

Sledovanie koncentrácie 6-sulfatoxymelatonínu v moči a jeho vzťahu s poruchami spánku a behaviorálnymi ukazovateľmi u detí s poruchami autistického spektra

MUDr. Kristína Bartakovičová¹

Spoluautori: Petra Keményová¹, Katarína Stebelová², Iveta Waczulíková³, Lenka Siklenková¹
Školiteľ: Doc. MUDr. Katarína Babinská, PhD.¹

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

² Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³ Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Poruchy autistického spektra (PAS) sú neurovývinové ochorenie charakterizované deficitmi v oblasti sociálnej interakcie a komunikácie a úzko vymedzeným a stereotypným správaním a záujmami (1). Deti s PAS okrem základnej triády príznakov, trpia mnohými komorbiditami. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce patria poruchy spánku s prevalenciou 50-80%, v porovnaní s 20-30% u neurotypických jedincov (2). Etiológia spánkových porúch je multifaktoriálna, vo výskume sa upriamuje pozornosť na možný vplyv narušeného cirkadiálneho rytmu a zmenených hladín melatonínu na kvalitu spánku. Melatonín je hormón produkovaný v epifýze, ktorého hlavnou funkciou je regulovať spánkový cyklus (3). Sekrécia melatonínu podlieha cirkadiálnemu rytmu. Pretože je silne inhibovaná svetlom, cez deň sú jeho koncentrácie nízke, naopak v noci dochádza k niekoľkonásobne vyššiemu vylučovaniu (4). Maximálne hladiny dosahuje približne v polovici spánku (5). Vo viacerých štúdiách mali deti s PAS preukázané nižšie hladiny melatonínu v porovnaní so zdravými jedincami, ktoré súviseli so závažnosťou PAS (6). Hlavným metabolitom melatonínu je 6-sulfatoxymelatonín (aMT6s), ktorý sa vylučuje močom a koreluje s hladinami melatonínu v sére. Navyše vzorka prvého ranného moču dostatočne odráža mieru vylučovania aMT6s počas noci. Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť výskyt porúch spánku u detí s PAS, sledovať hladiny 6-sulfatoxymelatonínu (aMT6s) vo vzorke ranného a poobedného moču, ktorý nám odzrkadlil nočnú aj dennú produkciu melatonínu. Následne sme sa zamerali na analýzu asociácii aMT6s so spánkovými a behaviorálnymi parametrami.

Materiál a metódy

Do výskumného súboru bolo zaradených 77 detí s PAS, ktoré boli diagnostikované v Akademickom centre výskumu autizmu. Kontrolná skupina predstavovala 84 neurotypických detí z materských a základných škôl zhodného veku.

Tabuľka 1. Charakteristika výskumného súboru

| | | PAS | Kontrolná skupina | P |
|------------|-----------------|------------------|-------------------|-------|
| Počet | | 77 | 84 | |
| Pohlavie | chlapci | 67 (87 %) | 62 (74 %) | 0.032 |
| | dievčatá | 10 (13 %) | 22 (26 %) | |
| Vek (roky) | medián (rozsah) | 4.9 (2.6 – 14.9) | 5.7 (2.5 – 15.5) | 0.201 |

Behaviorálne parametre sa získali štandardizovanými metódami ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule – second version) a ADI-R (Autism Diagnostic Interview – revised) v Akademickom centre výskumu autizmu na Fyziologickom ústave LFUK. ADOS-2 je semištruktúrované vyšetrenie, prostredníctvom ktorého sme hodnotili ukazovatele sociálneho afektu (SA) a úzko vymedzené repetitívne vzorce správania (UVRZ), na základe ktorých sme získali celkové skóre (SA+UVRZ). Deti boli vyšetrené rôznymi modulmi podľa úrovne expresívnej reči a veku dieťaťa.

ADI-R je štruktúrovaný rozhovor medzi rodičom dieťaťa a diagnostikom, ktorým sme získali informácie o prítomnosti kvalitatívnych abnormalít v troch oblastiach: suma A: recipročná sociálna interakcia, suma B: sociálna komunikácia, suma C: úzko vymedzené, repetitívne a stereotypné vzorce správania a aktivít.

Deti zaradené do štúdie museli spĺňať kritéria pre PAS v oboch diagnostických metódach.

Spánkové parametre: na hodnotenie prevalencie a jednotlivých typov spánkových porúch sme použili dotazník spánkových návykov dieťaťa (The Children's Sleep Habits Questionnaire – CSHQ). Je vyplňaný rodičom dieťaťa, pričom pri každom výroku vyberá z troch možností podľa výskytu frekvencie daného správania u dieťaťa v priebehu typického týždňa (zvyčajne/niekedy/zriedka). Maximálny počet dosiahnutých bodov je 99, najnižšie skóre je 33 bodov. Hranica pre potvrdenie poruchy spánku je 41, viac bodov predstavuje vyšší výskyt problémov so spánkom. Hodnotí sa 8 subškál: vzdor pri večierke, oneskorenie zaspávania, dĺžka spánku, spánková úzkosť, prebúdzenie počas noci, parasomnie, spánkové poruchy dýchania, denná ospalosť (7). V súčasnosti ide o najpoužívanejší štandardizovaný dotazník na hodnotenie spánku u detí s PAS (8).

Biologické parametre: Vzorky prvého ranného moču odobrali rodičia v domácom prostredí po prebudení dieťaťa. Poobedné odbery vzoriek boli realizované v čase obeda alebo v skorých popoludňajších hodinách. Vzorky sa skladovali zmrazené pri -20°C až do analýzy. Hladiny aMT6s v moči boli stanovené RIA metódou prostredníctvom komerčne dostupného setu (Stockgrand LTD., Guildford, UK). Hladina kreatinínu bola stanovená enzymatickou metódou (Erba Lachema, CZ) podľa odporúčania výrobcu.

Štatistická analýza: Na testovanie rozdielov medzi skupinami bol použitý dvojjvýberový t-test alebo Mann-Whitneyov U test. Na vyhodnotenie denných rozdielov aMT6s boli hodnoty logaritmicky transformované (so základom 2). Relatívne frekvencie a rozdiely medzi dvoma kategorickými premennými boli testované chí-kvadrátom alebo binomickými testami. Na určenie asociácie medzi vybranými premennými sme použili Spearmanove korelačné koeficienty. Štatistické analýzy sa uskutočňovali pomocou softvéru StatsDirect 3.0.191 (Stats Direct Ltd., Cheshire, UK) a softvéru Statistica 13.1 (TIBCO Software Inc., US). Rozdiely sa považovali za významné pri $p < 0,05$.

Výsledky

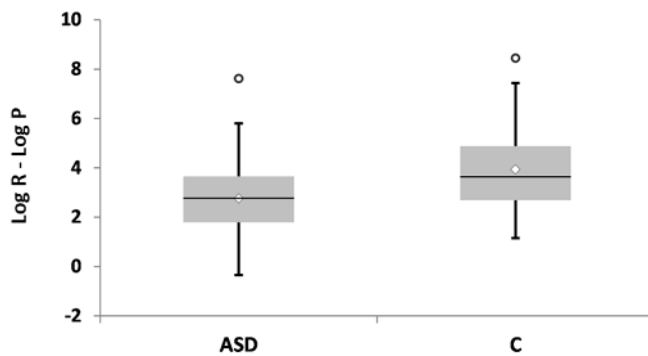
V tabuľke č.2 sú uvedené koncentrácie aMT6s, kreatinínu a aMT6s/kreatinín v ranných a popoludňajších vzorkách moču. Koncentrácia kreatinínu v moči vykazovala väčšiu variabilitu v skupine detí s PAS. Keďže tento faktor súvisí s koncentráciou biomarkerov v moči, pre presnejšiu interpretáciu výsledkov bol aMT6s štandardizovaný na hladiny kreatinínu (aMT6s/kreatinín). Priemerné hladiny aMT6s/kreatinín v ranej vzorke moču detí s PAS boli signifikantne nižšie v porovnaní s kontrolami ($p < 0,001$). Hodnoty aMT6s/kreatinín v popoludňajších vzorkách neboli významne rozdielne.

Tabuľka 2. Bivariačná analýza hladín aMT6s, kreatinínu a aMT6s/kreatinín vo vzorkách ranného (R) a poobedného (P) moču detí s PAS a kontrolnej skupiny (C)

| Charakteristika | PAS | Kontrola | Rozdiel PAS-C | p |
|----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|---------|
| R - aMT6s, ng/mL | 55.3 (38.6-119.9) | 76.0 (45.2-112.2) | -20.71 | 0.259 |
| R - kreatinín, mg/mL | 0.72 (0.44-1.14) | 0.52 (0.34-0.71) | 0.20 | 0.001 |
| R - aMT6s/kreatinín, ng/mg | 92.02 (58.38-149.64) | 149.72 (90.38-223.33) | -57.70 | < 0.001 |
| P - aMT6s, ng/mL | 6.98 (2.76-14.59) | 3.83 (1.25-8.39) | 3.15 | 0.002 |
| P - kreatinín, mg/mL | 0.57 (0.31-1.14) | 0.34 (0.14-0.66) | 0.23 | 0.001 |
| P - aMT6s/kreatinín, ng/mg | 11.37 (5.44-22.21) | 10.39 (4.56-20.54) | 0.98 | 0.221 |

Dáta sú prezentované ako medián a dolný-horný kvartil, R-ranné hodnoty, P-popoludňajšie hodnoty, p-štatistická významnosť

Skupinové priemery nevyjadrujú individuálne rozdiely medzi rannými a popoludňajšími hladinami aMT6s/kreatinín, preto sme vyhodnotili priemerné hodnoty individuálnych rozdielov medzi rannou a popoludňajšou hodnotou. U všetkých jedincov sme zaznamenali pokles hladín počas dňa s výnimkou jedného probanda s PAS. V skupine s PAS bol rozdiel menší a rovnal sa hodnote 2,8 (95 % CI: 2,4 – 3,1), v kontrolnej skupine boli rozdiely signifikantne väčšie 3,6 (95 % CI: 3,6 - 4.3, $p < 0,001$). Keďže ide o údaje vyjadrené ako logaritmus, naše výsledky vlastne preukazujú, že koncentrácie aMT6s/kreatinín v popoludňajšom moči detí s PAS boli priemerne 6,8 krát nižšie (95% CI: 5,3-8,7) než v rannom, zatiaľ čo v kontrolnom súbore bol rozdiel 12,5 násobný (95% CI: 11,8-19,9).



Graf 1. Rozdiely medzi logaritmicke transformovanými rannými (Log R) a popoludňajšími (Log P) hladinami aMT6s/kreatinín u detí s PAS a kontrolnej skupiny

Vyhodnotenie spánkového dotazníka: U detí s PAS sa poruchy spánku vyskytovali častejšie (81,5% vs 65%, $p=0,026$). V rámci jednotlivých typov porúch spánku, sme v skupine detí s PAS zaznamenali vyššie skóre CSHQ, čiže častejší výskyt problémov so vzdorom pri večierke, parasomniami, spánkovou úzkosťou, ako aj celkovou dĺžkou spánku.

Avšak nepotvrdili sme významné korelácie medzi hodnotami aMT6s/kreat in popoludňajších vzorkách moču s poruchami spánku. Taktiež boli pozorované iba nekonzistentné korelácie medzi závažnosťou porúch spánku a behaviorálnymi parametrami.

Tabuľka 3. Spearmanove korelačné koeficienty medzi sledovanými premennými v skupine detí s PAS

| | aMT6s/kreat | SA Suma (ADOS- 2) | UVRS Suma (ADOS- 2) | Miera Symptómov (ADOS-2) | A_SUM% (ADI-R) | B_SUM% (ADI-R) | C_SUM% (ADI-R) |
|------------------------------|-------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| aMT6s/kreat | | -0,144 | 0,048 | -0,177 | -0,104 | 0,113 | 0,003 |
| SUMA CSHQ | 0,25 | 0,155 | 0,091 | 0,144 | -0,111 | -0,111 | 0,012 |
| Vzdor pri večierke | 0,307 | 0,111 | 0,306 | 0,208 | 0,006 | 0,168 | 0,132 |
| Oneskorenie zaspávania | 0,129 | 0,065 | 0,083 | 0,140 | 0,017 | -0,062 | -0,061 |
| Dĺžka spánku | -0,026 | 0,185 | -0,051 | 0,162 | -0,024 | 0,011 | 0,007 |
| Spánková úzkosť | 0,277 | -0,033 | 0,149 | -0,030 | -0,127 | 0,057 | 0,086 |
| Prebúdzanie sa počas noci | 0,524 | -0,106 | 0,187 | -0,096 | -0,001 | -0,099 | 0,048 |
| Parasomnie | 0,195 | -0,167 | -0,074 | -0,222 | -0,050 | -0,138 | 0,015 |
| Spánkové poruchy dýchania | 0,03 | -0,134 | -0,143 | -0,236 | -0,046 | -0,195 | 0,152 |
| Denná ospalosť | -0,155 | 0,218 | -0,115 | 0,110 | -0,177 | -0,267 | -0,220 |

Diskusia

Viaceré štúdie použitím subjektívnych i objektívnych metód jednoznačne potvrdili vyššiu prevalenciu porúch spánku u jedincov s PAS (9). U mladších detí rodičia uvádzajú najmä problémy so vzdorom pred spánkom, spánkovú úzkosť, častejšie nočné prebúdzanie a parasomnie, zatiaľ čo staršie deti majú viac problémov so zaspávaním, celkovou dobou spánku a dennou ospalosťou (10). V našej štúdii sme preukázali vyššiu prevalenciu spánkových porúch ako aj špecifických problémov so spánkom u detí s PAS uvádzaných v literatúre. Etiopatogenéza spánkových porúch je stále neobjasnená. Predpokladá sa vzájomná interakcia vonkajších i vnútorných faktorov. Štúdie zaoberajúce sa melatonínom u detí s PAS poukazujú na odlišnosti v jeho vylučovaní. Okrem signifikantne nižšej hladiny melatonínu v sére a nižšej nočnej koncentrácie sa v niektorých štúdiách uvádza aj rozdiel v denných koncentráciách (11-14). V našej štúdii sme zistili znížený aMT6s/kreatinín v ranej vzorke moču, ktorá odzrkadľuje nižšiu nočnú produkciu melatonínu, ako aj menšie cirkadiálne kolísanie melatonínu u detí s PAS. Zmeny v hladinách melatonínu podporujú myšlienku o jeho možnej úlohe biomarkera v PAS. Štúdie sa zamerali aj na gény zapojené do syntézy, transportu a degradácie melatonínu. Výsledky naznačujú, že abnormality v expresii génov melatonínovej dráhy, môžu byť zodpovedné za jeho nízke hladiny a cirkadiálne poruchy u jedincov s PAS (6,9). V našom súbore sme nepotvrdili významnú koreláciu medzi zníženým vylučovaním melatonínu a poruchami spánku, ako aj príznakmi základného ochorenia. V literatúre sa uvádza, že sa spánkové poruchy vyskytujú častejšie pri závažnejšom stupni PAS, môžu súvisieť s kognitívnymi funkciami, problémovým správaním, impulzívnosťou i pridruženými komorbiditami (15). Jedna z možných príčin môže byť veková štruktúra, resp. ďalšie charakteristiky účastníkov štúdie. Terapia porúch spánku je multifaktoriálna. Podávanie melatonínu je jedna z terapeutických možností, ktorá by však mala nastúpiť v prípade, že sú behaviorálne metódy neučinné.

Podporené grantmi APVV 15-0085, APVV 15-0045, APVV 18-0174, VEGA 1/0141/17

Zoznam použitej literatúry

1. American Psychiatric Association, Association AP: Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing. 2013.
2. Mazzone L, Postorino V, Siracusano M, Riccioni A, Curatolo P: The relationship between sleep problems, neurobiological alterations, core symptoms of autism spectrum disorder, and psychiatric comorbidities. *Journal of Clinical Medicine* 2018; 7:102.
3. Zisapel N: New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175:3190–3199.
4. Zee PC, Attarian H, Videnovic A: Circadian rhythm abnormalities. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2013; 19:132–147.
5. Arendt J: Melatonin. *Clinical Endocrinology* 1998; 29:205–229.
6. Gagnon K, Godbout R: Melatonin and comorbidities in children with autism spectrum disorder. *Current Developmental Disorders Reports* 2018; 5:197–206.
7. Owens JA, Spirito A, McGuinn M: The Children's Sleep Habits Questionnaire (CSHQ): psychometric properties of a survey instrument for school-aged children. *Sleep* 2000; 23:1043–1051.
8. Hodge D, Parnell A, Hoffman CD, Sweeney DP: Methods for assessing sleep in children with autism spectrum disorders: A review. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2012; 6:1337–1344.
9. Carmassi C, Palagini L, Caruso D, Masci I, Nobili L, Vita A, Dell'Osso L: Systematic Review of Sleep Disturbances and Circadian Sleep Desynchronization in Autism Spectrum Disorder: Toward an Integrative Model of a Self-Reinforcing Loop. *Front Psychiatry* 2019; 10: 366.
10. Goldman SE, Richdale AL, Clemmons T, Malow BA: Parental sleep concerns in autism spectrum disorders: Variations from childhood to adolescence. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2012; 42:531–538.
11. Nir I, Meir D, Zilber N, Knobler H, Hadjez J, Lerner Y: Brief report: Circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 1995; 25:641–654.
12. Kulman G, Lissoni P, Rovelli F, Roselli MG, Brivio F, Sequeri P: Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. *Neuro Endocrinology Letters* 2000; 21:31–34.
13. Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y: Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biological Psychiatry* 2005; 57:134–138.
14. Tordjman S, Anderson GM, Bellissant E, Botbol M, Charbuy H, Camus F, Graignic R, Kermarrec S, Fougereou C, Cohen D, Touitou Y: Day and nighttime excretion of 6-sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37:1990–1997.
15. Tzischinsky O, Meiri G, Manelis L, Bar-Sinai A, Flusser H, Michaelovski A, Zivan O, Ilan M, Faroy M, Menashe I, Dinstein I: Sleep disturbances are associated with specific sensory sensitivities in children with autism. *Molecular Autism* 2018; 9:22.