспрессия FRa в тканях щитовидной железы снижена у детей старшего возраста и у взрослых людей, но высока на стадии внутриутробного и неонатального развития, и присутствие аутоантител к FRa может отразиться на процессе развития щитовидной железы [61]. Для лиц с расстройствами аутистического спектра предпочтительной стратегией является сдача образца сыворотки крови после периода потребления молочных продуктов, равного примерно 2-3 неделям, с целью анализа уровня аутоантител к FRa. Осуществив забор крови, ребенка с аутизмом можно перевести на диету с исключением животного молока. При получении положительного результата тестирования на наличие аутоантител к FRa, диету с исключением молока можно продолжить, немедленно также назначив фолиевую кислоту перорально в большой дозировке. Другими стратегиями терапии, направленными на снижение количества аутоантител к FRa, могут быть иммуносупрессия стероидными препаратами либо внутривенное введение иммуноглобулинов, однако эти варианты лечения следует прибегать для экстренных случаев, например, на случай рефрактерных (не поддающихся терапии) эпилептических приступов либо выраженных двигательных расстройств, таких как дистония, хореоатетоз либо баллизм.

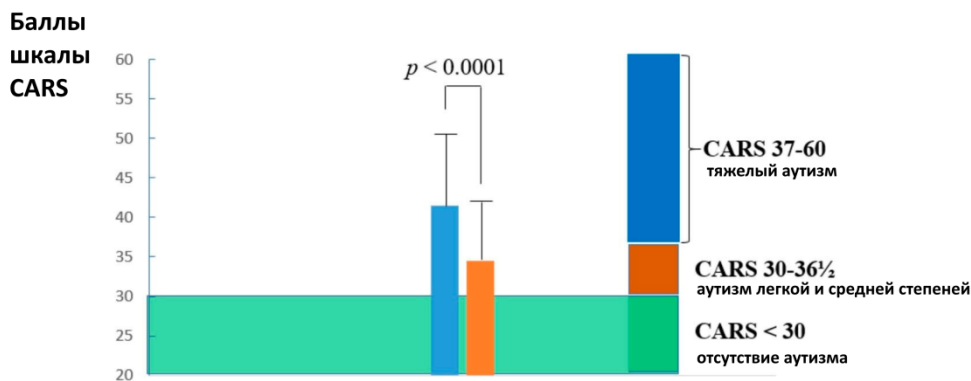


**Рисунок 2. (А)** Концентрация фолатных рецепторов в молоке. **(В)** Перекрестная реактивность блокирующих аутоантител в отношении различных антигенов FR. Блокирование анализировали с помощью образцов плазмы человека, взятых у 8 разных пациентов и демонстрирующих известную выраженность блокирования, изучая их реакцию с молярными эквивалентами антигенов FR из молока. Степень блокирующей активности выражали в пикомолях заблокированной <sup>3</sup>HPGA и сравнивали со степенью блокировки антигена, содержащегося в молоке человека.

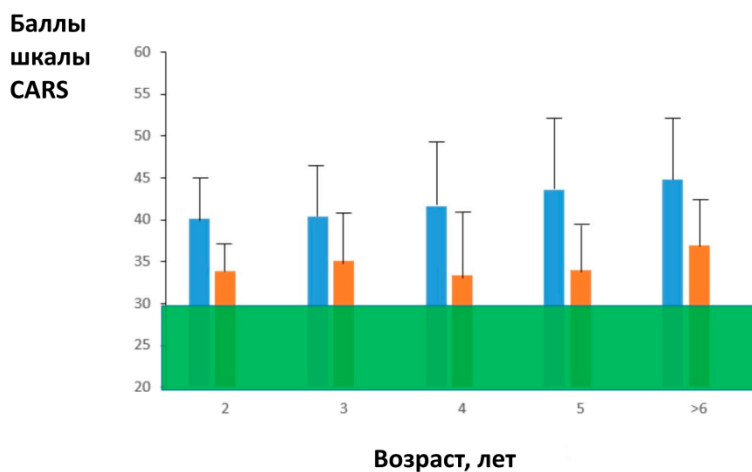
При терапии высокими дозами фолиевой кислоты в подгруппе детей с PAC и аутоантителами к FRa, т.е. у детей с низкофункциональным аутизмом и неврологическими отклонениями, наблюдалось ослабление основных симптомов аутизма и нормализация уровней 5-метилтетрагидрофолата в СМЖ (ранее уровни были снижены) [51]. В ходе двойного-слепого, плацебо-контролируемого исследования с участием детей с PAC без дополнительных неврологических отклонений у субъектов с выявленными антителами к FRa были отмечены значительные улучшения вербальных показателей после назначения фолиевой кислоты [48]. Недавно было осуществлено клиническое испытание «с контролем по самим себе» (self-controlled clinical trial) среди детей с низкофункциональным аутизмом без дополнительных неврологических осложнений. Распространенность антител к FRa среди испытуемых оказалась высокой, они были обнаружены у 76% участников. Дети также страдали недостаточностью множества нутриентов, вероятно, из-за избирательности в отношении продуктов питания и из-за недоедания. Меры по коррекции нутритивной недостаточности в сочетании с большими дозами фолиевой кислоты привели к значимому улучшению общего состояния – от аутизма тяжелой степени до аутизма легкой либо средней степени тяжести (рисунок 3А). Сравнение значений по Шкале оценки

детского аутизма (шкала CARS) до и после 2 лет терапии (супплементация фолиниевой кислотой в купе с коррекцией нутритивной недостаточности) показало, что терапевтический исход был лучше у детей с отрицательными либо низкими титрами блокирующих антител к FRa (на уровне до 0.44 пикомоль блокируемых FRa на мл сыворотки) по сравнению с детьми, у которых титр антител к FRa превышал значение 0.44 пикомоль/мл. У детей, которым терапию назначали в более позднем возрасте, наблюдался более высокий исходный показатель CARS. Результаты терапии были хуже в старшей подгруппе детей с аутизмом (рисунок 3B). На исход может также оказывать влияние наличие аутоантител у матери и у отца, и воздействие этих аутоантител на эмбрион. Данные предварительного характера позволяют предполагать, что при наличии аутоантител к FRa у матери либо отца ответ на терапию у ребенка также окажется более слабым (рисунок 3C).

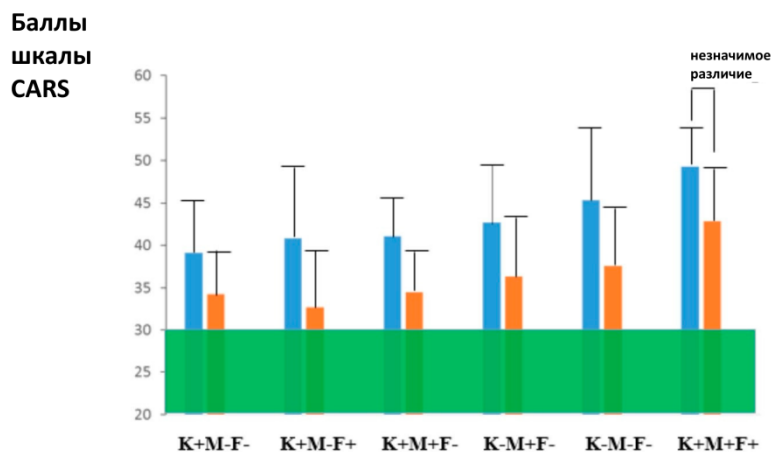
A.



B.



C.

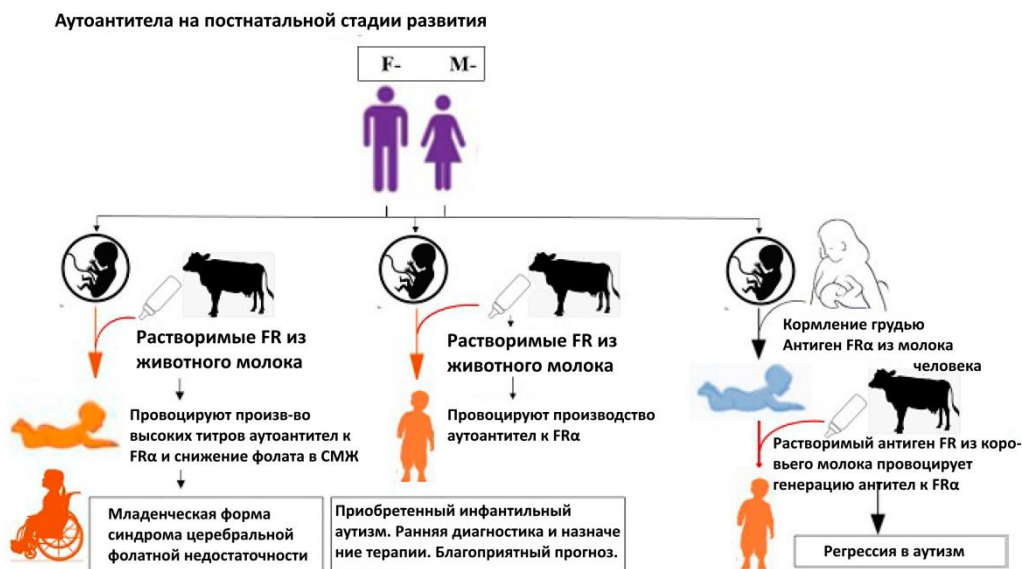


**Рисунок 3. (А).** В отличие от пациентов с аутизмом, не получавших терапию ( $n = 84$ ), у которых баллы по шкале CARS не изменились, в группе, членам которой давали фолиевую кислоту и корректировали нутритивные отклонения, было отмечено снижение баллов по шкале CARS от исходно высоких ( $n = 82$ ; среднее значение CARS  $\pm$  СКО:  $41.34 \pm 6.47$ ) до значений, соответствующих умеренной либо слабой выраженности аутизма (среднее значение  $\pm$  СКО:  $34.35 \pm 6.25$ ; двухсторонний t-критерий,  $p < 0.0001$ ). **(В).** С возрастом наблюдалось медленное повышение исходных значений по шкале CARS (синие столбцы), в то время как по истечении 2-летнего периода терапии во всех возрастных подгруппах отмечено значительное снижение значений по шкале CARS (оранжевые столбцы). Увеличение исходного показателя CARS с возрастом должно

негативным образом сказываться на конечном исходе в более возрастных группах, особенно в группе «старше 6 лет». **(С)**. На этом графике представлен исход терапии с разбивкой по профилю аутоантител к FRa, отражающему их наличие у ребенка (К), матери (М) и отца (F). Наличие антител к FRa у матери либо наличие антител у обоих родителей негативно сказывается на исходе терапии (изображение адаптировано из источника [51]).

В отличие от синдрома ЦФН с дебютом в младенческом возрасте, при котором у родителей не было выявлено антител к FRa, при тестировании родителей детей с аутизмом антитела были выявлены у 34% матерей и 29% отцов, при этом в контрольной группе антитела у родителей были выявлены лишь в 3% случаев [51]. Аналогичная распространенность (76%) аутоиммунной реакции против FRa была отмечена у детей с аутизмом в другом исследовании, причем в нем была отмечена более высокая, нежели в упомянутом выше исследовании, распространенность антител у не затронутых аутизмом братьев и сестер пациентов (75%), отцов пациентов (69%) и матерей пациентов (59%) [62]. В возникновении этих антител может играть роль семейная наследственность, но, вероятно, на риск развития РАС влияют и иные, неизвестные факторы, поскольку у некоторых сиблингов не отмечалось симптомов, несмотря на наличие антител. Два фактора, предположительно способствующих развитию аутизма – присутствие антител в организме на критической стадии развития нервной системы, в первые 18 месяцев после родов, и воздействие материнских антител на стадии развития плода.

Терапевтический исход после назначения фолиевой кислоты пациентам с аутизмом и аутоантителами к FRa, судя по всему, подвержен влиянию нескольких факторов - таких, как титр антител к FRa, возраст, в котором было назначено лечение, а также профиль антител к FRa у родителей пациентов. В наших исследованиях, в которых производилась оценка терапевтического исхода после двух лет применения фолиевой кислоты, мы задействовали лишь детей, у которых дебют аутизма наступил в младенческом возрасте и были исключены генетические отклонения, поскольку наличие генетических дефектов могло исказить результаты статистической оценки воздействия аутоиммунных реакций против рецептора FRa (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Аутоиммунный статус родителей: ассоциация с показателями нервно-психического развития у детей (верхняя панель) и постнатальной генерацией антител у детей (нижняя панель).

#### 14. Терапия аутоиммунной патологии FR $\alpha$ при беременности

Было установлено, что наличие аутоиммунной реакции против FR $\alpha$  ассоциировано с повышенным риском развития дефектов нервной трубки (ДНТ) и иных врожденных пороков развития у ребенка [16,17]. Ассоциация была подтверждена в независимых исследованиях [63,64]. Несмотря на повышенную частоту ДНТ среди ирландского населения, оценка аутоантител к FR $\alpha$  в данном населении не выявила статистически значимой корреляции с частотой развития ДНТ [65]. Вместе с тем в исследовании была продемонстрирована повышенная (35-40%) распространенность антител к FR $\alpha$  у матерей, а также как у мужчин, так и у женщин, составивших контрольную группу. Поскольку антитела к FR $\alpha$  в ходе исследования не измерялись у отцов детей с ДНТ, а измерялись лишь у не родственных детям мужчин, составлявших контрольную группу, нельзя исключить возможность того, что наличие антител к FR $\alpha$  у обоих родителей может влиять на риск развития ДНТ. В исследованиях с участием родителей было продемонстрировано влияние

как статуса матерей, так и статуса отцов на распространенность антител у детей и на клинический исход [51]. Фортификация продуктов питания фолиевой кислотой снизила распространенность ДНТ на 30-50 процентов. Тем не менее, мы подозреваем, что в случае женщин, у которых нормальный фолатный статус сочетается с положительным анализом на антитела к FRa, даже назначение дополнительно 400-800 мкг фолиевой кислоты/сутки, или 1000 мкг/сутки в случае двуплодной беременности, может оказаться недостаточным для предотвращения ДНТ или развития врожденных патологий у ребенка ввиду сохраняющейся эмбриональной и фетальной фолатной недостаточности в присутствии антител к FRa.

Описан случай, при котором контрольное обследование женщины, перенесшей три беременности, выявило у пациентки высокие титры блокирующих и связывающих аутоантител к FRa. Из трех беременностей, две беременности у женщины завершились выкидышами, а в третий раз пациентка была беременна монозиготными близнецами и принимала в ходе беременности по 1 мг фолиевой кислоты в сутки. На сроке 12 недель была осуществлена редукция одного из плодов по причине энцефалоцеле, а затем беременность пришлось прервать из-за синдрома гипоплазии левых отделов сердца и наличия кист сосудистого сплетения у второго близнеца. Осуществленное тогда обширное генетическое тестирование не выявило каких-либо отклонений. После обнаружения аутоантител к FRa пациентка была переведена на безмолочную диету, которая позволила снизить титры антител к FRa, но все же четвертая беременность, начатая с помощью экстракорпорального оплодотворения (IVF), также завершилась выкидышем на 6-м месяце. Лишь после продолжения безмолочной диеты, к которой была добавлена терапия, состоявшая в получении 4 мг фолиевой кислоты, 2.5 мг лейковорина и 5 мг преднизона, титры антител к FRa упали до неопределяемых значений, после чего пятая беременность завершилась в срок рождением здорового мальчика [17]. Отмечена значимая ассоциация аутоантител к FRa со сниженной фертильностью и преждевременными родами [45,46], при этом известно, что недоношенные дети чаще страдают расстройствами аутистического спектра [66]. Следовательно, осуществление анализа на наличие антител к FRa у женщин репродуктивного возраста может способствовать предотвращению развития некоторых из описанных патологий посредством раннего вмешательства.

#### **15. Предотвращение расстройств аутистического спектра, ассоциированных с наличием антител к фолатному рецептору, и связанных с ними осложнений**

В литературе нет сообщений о профилактике РАС. Тем не менее, представляется крайне важным диагностировать РАС как можно ранее, чтобы иметь возможность осуществлять дальнейшие обследования, включая анализ на наличие аутоантител к FRa в сыворотке крови. Если в отношении пациента имеются серьезные подозрения на наличие расстройства аутистического спектра, и при этом удалось как можно ранее, в возрасте до трех лет, выявить антитела к FRa, то, по нашему мнению, при немедленном начале терапии фолиевой кислотой в сочетании с диетой с исключением животного молока можно ожидать благоприятного терапевтического исхода, при условии, что у матери или у обоих родителей пациента не было выявлено антител к FRa [51].

В настоящее время анализ на антитела к FRa проводится только после того, как расстройство аутистического спектра было заподозрено или диагностировано. При таком порядке действий назначение лечения откладывается, что приводит к значительной задержке и неблагоприятно сказывается на прогнозе.

Медицинские работники могут воспользоваться модифицированным опросником для скрининга аутизма у детей раннего возраста (M-CHAT, Modified Checklist for Autism in Toddlers) или иными инструментами раннего скрининга детей в возрасте от 18 до 24 месяцев, хотя при использовании таких ранних тестов отмечается их недостаточная диагностическая чувствительность и специфичность.

Альтернативой может быть осуществление скрининг-анализа на наличие антител к FRa в раннем детском возрасте, от 12 до 18 месяцев, в первую очередь у детей, у которых был отмечен



один или более признак или симптом, позволяющий подозревать наличие аутизма. При обнаружении у ребенка антител к FRa он может быть переведен на диету с исключением животного молока и ему может быть назначена фолиевая кислота, с обязательным последующим контролем состояния.

## **16. Клиническое значение полученных данных**

За более чем сто лет, прошедших после открытия фолиевой кислоты, были подробно описаны гематологические последствия недостаточности этого витамина в организме и его роль в синтезе ДНК и терапии мегалобластной анемии. Целью продолжающихся исследований является определение роли фолата в реакциях метилирования, эпигенетическом регулировании экспрессии генов, репродуктивной функции, беременности и развитии плода. Становится очевидным, что фолат играет важную роль не только в развитии мозга у плода в ходе беременности, но также и в развитии после родов, и в усовершенствовании функциональной интеграции связей мозга во взрослом возрасте. Улучшение клинической картины, наблюдаемое при назначении фолиевой кислоты при расстройствах аутистического спектра, шизофрении, депрессии и деменции свидетельствует о той роли, которую играет фолат в метаболической регуляции работы мозга, возможно, посредством регуляции экспрессии и обработки нейромедиаторов. В текущей парадигме нарушение фолатного метаболизма принято связывать с недостатком фолатов в диете и с генетическими дефектами фолатных метаболических цепочек. Открытие аутоантител к фолатному рецептору, вносящих вклад в развитие фетальной и церебральной фолатной недостаточности, радикальным образом изменило наше понимание того, как происходит перенос фолатов в мозг и как фолаты регулируют работу мозга. Как следствие, понимание церебральной фолатной недостаточности врачами является критически важным элементом общего понимания расстройств нейроонтогенеза и нервно-психиатрических заболеваний.

Для того, чтобы обеспечить профилактику церебральной фолатной недостаточности, в специализированных руководствах, посвященных терапии будущих родителей, у которых были обнаружены антитела к FRa, следует указывать сроки терапии и дозировку фолиевой кислоты при назначении перед зачатием, а в отношении беременных матерей - дозировку фолиевой кислоты, назначаемой в ходе беременности. Выявление оптимальной дозировки, обеспечивающей достаточное, но не избыточное, поступление фолата, будет крайне важной задачей, поскольку в настоящее время отсутствуют данные о профиле безопасности высоких доз фолиевой кислоты в ходе беременности. Исходя из профиля безопасности высоких доз фолиевой кислоты при назначении пациентам с ЦФН и PAC, можно предположить, что суточная доза в диапазоне 5-10 мг окажется безопасной. Эту дозу в будущем можно будет уменьшить вдвое благодаря распространению левофолината. С точки зрения благоприятности исхода при ЦФН и PAC, осуществление раннего тестирования на антитела к FRa и назначение терапии фолиевой кислотой, возможно, позволит предотвращать развитие неврологических отклонений.

## **17. Заключительные комментарии**

Десятилетия, потраченные на исследование пороков нервной трубки при беременности, позволили снизить частоту их развития благодаря супплементации фолиевой кислотой, но не искоренили их полностью. В то же время частота развития расстройств аутистического спектра продолжает расти, при этом не установлено конкретной причины, предрасполагающей к такому росту. Усилия государственных и частных фондов, потративших значительную часть своих средств на выявление генетических дефектов и геномных полиморфизмов, не дали результата. Огромные средства были потрачены на разработку делеционных животных моделей с использованием подопытных мышей и крыс в целях выявления гена(ов), связанных с аутизмом. В настоящее время очевидным стало то, что PAC не являются генетически-обусловленными расстройствами развития и не следуют менделеевским принципам наследования. Следовательно, ответ на загадку

патогенеза PАС должен крыться в эпигенетических факторах и факторах среды, оказывающих обширное воздействие на экспрессию генов. Фолат играет ключевую роль в синтезе ДНК/РНК, метилировании и эпигенетическом контроле экспрессии генов, и, как следствие, снижение доступности фолата на критических стадиях развития, из-за наличия антител, блокирующих FRa и провоцирующих воспаление, может играть значимую роль в патологии расстройств аутистического спектра.

**Вклад авторов:** Все авторы внесли одинаковый вклад в разработку концепции, написание и доработку рукописи. Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и одобрили её.

**Финансирование:** Финансовая поддержка исследований, продолжающихся в лаборатории Эдварда Квадроса (Quadros Laboratory), оказывается за счет гранта, полученного от фонда “Brain Foundation” и от фонда семьи Вембу Шринивасана (Vembu Srinivasan family fund). Автор N.B.-K. (Наташа Бобровски-Хури) получает стипендию для студентов магистратуры, выданную Институтом базовых исследований (Institute for Basic Research), работа которого финансируется городом Нью-Йорк и который расположен в округе Статен-Айленд, Нью-Йорк, США.

**Заявление экспертного совета организации:** неприменимо.

**Заявление об информированном согласии:** информирование согласие было получено у всех субъектов, упоминаемых в настоящем исследовании.

**Заявление о доступности данных:** неприменимо.

**Конфликты интересов:** двое авторов (J.M.S. и E.V.Q.) являются изобретателями, упомянутыми в патенте (США), предметом которого является детекция аутоантител к FRa. Патент был выдан Фонду Исследований Университета штата Нью-Йорк (Research Foundation of SUNY).

## Список литературы

1. Rucker, R.B.; Zempleni, J.; Suttie, J.W.; McCormick, D.B. Handbook of Vitamins, 4th ed.; Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2007. Available online: <https://books.google.com/books?id=AasGngEACAAJ> (accessed on 4 November 2019).
2. Mikkelsen, K.; Apostolopoulos, V. Vitamin B12, Folic Acid, and the Immune System. In Nutrition and Immunity; Mahmoudi, M., Rezaei, N., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019.
3. Scott, J.M. Folate and vitamin B12. *Proc. Nutr. Soc.* 1999, *58*, 441–448.
4. Ramaekers, V.T.; Blau, N. Cerebral folate deficiency. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2004, *46*, 843–851.
5. Cario, H.; Bode, H.; Debatin, K.M.; Opladen, T.; Schwarz, K. Congenital null mutations of the FOLR1 gene: A progressive neurologic disease and its treatment. *Neurology* 2009, *73*, 2127–2129.
6. Pérez-Dueñas, B.; Toma, C.; Ormazábal, A.; Muchart, J.; Sanmartí, F.; Bombau, G.; Serrano, M.; García-Cazorla, A.; Cormand, B.; Artuch, R. Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2010, *33*, 795–802.
7. Delmelle, F.; Thöny, B.; Clapuyt, P.; Blau, N.; Nassogne, M.C. Neurological improvement following intravenous high-dose folinic acid for cerebral folate transporter deficiency caused by FOLR-1 mutation. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2016, *20*, 709–713.
8. Ramaekers, V.T.; Rothenberg, S.P.; Sequeira, J.M.; Opladen, T.; Blau, N.; Quadros, E.V.; Selhub, J. Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2005, *352*, 1985–1991.

9. Ramaekers, V.T.; Segers, K.; Sequeira, J.M.; Koenig, M.; Van Maldergem, L.; Bours, V.; Kornak, U.; Quadros, E.V. Genetic assessment and folate receptor autoantibodies in infantile-onset cerebral folate deficiency (CFD) syndrome. *Mol. Genet. Metab.* **2018**, *124*, 87–93.
10. Cao, X.; Wolf, A.; Kim, S.E.; Cabrera, R.M.; Wlodarczyk, B.J.; Zhu, H.; Parker, M.; Lin, Y.; Steele, J.W.; Han, X.; et al. CIC de novo loss of function variants contribute to cerebral folate deficiency by downregulating FOLR1 expression. *J. Med. Genet.* **2020**, 1–11.
11. Ramaekers, V.T.; Blau, N.; Sequeira, J.M.; Nassogne, M.C.; Quadros, E.V. Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. *Neuropediatrics* **2007**, *38*, 276–281.
12. Ramaekers, V.T.; Sequeira, J.M.; Thöny, B.; Quadros, E.V. Oxidative Stress, Folate Receptor Autoimmunity, and CSF Findings in Severe Infantile Autism. *Autism Res. Treat.* **2020**, *2020*, 9095284.
13. Fekete, K.; Berti, C.; Trovato, M.; Lohner, S.; Dullmeijer, C.; Souverein, O.W.; Cetin, I.; Decsi, T. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: A systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. *Nutr. J.* **2012**, *11*, 1–8.
14. Greenberg, J.A.; Bell, S.J.; Guan, Y.; Yu, Y. Folic acid supplementation and pregnancy—More than just neural tube defect prevention. *Rev. Obs. Gynecol.* **2011**, *4*, 52–59.
15. Bailey, L.B.; Stover, P.J.; McNulty, H.; Fenech, M.F.; Gregory, J.F., 3rd; Mills, J.L.; Pfeiffer, C.M.; Fazili, Z.; Zhang, M.; Ueland, P.M.; et al. Biomarkers of nutrition for development-Folate Review. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1636S–1680S.
16. Rothenberg, S.P.; da Costa, M.P.; Sequeira, J.M.; Cracco, J.; Roberts, J.L.; Weedon, J.; Quadros, E.V. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 134–142.
17. Shapira, I.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. Folate receptor autoantibodies in pregnancy related complications. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* **2015**, *103*, 1028–1030.
18. Peng, L.; Dreumont, N.; Coelho, D.; Guéant, J.L.; Arnold, C. Genetic animal models to decipher the pathogenic effects of vitamin B12 and folate deficiency. *Biochimie* **2016**, *126*, 43–51.
19. Kappen, C. Folate supplementation in three genetic models: Implications for understanding folate-dependent developmental pathways. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin Med. Genet.* **2005**, *135C*, 24–30.
20. Piedrahita, J.A.; Oetama, B.; Bennett, G.D.; van Waes, J.; Kamen, B.A.; Richardson, J.; Lacey, S.W.; Anderson, R.G.; Finnell, R.H. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 228–232.
21. Tang, L.S.; Santillano, D.R.; Wlodarczyk, B.J.; Miranda, R.C.; Finnell, R.H. Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **2005**, *135C*, 48–58.
22. Craciunescu, C.N.; Brown, E.C.; Mar, M.H.; Albright, C.D.; Nadeau, M.R.; Zeisel, S.H. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr.* **2004**, *134*, 162–166.
23. Berrocal-Zaragoza, M.I.; Sequeira, J.M.; Murphy, M.M.; Fernandez-Ballart, J.D.; Abdel Baki, S.G.; Bergold, P.J.; Quadros, E.V. Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1323–1332.
24. Blaise, S.A.; Nédélec, E.; Schroeder, H.; Alberto, J.M.; Bossenmeyer-Pourie, C.; Guéant, J.L.; Daval, J.L. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 667–679.

25. da Costa, M.; Sequeira, J.M.; Rothenberg, S.P.; Weedon, J. Antibodies to Folate Receptors Impair Embryogenesis and Fetal Development in the Rat. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 2003, *67*, 837–847.
26. Sequeira, J.M.; Desai, A.; Berrocal-Zaragoza, M.I.; Murphy, M.M.; Fernandez-Ballart, J.D.; Quadros, E.V. Exposure to folate receptor alpha antibodies during gestation and weaning leads to severe behavioral deficits in rats: A pilot study. *PLoS ONE* 2016, *11*, e0152249.
27. Desai, A.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. Prevention of behavioral deficits in rats exposed to folate receptor antibodies: Implication in autism. *Mol. Psychiatry* 2017, *22*, 1291–1297.
28. Balashova, O.A.; Visina, O.; Borodinsky, L.N. Folate action in nervous system development and disease. *Dev. Neurobiol.* 2018, *78*, 391–402.
29. Mann, A.; Portnoy, E.; Han, H.; Inbar, D.; Blatch, D.; Shmuel, M.; Ben-Hur, T.; Eyal, S.; Ekstein, D. Folate homeostasis in epileptic rats. *Epilepsy Res.* 2018, *142*, 64–72.
30. Kruman, I.I.; Mouton, P.R.; Emokpae, R., Jr.; Cutler, R.G.; Mattson, M.P. Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *NeuroReport*. 2005, *16*, 1055–1059.
31. Weng, Q.; Wang, J.; Wang, J.; Tan, B.; Wang, J.; Wang, H.; Zheng, T.; Lu, Q.R.; Yang, B.; He, Q. Folate Metabolism Regulates Oligodendrocyte Survival and Differentiation by Modulating AMPK $\alpha$  Activity. *Sci. Rep.* 2017, *7*, 1705.
32. Kim, G.B.; Chen, Y.; Kang, W.; Guo, J.; Payne, R.; Li, H.; Wei, Q.; Baker, J.; Dong, C.; Zhang, S.; et al. The critical chemical and mechanical regulation of folic acid on neural engineering. *Biomaterials.* 2018, *178*, 504–516.
33. Mayanil, C.S.; Siddiqui, M.R.; Tomita, T. Novel functions of folate receptor alpha in CNS development and diseases. *Neurosci. Discov.* 2014, *2*, 5.
34. Hou, Z.; Matherly, L.H. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr. Top. Membr.* 2014, *73*, 175–204.
35. Antony, A.C. Folate receptors. *Annu. Rev. Nutr.* 1996, *16*, 501–521.
36. Machacek, C.; Supper, V.; Leksa, V.; Mitulovic, G.; Spittler, A.; Drbal, K.; Suchanek, M.; Ohradanova-Repic, A.; Stockinger, H. Folate Receptor  $\beta$  Regulates Integrin CD11b/CD18 Adhesion of a Macrophage Subset to Collagen. *J. Immunol.* 2016, *197*, 2229–2238.
37. Kelemen, L.E. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? *Int. J. Cancer* 2006, *119*, 243–250.
38. Spiegelstein, O.; Eudy, J.D.; Finnell, R.H. Identification of two putative novel folate receptor genes in humans and mouse. *Gene* 2000, *258*, 117–125.
39. Holm, J.; Hansen, S.I. Characterization of soluble folate receptors (folate binding proteins) in humans. Biological roles and clinical potentials in infection and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2020, *1868*, 140466.
40. Alam, C.; Hoque, M.T.; Finnell, R.H.; Goldman, I.D.; Bendayan, R. Regulation of Reduced Folate Carrier (RFC) by Vitamin D Receptor at the Blood-Brain Barrier. *Mol. Pharm.* 2017, *14*, 3848–3858.
41. Yasuda, S.; Hasui, S.; Yamamoto, C.; Yoshioka, C.; Kobayashi, M.; Itagaki, S.; Hirano, T.; Iseki, K. Placental folate transport during pregnancy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, *72*, 2277–2284.
42. Grapp, M.; Wrede, A.; Schweizer, M.; Hüwel, S.; Galla, H.J.; Snaidero, N.; Simons, M.; Bückers, J.; Low, P.S.; Urlaub, H.; et al. Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat. Commun.* 2013, *4*, 2123.
43. Alam, C.; Kondo, M.; O'Connor, D.L.; Bendayan, R. Clinical Implications of Folate Transport in the Central Nervous System. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020, *41*, 349–361.

44. Desai, A.; Sequeira, J.M.; and Quadros, E.V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* 2016, *126*, 31–42.
45. Berrocal-Zaragoza, M.I.; Fernandez-Ballart, J.D.; Murphy, M.M.; Cavallé-Busquets, P.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility. *Fertil. Steril.* 2009, *91* (Suppl. 4), 1518–1521.
46. Vo, H.D.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V.; Schwarz, S.M.; Perenyi, A.R. The role of folate receptor autoantibodies in preterm birth. *Nutrition* 2015, *31*, 1224–1227.
47. Ramaekers, V.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. Clinical recognition and aspects of the cerebral folate deficiency syndromes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013, *51*, 497–511.
48. Frye, R.E.; Slattery, J.; Delhey, L.; Furgerson, B.; Strickland, T.; Tippett, M.; Sailey, A.; Wynne, R.; Rose, S.; Melnyk, S.; et al. Folinic acid improves verbal communication in children with autism and language impairment: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Mol. Psychiatry* 2018, *23*, 247–256.
49. Frye, R.E.; Delhey, L.; Slattery, J.; Tippett, M.; Wynne, R.; Rose, S.; Kahler, S.G.; Bennuri, S.C.; Stepan, M.; Sequeira, J.M.; et al. Blocking and binding folate receptor alpha autoantibodies identify novel autism spectrum disorder subgroups. *Front. Neurosci.* 2016, *10*, 80.
50. Sequeira, J.M.; Ramaekers, V.T.; Quadros, E.V. The diagnostic utility of folate receptor autoantibodies in blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013, *51*, 545–554.
51. Ramaekers, V.T.; Sequeira, J.M.; DiDuca, M.; Vrancken, G.; Thomas, A.; Philippe, C.; Peters, M.; Jadot, A.; Quadros, E.V. Improving Outcome in Infantile Autism with Folate Receptor Autoimmunity and Nutritional Derangements: A Self-Controlled Trial. *Autism Res. Treat.* 2019, *2019*, 7486431.
52. Zhou, J.; Liu, A.; He, F.; Jin, Y.; Zhou, S.; Xu, R.; Guo, H.; Zhou, W.; Wei, Q.; Wang, M. High prevalence of serum folate receptor autoantibodies in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers* 2018, *23*, 622–624.
53. Elsabbagh, M.; Divan, G.; Koh, Y.J.; Shin Kim, Y.; Kauchali, S.; Marcin, C.; Montiel-Nava, C.; Patel, P.; Paula, C.S.; Wang, C.; et al. Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Res.* 2012, *5*, 160–179.
54. Chiarotti, F.; Venerosi, A. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sci.* 2020, *10*, 274.
55. Ramaekers, V.T.; Sequeira, J.M.; Blau, N.; Quadros, E.V. A milk-free diet downregulates folate receptor autoimmunity in cerebral folate deficiency syndrome. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2008, *50*, 346–352.
56. Whiteley, P.; Shattock, P.; Knivsberg, A.M.; Seim, A.; Reichelt, K.L.; Todd, L.; Carr, K.; Hooper, M. Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front. Hum. Neurosci.* 2013, *6*, 344.
57. Whiteley, P.; Haracopos, D.; Knivsberg, A.M.; Reichelt, K.L.; Parlar, S.; Jacobsen, J.; Seim, A.; Pedersen, L.; Schondel, M.; Shattock, P. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr. Neurosci.* 2010, *13*, 87–100.
58. Knivsberg, A.M.; Reichelt, K.L.; Høien, T.; Nødland, M. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr. Neurosci.* 2002, *5*, 251–261.
59. Jarmołowska, B.; Bukalo, M.; Fiedorowicz, E.; Cieslin´ska, A.; Kordulewska, N.K.; Moszyn´ska, M.; S´wia˛tecki, A.; Kostyra, E. Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients* 2019, *11*, 87.
60. Schwartz, R.S. Autoimmune folate deficiency and the rise and fall of “horror autotoxicus”. *N. Engl. J. Med.* 2005, *352*, 1948–1950.

61. Frye, R.E.; Wynne, R.; Rose, S.; Slattery, J.; Delhey, L.; Tippett, M.; Kahler, S.G.; Bennuri, S.C.; Melnyk, S.; Sequeira, J.M.; et al. Thyroid dysfunction in children with autism spectrum disorder is associated with folate receptor  $\alpha$  autoimmune disorder. *J. Neuroendocrinol.* 2017, *29*.
62. Quadros, E.V.; Sequeira, J.M.; Brown, W.T.; Mevs, C.; Marchi, E.; Flory, M.; Jenkins, E.C.; Velinov, M.T.; Cohen, I.L. Folate receptor autoantibodies are prevalent in children diagnosed with autism spectrum disorder, their normal siblings and parents. *Autism Res.* 2018, *11*, 707–712.
63. Cabrera, R.M.; Shaw, G.M.; Ballard, J.L.; Carmichael, S.L.; Yang, W.; Lammer, E.J.; Finnell, R.H. Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. *J. Reprod. Immunol.* 2008, *79*, 85–92.
64. Boyles, A.L.; Ballard, J.L.; Gorman, E.B.; McConnaughey, D.R.; Cabrera, R.M.; Wilcox, A.J.; Lie, R.T.; Finnell, R.H. Association between inhibited binding of folic acid to folate receptor alpha in maternal serum and folate-related birth defects in Norway. *Hum. Reprod.* 2011, *26*, 2232–2238.
65. Molloy, A.M.; Quadros, E.V.; Sequeira, J.M.; Troendle, J.F.; Scott, J.M.; Kirke, P.N.; Mills, J.L. Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 2009, *361*, 152–160.
66. Harel-Gadassi, A.; Friedlander, E.; Yaari, M.; Bar-Oz, B.; Eventov-Friedman, S.; Mankuta, D.; Yirmiya, N. Risk for ASD in Preterm Infants: A Three-Year Follow-Up Study. *Autism Res. Treat.* 2018, *2018*, 8316212.