

Koncentrácie prozápalových cytokínov v plazme detí s poruchou autistického spektra a ich vzťah so závažnosťou príznakov

Mgr. Ivan Belica
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Katarína Janšáková¹, Michaela Kopčová¹, Žofia Szapuová¹, Petra Keményová¹, Mária Vidošovičová¹, Hana Celušáková¹, Iveta Waczulíková², Daniela Ostatníková¹
Školiteľ: Doc. MUDr. Katarína Babinská, PhD., MSc.¹

¹Fyziologický ústav, LF UK, Bratislava

²Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK, Bratislava

Úvod

Porucha autistického spektra (PAS) je charakterizovaná tromi hlavnými, jadrovými príznakmi: narušením sociálnej interakcie, narušením komunikácie a stereotypným správaním a záujmami. Predpokladá sa, že existuje viacero patomechanizmov vzniku PAS, všetky majú spoločné to, že negatívne ovplyvňujú prenatálny vývin nervového systému, čo sa neskôr prejaví charakteristickými zmenami v správaní. Jedna z teórií predpokladá účasť zápalu v etiopatogenéze PAS. Ukazuje sa, že alterácie hladín cytokínov, ktorým je vystavený mozog plodu, môžu narušiť jeho vývin a po narodení sa prejaví aj v správaní (1). Experimenty na myšiach, potkanoch či opiciach ukázali, že ak gravidným samiciam injikovali látky napodobňujúce prítomnosť baktérií či vírusov, alebo injikovali priamo zápalové cytokíny, ich potomkovia v období mladosti i dospelosti vykazovali črty správania podobné autistickým. Vykazovali tiež viaceré biochemické a anatomické odlišnosti mozgu, podobne ako sa pozorovali u ľudí s PAS (1). V humánnych štúdiách sa zistilo, že infekcia matky v určitej fáze tehotenstva zvyšuje riziko výskytu PAS u dieťaťa (2). Merania hladín cytokínov v plodovej vode matky počas tehotenstva (3) a v krvi dieťaťa v neonatálnom období (4, 5), ako aj v jeho neskoršom veku (6, 7, 8), preukázali, že zvýšená hladina určitých zápalových cytokínov, alebo naopak znížená hladina určitých protizápalových cytokínov (9) je spojená so zvýšeným rizikom výskytu PAS u dieťaťa. Na základe uvedeného sa predpokladá, že aktivácia imunitného systému dieťaťa napr. následkom prekonanej infekcie matky počas tehotenstva pretrváva aj v neskoršom období po narodení, neprejavuje sa však typickými príznakmi zápalu a preto môžeme uvažovať o chronickom subklinickom zápale, aspoň u časti detí s PAS. Zatiaľ neexistuje biologický marker PAS a niektorí autori uvažujú ako o potenciálnych biomarkeroch PAS aj o cytokínoch (10). Cieľom našej pilotnej štúdie je sledovať, či koncentrácie vybraných najvýznamnejších zápalových cytokínov budú podľa predpokladov vyššie u detí s PAS ako u detí kontrolného súboru. Zisťovali sme zároveň či je vzťah medzi hladinami cytokínov a závažnosťou príznakov PAS.

Materiál a metódy

Výskumný súbor

Výskumný súbor tvorilo spolu 53 detí, z toho 35 s PAS (32 chlapcov, 3 dievčatá) a 18 neurotypických (9 chlapcov, 9 dievčat). Skupiny boli navzájom vyrovnané podľa veku, v pomere 2:1. Priemerný vek participantov s PAS bol $7,8 \pm 2,8$ (SD) roka a neurotypických $7,9 \pm 2,7$ (SD) roka. Deti s PAS mali rôznu úroveň reči – 18 bolo neverbálnych, 2 mali slabou rozvinutú reč a 15 bolo plne verbálnych. Všetky deti v kontrolnom súbore boli verbálne.

Diagnostika PAS

Na zistenie prítomnosti PAS sme použili Diagnostickú škálu pre autizmus (Autism diagnostic observation schedule - ADOS-2), podľa ktorej administrátor hodnotí správanie dieťaťa na základe priameho pozorovania a interakcie s ním, a Diagnostické interview na autizmus (Autism diagnostic interview Revised - ADI-R), ktorý predstavuje štruktúrovaný rozhovor s rodičmi dieťaťa. Diagnóza PAS bola stanovená ak sa závery oboch vyšetrení, ktoré boli administrované nezávisle inými osobami, zhodovali. Oba uvedené diagnostické postupy umožňujú vyjadriť aj závažnosť jednotlivých jadrových príznakov PAS. V prípade ADOS-2 ide o skóre sociálneho afektu (SA; vyjadruje závažnosť narušenia sociálnej interakcie a komunikácie), skóre vyjadrujúce závažnosť stereotypného správania a záujmov (ÚVRS) a celkové komparatívne skóre (vyjadruje celkovú závažnosť príznakov). ADI-R umožňuje vypočítať skóre vyjadrujúce závažnosť narušenia sociálnej interakcie (časť A), skóre vyjadrujúce závažnosť narušenia komunikácie (časť B) a skóre vyjadrujúce závažnosť narušenia v oblasti stereotypného a úzko vymedzeného správania a záujmov (časť C).

Stanovenie koncentrácií cytokínov

Venózna krv bola odobratá v ranných hodinách do skúmaviek s EDTA. Skúmavky s krvou sa centrifugovali 10 minút pri rýchlosti 3000 otáčok/min. Oddelila sa plazma, ktorá sa uchovala pri -80°C . Na analýzu cytokínov sa využila multiplexová analýza, umožňujúca simultánne stanovenie koncentrácie väčšieho počtu analytov z malého množstva plazmy v rovnakej jamke mikrotitračnej doštičky (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay) na základe postupu odporúčaného výrobcom (EMD Millipore Corporation, 2013). V plazme boli stanovené prozápalové cytokíny TNF- α (tumor nekrotizujúci faktor alfa), IL-1 β (interleukín 1-beta), IL-17 (interleukín 17), IFN- γ (interferón gama).

Štatistická analýza

Na štatistické spracovanie výsledkov sme použili Shapiro-Wilkov test pre overenie predpokladu normality rozloženia dát. Pri testovaní rozdielov medzi skupinami sme v prípade normálnej distribúcie použili nezávislý t-test, v prípade ak distribúcia nebola normálna sme použili Mann-Whitneyov U-test. Ak sa preukázal signifikantný rozdiel, na vyjadrenie veľkosti efektu sme použili Cohenovo-d alebo r-hodnotu. Vzťah koncentrácií cytokínov so závažnosťou symptómov u detí s PAS sme zisťovali pomocou Spearmanového korelačného koeficientu.

Výsledky

Výsledky porovnaní sme zhrnuli v tabuľke 1 (hodnoty koncentrácií sú v pg/ml). Zistili sme signifikantne vyššie plazmatické hladiny prozápalových cytokínov IL-17 ($p = 0,007$), IFN- γ ($p = 0,015$) a TNF- α ($p = 0,017$) u detí s PAS v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Analýza veľkosti efektu preukázala, že v prípade IL-17 ($r = 0,372$) a IFN- γ ($r = 0,244$) možno hodnotiť rozdiely ako malé, v prípade TNF- α rozdiely hodnotíme ako stredne veľké ($d = 0,682$). Hladina IL-1 β bola v priemere vyššia u detí s PAS, ale rozdiel nebol signifikantný ($p = 0,164$). Hladiny cytokínov nepreukázali vzťah so závažnosťou symptómov PAS podľa ADOS-2 ani podľa ADI-R, s výnimkou IL-17, ktorý slabo negatívne koreloval ($p = 0,036$; $\rho = -0,372$) so závažnosťou narušenia sociálnej interakcie (ADI-R, časť A) (tabuľka 2).

Tabuľka 1: Porovnanie plazmatických koncentrácií cytokínov (pg/ml) medzi deťmi s PAS a kontrolným súborom

cytokín	skupina	priemer	medián	SD	min.	max.	test	p	veľkosť efektu
IL-1 β	kontrola PAS	1,47 2,28	1,39 2,26	0,88 1,81	0,02 0,13	3,35 7,41	U = 241,0	0,164	-
IL-17	kontrola PAS	4,48 6,69	3,68 5,58	2,11 3,89	1,21 2,22	9,97 17,84	U = 171,0	0,007	r = 0,372
IFN- γ	kontrola PAS	7,99 14,09	7,53 11,07	4,48 9,70	1,43 3,21	15,68 42,42	U = 185,5	0,015	r = 0,244
TNF- α	kontrola PAS	17,24 23,40	18,66 22,78	7,38 10,42	1,85 4,59	29,49 46,76	t = 2,232	0,017	d = 0,682

Tabuľka 2: Vzťah koncentrácií cytokínov so závažnosťou symptómov u detí s PAS (Spearmanova korelácia)

cytokíny		ADOS-2			ADI-R		
		SA	UVRS	celkové	časť A	časť B	časť C
IL-1 β	rho	-0,086	-0,165	-0,252	0,045	0,167	0,019
	p	0,628	0,350	0,144	0,801	0,346	0,914
IL-17	rho	-0,062	0,128	-0,034	-0,372*	-0,257	-0,221
	p	0,738	0,484	0,851	0,036	0,155	0,223
IFN- γ	rho	-0,037	-0,088	-0,188	0,075	0,217	0,068
	p	0,835	0,620	0,279	0,675	0,219	0,700
TNF- α	rho	0,040	0,124	-0,181	-0,080	-0,003	-0,101
	p	0,823	0,484	0,298	0,653	0,985	0,571

SA - čiastkové skóre sociálny afekt v ADOS-2 (závažnosť narušenia sociálnej interakcie a komunikácie)

UVRS - čiastkové skóre stereotypného správania a úzko vymedzených záujmov v ADOS-2

ADI-R – časť A - závažnosť narušenia sociálnej interakcie

ADI-R – časť B - závažnosť narušenia komunikácie

ADI-R – časť C - závažnosť stereotypného správania a úzko vymedzených záujmov

* p < 0,05

Diskusia

V našej štúdií sme preukázali vyššie hladiny troch prozápalových cytokínov (IL-17, IFN- γ , TNF- α) u detí s PAS s malým až stredne veľkým rozdielom v porovnaní s kontrolným súborom. V prípade IL-1 β sme významný rozdiel nezistili. Naše výsledky tak podporujú úvahy o tom, že u detí s PAS je zvýšená aktivita imunitného systému v porovnaní s neurotypickými deťmi. V prípade IFN- γ a TNF- α sa naše výsledky zhodujú s väčšinou doterajších štúdií (7, 8, 11), naopak, v prípade IL-1 β a IL-17 sú naše výsledky skôr opačné (6, 7, 8). Protirečivé výsledky štúdií zameraných na PAS sú často výsledkom heterogenosti skúmaných skupín – líšia sa mierou inteligencie, počtom a závažnosťou rôznych pridružených problémov (napr. somatických), kvalitou reči, a pod.. Aj jedným z limitov našej štúdie je že v súbore PAS sú zmiešané deti verbálne i neverbálne, ako aj deti s rôznou mierou závažnosti príznakov. Zaujímavým výsledkom je negatívna korelácia medzi závažnosťou narušenia sociálnej interakcie a hladinou IL-17, čo znamená že vyššia hladina IL-17 súvisí s menšou závažnosťou príznakov v tejto oblasti. Interpretácia tohto zistenia je nateraz nejasná.

Prezentované dáta sú výsledkom pilotnej štúdie zameranej na úlohu imunitnej dysfunkcie v patomechanizmoch PAS. Všetky štyri uvedené cytokíny sú len výberom z oveľa väčšieho počtu, ktoré sme analyzovali, aktuálne prezentujeme len tie, ktoré sa v literatúre ukazujú ako najvýznamnejšie v spojitosti s PAS či už prenatálne alebo po narodení. V ďalšom kroku plánujeme použiť zložitejšie štatistické analýzy, ktoré budú zohľadňovať aj mieru symptómov PAS a ďalšie biologické a behaviorálne premenné, ako aj rozšíriť záber na ostatné analyzované cytokíny.

Podporené grantom APVV 15-0045, APVV 15-0085 a VEGA 1/0141/17.

Zoznam použitej literatúry

1. Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in Neurobiology*. 2019. 175(4):1-19.
2. Jiang HY, Xu LL, Shao L a spol. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behavior and Immunity*. 2016. 58(11):165-172.
3. Abdallah MW, Larsen N, Grove J, Nørgaard-Pedersen B, Thorsen P, Mortensen EL, Hougaard DM. Amniotic fluid inflammatory cytokines: potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2013. 14(7):528-38.
4. Krakowiak P, Goines PE, Tancredi DJ, Ashwood P, Hansen RL, Hertz-Picciotto I, Van de Water J. Neonatal Cytokine Profiles Associated With Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*. 2017. 81(5):442-451.
5. Heuer LS, Croen LA, Jones KL a spol. An Exploratory Examination of Neonatal Cytokines and Chemokines as Predictors of Autism Risk: The Early Markers for Autism Study. *Biological Psychiatry*. 2019. 86(4):255-264.
6. Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*. 2015. 20(4):440-6.
7. Xie J, Huang L, Li X a spol. Immunological cytokine profiling identifies TNF- α as a key molecule dysregulated in autistic children. *Oncotarget*. 2017. 8(47):82390-82398.
8. Saghazadeh A, Ataeinia B, Keynejad K, Abdolalizadeh A, Hirbod-Mobarakeh A, Rezaei N. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *Journal of Psychiatric Research*. 2019. 115(8):90-102.
9. Saghazadeh A, Ataeinia B, Keynejad K, Abdolalizadeh A, Hirbod-Mobarakeh A, Rezaei N. Anti-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2019. 123(11):154740.
10. Rose D, Ashwood P. Potential cytokine biomarkers in autism spectrum disorders. *Biomarkers in Medicine*. 2014. 8(9):1171-81.
11. Abdallah MW, Larsen N, Mortensen EL a spol. Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: An exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *Journal of Neuroimmunology*. 2012. 252 (1-2):75-82.