

Rola wybranych polimorfizmów w regulacji ekspresji genu *CD38* i ich wpływ na ryzyko oraz obraz kliniczny zaburzeń ze spektrum autyzmu

The role of selected polymorphisms in regulation of gene *CD38* expression and their effect on the clinical picture of autism spectrum disorders – preliminary study

Krzysztof M. Wilczyński^{1,2}, Aleksandra Auguściak-Duma³, Aleksandra Stasik², Lena Cichoń^{1,2}, Małgorzata Janas-Kozik^{1,2}

¹ Katedra Psychiatrii i Psychoterapii Wieków Rozwojowego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II w Sosnowcu Sp. z o.o.

³ Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Summary

Aim. Clinical effects observed in cases of oxytocin deficiency can also manifest themselves in disorders of mechanisms responsible, for example, for its secretion. For oxytocin, this function is played by – among others – the cluster of differentiation antigen 38 (CD38). Existing literature along with the correlation between protein CD38 and oxytocin secretion raise interest in the context of their possible relation to the clinical picture and development of the autism spectrum disorders (ASD). The aim of the study was to analyze the correlations between polymorphisms *rs3796863* and *rs6449197* in gene *CD38*, the level of gene expression and the clinical picture and the risk of ASD diagnosis.

Method. The study included 59 individuals with the mean age of 15.05 years with IQ > 90. The participants were divided into two groups: the studied group consisting of 37 persons with confirmed ASD diagnoses and the control group including 22 neurotypical individuals. Diagnosis verification was carried out via the ADOS-2 protocol.

Results. The comparative analysis with the standardized population based on the 1000Genomes database with the presence of clinically significant intensification of ASD traits showed the correlation of alleles “T” of polymorphisms *rs3796863* and *rs6449197*, which are more frequent in the general population and are treated as “wild”. In the inter-group analysis, this type of dependency was weaker, and the genotype of the control group was somehow intermediate between the studied group and the standardized population. In the $\Delta\Delta Ct$ analysis, the

normalized value of the relative expression level of gene *CD38* showed that in the studied group the expression level was around 1.1–1.2 times higher than in the control group. **Conclusions.** The obtained results show that a significant correlation with the severity of autism spectrum disorder traits is mainly observed in the carriers of wild variants of the studied polymorphisms, in which the related increase in the expression level of gene *CD38* is also observed.

Słowa klucze: ASD, oksytocyna, *CD38*

Key words: ASD, oxytocin, *CD38*

Wstęp

W ostatnich latach duże zainteresowanie w kontekście badań nad deficytami kompetencji społecznych i w populacji neurotypowej, i wśród osób z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (*Autism Apectrum Disorder* – ASD), wzbudziły zaburzenia w zakresie układu oksytocynergicznego [1, 2]. Dostępnych jest wiele publikacji analizujących potencjalny udział oksytocyny w rozwoju ASD, zarówno w zakresie jej stężenia we krwi [3], jak i polimorfizmów w obrębie genów odpowiadających za jej receptory [4], lecz znakomita większość tych prac prezentuje wyniki niejednoznaczne, a często – sprzeczne.

Efekty kliniczne, jakie się obserwuje przy niedoborze oksytocyny, mogą być również obecne w zaburzeniach w zakresie ich receptorów lub mechanizmów odpowiedzialnych np. za ich sekrecję. W wypadku oksytocyny mowa m.in. o genie dla antygeny różnicowania komórkowego 38 (*Cluster of Differentiation 38* – CD38) [5]. CD38 jest białkiem transbłonowym, pełniącym funkcje enzymatyczne i transportowe, przy czym jego funkcja obejmuje m.in. cyklizację dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺) do cyklicznej ADP-rybozy (cADPR), odgrywającej istotną rolę w gospodarce wapniowej w obrębie m.in. neuronów. Ma to kluczowe znaczenie dla procesów związanych z neuroplastycznością i dojrzewaniem mózgowia, a także wydzielaniem niektórych neuroprzekaźników – w tym oksytocyny [5, 6]. Dostępne doniesienia z literatury przedmiotu skupiają się przede wszystkim na badaniach na zwierzętach. Przykładowo u myszy pozbawionych genu *CD38* obserwowano zaburzenia w zakresie pamięci społecznej i zachowań macierzyńskich [7, 8]. Badania nad kompetencjami społecznymi i relacjami w zależności od genotypu *CD38* były oczywiście prowadzone również w populacji ludzkiej. Przykładowo w 2021 roku opublikowano badanie Makhanovej i wsp. [9] wskazujące na występowanie istotnego związku między genotypem polimorfizmu *rs3796863* a zadowoleniem i powodzeniem w tworzeniu więzi w ramach związku małżeńskiego. Również w 2021 roku Krol i wsp. [10] powiązali genotyp „CC” *rs3796863* z motywacją społeczną u niemowląt. Z kolei np. w badaniu Huettera i wsp. [11] nie stwierdzono związku genotypu *rs3796863* z poziomami empatii u neurotypowych uczestników. Oczywiście wymienione publikacje to tylko niektóre opracowania dotyczące analizy różnych aspektów kompetencji społecznych w odniesieniu do genotypu *CD38*. Różnorodność przedmiotu badań wszakże sprawia, że wyniki te są niejednorodne, a przez to trudno wyciągać na ich podstawie konkretne wnioski. Wciąż jednak dane z piśmiennictwa, jak również związki białka CD38 z sekrecją oksytocyny budzą zainteresowanie w kontekście ich możliwego powiązania

z obrazem klinicznym i rozwojem ASD. Lecz na ten temat znaleźć można w bazie PubMed tylko dwie publikacje. Pierwsza to oryginalna praca autorstwa Muneseo i wsp. [12] z 2010 roku. Opisywano w niej badanie przeprowadzone na podstawie materiału genetycznego dostępnego w ramach *Autism Genetic Resource Exchange* (AGRE), w którym wykazano istotny związek allelu „C” polimorfizmu *rs3796863* z wystąpieniem autyzmu w populacji amerykańskiej, ale nie obserwowano tego typu relacji w populacji japońskiej. W analizie typu testu asocjacji opartego na badaniach rodzinnych w drugiej kohorcie z populacji amerykańskiej stwierdzono istotność statystyczną w wypadku polimorfizmów *rs3796863* oraz *rs6449197*. Pozostałe 8 polimorfizmów w obrębie genu *CD38* nie przejawiało istotnych statystycznie związków z ryzykiem autyzmu w żadnej z badanych kohort.

Drugą publikacją była praca Lerera i wsp. [13] z 2010 roku, w której analizowano polimorfizmy oraz poziomy ekspresji dla genu *CD38* u osób z niskofunkcjonującym autyzmem (IQ < 70) oraz u ich neurotypowych rodziców. Autorzy tej pracy analizowali jednocześnie haplotypy (w tym obejmujące polimorfizm *rs3796863*) i poziomy ekspresji *CD38*. Allel „C” *rs3796863* był istotnie powiązany z diagnozą autyzmu w czterech z pięciu badanych haplotypów. Oprócz tego powiązano allel „C” z obniżonym poziomem ekspresji *CD38* i wykazano związek obniżonego poziomu ekspresji *CD38* z ryzykiem autyzmu u osób z niepełnosprawnością intelektualną.

Dodatkowo w bazie PubMed zidentyfikowano jeszcze jedną publikację analizującą poziomy transkrypcji wybranych genów powiązanych w przeszłości z ryzykiem ASD, w tym genu *CD38*. Thansem i wsp. [14] w swoim badaniu przeprowadzonym na pobranych *post mortem* tkankach mózgowia 8 pacjentów z ASD i 13 osób neurotypowych wykazali zwiększenie poziomów ekspresji genu *CD38* u osób z ASD. Zmiany w zakresie ekspresji analizowanych genów łączyli oni ze zmianami ekspresji dla genu *Transcription Factor Specificity Protein 1* (Sp1). Czynniki Sp1 reguluje ekspresję szerokiej palety genów, w tym wielu powiązanych z zaburzeniami ze spektrum autyzmu ASD.

Zatem dostępna literatura, jeśli chodzi o relację między diagnozą autyzmu a genotypem polimorfizmów w obrębie *CD38*, jest niezwykle uboga, a wyniki badań są niejednoznaczne. W związku z tym autorzy niniejszej pracy podjęli się szczegółowej analizy relacji między objawami ASD a polimorfizmami i ekspresją genu *CD38*. Artykuł stanowi podsumowanie wstępnych wyników projektu, którego celem jest ocena wpływu genotypów polimorfizmów w obrębie genu *CD38*, jak również poziomów jego ekspresji we krwi obwodowej na obraz kliniczny i ryzyko ASD.

Material i metody

Uczestnicy badania

Badania prowadzone były w Katedrze Psychiatrii i Psychoterapii Wieku Rozwojowego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, w Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II w Sosnowcu Sp. z o.o. we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej SUM w Katowicach. Uczestnicy rekrutowani byli spośród pacjentów Centrum Pediatrii

im. Jana Pawła II w Sosnowcu, w tym w ramach Oddziału Klinicznego Psychiatrii i Psychoterapii Wieków Rozwojowego SUM, przyklinicznej poradni zdrowia psychicznego oraz spośród uczniów szkół na terenie województwa śląskiego. Świadoma zgoda na udział w badaniu była uzyskiwana – po udzieleniu szczegółowych informacji na temat projektu – zarówno od rodziców, jak i od samych uczestników.

Kryteria włączenia do grupy badanej obejmowały potwierdzenie za pomocą protokołu ADOS-2 rozpoznania zaburzenia ze spektrum autyzmu ASD, wcześniej postawionego przez specjalistę psychiatrii dzieci i młodzieży. Kryteria wykluczenia z grupy badanej i kontrolnej obejmowały: (1) współtowarzyszące rozpoznanie innego zaburzenia psychiatrycznego, (2) wiek poniżej 12 oraz powyżej 19 lat, (3) współistniejącą niepełnosprawność intelektualną, (4) padaczkę, (5) znane genetyczne, neurometaboliczne etc. podłoże obserwowanych objawów (np. zespół kruchego chromosomu X) – tzw. autyzm plus, (6) zły stan somatyczny, (7) rozpoznanie poważnej choroby wątroby, nerek lub serca, (8) niedoczynność tarczycy. Dodatkowo w wypadku grupy kontrolnej kryterium wykluczenia stanowiły: (1) podejrzenie lub diagnoza zaburzeń ze spektrum autyzmu ASD w wywiadzie, (2) obecność osoby z diagnozą zaburzeń ze spektrum autyzmu ASD wśród krewnych I i II stopnia.

Dane zebrane w ramach badania były pseudonimizowane. Badanie objęło 59 osób w wieku średnio 15,05 lat (95% CI: 14,24–15,86; min./max.: 8/20) z IQ > 90. Uczestnicy byli podzieleni na dwie grupy na podstawie potwierdzonej lub wykluczonej diagnozy zaburzeń ze spektrum autyzmu ASD według kryteriów DSM-5 i ICD-10, a następnie z wykorzystaniem protokołu ADOS-2. Grupa badana obejmująca uczestników z potwierdzoną diagnozą ASD składała się z 37 osób w średnim wieku 14,1 lat (95% CI: 13,23–15,15), z czego 32,4% ($n = 12$) stanowiły kobiety. Grupa kontrolna obejmowała 22 osoby w średnim wieku 16,3 lat (95% CI: 15,01–17,65), z czego 18,1% ($n = 4$) stanowiły kobiety. Obserwowana różnica w zakresie wieku była istotna statystycznie ($p < 0,05$), przy czym w wypadku analizy łączonej grup, mającej na celu ocenę zależności między genotypami badanych polimorfizmów a np. poziomem ekspresji genów, nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie wieku.

Analiza psychometryczna

U wszystkich uczestników wykonane zostało badanie protokołem ADOS-2 z wykorzystaniem modułów korespondujących dla wieku oraz poziomu językowego uczestników. Protokół ADOS-2 jest narzędziem, które obejmuje zestaw prób prowokujących osobę badaną do określonych zachowań społecznych. Na podstawie obserwacji diagnosta ocenia zachowania badanego w pięciu kategoriach: (1) „Język i komunikacja”, (2) „Wzajemność w interakcjach społecznych”, (3) „Zabawa/wyobraźnia”, (4) „Zachowania stereotypowe i sztywne zainteresowania”, (5) „Inne zachowania odbiegające od normy”. Efektem badania jest uzyskanie wyniku ilościowego w dwóch skalach (afekt społeczny i ograniczone powtarzalne zachowania) oraz wyniku całkowitego pozwalającego na określenie stopnia nasilenia objawów związanych ze spektrum autyzmu. W dalszych analizach przede wszystkim skupiono się na wyniku porównawczym (ADOS:WP), domenie afektu społecznego (ADOS:SA) oraz

domenie powtarzalnych i stereotypowych schematów zachowań oraz zainteresowań (ADOS:RRB). Oprócz tego w badaniu wykorzystano:

- Test *Reading Mind in the Eyes* (RMiE) – jest to narzędzie zaprojektowane przez Baron-Cohena [15, 16], które w wersji aplikowanej w naszym badaniu składa się z 28 obrazów prezentujących wycinki oczu otoczonych 4 określeniami stanu psychicznego, z których badany ma wybrać jeden, odpowiadający danej rycinie. Badanie jest wykonywane bez limitu czasu.
- Test *Autism Quotient* (AQ) [17] – jest to kwestionariusz skonstruowany w 2001 roku do oceny prawdopodobieństwa diagnozy zaburzeń ze spektrum autyzmu. Składa się z 50 pytań wraz z odpowiedziami opartymi na 4-punktowej skali Likerta.
- Test *Empathy Quotient* (EQ) – jest to narzędzie zaprojektowane przez Baron-Cohena (w tłumaczeniu Jankowiak-Siudy i wsp. [18] z 2017 roku), pozwalające na określenie różnic indywidualnych w zakresie zdolności do empatyzowania. W prezentowanej pracy zastosowano wersję Wakabayashi i wsp. zawierającą 22 pozycje testowe [19].

Zgoda komisji bioetycznej i źródło finansowania

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej SUM wydaną uchwałą nr KNW/0022/KB1/123/18/19 z dnia 8.01.2019 roku.

Koszty badania zostały pokryte ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach umów o pracę statutową nr KNW-2-K18/D/9/N oraz KNW-1-178/N/9/K.

Analiza molekularna

Analiza polimorfizmów DNA

DNA izolowano z 200 μ l krwi obwodowej pobieranej na EDTA za pomocą GeneMatrix Quick Blood DNA Purification Kit (EuRX, Polska) zgodnie z wytycznymi producenta. Oceny jakościowej i ilościowej DNA dokonywano spektrofotometrycznie na urządzeniu NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie wykonywano analizę genotypowania, w dwóch powtórzeniach, na termocyklerze Light-Cycler480 II (Roche, Niemcy) z użyciem sond TaqMan SNP Genotyping Assay (dla *rs3796863*: c_1216944_10; dla *rs6449197*: c_31096525_20) (Applied Biosystems, USA) oraz TaqPath ProAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) zgodnie z wytycznymi producenta.

Analiza ekspresji RNA

Całkowite mRNA izolowano z krwi obwodowej pobieranej do PaxTube, w celu zachowania integralności RNA, z użyciem PaxGene Blood RNA Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z wytycznymi producenta. Oceny jakościowej i ilościowej RNA

dokonywano spektrofotometrycznie na urządzeniu NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Do reakcji odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Roche, Niemcy) pobierano 500 ng całkowitego RNA. Analizy ekspresji dokonywano z wykorzystaniem TaqMan Gene Expression Assay – sonda Hs01120071_m1 dla genu *CD38*, sonda Hs03929097_g1 dla genu referencyjnego *GAPDH* (Applied Biosystems, USA) – oraz TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA). Reakcję dla 50 ng cDNA przeprowadzano w termocyklerze czasu rzeczywistego LightCycler480 II (Roche, Niemcy) w dwóch powtórzeniach. Wyniki z ekspresji analizowano za pomocą programu GenEx ver6 (MultiD Analyses AB, Szwecja). Analizy surowych danych wykonywano, używając metody ΔCt , czyli ekspresji względnej, następująco: surowe dane normalizowano do powtórzeń technicznych, do ilości cDNA i na końcu do genu referencyjnego *GAPDH*. W wypadku analizy $\Delta\Delta Ct$, czyli metody komparatywnej, dodatkowym krokiem była normalizacja do kalibratora.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą oprogramowania StatSoft Statistica w wersji 13. Przyjęty poziom istotności statystycznej wynosił $\alpha = 0,05$. Do analizy częstości alleli wybranych polimorfizmów wykorzystano wzór na częstość wynikający z prawa Hardy’ego-Weinberga określającego stosunki między frekwencją alleli a częstością genotypów w populacji.

Zastosowany wzór:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 \text{ przy założeniu } p + q = 1$$

W prezentowanym badaniu p odpowiada częstości allelu dzikiego, natomiast q częstości allelu zmutowanego.

W kontekście poziomów ekspresji genu *CD38* do analiz wykorzystywano metodę $\Delta\Delta Ct$. W wypadku analiz statystycznych wyników kwestionariuszy w odniesieniu do poziomów ekspresji *CD38* wykorzystano wartości ΔCt . Przy porównaniu poziomów ekspresji między grupą badaną i kontrolną oraz osobami posiadającymi allel zmutowany oraz homozygotami pod względem allelu dzikiego wykorzystano wzór na znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji badanego genu:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gdzie wartość $R = 1$ oznacza, że poziomy ekspresji między analizowanymi grupami są równe.

Wyniki

	Grupa badana		Grupa kontrolna		Populacja wzorcowa*	
	rs6449197 C > T	rs3796863 G > T	rs6449197 C > T	rs3796863 G > T	rs6449197 C > T	rs3796863 G > T
p-freq	0,89	0,75	0,83	0,65	0,74	0,57

dalszy ciąg tabeli na następnej stronie

q-freq	0,11	0,24	0,17	0,34	0,26	0,43
p-value vs. PW	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05	n/d	n/d

Rozkład częstości genotypów dla obu analizowanych polimorfizmów był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga. Rozkłady alleli polimorfizmów w grupie kontrolnej, badanej oraz populacji wzorcowej [20] prezentuje tabela 1 Średnie wyniki zastosowanych kwestionariuszy w grupie badanej i kontrolnej pokazano w tabeli 2.

Tabela 2. Średnie wyniki badanych kwestionariuszy w grupie badanej i kontrolnej

	Grupa badana		Grupa kontrolna		p-value*
	Średnia	95% CI	Średnia	95% CI	
ADOS: SA	12,92	11,6–14,1	3,04	2,2–3,8	<0,05
ADOS: RRB	1,96	1,2–2,7	0,47	0,1–0,7	<0,05
ADOS: WP	7,21	6,5–7,9	1,57	1–2,1	<0,05
EQ	14,84	10,6–19	24,38	20,9–27,8	<0,05
AQ	26,3	22,4–30,2	15,75	12,8–18,7	<0,05
RMiE	0,58	0,5–0,65	0,65	0,59–0,71	0,33

* Test U Manna-Whitneya

W analizie różnic rozkładu alleli między grupą badaną i kontrolną a populacją wzorcową wykazano istnienie istotnych statystycznie różnic w teście χ^2 . W wypadku obu polimorfizmów w grupie badanej częstość allelu zmutowanego była niższa niż w populacji wzorcowej. W grupie kontrolnej tego typu sytuacja dotyczyła polimorfizmu *rs3796863*, natomiast w wypadku polimorfizmu *rs6449197* różnic w rozkładzie nie obserwowano. Analizowano również różnicę w rozkładzie alleli polimorfizmów między populacją kontrolną a badaną, jednakże obserwowane różnice w rozkładach nie uzyskały istotności statystycznej.

W przeprowadzonej analizie poziomów ekspresji genu *CD38* we krwi obwodowej średnia wartość ΔCt dla grupy badanej wynosiła 7,14 ($SD = 0,43$), a dla grupy kontrolnej 7,37 ($SD = 0,39$) (wyższy wynik oznacza niższy poziom ekspresji). W analizie $\Delta\Delta Ct$ znormalizowana wartość względnego poziomu ekspresji badanego genu między grupą badaną i kontrolną wynosiła $R = 1,16$ ($SD = 1,11–1,21$), co oznacza, że w grupie badanej poziom ekspresji genu *CD38* był o mniej więcej 1,1–1,2 razy wyższy niż w grupie kontrolnej. Jednocześnie zbadano wpływ samego w sobie genotypu badanych polimorfizmów na poziom ekspresji odpowiednich genów zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. W wypadku polimorfizmu *rs6449197* obecność allelu zmutowanego prowadziła do obniżenia ekspresji białka CD38 o średnio 14% ($R = 0,86$; $SD = 0,84–0,89$). Wariant zmutowany polimorfizmu *rs3796863* również się wiązał z obniżeniem poziomu ekspresji o jakieś 6% ($R = 0,94$; $SD = 0,93–0,95$). Finalnie przeprowadzono analizę regresji logistycznej, analizującej związek obniżenia poziomu ekspresji *CD38* z ryzykiem ASD, nie uzyskując istotnej statystycznie zależ-

ności. Iloraz szans (*Odds Ratio* – OR) przynależności do grupy osób z ASD wynosił $OR = 0,28$ (95% CI: 0,07–1,06; $p = 0,06$).

Przeprowadzono również analizę OR wystąpienia ASD dla obu polimorfizmów. W wypadku *rs6449197* wystąpienie wariantu zmutowanego wiązało się z $OR = 0,92$ (95% CI: 0,3–2,76), a przy *rs3796863* $OR = 0,98$ (95% CI: 0,36–2,62). Oba parametry były nieistotne statystycznie.

W dalszej kolejności przeprowadzono analizę korelacji między wartościami ΔCt a wykorzystanymi kwestionariuszami. Wzrost poziomów ekspresji genu dla *CD38* wykazywał istotną korelację z wynikiem badania ADOS-2 w niskim stopniu ($r = 0,28$; $p < 0,05$) oraz w umiarkowanym z podskalą afektu społecznego ($r = 0,34$; $p < 0,05$). Podobnie w zakresie narzędzia *Reading Mind in the Eyes* wzrost ekspresji *CD38* wiązał się z pogorszeniem uzyskanych wyników ($r = -0,38$; $p < 0,05$). Pozostałe narzędzia nie wykazywały istotnego statystycznie związku z poziomem ekspresji *CD38*.

Porównano także wyniki tych kwestionariuszy między nosicielami co najmniej jednego allelu zmutowanego badanych polimorfizmów a homozygotami pod względem allelu dzikiego. Statystycznie istotne różnice zaobserwowano w wypadku SNP *rs3796863* dla wyniku ogólnego ADOS-2 ($p = 0,004$) oraz podskali afektu społecznego ($p = 0,007$). W odniesieniu do SNP *rs6449197* nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w analizowanych kwestionariuszach, jednakże w teście *Reading Mind in the Eyes* różnica była na granicy istotności statystycznej ($p = 0,051$). Dokładne wyniki prezentują tabele 3 i 4.

Tabela 4. Średnie wyniki badanych kwestionariuszy w zależności od obserwowanego genotypu *rs6449197*

	Homozygota wariant dziki		Nosiciel allelu zmutowanego		p-value*
	Średnia	95% CI	Średnia	95% CI	
ADOS: SA	12,05	10,47–13,63	8,80	6,83–10,78	0,007**
ADOS: RRB	2,20	1,72–2,69	1,29	0,74–1,83	0,01**
ADOS: WP	6,73	5,88–7,58	3	3,77–5,97	0,004**
EQ	17,21	14,04–20,39	18,68	14,39–22,96	0,55
AQ	28,1	24,93–31,27	24,84	21,16–28,52	0,15
RMiE	0,61	0,57–0,66	0,66	0,6–0,72	0,27

	Homozygota wariant dziki		Nosiciel allelu zmutowanego		p-value*
	Średnia	95%CI	Średnia	95%CI	
ADOS: SA	12,05	10,47–13,63	8,80	6,83–10,78	0,059**
ADOS: RRB	2,20	1,72–2,69	1,29	0,74–1,83	0,15
ADOS: WP	6,73	5,88–7,58	3	3,77–5,97	0,16
EQ	17,21	14,04–20,39	18,68	14,39–22,96	0,49
AQ	28,1	24,93–31,27	24,84	21,16–28,52	0,26
RMiE	0,61	0,57–0,66	0,66	0,6–0,72	0,052**

* Test U Manna-Whitneya; ** wyniki istotne statystycznie przy $p < 0,1$

Dyskusja

Analizy rozkładu alleli w zakresie badanych polimorfizmów, w porównaniu z populacją wzorcową 1000Genomes, wykazują wyniki spójne z obserwacjami Munesuego i wsp. [19] oraz Lerera i wsp. [12]. Zarówno w populacji badanej, jak i kontrolnej odbiegały one w sposób istotny statystycznie od rozkładu oczekiwanego na podstawie populacji wzorcowej, zaczerpniętej z bazy 1000Genomes. Co ciekawe, powiązanie z ASD wykazywały allele „T” polimorfizmów *rs3796863* oraz *rs6449197*, które mają wyższą częstość w populacji ogólnej i traktowane są jako dzikie. Z nimi także łączyły się wyższe wyniki w badaniu ADOS-2 oraz, w wypadku polimorfizmu *rs6449197*, testu RMiE.

Inaczej wygląda jednak sytuacja z analizą porównawczą między grupą badaną oraz kontrolną. Rozkłady alleli polimorfizmów w grupie kontrolnej nie wykazują istotnych różnic względem rozkładów obserwowanych w grupie badanej. Jednocześnie w wypadku polimorfizmu *rs3796863* w grupie kontrolnej obserwowano istotne różnice w rozkładzie względem populacji wzorcowej. Co ciekawe, analizując surowe rozkłady, pomimo braku istotnych statystycznie różnic między grupą badaną a kontrolną, można zauważyć, że rozkład genotypów w grupie kontrolnej jest niejako pośredni między grupą badaną a populacją wzorcową. Podobnie wyniki w zakresie narzędzi EQ oraz RMiE w grupie kontrolnej odbiegają od oczekiwanych. Co prawda w EQ wynik był w sposób istotny statystycznie wyższy niż w grupie badanej, jednakże był również zauważalnie niższy od wyników uzyskiwanych w innych badaniach, np. w badaniu Wakabayashi i wsp. [19] z 2006 roku, gdzie średni wynik EQ w populacji neurotypowych mężczyzn był równy 39,0 ($SD = 11,56$). W RMiE wynik w grupie kontrolnej był również niższy niż oczekiwany np. na podstawie metaanalizy badań przeprowadzonej przez Penuelas-Calvo i wsp. z 2019 roku [21], gdzie średni wynik w badaniu RMiE-C w grupie neurotypowej wynosił 73,49%. Przy czym nie obserwowano znamiennej statystycznie różnicy między grupą kontrolną a badaną. Wyniki te wskazują, że wbrew niektórym doniesieniom odsetek prawidłowych odpowiedzi w RMiE, a co za tym idzie – zdolność do rozpoznawania stanów emocjonalnych na podstawie mimiki, nie pozwala różnicować pacjentów neurotypowych od osób z ASD.

Wyniki te przywodzą na myśl badania, które przeprowadzili Camodeca [22] oraz Miu i wsp. [23], gdzie tego typu zjawiska stanowiły zasadnicze cechy tzw. szerokiego fenotypu autyzmu (*Broad Autism Phenotype – BAP*), czyli właśnie konstelacji subklinicznych objawów ze spektrum autyzmu występujących w populacji osób neurotypowych. Początkowo zjawisko to badane było głównie u rodzin pacjentów z ASD i było traktowane jako poronna postać spektrum oraz jeden z argumentów za podłożem genetycznym autyzmu. Stopniowo jednak analizy objęły populację ogólną i np. w badaniu Dovgan i wsp. [24] odsetek osób z BAP wśród uczniów szkół wyższych wynosił 25,3% i nie był powiązany z deklarowanym wywiadem rodzinnym w stronę ASD. Dalsze badania wykazały, że nasilenie różnych „cech ze spektrum autyzmu” układa się zgodnie z rozkładem normalnym w populacji ogólnej [21]. To zaś naturalnie prowadziło do wniosku, że tak naprawdę spektrum autyzmu stanowi kontinuum w populacji ogólnej, obejmując zarówno osoby całkowicie pozbawione

tego typu cech na jednym biegunie, jak i wraz ze wzrostem nasilenia cech kwalifikujące się do grupy BAP, a następnie do pełnej diagnozy ASD – na drugim [24]. Tego typu hipoteza tłumaczyłaby rozkłady alleli obserwowane w prezentowanym badaniu. Przyjmując obowiązujące na ten moment teorie wskazujące na wielogenowe podłoże ASD [4] oraz analizując dotychczasowe badania można wysnuć hipotezę, że mamy do czynienia z efektem masy. Wraz ze wzrostem ilości alleli warunkujących cechy ASD w różnych genach obraz kliniczny coraz bardziej przybliża się do nasilenia uzasadniającego postawienie diagnozy. Tego typu pogląd tłumaczyłby również obserwowane związki między wariantami powiązаныmi z ASD a wynikami skal analizujących różne obszary diagnostyczne u osób bez diagnozy ASD.

W analizie zależności między genotypem badanych polimorfizmów oraz wynikami zastosowanych narzędzi badawczych istotnie statystycznie różnice zaobserwowano w zakresie obu podskal, jak i wyniku porównawczego ADOS-2 przy polimorfizmie *rs3796863*. W wypadku polimorfizmu *rs6449197* nie stwierdzono istotnych różnic między nosicielami allelu zmutowanego a osobami homozygotycznymi pod względem allelu dzikiego. Jednakże różnice w podskali afektu społecznego oraz RMiE pozostawały na granicy istotności statystycznej, co może wskazywać, że polimorfizm ten może wywierać w jakimś stopniu wpływ na kompetencje społeczne niezależnie od diagnozy.

W analizie różnic między rozkładami genotypów SNP w różnych genach często pomijana jest kwestia ich faktycznego efektu biologicznego. Wykazanie związku między polimorfizmem, który nie ma efektów ani strukturalnych, ani regulacyjnych na badany gen, sugeruje, że obserwowana zależność będzie prawdopodobnie przypadkowa. W badaniach Munesuego i wsp. [12] również zwrócono na ten fakt uwagę, wskazując na potrzebę badań analizujących biologiczne efekty badanych SNP.

Lokalizacja badanych polimorfizmów w obszarach intronowych genu *CD38* implikuje, że hipotetyczny wpływ ich genotypu na ryzyko/obraz kliniczny ASD wynikać będzie przypuszczalnie z modyfikacji ich poziomów ekspresji. Obecnie w literaturze przedmiotu brakuje tego typu badań, co ogranicza możliwość interpretacji uzyskanych wyników. W prezentowanym badaniu allele zmutowane obu polimorfizmów były powiązane z niższymi poziomami ekspresji, przy czym efekt ten był ponad dwukrotnie silniejszy w wypadku polimorfizmu *rs6449197*. Należy oczywiście pamiętać o możliwości występowania nierównowagi sprzężeń między badanymi polimorfizmami a innymi SNP w obrębie genu *CD38*, co mogłoby stanowić podstawę do zaistnienia pozornej zależności między badanym genotypem a poziomem ekspresji. Zakładając jednakże brak tego typu czynnika zakłócającego interpretację wyników, można stwierdzić, że oba polimorfizmy faktycznie mają wpływ na poziom ekspresji genu, a co za tym idzie – obserwowane różnice w rozkładach genotypów mogą przekładać się na faktyczne efekty biologiczne pod postacią np. zaburzeń poznania społecznego.

Biorąc pod uwagę fakt, że warianty zmutowane analizowanych polimorfizmów obniżały ekspresję genu *CD38* w prezentowanym badaniu, można oczekiwać, że w analizie porównawczej grupy badanej i kontrolnej poziomu ekspresji *CD38* będą wyższe niż w grupie kontrolnej. I faktycznie w analizie $\Delta\Delta Ct$ znormalizowana wartość względnego poziomu ekspresji badanego genu wskazywała, że w grupie badanej poziom ekspresji genu *CD38* był o mniej więcej 1,1–1,2 razy wyższy niż w grupie

kontrolnej. Ponadto w analizie wyników zastosowanych narzędzi wyższe poziomy ekspresji *CD38* były również istotnie powiązane z gorszymi wynikami w zakresie narzędzia ADOS-2 oraz testu RMI-E. Zależność ta nie znalazła jednak odzwierciedlenia w analizie regresji logistycznej, gdzie (przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$) poziomy *CD38* nie były w sposób istotny statystycznie powiązane z ryzykiem ASD. Należy wszakże zaznaczyć, że opisany model ryzyka uzyskałby istotność statystyczną przy założeniu poziomu istotności $\alpha = 0,1$.

Uzyskane wyniki w zakresie ekspresji genu *CD38* stoją mimo wszystko w sprzeczności z wynikami zaprezentowanymi przez Lerera i wsp. [12], u których allel „C” polimorfizmu *rs3796863*, jakkolwiek faktycznie powiązany z diagnozą ASD, był zarazem związany z obniżeniem ekspresji genu *CD38*, a zatem odwrotnie niż w naszym badaniu obniżona ekspresja *CD38* łączyła się z diagnozą ASD. Lecz obserwowana sprzeczność w zakresie związków poziomu ekspresji z diagnozą oraz polimorfizmem *rs3796863* może być efektem zasadniczej różnicy w doborze grupy badanej. Opisywana tutaj analiza obejmowała osoby z ASD na wysokim poziomie funkcjonowania, a tym samym w normie intelektualnej. Tymczasem Lerer i wsp. [12] badali osoby z niskofunkcjonującym autyzmem (IQ < 70). Biorąc pod uwagę wszechstronność oddziaływań białka CD38, jego udział w licznych procesach związanych z neuroplastycznością oraz dojrzewaniem mózgowia [25, 26], jak również jego znany wpływ na zdolności poznawcze (naukę i zapamiętywanie) w modelach zwierzęcych [27], związek tego białka z niepełnosprawnością intelektualną niezależnie od ASD wydaje się bardzo prawdopodobny. To zaś sugerowałoby z kolei, że uzyskana przez Lerera i wsp. [12] zależność z polimorfizmem *rs3796863*, jak i z samym ASD, mogłaby być przykładem błędu ekologicznego i wynikać z korelacji z niepełnosprawnością intelektualną.

W prezentowanym badaniu, jak również w badaniu Muneseo i wsp. [19] oraz Lerera i wsp. [12], intrygującym aspektem jest protekcyjna rola, którą wydają się odgrywać warianty zmutowane badanych polimorfizmów wobec ryzyka ASD. Przyjmując za punkt wyjścia do dalszych analiz hipotezę o powszechnym występowaniu cech ze spektrum autyzmu w populacji ogólnej i ich związku z narastającą ilością mutacji w obrębie różnych genów, zasadna byłaby rekonceptualizacja klinicznego podejścia do ASD jako bardziej „pierwotnej” formy procesów poznawczych człowieka, a „neurotypowość” należałoby traktować jako zdobycz ewolucyjną, która w różnym stopniu występuje u różnych osobników. Zdobycz, która w ostatnich dwóch stuleciach rozwoju techniki może tracić swoją uprzywilejowaną rolę na rzecz przewagi, jaką dają cechy ASD w nowoczesnym społeczeństwie. Osoby ze spektrum prezentują szeroką paletę umiejętności i talentów, które są naturalną konsekwencją osiowych objawów tej jednostki nozologicznej. W funkcjonowaniu tych osób możemy obserwować na przykład większe zdolności poznawcze, umiejętności mnemotechniczne, muzyczne, zdolność do szybkiej identyfikacji i analizy złożonych schematów i systemów, czyli cechy, które predysponują do pracy w obszarze nauki, technologii, inżynierii i matematyki [28]. Z tego względu osoby z ASD powszechnie zajmują się dziś dziedzinami nie tylko kluczowymi dla gospodarki i społeczeństwa, ale także związanymi z prestiżem i wyższym statusem finansowym. To zaś w konsekwencji sprzyja nie tylko dobremu

funkcjonowaniu, lecz być może nawet przewadze ewolucyjnej nad osobami uznawanymi za „neurotypowe”.

Implikacje zarówno kliniczne, jak i naukowe takiej hipotezy byłyby znaczne. Po pierwsze, stawałoby to pod znakiem zapytania sensowność rozgraniczania osób z klinicznie istotnym nasileniem cech ASD za pomocą sztywnych kryteriów diagnostycznych i promowałoby w procesie diagnozy rzeczywiste potrzeby osoby badanej oraz jej niezależny od nasilenia objawów poziom funkcjonowania w rolach społecznych. Niezwykle istotną konsekwencją tego typu podejścia mogłoby być ułatwienie dostępu do oddziaływań terapeutycznych dla dziewcząt z ASD. Powszechnie podkreślane w literaturze przedmiotu jest niedostosowanie kryteriów diagnostycznych do obrazu klinicznego ASD u kobiet, ze względu na ich umiejętność maskowania objawów oraz zasadniczo wysoki poziom funkcjonowania społecznego [29]. Te cechy prowadzą zaś do niedodiagnozowania, a w efekcie „wąskiego gardła” w dostępie do właściwych oddziaływań terapeutycznych i rehabilitacyjnych. Po drugie, w zakresie dalszych badań naukowych sugerowałoby to konieczność odejścia od sztywnego modelu różnic w grupie badanej i kontrolnej – gdzie tak naprawdę niemożliwe byłoby jednoznaczne oraz obiektywne naukowo rozdzielenie osób „prawdziwie neurotypowych” i „prawdziwie neuroatypowych”. O wiele sensowniejszym modelem wydawałoby się analizowanie związków różnych parametrów (genetycznych lub środowiskowych) z nasileniem cech ASD w danej populacji mierzonych za pomocą wciąż udoskonalanych narzędzi diagnostycznych.

Finalnie niezwykle istotne jest omówienie ograniczeń prezentowanego badania, przez których pryzmat należy oceniać uzyskane wyniki. Pierwszym ograniczeniem jest ryzyko błędnej kwalifikacji pacjentów do grupy neurotypowej i neuroatypowej. Jest to trudność metodologiczna wspólna dla wszystkich dostępnych w piśmiennictwie prac z tego obszaru. Jednak ze względu na dwustopniowy proces kwalifikacji do badania, obejmujący konsultację psychiatryczną z postawieniem wstępnej diagnozy oraz wykonanie badania ADOS-2 przez certyfikowanego diagnostę, można przyjąć, że w tym wypadku ryzyko tego typu błędu jest nikłe. Następną kwestią jest kontrola pod kątem czynników zakłócających. Zasadniczym problemem jest tu możliwy wpływ nieujętych w analizie polimorfizmów w innych lokalizacjach, które pozostają np. w nierównowadze sprzężeń z badanymi i generują ryzyko wystąpienia pozornych, istotnych statystycznie zależności z analizowanymi parametrami.

Kolejną kwestią jest także istotna statystycznie różnica w średnim wieku między grupą badaną i kontrolną. W zakresie zastosowanych narzędzi badawczych dostępne w literaturze przedmiotu doniesienia wskazują na ich odporność na różnice w wieku, zwłaszcza niewielkie – takie jak w prezentowanym badaniu. Ostatnią kwestią jest ograniczona liczebność grupy badanej oraz kontrolnej, co również pozostaje wspólne dla wszystkich dostępnych opracowań. Lecz biorąc pod uwagę uzyskane parametry statystyczne, istniejące rozkłady badanych polimorfizmów oraz inne doniesienia, można przyjąć, że liczebność ta jest wystarczająca, by z zadowalającym przybliżeniem można było wyciągać wnioski dotyczące populacji.

Piśmiennictwo

1. Gimpl G, Fahrenholz F. *The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation*. *Physiol. Rev.* 2001; 81(2): 629–683.
2. Carter CS. *Oxytocin pathways and the evolution of human behavior*. *Annu. Rev. Psychol.* 2014; 65(1): 17–39.
3. Wilczyński KM, Zasada I, Siwiec A, Janas-Kozik M. *Differences in oxytocin and vasopressin levels in individuals suffering from the autism spectrum disorders vs general population – A systematic review*. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019; 15: 2613–2620.
4. Wilczyński KM, Siwiec A, Janas-Kozik M. *Systematic review of literature on single-nucleotide polymorphisms within the oxytocin and vasopressin receptor genes in the development of social cognition dysfunctions in individuals suffering from autism spectrum disorder*. *Front Psychiatry.* 2019; 10: 380.
5. Nelissen TP, Bamford RA, Tochitani S, Akkus K, Kudzinskas A, Yokoi K i wsp. *CD38 is Required for Dendritic Organization in Visual Cortex and Hippocampus*. *Neuroscience* 2018; 372: 114–125.
6. Hattori T, Kaji M, Ishii H, Jureepon R, Takarada-Iemata M, Minh Ta H i wsp. *CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously*. *Glia* 2017; 65(6): 974–989.
7. Jin D, Liu HX, Hirai H, Torashima T, Nagai T, Lopatina O i wsp. *CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion*. *Nature* 2007; 446(7131): 41–45.
8. Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, T Munesue T i wsp. *Oxytocin signal and social behaviour: Comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice*. *J. Neuroendocrinol.* 2010; 22(5): 373–379.
9. Makhanova A, McNulty JK, Eckel LA, Nikonova L, Bartz JA, Hammock EAD. *CD38 is associated with bonding-relevant cognitions and relationship satisfaction over the first 3 years of marriage*. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 2965.
10. Krol KM, Namaky N, Monakhov MV, Lai PS, Ebstein R, Grossmann T. *Genetic variation in the oxytocin system and its link to social motivation in human infants*. *Psychoneuroendocrinology* 2021; 131: 105290.
11. Huetter FK, Moehlendick B, Knop D, Siffert W. *Lack of association of common polymorphisms linked to empathic behavior with self-reported trait empathy in healthy volunteers*. *Horm. Behav.* 2020; 126: 104841.
12. Munesue T, Yokoyama S, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Hayashi K i wsp. *Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls*. *Neurosci. Res.* 2010; 67(2): 181–191.
13. Lerer E, Levi S, Salomon S, Darvasi A, Yirmiya N, Ebstein RP. *Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and autism: Relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition*. *Mol. Psychiatry* 2008; 13(10): 980–988.
14. Thanseem I, Anitha A, Nakamura K, Suda S, Iwata K, Matsuzaki H i wsp. *Elevated transcription factor specificity protein 1 in autistic brains alters the expression of autism candidate genes*. *Biol. Psychiatry* 2012; 71(5): 410–418.
15. Jankowiak-Siuda K, Simon BC, Białaszek W, Dopierała A, Kozłowska A, Rymarczyk K. *Psychometric evaluation of the “reading the mind in the eyes” test with samples of different ages from a polish population*. *Stud. Psychol. (Bratisl.)*. 2016; 58(1): 18–31.
16. Vellante M, Baron-Cohen S, Melis M, Marrone M, Petretto DR, Masala C i wsp. *The “reading the Mind in the Eyes” test: Systematic review of psychometric properties and a validation study in Italy*. *Cogn. Neuropsychiatry* 2013; 18(4): 326–354.

17. Baron-Cohen S, Hoekstra RA, Knickmeyer R, Wheelwright S. *The Autism-Spectrum Quotient (AQ) – Adolescent version*. J. Autism Dev. Disord. 2006; 36(3): 343–350.
18. Jankowiak-Siuda K, Kantor-Martynuska J, Siwy-Hudowska A, Śmieja M, Dobrołowicz-Konkol M, Zaraś-Wieczorek I i wsp. *Psychometric properties of the Polish adaptation of short form of the Empathy Quotient (EQ-Short) [Analiza właściwości psychometrycznych polskiej wersji językowej Skróconej Skali Ilorazu Empatii (SSIE) – The Empathy Quotient (EQ-Short)]*. Psychiatr. Pol. 2017; 51(4): 719–734.
19. Akio Wakabayashi, Simon Baron-Cohen, Sally Wheelwright, Nigel Goldenfeld, Joe Delaney, Debra Fine, Richard Smith, Leonora Weil, Development of short forms of the Empathy Quotient (EQ-Short) and the Systemizing Quotient (SQ-Short); Personality and Individual Differences 2006; 41 (5); 929-940.
20. PubMed SNP database.
21. Peñuelas-Calvo I, Sareen A, Sevilla-Llewellyn-Jones J, Fernández-Berrocal P. The “Reading the Mind in the Eyes” Test in Autism-Spectrum Disorders Comparison with Healthy Controls: A Systematic Review and Meta-analysis. J Autism Dev Disord. 2019 Mar;49(3):1048-1061.
22. Camodeca A. *Theory of mind performance in broad autism phenotype groups: Between-group differences and predictor variables*. J. Autism Dev. Disord. 2019; 49(10): 4079–4096.
23. Miu AC, Pană SE, Avram J. *Emotional face processing in neurotypicals with autistic traits: Implications for the broad autism phenotype*. Psychiatry Res. 2012; 198(3): 489–494.
24. Dovgan KN, Villanti KM. *The prevalence of broad autism phenotype in young adults: The roles of genetic relationship to autism, gender, and academic major*. J. Genet. Psychol. 2021; 182(3): 174v181.
25. Groot de K, Strien van JW. *Evidence for a broad autism phenotype*. Adv. Neurodev. Disord. 2017; 1(3): 129–140.
26. Morandi F, Airoidi I, Marimpietri D, Bracci C, Faini AC, Gramignoli R. *Cd38, a receptor with multifunctional activities: From modulatory functions on regulatory cell subsets and extracellular vesicles, to a target for therapeutic strategies*. Cells 2019; 8(12): 1527.25.
27. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E i wsp. *Evolution and Function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology*. Physiol. Rev. 2008; 88(3): 841–886.
28. Kim S, Kim T, Lee HR, Jang EH, Ryu HH, Kang M i wsp. *Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice*. Mol. Brain 2016; 9(1): 16.
29. Wright B, Spikins P, Pearson H. *Should autism spectrum conditions be characterised in a more positive way in our modern world?* Medicina (Kaunas) 2020; 56(5): 233.
30. Rynkiewicz A, Janas-Kozik M, Słopeń A. *Girls and women with autism*. Psychiatr. Pol. 2019; 53(4): 737–752.

Adres: Krzysztof Maria Wilczyński
Katedra Psychiatrii i Psychoterapii Wieku Rozwojowego
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
e-mail: wil.k.m91@gmail.com

Otrzymano: 4.02.2023

Zrecenzowano: 11.04.2023

Otrzymano po poprawie: 12.04.2023

Przyjęto do druku: 12.05.2023