

Vlastnosti červených krviniek u detí s poruchou autistického spektra

Tomáš Jasenovec

(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Mária Vidošovičová¹, Dominika Radošinská², Hana Celušáková¹, Angelika Púzserová³, Norbert Vrbjar³, Jana Radošinská^{1,3}

Školiteľ: doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD^{1,3}

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

² Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

³ Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, Slovensko

Rozbor aktuálneho stavu riešenia témy projektu

Porucha autistického spektra (PAS) je skupina ochorení, ktoré sa prejavujú zväčša pred tretím rokom života a sú typické ťažkosťami v oblasti sociálnych interakcií, komunikácii a v obmedzenom, stereotypne opakujúcom správaní sa. Okrem typických behaviorálnych príznakov sú však veľmi časté aj somatické prejavy ako napríklad imunitné (1), či gastrointestinálne (2). Pri PAS bolo pozorované zvýšenie oxidačného stresu (3), čo môže viesť k poškodeniu rôznych orgánov ako aj erytrocytov. Na súvislosť medzi oxidačným stresom, poškodením membrány erytrocytov a závažnosťou klinických prejavov autizmu už bolo poukázané (4). Abnormality v tvare erytrocytov boli definované ako jedna z nerozpoznaných typických črt autizmu (5). Pozorované bolo taktiež zníženie deformability erytrocytov u detí s PAS v porovnaní s neurotypickými jedincami (6).

Deformabilita erytrocytov predstavuje ich schopnosť meniť tvar bez toho, aby došlo k ich poškodeniu. Táto vlastnosť významne ovplyvňuje životnosť erytrocytov a hemodynamiku ako takú (7). Poznáme tri hlavné charakteristiky, ktoré popisujú deformabilitu erytrocytov: pomer povrchu a objemu erytrocytu, cytoplazmatická viskozita, mechanické vlastnosti a flexibilita membrány a cytoskeletu (8). Jedným z dôležitých faktorov ovplyvňujúcich pomer povrchu a objemu erytrocytu erytrocytov je schopnosť udržiavať iónovú a vodnú homeostázu. Kľúčovú úlohu tu zohráva sodíkovo-draslíková pumpa (Na,K-ATPáza) (7). Funkcia tohto enzýmu je však mimoriadne citlivá na vplyv oxidačného stresu a u detí s PAS je jej aktivita výrazne znížená (4). Významným faktorom ovplyvňujúcim deformabilitu erytrocytov je taktiež adekvátna produkcia oxidu dusnatého (NO) erytrocytmi. Tento dôležitý vazodilatant je tvorený aj samotnými erytrocytmi, ktoré obsahujú vlastnú endotelovú NO syntázu a tvorbou NO významne prispievajú k biodostupnosti NO v krvi (9).

Existuje viacero prác (4, 5, 6, 12) zaoberajúcich sa erytrocytmi pri PAS, ale len jedna z nich (4) popisuje vzťah medzi klinickou symptomatológiou PAS a parametrami erytrocytov. Cieľom tejto práce bolo popísať vzťah medzi deformabilitou erytrocytov, ako kľúčovej vlastnosti erytrocytov vzhľadom na ich funkciu, a jej parametrami so závažnosťou klinických príznakov PAS.

Metodika:

Dizajn štúdie a diagnostické metódy

Našej štúdie sa zúčastnilo 104 detí s PAS (86 chlapcov, 18 dievčat) s mediánom veku 3,688 (2,65min; 8,058 max). Porucha autistického spektra bola diagnostikovaná v súlade s kritériami DSM-V pomocou metód ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule – second edition) a ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised). ADI-R pozostáva z 5 domén, ale len tri z nich sú zamerané na hlavné znaky PAS. Ide o domény A (kvalitatívne abnormality v recipročnej sociálnej interakcii), B (kvalitatívne abnormality v komunikácii) a C (úzko vymedzené, repetitívne a stereotypné správanie sa). Každá z týchto domén má ešte 4 subdomény, ktoré zodpovedajú konkrétnym príznakom PAS a ich závažnosť je hodnotená pomocou bodovacieho systému. Vyššie skóre predstavuje závažnejšie prejavy PAS. Všetky deti, ktoré sme zaradili do nášho výskumu boli v rámci diagnostiky zaradené do modulu 1, ktorý je určený pre jedincov, ktorí nepoužívajú slovné spojenia.

Parametre erytrocytov

Venóznou krv odobranú deťom po skončení diagnostiky sme použili na stanovenie nasledujúcich parametrov: deformabilita erytrocytov, produkcia oxidu dusnatého erytrocytmi a kinetické parametre erytrocytovej Na,K-ATPázy.

Deformabilita erytrocytov:

Deformabilitu erytrocytov sme stanovili pomocou filtračnej metódy. Krv sme hneď po odbere 5 minút centrifugovali pri 1150 g a 4°C. Plazmu, buffy coat, ako aj vrchných 20% erytrocytov sme odstránili. Zvyšné erytrocyty sme 3-krát premyli vo fyziologickom roztoku. Takto premyté erytrocyty sme nariedili roztokom Cellpack (roztok pre krvný analyzátor Sysmex) v pomere 1:1000 a 5 minút centrifugovali pri 175 g cez membránové filtre s priemerom 5µm. Deformabilitu erytrocytov sme vypočítali ako podiel erytrocytov po filtrácii z počtu erytrocytov pred filtráciou.

Produkcia oxidu dusnatého (NO) erytrocytmi:

Ako indikátor prítomnosti NO sme použili fluorescenčnú sondu 5,6-diaminofluoresceín diacetát (DAF-2 DA). Plnú krv sme nariedili s modifikovaným fyziologickým roztokom (118,99 mmol/l NaCl, 4,69 mmol/l KCl, 25 mmol/l NaHCO₃, 1,17 mmol/l MgSO₄.7H₂O, 1,18 mmol/l KH₂PO₄, 2,5 mmol/l CaCl₂.2H₂O, 0,3 mmol/l Na₂EDTA, 5,5 mmol/l glukóza) v pomere 1:9. Do nariedenej plnej krvi sme pridali DAF-2 DA v koncentrácii 25 µmol/l. Vzorky sme inkubovali 10 minút v tme pri izbovej teplote. Po inkubácii sme fluorescenčný signál snímali pomocou fluorescenčného mikroskopu (Nikon Eclipse Ti). Kvantitatívnu analýzu sme uskutočnili pomocou programu ImageJ. Výsledky analýzy sú prezentované vo forme integrovanej denzity (priemerná suma intenzity jednotlivých pixelov jedného erytrocytu).

Izolácia erytrocytových membrán:

Premyté erytrocyty sme premiešali s 35 ml tlmivého roztoku (50 mmol/l TRIS) a po hemolýze s použitím homogenizéru sme vzorku 30 minút centrifugovali pri 13 000 g a 4°C. Vzniknutý supernatant sme odstránili a pelet, ktorý obsahuje membrány sme ešte 3x premyli hypotonickým tlmivým roztokom (30,20,10 mmol/l TRIS). Izolované membrány sme skladovali pri -80°C.

Merania kinetických parametrov erytrocytovej Na,K-ATPázy:

Aktivitu Na,K-ATPázy pre kofaktor Na⁺ sme stanovili pri rôznych koncentráciách NaCl (2 -100 mmol/l). Po 20 minútovej preinkubácii (50 µg membránových proteínov) sme pridaním ATP spustili reakciu, ktorá bola po ďalších 20 minútach zastavená pridaním kyseliny trichlóroctovej. Následne sme stanovili hladinu anorganického fosfátu, ktorý vzniká pri hydrolyze ATP. Pomocou nameraných dát sme vypočítali nasledovné kinetické parametre: maximálna rýchlosť enzýmovej reakcie (V_{max}) a koncentrácia Na⁺ potrebná k polovičnej rýchlosti enzýmovej reakcie (K_{Na}). Parameter V_{max} poukazuje na množstvo aktívnych molekúl enzýmu vo vzorke a K_{Na} na afinitu enzýmu k Na⁺.

Spracovanie nameraných dát: Na analýzu výsledkov sme použili program Graphpad Prism 7 a SigmaPlot 13. Normalitu dát sme testovali Shapiro- Wilkovým testom. Dáta sú prezentované ako priemer ± SD pri ich parametrickom rozdelení a ako medián s min a max hodnotou ak sú neparametricky rozdelené. Na popis korelácií sme použili Spearmanov test. Za štatisticky významné rozdiely sme považovali tie s hodnotou menšou ako 0,05.

Výsledky:

Deformabilita bola u detí s PAS 72,83 % (57,99 min, 81,82 max, n=103). Priemerná tvorba NO erytrocytmi bola $972,4 \pm 84,7$ (n=49). Merania kinetických parametrov (n=69) boli v našom súbore nasledovné: V_{max} $2,75 \pm 0,79$ µmol anorganického fosfátu/(mg proteínu)⁻¹·h⁻¹; K_{Na} 31,38 (11,8 min, 72,35 max) mmol/l NaCl. U participantov sme nepozorovali vplyv veku, či pohlavia na deformabilitu erytrocytov, produkciu NO erytrocytmi ani na kinetické parametre Na,K-ATPázy.

Deformabilita erytrocytov, vykazovala negatívnu koreláciu s C doménou (p=0,028 Spearman r=-0,213) ADI-R a jej subdoménou C1 (p=0,001; spearman r=-0,307). Pozitívnu koreláciu sme preukázali medzi produkciou NO erytrocytmi a C doménou (p=0,017; spearman r=0,34) vyšetrenia ADI-R, ako aj subdoménami C1 (p=0,041; spearman r=0,3) a C2 (p=0,007; spearman r=0,379). Parameter V_{max} negatívne koreloval so subdoménou A4 (p=0,011; spearman r=-0,311). Vzťahy medzi deformabilitou, produkciou NO erytrocytmi a parametrami Na,K-ATPázy pozorované neboli.

Diskusia:

Z našej štúdie vyplýva, že pravdepodobne existuje vzťah medzi deformabilitou erytrocytov, produkciou NO erytrocytmi a C doménou ADI-R diagnostickej metódy u detí s PAS. C doména zodpovedá úzko vymedzenému, repetitívnemu a stereotypnému správaniu sa. Deti so zhoršenou deformabilitou vykazovali závažnejšie príznaky spadajúce pod doménu C. Závažnejšie príznaky v tejto doméne vykazovali však aj deti, ktoré mali vyššiu produkciu NO erytrocytmi. Bolo popísané, že deformabilita erytrocytov je závislá od optimálnej tvorby NO. Inhibícia tvorby NO vedie k poškodeniu deformability erytrocytov a donory NO ju po takejto inhibícii normalizujú (10). Naproti tomu pri zvýšení tvorby NO (napr. v podmienkach zápalu) je deformabilita znova znížená (11). Molekula NO vykazuje aj vlastnosti voľného radikálu a v erytrocytoch autistických detí bola popísaná jeho zvýšená hladina (12). Toto by mohlo prinajmenšom čiastočne vysvetliť pozitívnu koreláciu medzi symptomatológiou PAS a produkciou NO v erytrocytoch pri jej súčasnej negatívnej korelácii s deformabilitou erytrocytov.

Kinetické parametre Na,K-ATPázy u detí s PAS síce nekorelovali s doménou C ADI-R, ale s položkou v doméne A, čo prispieva k hypotéze, že závažnosť symptomatológie PAS môže ovplyvňovať funkčný stav erytrocytov.

Nakoľko sme nepozorovali vzťahy medzi jednotlivými parametrami erytrocytov u detí s PAS, predpokladáme v tejto populácii dysreguláciu ich funkcií, za ktorú by podľa literatúry (13) mohol byť zodpovedný oxidačný stres. Preto v budúcnosti plánujeme u detí s PAS analyzovať parametre oxidačného stresu v súvislosti s parametrami erytrocytov. Veríme, že rozšírenie nášho výskumu vnesie nové svetlo do problematiky erytrocytov u jedincov s PAS.

Podporené grantom *VEGA 1/0286/18 a APVV-15-0085*.

Použitá literatúra:

1. Edmiston E, Ashwood P, Van de Water J: Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):383–390. doi:10.1016/j.biopsych.2016.08.031
2. Kushak RI, Buie TM, Murray KF, Newburg DS, Chen C, Nestoridi E, Winter HS: Evaluation of Intestinal Function in Children With Autism and Gastrointestinal Symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(5):687-91. doi:10.1097/MPG.0000000000001174.
3. Meguid NA, Dardir AA, Abdel-Raouf ER, Hashish A: Evaluation of oxidative stress in autism: defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143(1):58-65. doi: 10.1007/s12011-010-8840-9.;143:58–65
4. Ghezzi A, Visconti P, Abruzzo PM, Bolotta A, Ferreri C, Gobbi G, Malisardi G, Manfredini S, Marini M, Nanetti L, Pipitone E, Raffaelli F, Resca F, Vignini A, Mazzanti L: Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features. *PLoS One*. 2013;8(6):e66418. doi: 10.1371/journal.pone.0066418.
5. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Guerranti R, Cortelazzo A, Gentile M, Zollo G, Durand T, Valacchi G, Rossi M, Hayek J: Erythrocyte shape abnormalities, membrane oxidative damage, and β -actin alterations: an unrecognized triad in classical autism. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:432616. doi: 10.1155/2013/432616.
6. László A, Novák Z, Szöllősi-Varga I, Hai du Q, Vetró Á, Kovács A: Blood lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and hemorheological changes in autistic children. *Ideggyogy Sz*. 2013;66(1-2):23-8.
7. Radosinska J, Vrbjar N: The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Physiol Res*. 2016;65 Suppl 1:S43-54.
8. Tomaiuolo G: Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014 Sep 17;8(5):051501. doi:10.1063/1.4895755.
9. Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiß C, Kröncke KD, Hogg N, Feelisch M, Kelm M: Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*. 2012;120(20):4229-37. doi: 10.1182/blood-2012-07-442277.
10. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK: Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(5):H1577-84.
11. Bateman RM, Sharpe MD, Singer M, Ellis CG: The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1932. Published 2017 Sep 8. doi:10.3390/ijms18091932
12. Söğüt S, Zoroğlu SS, Ozyurt H, Yılmaz HR, Ozuğurlu F, Sivasli E, Yetkin O, Yanik M, Tutkun H, Savaş HA, Tarakçıoğlu M, Akyol O: Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta*. 2003;331(1-2):111-7
13. Bolotta A, Battistelli M, Falcieri E, Ghezzi A, Manara MC, Manfredini S, Marini M, Posar A, Visconti P, Abruzzo PM: Oxidative Stress in Autistic Children Alters Erythrocyte Shape in the Absence of Quantitative Protein Alterations and of Loss of Membrane Phospholipid Asymmetry. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:6430601. doi: 10.1155/2018/6430601. eCollection 2018. PubMed PMID:30607218; PubMed Central PMCID: PMC6252219.