

# Soolestiku-aju seosed ASH korral kui tuleviku sihtmärk haigusega toimetulekuks

Tölge Eva Kumpas

*de Theije, C.G.M., et al., Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management, Eur. J. Pharmacol. (2011)*

## KOKKUVÕTE

Autismispektri häired (ASH, ingl.k. *autism spectrum disorders, ASDs*) on pervasiivsed neuroloogilised häired, mida iseloomustavad kõrvalekalded sotsiaalses suhtlemises ja suhetes ning piiratud, korduvate ja stereotüüpsete huvide ja käitumiste esinemine. ASH laste puhul on tihti viidatud soolesümptomitele ning seedekulgla häirete potentsiaalsele rollile ASH puhul. Siinne ülevaade keskendub (allergiliste) soolestikupobleemide tähtsusele ASH korral. Anname ülevaate võimalikest soolestiku-aju teedest ja toome välja võimalusi farmakoloogiliseks ja toitumuslikuks raviks.

## SISUKORD

Kokkuvõte	1
Sissejuhatus	2
1. Gastrointestinaalsed (mao-sooletrakti) häired ASH korral	3
2. Gastrointestinaalne (mao-sooletrakti) patoloogia ASH korral	3
3. Soolepõletiku puhul tekkivad neuroimmunoloogilised interaktsioonid/koostoimed	6
3.1. Soolepõletiku kujunemine	6
3.2. Serotoniin: neurotransmitter ja põletiku vahendaja (mediaatoraine)	6
3.3. Toiduallergia ASH korral	7
3.4. Seos ASH ja ema allergiliste haiguste vahel	9
3.5. Muud immuunprotsessid ASH korral	9
4. Neuroimmuunsed interaktsioonid aju-vere barjääri poolt	10
4.1. Lümfootsüüdid sisenevad ajusse ja mõjutavad neuroneid läbi immuunfaktorite tootmise	10
4.2. Tsütokiinid sisenevad ajusse ja mõjutavad neuroneid läbi neurogliia	11
4.3. Immuunfaktorid mõjutavad neuroneid kinnitades aju endoteliaalsetele rakkudele	12
4.4. LPS mõjutab neuroneid läbi vere-aju barjääri	12
5. mTOR kui võimalik lüli ASH-ga seotud immuunhäirete ja kesknärvisüsteemi (CNS) vahel	13
6. Mao-sooletrakt kui sihtmärk ASH puhul	15
Tänuõnad	17
Viited	17

## SISSEJUHATUS

Autismispektri häire (ASH) hõlmab autismi, pervasiivseid arenguhäireid (mida ei ole teisisi spetsifitseeritud) (PDD-NOS) ja Aspergeri sündroomi. Neid pervasiivseid neuroarengu häireid iseloomustatakse häirega sotsiaalses suhtlemises ja suhetes ning piiratud, korduvate ja stereotüüpsete huvide ning käitumismustrite esinemisega (Johnson and Myers, 2007; Vandereycken, 2003). Senini ei ole ASH biomarkereid tuvastatud ning seetõttu sõltub ASH diagnoosimine täielikult käitumise vaatlusest, lähtudes DSM-IV kriteeriumitest (American-Psychiatric-Association, 2000).

Tõlkija märkus:

- *Psiühikahäirete diagnostikas on varasemalt laiemat tunnustust leidnud Ameerika Psühhiaatrite Assotsiatsiooni poolt väljatöötatud DSM-süsteem, mis on kasutusel Ameerika Ühendriikides ning kuni viimase ajani ka paljudes Euroopa riikides (nt Soome). Alates 1994.a. on kasutusel DSM neljas versioon (DSM-IV). Mahult on DSM-IV oluliselt ulatuslikum kui RHK-10/V põhiversioon. Erinevalt RHK-10/V põhiversioonist kasutatakse DSM-s diagnoosi määramisel diagnostilisi kriteeriume nagu ka ICD10/RC.*

Kirjalikele allikatele toetudes võib öelda, et ASH esinemissagedus on tõusnud 20 korda, 1:2500-lt 1980-ndate keskel 9:1000-ni tänapäeval (Genuis, 2009; MMWR, 2009). Nüüdseks on kättesaadavad varased diagnostikavahendid (Luyster et al., 2009) ja välja on arendatud diagnostiline stabiilsus (Zwaigenbaum et al., 2009). Kuigi paljud arvavad, et ASH diagnoosiga patsientide arvu kasvu põhjuseks on täpsem ja varasem diagnoosimine ning tõusnud teadlikkus ja laiienenud kriteeriumid diagnoosi panemiseks, leitakse, et need muutused ei ole ASH kiire tõusu seletamiseks piisavad (Hertz-Picciotto and Delwiche, 2009).

Huvi ASH uurimise vastu on viimasel ajal kasvanud, aga häirete põhjuseks olev patofüsioloogia on endiselt teadmata. Hoolimata geneetiliste faktorite tähtsusest, millele viitab esinemissagedus mõlemal kaksikul (Bailey et al., 1995), on ASH kõige tõenäolisemalt multifaktoriaalne haigus, mille puhul geneetilised häired ja keskkonafaktorid mängivad rolli autistliku fenotüübi väljendumisel. Tänapäeval seostatakse ASH-ga paljusid keskkondlikke tegureid, nii sünnieelseid kui ka -järgseid, ning samuti seedekulglä häireid. Kuigi andmed on vastuolulised ja vaja on rohkem uurimusi, et tuvastada seedekulglä häirete sage esinemine autistliku populatsiooni hulgas, on soolesümptome autistide puhul korduvalt välja toodud. Käesolev ülevaade keskendub (allergiliste) seedekulglä häirete tähtsusele ASH puhul. Me anname ülevaate võimalikest soolestiku-aju teedest ja arutleme võimaluste üle farmatseutilisteks ja/või toitumuslikeks lähenemisteks ASH raviks.

## 1. GASTROINTESTINAALSED (MAO-SOOLETRAKTI) HÄIRED ASH KORRAL

Sotsiaalsete ja kommunikatiivsete häirete tõttu on ASH patsientide soolestikuprobleemide kindlaks tegemine väga keeruline. Paljudel autistlikel patsientidel on verbaalne suhtlemine häiritud või puudub üldse, mis teeb neile oma ebamugavustunde väljendamise peaaegu võimatuks. Isegi autistid, kelle suuline eneseväljendus on hea, võivad olla tunnete väljendamisel piiratud oma sotsiaalse võimetuse tõttu. Seetõttu on keeruline määrata täpset soolestikuprobleemide levimust autistide hulgas. Välja on toodud levimus skaalal 9% kuni 91,4% (Black et al., 2002; Galli-Carminati et al., 2006; Ibrahim et al., 2009; Mouridsen et al., 2009; Parracho et al., 2005; Smith et al., 2009; Valicenti-McDermott et al., 2006), väga suur varieeruvus tuleneb osaliselt ka soolestikuprobleemide erinevatest interpretatsioonidest.

Sagedamini täheldatud sümptomid autistide puhul on krooniline kõhukinnisus või –lahtisus, kõhuvalu ja sellised patoloogiad nagu toiduallergiad, gastroösofageaalne reflukshaigus (GERD), haavandiline koliit, lümfoidne hüperplaasia ja ösofagiit ehk söögitorupõletik (Horvath et al., 1999; Wakefield et al., 2005). Pang and Croaker (2011) määrasid ASH esinemise patsientide hulgas, kes olid ravil nende Kirurgilise Kõhukinnisuse Lastekliinikus (Paediatric Surgical Constipation clinic). ASH-d esines peaaegu kümme korda rohkem kliiniku patsientide hulgas (8,5%) kui üldiselt elanikkonnas (0,9%). Hiljem viis Peeters et al. (2011) läbi sarnase uuringu, tehes kindlaks ASH esinemissageduse oma kliinikus ravil olevate laste hulgas, kellel oli diagnoositud funktsionaalne kõhukinnisus või funktsionaalne roojapidamatus (*fecal incontinence*). Märkimisväärset protsenti (18%) lastest olid punktisummad, mis viitasid ASH-le.

Pang and Croaker'i (2011) uurimus näitas samuti, et kõhukinnisuse algus autistlike patsientide hulgas oli varasem ja isegi varasem kui keskmine autismi algusaeg ühes teises uurimuses (Ibrahim et al. 2009). Sellest lähtuvalt arvasid nad, et kõhukinnisus on pigem esmane kui teisene tegur ASH väljakujunemisel. Ibrahim et al. (2009) ei suutnud leida olulisi erinevusi ASH patsientidel ja kontrollgrupi isikutel sooleprobleemide üldise esinemissageduse vahel, küll aga tegid nad kindlaks kõhukinnisuse suurema esinemissageduse autistidel (ASH: 33,9% versus kontrollgrupp: 17,6%,  $P=0,003$ ). Ühes teises uurimuses on ka kõhulahtisust ASHga seostatud (Sandhu et al., 2009). 30- ja 42-kuu vanuselt oli ASH-ga lastel suurema tõenäosusega kaks või rohkem väljaheidet päevas ning kõhulahtisust oli kontrollgrupiga võrreldes oluliselt rohkem (ASH: 58% vs. kontrollgrupp: 44%,  $P=0,039$ ).

## **2. GASTROINTESTINAALNE (MAO-SOOLETRAKTI) PATOLOOGIA ASH KORRAL**

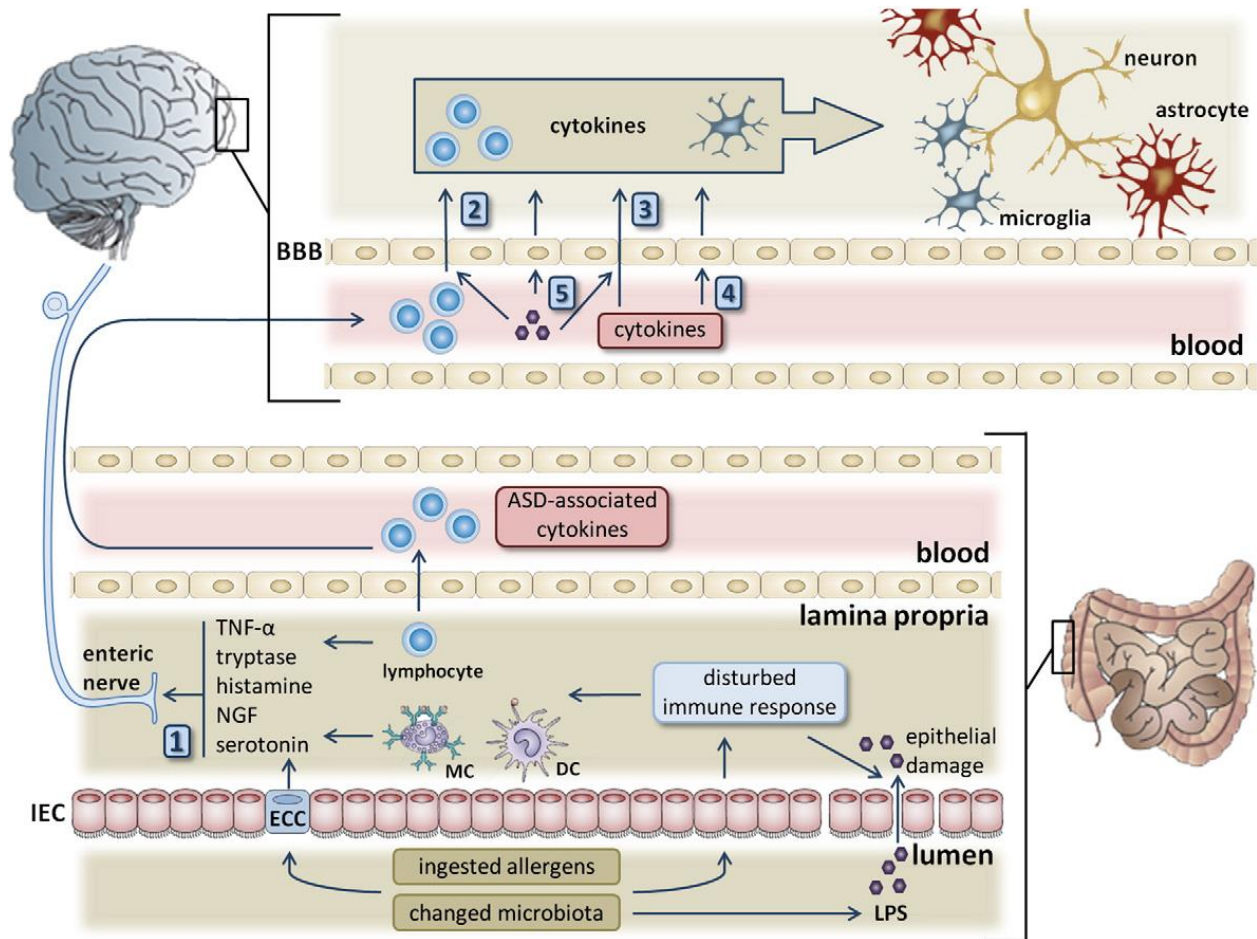
Kolm uurimust on vaadelnud lähemalt soole lümfotsütaarset infiltratsiooni ASH-ga lastel biopsia abil ja leidnud tähelepanuväärseid tulemusi (Ashwood et al., 2003; Furlano et al., 2001; Torrente et al., 2002). Võrreldes histoloogiliselt mittepõletikulise kontrollgrupiga, oli sooleprobleemidega ASH-ga patsientidel kaksteistsõrmiksoole, peensoole lõpuosa ja käärsoole koeproovides suurem arv infiltreeritud T-helper ja T-tsütotoksilisi rakke ning CD19+ B-rakke (Ashwood et al., 2003; Furlano et al., 2001; Torrente et al., 2002). Veelgi enam, isegi võrreldes histoloogiliselt põletikulise kontrollgrupiga oli nendel autistlikel lastel suurem T-helperite ja CD19+B rakkude infiltratsioon kõigis soolestiku osades (Ashwood et al., 2003). Veelgi üllatuslikum oli aga see, et

autismiga laste puhul oli T-helperrakkude infiltratsioon ka peensoole lõpuosas ning käärsooles suurenenud, võrreldes lastega, kellel oli põletikuline soolehaigus (Ashwood et al., 2003).

Ühes teises uuringus avastati dentriitiliste T-rakkude suurenenud tihedus soolestikuprobleemidega ASH laste käärsooles võrreldes histoloogiliselt mittepõletikulise kontrollgrupiga ning isegi võrreldes kontrollgrupiga, kellel oli lümfoidne nodulaarne hüperplaasia, Crohni tõbi ja haavandiline koliit. Basaalembraani paksus oli samuti suurenenud võrreldes kõigi teiste gruppidega. Samas näitas histopatoloogia, et lümfotsütaarne koliit oli autistlike laste hulgas vähem tõsine kui klassikalise põletikulise soolehaiguse korral (Furlano et al., 2001). Veelgi enam, soolestikuprobleemidega autistlike laste basolateraalse enterotsüüdimembraani IgG1 ja IgG4 ladestused olid kuhjunud võrreldes normaalse kontrollgrupiga ja tsöliaakiapatsientidega (Torrente et al., 2002).

Faktor, mis võib soodustada mao-sooletrakti probleemide tekkimist autistide hulgas, on soole ebanormaalne mikrofloora. Paljud on uurinud autistide soolestiku mikrofloorat ja leidnud mitmete mikroobiliikide erinevaid kooslusi võrreldes terve kontrollgrupiga. Need ASH-ga seostatavad mikroobiliigid koosnesid peamiselt erinevatest Clostridium tüvedest, Ruminococcus, Bacteroidetes, Bacteroides, Firmicutes ja Desulfovibrio liikidest (Finegold et al., 2002, 2010; Parracho et al., 2005; Song et al., 2004). Hiljutine uurimustöö, mille autoriks on Adams et al. (2011), näitas Bifidobakteri madalamat taset ja Lactobacilluse kõigi liikide kõrgemat taset ASH puhul, neid mõlemaid peetakse headeks bakteriteks (Adams et al., 2011). Clostridiumi liikidega kolonisatsiooni Bifidobakteri arvelt on seostatud toiduallergia kõrgema riskiga ja samuti (laste) põletikulise soolehaiguse väljakujunemisega (Adlerberth et al., 2007; Schwartz et al., 2010; Vanderploeg et al., 2010; Willing et al., 2010). Huvitav on märkida, et ASH laste antibiootikumiravi ei viinud ainult mao-sooletrakti seisundi paranemiseni, vaid parandas ka kognitiivseid oskusi (Sandler et al., 2000).

Andmed mao-sooletrakti probleemide kohta, nagu näiteks muutused soolestiku mikroflooras ja T-rakkude infiltratsioon, viitavad kindlalt muutunud immuunsuse seisundile autistide soolestikus. Ei ole aga teada, kas seos autistliku käitumise ja soolestikuprobleemide vahel on põhjus-tagajärg seos ning kumb tegur on olulisem. Võttes arvesse seda, et mao-sooletrakti probleemid on tugevas seoses autistliku käitumise tõsidusega (Adams et al., 2011), oletame, et mao-sooletrakti (gastrointestinaalse-, GI) põletiku olemasolu teeb geneetilise ASH eelsoodumusega lapse altimaks autistliku fenotüübi tekkimisele või suurendab autistliku käitumise tõsidust. **Joonisel 1** on kujutatud võimalikud teed, kuidas soolestikust lähtuvad immuunfaktorid võivad mõjutada neuronite tööd ja seeeläbi käitumist.



**Joonis 1.** Võimalikud teed sooles neuroimmuunsete vastastikutega ASH puhul. Immuunhäire korral GI-traktis muutuvad sooleepiteeli rakud (intestinal epithelial cells, IECs) läbilaskvamaks ja enterokromafiinsed rakud (enterochromaffin cells, ECCs), lümfotsüüdid, mast-rakud ehk nuumrakud (mast cells, MCs) ja dendriilised trakud (dendritic cells, DCs) eritavad erinevaid neuroimmuunseid faktoreid/ühendeid, mis võivad stimuleerida enteerilisi ehk soolenärve (1). Lisaks on ASH-ga seotud tsütokiinid (*IL-1 $\beta$* , *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-13*, *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* ) ja lümfotsüüdid tsirkulatsioonis. Sellest tulenevalt võivad lümfotsüüdid pääseda läbi aju-vere barjääri (bloodbrain barrier, BBB) (2), seerumi tsütokiinid (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* ) võivad läbida aju-vere barjääri (3) ja tsütokiinid (*IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* ) võivad kinnituda aju endoteliaalsetele rakkudele, tuues kaasa ajus immuunvastuse (4). Lipopolüsahhariid (LPS) võib suurendada aju-vere barjääri läbilaskvust, soodustades tsütokiinide ja lümfotsüütide infiltratsiooni või kinnituda aju endoteliaalsetele rakkudele, tuues kaasa immuunvastuse ajus (5). Aju immuunvastus võib koosneda suurenenud lümfotsüütide ja tsütokiinide hulgast (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *CXCL-8*, *IL-10*, *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , *CCL-2* and *GM-CSF*), toodetuna ka neuroglia poolt ning tulemusel muutustega neuronaaelses homoöstaasis.

### 3. SOOLEPÕLETIKU PUHUL TEKKIVAD NEUROIMMUUNSED KOOSTOIMED

#### 3.1. SOOLEPÕLETIKU KUJUNEMINE

GI-trakt puutub pidevalt kokku toidust pärit antigeenidega ning bakterite ja nende produktidega, seepärast on ta väga oluline kaasasündinud ja adaptiivse immuunregulatsiooni koht. Allaneelatud antigeenid sisenevad soole limaskestast läbi M-rakkude (*microfold cells*) Peyeri naastudes või läbi kahjustunud epiteelkoe, kust nad viiakse edasi või võetakse otse vastu antigeeni esitlevate rakkude poolt (*antigen presenting cells, APC*). Need on kõige sagedmini dendriitilised rakud (*dendritic cells, DC*), mis liiguvad T-rakkude aladesse nagu Peyeri naastud või mesenteriaalsed lümfisõlmed (*mesenteric lymph node, MLN*), kus nad toimivad vastastikku tavaliste lümfotsüütidega, et esile kutsuda adaptiivset immuunreaktsiooni. Peale korduvaid kokkupuuteid antigeeniga aktiveerub T- ja B-rakkude mälu ning selle tulemuseks on proliferatsioon ja tsütokiinide vabastamine, mis viib gastrointestinaalse põletikuni (Mowat, 2003).

Krooniline põletik sooles võib kahjustada epiteelrakkude kihti ja seetõttu suurendada sooleseina läbilaskvust, tuues kaasa kõrgema antigeense koormuse. Autistlikel lastel on leitud suuremat soole läbilaskvust (D'Eufemia et al., 1996). Hiljuti kinnitas de Magistris et al. (2010) neid tulemusi, esitledes oluliselt suurenenud soole läbilaskvust ASH-ga lastel ja nende esimese astme sugulastel (de Magistris et al., 2010). Ebanormaalselt kõrge soole läbilaskvus leiti olevat 36,7 %-l ASH-ga patsientidest võrreldes 0%-ga samaealiste kontrollgrupis. Esimese astme sugulastel oli see 21,2% - ebanormaalselt kõrge soole läbilaskvus võrreldes 4,8%-ga täiskasvanute kontrollgrupis. Suurenenud soole läbilaskvus, mida täheldati autistide hulgas, võib olla nende laste puhul nii põhjus kui ka soolepõletiku tagajärg. Igal juhul suurendab kõrge soole läbilaskvus gastrointestinaalset põletikku ning sellega seoses ka ebamugavust ning seedevaevusi.

#### 3.2. SEROTONIIN: NEUROTRANSMITTER JA PÕLETIKU VAHENDAJA (MEDIAATORAINE)

Serotonergilist süsteemi on seostatud ASH patogeneesiga ajast, mil kirjeldati esmakordselt autistlike laste kõrge vererõhku (serotoniin ehk 5-hüdroksütrüptamiin, 5-HT) (Schain and Freedman, 1961). Hilisemad uuringud näitasid, et umbes ühel kolmandikul ASH patsientidest on kõrge vererõhk (Anderson et al., 1987; Hanley et al., 1977). Teisest küljest on autistide võime kogu aju ulatuses serotoniini ehk 5-HT sünteesida väiksem (Chugani et al., 1999), viidates väiksemale 5-HT kättesaadavusele ajus. ASH-ga seotud vere kõrge serotoniinitase tuleneb arvatavasti geneetilistest (Coutinho et al., 2007), gastrointestinaalsetest (Minderaa et al., 1987; Mulder et al., 2010) või immunoloogilistest (Burgess et al., 2006; Warren et al., 1986) muutustest.

Tuginedes madala astme põletikule sooles, vere kõrgele serotoniinitasemele ja madalale 5-HT sünteesile ajus pakume välja järgneva hüpoteesi. Põletikuvastuse ajal toodetakse ja vabastatakse sooles 5-HT enterokromafiinsete rakkude ja soole põletikurakkude (nuumrakud ja trombotsüüdid) poolt, mis kiirendab soole peristaltikat ja suurendab sekretsiooni, veresoonte laienemist ning läbilaskvust. See omakorda viib probleemideni funktsionaalses peristaltikas, väljaheite konsistentsis (kõhulahtisus või -kinnisus) ja leukotsüütide infiltratsioonis sooleseinas. Toidust pärit trüptofaani suurenenud kasutamise tõttu sooles jääb vähem trüptofaani vere-aju barjääri läbimiseks. Tulemuseks on see, et aju 5-HT tase on alanenud ning see omakorda võib

viia tujumuutuste ja kognitiivsete häireteni, mida on ASH puhul täheldatud. Trüptofaani saadavus on oluline, sest toidust eemaldatud trüptofaan suurendab autistlikku käitumist täiskasvanud patsientide puhul (McDougle et al., 1996).

On vaja rohkem uuringuid, et kindlaks teha, kas 5-HT metabolism võiks olla ravivõimaluseks ASH korral, kas siis kindlustades trüptofaani toiduga või ravimina nagu näiteks selektiivsed seerotiini tagasihaarde inhibiitorid (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs). Hiljuti anti teada, et ei ole tõendeid sellele, et SSRI-ga ravimisel oleks positiivne mõju autistlikele lastele. Mõjust täiskasvanud ASH patsientidele on vaid piiratud tõendid SSRI efektiivsuse kohta (Williams et al. 2010). Võibolla oleks trüptofaani saadavuse parandamiseks 5-HT sünteesi jaoks tulemuslikum see, kui võtta ravi eesmärgiks ASH-ga seotud madala astme põletik sooles.

### **3.3. TOIDUALLERGIA ASH KORRAL**

Häiritud soolestiku immuunreaktsioon võib olla suunatud toiduosakeste vastu, algatades allergilise vastuse. Tihti viidatakse autistide hulgas toiduallergia esinemisele. Lastevanemate tähelepanekud kinnitavad, et toiduallergiat esineb sagedamini autistide hulgas võrreldes terve kontrollgrupiga (Gurney et al., 2006; Jyonouchi et al., 2008). Oluline on ka arvesse võtta seda, et ASH lapsed on tõenäoliselt toiduallergiate osas aladiagnoositud nende võimetuse tõttu oma ebamugavustunnet väljendada.

Lucarelli et al. (1995) täheldasid, et lehmapiima tarbimine viis mõnede ASH-le omaste käitumuslike sümptomite halvenemiseni. Samuti leidsid nad, et ASH lastel oli võrreldes tervete kontrollgrupiga märkimisväärselt kõrgemad seerumi IgA, IgG ja IgM tasemed kaseiinile ning IgA laktoalbumiinile ja  $\beta$ -laktoglobuliinile (Lucarelli et al. 1995). Veelgi enam, piimavalgu tarbimine oli märkimisväärne kõhukinnisuse esilekutsuja autistide hulgas (Afzal et al., 2003). Seetõttu jätvavad ASH patsiendid tihti gluteeni ja piimavalgu oma toidulaualt välja, s.o. gluteeni- ja kaseiinivaba toitumine.

Mõned ASH ja gastrointestinaalsete probleemide alased publikatsioonid võrdlesid gluteeni- ja kaseiinivabal toitumisel olevaid ASH patsiente nende ASH patsientidega, kes olid tavatoidul. Näiteks regressiivse autismi ja GI-probleemidega laste soole biopsial saadi märkimisväärselt madalam eosinofiilide infiltratsioon gluteeni- ja kaseiinivabal toitumisel olevatel lastel võrreldes tavatoidul olevatega (Ashwood et al., 2003). Veelgi enam, ASH patsiendid, kes jätsid välja gluteeni ja piimavalgu, näitasid tähelepanuväärset soole läbilaskvuse vähenemist võrreldes tavatoidul olevate ASH patsientidega (deMagistris et al., 2010). Lisaks kasulikule mõjule maosooletrakti häiretele on täheldatud ka gluteeni- ja piimavaba dieedi positiivset mõju autistlikule käitumisele. Lapsevanemad on välja toonud sotsiaalse käitumise ja keeleoskuse paranemist (Elder et al. 2006).

Üksikud uuringud on läbi viidud gluteeni ja kaseiini eliminatsiooni efektiivsuse uurimiseks, mis näitavad paranemist igapäevategevustes, verbaalses suhtlemises, inimestevahelistes suhetes ja õppimisvõimes (Hsu et al., 2009; Knivsberg et al., 2002; Millward et al., 2008; Whiteley et al., 2010). Kahjuks koosnevad need uuringud kas väikestest kohortuuringutest või juhtumiaruannetest ega saa seetõttu kinnitada gluteeni- ja kaseiinivaba toitumise tulemuslikkust. Tulemuste kinnitamiseks on vaja rohkem uuringuid.

Enamikku allergiatest iseloomustab T-helper-raku (*T helper Th*) 2-tüüpi immuunreaktsioon. Th2 efektorrakud toodavad Th2 tsütokiine (interleukiine (IL)-4, IL-5 ja IL-13) ning võivad aktiveerida mälu-B-rakud (*memory B cells*) eritama immunoglobuliine (Valenta, 2002). Allergia rolli ASH puhul kinnitab ka see, et nende patsientide puhul näib olevat tasakaalutus Th1 ja Th2 tsütokiinides. ASH-ga laste perifeerse vere mononukleaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*) tootsid oluliselt rohkem IL-4, IL-5 ja IL-13 kui kontrollgupi lastel (Molloy et al., 2006). ASH laste veres oli vähem interferoon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) ning IL-2 positiivseid helpeid ja tsütotoksilisi T-rakke kui terve kontrollgrupi veres ning IL-4 positiivsete helperite ja tsütotoksiliste T rakkude arvukus oli vastupidiselt sellele suurenenud (Gupta et al., 1998). Lisaks neile andmetele häiritud Th1/Th2 tasakaalu kohta leiti madalam IFN- $\gamma$ /IL-10 suhe meessoost rottide hulgas, kes olid sünnieelselt kokku puutunud valproehappega - iseloomulik autismi loomudel (Schneider et al., 2008).

Lehmapiima valgule vastuseks tootsid ASH laste (nii soolestikuprobleemidega kui ilma) PBMC-d rohkem kasvaja nekroosifaktorit- $\alpha$  (*tumor necrosis factor, TNF*) ja IL-12 kui kontrollgrupi lapsed (Jyonouchi et al., 2005). Veelgi enam, GI-probleemidega ASH laste perifeerias ja soole limaskestas oli vähem IL-10 positiivseid T rakke võrreldes põletikku mitteomava kontrollgrupi ja Crohni tõvega lastega (Ashwood and Wakefield, 2006).

T-rakud, mis toodavad põletikuvastast tsütokiini IL-10, on peamiselt indutseerivad T-regulaator-rakud. Allergeenispetsiifilised T-regulaator-rakud on peamiselt tervetel inimestel selleks, et suruda alla allergilist vastust. Vähem IL-10 positiivseid T rakke on seega seotud suurenenud Th2 vastustega. Teise T-regulatoorse tsütokiine transformeeriva kasvufaktori- $\beta$  (*transforming growth factor (TGF)- $\beta$* ) tase plasmas oli samuti vähenenud kahe uuringu põhjal (Ashwood et al. 2008; Okada et al., 2007). Madal TGF- $\beta$  tase oli pöördvõrdeline käitumistulemustega (Ashwood et al., 2008). See näitab, reguleerivate T-rakkude vastused ASH patsientidel on väiksemad ning immuunsüsteemi mahasurumise võime puudumine võib olla seotud autistliku käitumise väljendumisega.

Allergilise reaktsiooni käigus immunoglobuliinid aktiveerivad numrakke (mast-rakke) ja basofiile, põhjustades mitmete mediaatorainete vabastamise, kaasa arvatud histamiin ja tsütokiinid. Arvatakse, et numraku aktiveerimine mängib samuti autistlike häirete puhul rolli. Seda oletust toetab esialgne aruanne, mis toob välja, et ASH on rohkem levinud patsientide hulgas, kellel on mastotsütoos (Theoharides, 2009).

Mitte ainult immunoglobuliinid, vaid ka mitmed neuropeptiidid võivad päästa valla numrakkude aktiveerimise, nagu näiteks aine P, närvi kasvufaktor (*nerve growth factor, NGF*), vasoaktiivne soole peptiid (*vasoactive intestinal peptide, VIP*) ja neurotensiin (Theoharides et al. 2004). Neurotensiin oli ASH laste seerumis märkimisväärselt tõusnud (Angelidou et al., 2010). Aktiveerituna võivad numrakud toota erinevaid aineid, nagu nt trüptaas, histamiin, 5-HT, NGF ja TNF- $\alpha$ , mis võivad mõjutada soole neuroneid/närvirakke (Rijnierse et al., 2007) (*Joonis 1, tee 1*). Mao-sooletraktis toimub numraku-neuroni koostoime näiteks põletikulise soolehaiguse ja ärritunud soole sündroomi korral (Rijnierse et al., 2007). Seega võib allergiline reaktsioon soolestikus mõjutada käitumist läbi numrakkude või teiste immuunrakkude, mis on võimelised valla päästma soole närvirakkude poolt info edastamise läbi aferentsete teede uit-ja seljaajunärvide kaudu kesknärvisüsteemi (CNS).



### 3.4. SEOSSED ASH JA EMA ALLERGILISTE HAIGUSTE VAHEL

Allergia tähtsust ASH patofüsioloogias kinnitab leid, et emadel, kellel on diagnoositud astma või allergiad (nagu näiteks atoopiline dermatiit ja nohu) raseduse teisel trimestril, oli rohkem kui kaks korda suurem risk saada ASH-ga last (Croen et al. 2005). Lisaks sellele täheldati suuremat seost allergiliste seisundite ja autismi vahel perekondades, kus kasvas üle ühe ASH-ga lapse. See tähelepanek viib arvamuseni, et atoopiat soodustavad geenid võivad olla seotud ASH tekkega (Croen et al., 2005).

Hiljuti püstitas King (2011) hüpoteesi, et epigeneetilised häired aju arengus on põhjustatud rasedusaegsest kokkupuutest allergiaga seotud põletikuliste mediaatroainetega (näiteks IL-6 ja histamiin) (King, 2011). Need vahendused kutsuvad esile retinoolhappe ja östradiooli geeni transkriptsiooni, tuues kaasa loote liigse kokkupuute retinoolhappe ja östradiooliga. Retinoolhappe (A-vitamiini metaboliit) on vajalik kasvuks ja arenguks, kuid selle liiga seostatakse ASH puhul esinevate aju arenguhäiretega, nagu näiteks väikeaju vääraarengud, kraniaalnärvide ja dopamiinergilise süsteemi kõrvalekalded (London, 2000).

Östradiooli tuntakse loote aju feminiseerimise vähendajana, mängides olulist rolli seksuaalses eristumises. Suurem eksponeeritus östrogeenile mõjutab paljusid kognitiivseid funktsioone, mis on autistidele omased, näiteks ärevus, motoorsed häired, stereotüüpsed ja korduvad liigutused, hüperaktiivsus ja tähelepanupuudulikkus (King, 2011; McEwen et al., 1999).

### 3.5. TEISED IMMUNPROTSESSID ASH KORRAL

Kuigi paljud uuringud toetavad hüpoteesi, et ASH seostub Th2 vildaka (*Th2-skewed*) tüüpi immuunvastusega, on uuringuid, mis viitavad teiste immuunsusega seotud teede kaasatusele. Näiteks oli autistidel tõusnud IL-12 ja IFN- $\gamma$  tase plasmas, viidates pigem Th1 kui Th2 tüüpi immuunvastusele (Singh, 1996).

Vähehenud NK-rakkude (*natural killer, NK*) tsütotoksilist aktiivsust on samuti välja toodud (Vojdani et al., 2008). Hiljuti näitas Ashwood et al. (2011a,b) heterogeense tsütokiinide grupi suurenenud taset plasmas, sh IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 ja IL-12p40, mis teeb spetsiifilise immuunvastuse kindlaksmääramise veelgi raskemaks. Veelgi enam, makrofaagide migratsiooni inhibeeriv faktor (*macrophage migration inhibitory factor, MIF*), mis on samuti ajukoos ülesehituslikult väljendunud (Bacher et al., 1998), oli autistidel perifeerses veres kõrgem kui tavaarenguga laste kontrollgrupis. Kõrge MIF tase vereplasmas oli autistliku käitumisega positiivses korrelatsioonis (Grigorenko et al., 2008). Kemokiinid CCL2, CCL5 ja CCL11 olid samuti tõusnud ASH-ga laste vereplasmas võrreldes kontrollgrupiga. Suurenenud kemokiinide taset seostati käitumishälvete sagenemisega (Ashwood et al., 2011b). Autistlike häirete heterogeensus võib olla nende vastuoluliste andmete põhjuseks.

## 4. NEUROIMMUUNSED INTERAKTSIOONID AJU-VERE BARJÄÄRI POOLT

Immuunrakud toodavad sooletraktis esineva põletiku vastusena erinevaid aineid (tsütokiinid ja kemokiinid). Need immuunrakud ja nende poolt toodetud ühendid ei piirdu soolega, vaid sisenevad vereringesse ja jõuavad seekaudu ka kõikidesse organitesse, kaasa arvatud aju. Aju on väga vaskulariseeritud organ, aga ajurakud on kaitstud veres olevate kahjulike ühendite eest vere-aju barjääriga. See barjäär on endoteelirakkude kiht, mis on omavahel ühendatud tiheühendustega. Rakkudel on vähe rakusiseseid fenestratsioone ja nende võime pinotsütoosiks on väga väike (Reese and Karnovsky, 1967). Unikaalselt modifitseeritud endoteelirakud takistavad enamiku lahustuvate ainete vaba transporti vere ja aju vahel.

Vaatamata sellele suudavad tsütokiinid siiski ületada barjääri tänu aktiivsele transpordile ja isegi immuunrakud võivad pääseda läbi tihedate ühenduste diapedeesi teel (Banks and Erickson, 2010). Sellest võib järeldada, et mao-sooletrakti põletikuline seisund autistlike patsientide puhul võib mõjutada aju ja seeläbi käitumist mitmel eri viisil, nagu näidatud **Joonisel 1**. Kuigi ASH-d peetakse neuroarenguliseks häireteks, mõistetakse neuropatoloogiat vähe. Aju kasvu häired on ASH neuropatoloogia puhul peamised leiud.

Aju läbib kiire kasvu perioodi, millele järgneb arengu hilisemas etapis aeglane kasv (Courchesne et al., 2003). Lisaks kõrvalekalletele aju kasvumustrites on üks püsivaid tähelepanekuid autistide *neuroimaging*-uuringutes kõrvalekallete olemasolu väikeajus, nagu nt Purkinje rakkude kadu, suurenenud aju valgeaine hulk ja ajukoore paksenemine (Bauman and Kemper, 2003; Ecker et al., 2010; Schumann et al., 2010).

### 4.1. LÜMFOTSÜÜDID SISENEVAD AJUSSE JA MÕJUTAVAD NEURONEID LÄBI IMMUUNFAKTORITE TOOTMISE

Endoteliaalsete rakkude kiht aju-vere barjääris on ümbritsetud basaalkihiga, mis on otseses kontaktis peritsüütide ja astrotsüütidega ning tihedalt mikrogliiaga seotud. Füsioloogilised muutused neuroglia rakkudes võivad mõjutada aju-vere barjääri terviklikkust ja muuta selle lümfotsüütidele läbilaskvamaks (Banks and Erickson, 2010).

Immuunfaktorid võivad samuti muuta vere-aju barjääri läbilaskvust. Näiteks TNF- $\alpha$  võib häirida barjääri, suurendades P-glütsoproteiini tootmist (Bauer et al., 2007) ja muutes aju endoteelirakkude tsütoskeleti ülesehitust (Deli et al., 1995). Lümfotsüütide liikumine üle vere-aju barjääri toimub ka hea tervise korral ja lümfotsüüdid on ajus pidevalt olemas, aga immuunaktivatsiooni korral on infiltratsioon nendega oluliselt suurenenud (**Joonis 1, tee 2**).

Pärast ajusse infiltreerumist eritavad lümfotsüüdid tsütokiine ja kemokiine, mis aktiveerivad mikrogliia ja mõjutavad seekaudu närvifunktsioone, nagu kirjeldatud peatükis 5.2. Üks uurijate grupp vaatles lümfotsüütide olemasolu autistlike laste surmajärgsetes ajudes, aga ei suutnud kindlaks teha lümfotsüütide infiltratsiooni ega immunoglobuliinide kuhjumist (Vargas et al., 2005). Seega võivad need olla pigem tsütokiinid, mitte lümfotsüüdid, mis ületavad vere-aju barjääri ja algatavad immuunvastuse.

## 4.2. TSÜTOKIINID SISENEVAD AJUSSE JA MÕJUTAVAD NEURONEID LÄBI NEUROGLIIA

Mitmed tsütokiinid on võimelised ületama vere-aju barjääri, näiteks IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  (Banks et al., 1994; Gutierrez et al., 1993; McLay et al., 2000; Pan et al., 1997). Nagu eelnevalt mainitud, IL-1 $\beta$  ja IL-6 tasemed vereplasmas olid autistlike patsientide puhul tõusnud ja perifeerse vere mononukleaarsete rakkude (PBMCs) stimulatsioon lehmapiimaga tõi kaasa suurenenud TNF- $\alpha$  vastuse (Ashwood et al., 2011a; Jyonouchi et al., 2005). Kuna need tsütokiinid on võimelised ületama vere-aju barjääri, on nad neuroimmuunsetes interaktsioonides olulised ained (**Joonis 1, tee 3**).

Ajus võivad need tsütokiinid toimida koos neuroglia rakkudega, tekitades põletikureaktsiooni. Terve ja toimiva kesknärvisüsteemi (CNS) puhul mängivad astrotsüüdid ja mikroglia närvfunktsioonides ja homoöstaasis olulist rolli, kuna mõlemad on baasiliselt seotud kortikaalse organisatsiooni, neuroaksonaalse juhtimise ja sünaptilise edastamisega (Fields and Stevens-Graham, 2002). Veelgi enam, astrotsüüdid ja mikroglia on samuti väga olulised immuunvastuse reguleerimisel tsentraalses närvisüsteemis. Mikroglia on aju makrofaagid ja seetõttu haaratud immuunjäreldusse (Aloisi, 2001). Astrotsüüdid ja mikroglia on võimelised tootma neurotroofseid faktoreid, tsütokiine ja kemokiine (Bauer et al., 2001; Watkins and Maier, 2003) ja on olulised vere-aju barjääri terviklikkuse regulatsioonis (Prat et al., 2001). Vastuseks immuunsüsteemile esitatud väljakutsele indutseerivad aktiveeritud astrotsüüdid ja mikroglia neuraalseid ja sünaptilisi muutusi, mis muudavad kesknärvisüsteemi homoöstaasi ja annavad oma panuse haiguse käigus tekkivale neuronaalsele düsfunktsioonile.

Autistlike patsientide surmajärgsetes ajudes oli näha astrotsüütide ja mikroglia suurenenud aktivatsiooni (Vargas et al., 2005). Astrotsüütide aktiivsus oli märgatav keskmise frontaalkääru ja eesmise tsingulaarkääru subkortikaalses valgeolluses ja granulaarses rakukihis, Purkinje rakkude kihis ja väikeaju valgeaines. Lisaks märgati astrotsüütide aktiivsuse suurenemist hapra ehk fragiilse X sündroomiga (tihti autismiga seotud) hiirte aju striatumis/juttkehas, hipokampuses ja ajukoos (Yuskaitis et al., 2010). Mikroglia kõrgeenenud aktiivsust märgati ASH puhul peamiselt granulaarses rakukihis ja väikeaju valgeolluses (Vargas et al., 2005).

Ei ole selge, millal ja kuidas neuroglia autistlike patsientide puhul ajus aktiveerub. Et seda uurida, Vargas et al. (2005) iseloomustasid lisaks tsütokiinide ja kemokiinide profiile ASH-ga aju, väikeajus ning ajuvedelikus. Autistlike laste ajuvedelikus oli märgata IL-6, IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL4, CXCL8 ja CXCL10 kõrgeenenud taset. Autistide surmajärgsetes ajudes oli TGF- $\beta$  tõusnud kõigis kolmes aju osas (keskforntaalses- ja eesmises tsinguraalkäarus ja väikeajus) ning põletikku soodustavad kemokiinid CCL2, tüümus ning aktivatsioon-reguleeritud kemokiinid (*activation-regulated chemokine, TARC*) olid suurenenud eesmises tsingulaarkäarus ja väikeajus. Veelgi enam, eesmises tsingulaarkäarus oli mitmete põletikku soodustavate tsütokiinide ja kemokiinide tase tõusnud, kaasa arvatud IL-6, IL-10, CCL7, CCL22, CCL23, CXCL9 ja CXCL13 (Vargas et al., 2005).

Teinegi grupp mõõtis tsütokiiniprofiile ASH patsientide ajude ajukoore frontaal- ehk eesmises osas ja märkas põletikku soodustavate tsütokiinide IL-6, TNF $\alpha$  ja granulotsüütide-makrofaagide kolooniat stimuleeriva faktori (*granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF*),

Th1 tsütokiini IFN- $\gamma$  ja kemokiini CXCL8 kõrge tase (Li et al., 2009). Kuna autistide ajudes ei märgatud lümfotsüütide suurenenud infiltratsiooni, võib olla tõenäoline, et neuroglia aktiveerub tänu infiltratsioonile. Aktiveeritud neuroglia võib toota immuunfaktoreid, nagu eelnevalt kirjeldatud, mis sellega kaasnevalt kohandavad neuronaalet homoöstaasi ja funktsioneerimist, tuues kaasa muutused käitumises.

#### **4.3. IMMUNFAKTORID MÕJUTAVAD NEURONEID KINNITUDES AJU ENDOTELIAALSETELE RAKKUDELE**

Aju endoteelirakud toimivad nagu barjäär vere ja aju vahel ning reguleerivad immuunfaktorite infiltratsiooni. Lisaks barjäärifunktsioonile on aju endoteelirakud tuntud selle poolest, et nad on tsütokiinide poolt aktiveeritavad ja toodavad ka ise tsütokiine (**Joonis 1, tee 4**). IL-1 $\beta$  (Cao et al., 1996) ja TNF- $\alpha$  (Bugno et al., 1999), kaks tsütokiini, mis on samuti ASH puhul asjakohased, võivad kinnitada aju endoteelirakkudele ja alata immuunvastuse (Stanimirovic and Satoh, 2000).

Omakorda on aju endoteelirakud tähtsad põletikku soodustavate vahendainete allikad, nagu prostaglandiinid, leukotrieenid, tsütokiinid ja kemokiinid (Stanimirovic and Satoh, 2000; Vadeboncoeur et al., 2003; Verma et al., 2006). Nende poolt toodetavad faktorid, sealhulgas tsütokiinid IL-6, GM-CSF ja TNF- $\alpha$  ning kemokiinid CCL2 ja CXCL8 (Verma et al., 2006; Zhang et al., 1999) võidakse vabastada mõlemal poolel, nii ajupolel kui ka veresoontes. Kui aju endoteelirakud toodavad immuunfaktoreid aju poolel, aktiveeruvad astrotsüüdid ja mikroglia ning mõjutavad närvifunktsiooni ja seeläbi ka käitumist.

#### **4.4. LPS MÕJUTAB NEURONEID LÄBI VERE-AJU BARJÄÄRI**

Sügava autismiga patsientidel on vereplasma lipopolüsahhariidide (LPS) tase kõrge. Veelgi enam, LPS tase korreleerub kirjeldatud patsientide käitumishäirete tõsidusega (Emanuele et al., 2010). LPS, tuntud TLR-4 ligandina, on gramnegatiivsete bakterite peamine komponent ja kõrge LPS plasmataase on tõenäoliselt suurenenud soole läbilaskvuse tulemus. LPS on oluline faktor neuropõletiku kujunemises oma mõju tõttu aju endoteelirakkudele, mis toodavad TLR-4 (Nagyoszi et al., 2010). LPS võib suurendada vere-aju barjääri läbilaskvust mitme erineva tee kaudu (Jaeger et al., 2009; Wispelwey et al., 1988; Xiaio et al., 2001) (**Joonis 1, tee 5**). See võib suurendada aju endoteelirakkude kaudu endotsütoosi (Banks et al., 1999) ja lihtsustada immuunrakkude liikumist (de Vries et al., 1994; Persidsky et al., 1997).

Veelgi enam, LPS võib stimuleerida aju endoteelirakke tsütokiine sekreteerima (Reyes et al., 1999; Verma et al., 2006). Suurenenud LPS tase tõsise autismiga patsientide hulgas võib stimuleerida aju endoteelirakke eritama tsütokiine ja muuta vere-aju barjääri läbilasvamaks. See omakorda suurendab neuropõletikku ja võib seeläbi ägestada käitumuslikke ilminguid. See võib selgitada korrelatsiooni LPS taseme ja autistide käitumishäirete tõsiduse vahel.

## 5. mTOR KUI VÕIMALIK LÜLI ASH-GA SEOTUD IMMUUNHÄIRETE JA KESKNÄRVISÜSTEEMI (CNS) VAHEL

Imetajate rapamütsiinsihivalk mTOR (*mammalian target of rapamycin* mTOR) on hästi säilinud rakusisene seriini/treoniini kinaas, mis reguleerib rakkude kasvu ja ainevahetust vastuseks paljudele erinevatele signaalidele, sh kasvufaktorid, toitained, energia- ja põletikulised faktorid (Hay and Sonenberg, 2004; Sengupta et al., 2010; Wullschleger et al., 2006). mTOR kuulub fosfoinositiid-3-kinaasiga (*phosphoinositide 3-kinase*, *PI3K*) seotud kinaaside perekonda ja toimib kui katalüütiline allühik kahele struktuuraalselt ja funktsionaalselt erinevale multiproteiini kompleksile, mida nimetatakse mTOR kompleks 1 (mTORC1) ja mTOR kompleks 2 (mTORC2). **Joonis 2** kirjeldab piltlikult ja skemaatiliselt peamiseid ülenevaid ja alanevaid mTOR signaalradasid.

Insuliini kinnitumine insuliinireseptorile rakumembraanis viib insuliini retseptori substraadi (*insulin receptor substrate*, *IRS*) värbamise ja fosforüülimiseni, mis resulteerub Ras-I taolise väikese GTP-aasi Rheb'i aktivatsiooniga (*Ras homolog enriched in brain*, *Rheb*). Rheb seondub otseselt mTOR-ga mTORC1 puhul ja stimuleerib mTORi katalüütilist aktiivsust, kutsudes esile spetsiifiliste sihtmärkide fosforüülimise, mis reguleerivad valkude sünteesi ja paljusid teisi kasvuga seotud protsesse (Fingar and Blenis, 2004). Teised mTORC1 ülenevad signaalid on toitained, energia ja põletikuline stress, nagu tsütokiinid ja immunoglobuliini retseptoritega ristseandumine (Wullschleger et al., 2006). Vastupidiselt mTORC1-le on suhteliselt vähe teada mTORC2 ülenevast signalisatsioonist. Siiski, mTORC2 võib kaudselt aktiveerida mTORC1-e.

ASH-ga patsientide puhul on leitud mitmeid geenimutatsioone, mis on kindlalt seotud mTOR signaalirajaga. Tuberoosne skleroos (*tuberous sclerosis*) on geneetiline häire, mis on põhjustatud heterosügootsete mutatsioonide poolt mTOR rajas, seotud tuberoosse skleroosi kompleksi Tsc1 või Tsc2 geenidega ning sageli seostatud autistliku fenotüübiga. Tsc2 geeni heterosügootse mutatsiooniga hiirtel (Tsc2 +/- hiired) on tugevamad mTOR signaalid hipokampuses, mis annavad panuse õpiraskuste ja mäluprobleemide kujunemisse. Täiskasvanud Tsc2+/- hiirte ravi rapamütsiiniga parandas õppimis- ja mäluhäired (Ehninger et al., 2008). Lisaks sellele oli Tsc1+/- hiirte puhul märgata sotsiaalse käitumise ja kognitiivsete funktsioonide halvenemist (Goorden et al., 2007).

Fosfataasi ja tensiini homolog PTEN (*phosphatase and tensin homolog*, *PTEN*), kustutatud kümnendast kromosoomist, käitub fosfataasina, mis defosforüülib ühe üleneva TSC/mTOR-ga seotud signaali transduktsiooni molekulid, tuues kaasa mTOR-i suurema aktiivsuse. PTEN-i mutatsioonid on seotud mitmete erinevate neuroloogiliste häiretega, k.a. ASH (Rosner et al., 2008). PTEN geenimutatsiooni analüüsi soovitatakse makrotsefaaliaga patsientidele – seisund, mida esineb 20%-l ASH-ga patsientidest (Butler et al., 2005). PTEN - puudusega hiirtel on PTENi puudus ajukoore ja hipokampuse neuronites ning see toob kaasa kaasa autistlike fenotüüpide, nagu makrotsefaalia ja häiritud sotsiaalse käitumise, väljaarenemise.

Lisaks on märgatud muutusi rakumorfoloogias, sh neuronite hüpertroofia ja neuronite polaarsuse kadumine, mis tähendab, et aksonite ja dendriitide rajamine on neis neuronites häiritud. PTEN-puudusega hiirte ravi rapamütsiiniga parandas neuronite hüpertroofiat ja makrotsefaaliat ja ASH-le omaseid käitumishäireid (Zhou et al., 2009). Veelgi enam, mTOR on haaratud proteiini sünteesist sõltuvasse sünaptogeneesi. mTOR raja aktiveerimine võib suurendada sünaptiliste

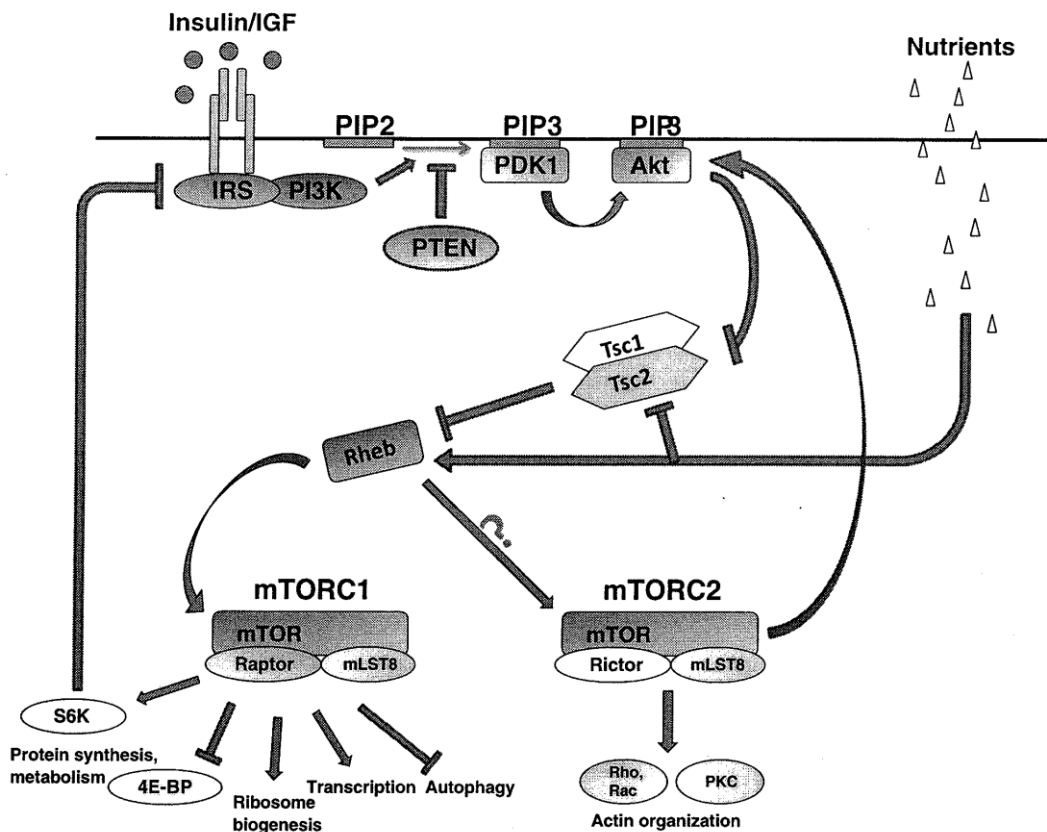
signaalvalkude tootmist ja uute seljaaju sünapside moodustamist rottide prefrontaalses ajukoos. mTOR inhibeerimine rapamütsiiniga blokeeris rottide sünaptilise valgusünteesi ja antidepressantse käitumisvastuse.

Järjest enam selgub, et mTOR mängib ka olulist rolli immuunvastuste suunamises. Hiljutine uurimus oletab, et Th1 ja Th17 diferentseerumine on spetsiifiliselt reguleeritud mTORC1 signaliseerimise poolt. Vatupidiselt sellele sõltub Th2 diferentseerumine mTORC2 signaliseerimisest, kuna T rakud, kus mTORC2 aktiivsus on elimineeritud, ei suutnud diferentseeruda Th2 rakkudeks ei in vitro ega in vivo, aga olid suutelised diferentseeruma Th1 ja Th17 rakkudeks (Li et al., 2010). Veelgi enam, näidati, et T rakud diferentseerusid reguleeritult T rakkudeks tavalise rapamütsiini doosi juures, mis pidurdab mTORC1 ja mTORC2 (Li et al., 2010). Tõesti, rapamütsiini poolt esile kutsutud mTOR pärssimine resulteerus kõrgeenenud reguleeritult T-rakkude tasemega kroonilise allergilise nohu käes kannatavate patsientide ninapolüüpide koekultuuris (Xu et al., 2009). Veelgi enam, mTORC1 aktivatsioon nuumrakkudes on seotud tähtsate "allergiliste" rakkude eluspüsimise, diferentseerumise, migratsiooni/liikumise ja tsütokiinide tootmisega (Kim et al., 2008). Lõpetuseks - tõusnud mTOR aktiivsus on nõrgendanud autofaagiat (Yu et al., 2010). See leid võib selgitada vähenenud põletikurakkude eemaldamist ja nende säilimist allergilise põletiku kohtades. Kokkuvõttes võib öelda, et tänu oma funktsioonile immuun- ja neuronaaletes teedes võib mTOR olla üks võimalik eesmärk ASH ravis.

## JOONIS 2

*Joonis 2. mTOR signaaliraja skeem. mTORC1 sisaldab lisaks mTOR-ile nelja komponenti: reguleeritult seotud mTORI-1 valk (Raptor- regulatory associated protein of mTOR), imetajate letaalne koos Sec 13-ga valk 8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8 –mLST8; tuntud ka kui GβL), proliinirikas AKT substraat 40 kDa (PRAS40) ja DEP-domeeni-sisaldav mTOR-vastastikku toimiv valk (Deptor - DEP-domain-containing mTOR-interacting protein). mTORC2 jagab mitmeid valke mTORC1-ga ja koosneb kuuest erinevast valgust: mTOR, rapamütsiinitundetu mTOR-i kaaslane (Rictor - rapamycin-insensitive companion of mTOR), imetajate stress-aktiveeritud protein-kinaasi vastastikku toimiv valk (mSIN1- mammalian stressed-activated protein kinase interacting protein), koos Rictor-1ga vaadeldud valk (Protor-1 -protein observed with Rictor-1), mLST8 ja Deptor (Hay and Sonenberg, 2004; Sengupta et al., 2010).*

*Kaks multi-valgulist kompleksi, mTORC1 ja mTORC2, on keskselt haaratud mTOR signaalivõrgustikku. mTORC1, mis on rapamütsiinitundlik, aktiveeritakse kasvufaktorite poolt läbi PI3K/Akt signaaliraja ja samuti toitainete, energia ja stressi poolt, viies S6K ja 4EBP1 fosforüülimiseni ja reguleerides seda kaudu valgusünteesi ja rakukasvu. Vastupidiselt mTORC1-le, on rapamütsiinitundetu mTORC2-e ülenev signalisatsioon hetkel tundmatu. mTORC2 võib otseselt fosforüülda Akt mTORC1 ülenemist ja seekaudu kaudselt aktiveerida mTORC1. mTORC2 on samuti haaratud tsütoskeleti organiseerimise reguleerimise läbi PKC, RhoA ja Rac1 aktiveerimise.*



2. Schematic illustration of mTOR signaling pathway. mTORC1 comprises four components apart from mTOR: regulatory associated protein of mTOR (Raptor), mammalian lethal Sec13 protein 8 (mLST8; also known as GBL), proline-rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40), and DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor). mTORC2 shares several proteins with mTORC1 and is composed of six different proteins: mTOR, rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), mammalian stressed-activated protein kinase acting protein (mSIN1), protein observed with Rictor-1 (Protor-1), mLST8 and Deptor (Hay and Sonenberg, 2004; Sengupta et al., 2010). Two multi-protein complexes, mTORC1 and mTORC2, are centrally involved in the mTOR signaling network. mTORC1, which is rapamycin sensitive, is activated by growth factors through the PI3K/Akt signaling pathway by nutrients, energy, stress, leading to the phosphorylation of S6K and 4EBP1 and thereby regulating protein synthesis and cell growth. In contrast to mTORC1, the upstream signaling of rapamycin insensitive mTORC2 is currently unknown. mTORC2 can directly phosphorylate Akt upstream of mTORC1 and thereby indirectly activate mTORC1. mTORC2 also been involved in regulating cytoskeletal organization through the activation of PKC and RhoA and Rac1

## 6. MAO-SOOLETRAKT KUI SIHTMÄRK ASH PUHUL

Paljud vanemad teavad, et nende autistlik laps kannatab mao-sooletrakti vaevuste käes. See on viinud uurimusteni seedetrakti häirete levimuse ja iseloomu kohta autistide hulgas.

Seedetrakti vaevuste levimuse vastuolulised andmed tulenevad erinevatest faktidest: mao-sooletrakti sümptomite tõlgendamine, patsientide sotsiaalsed ja suhtlemisraskused ning ASH heterogeensus. Autistliku käitumise ägedus on vastavuses mao-sooletrakti vaevuste, suurenenud soole läbilaskvuse ja kõrgeenenud seerumi LPS, tsütokiinide ja kemokiinide tasemega.

Sellest tulenevalt järeldame, et geneetilise eelsoodumusega lapsed on tundlikumad ASH väljaarenemisele siis, kui neil on immuunsüsteemi häireid või et mao-sooletrakti põletik halvendab ASH-ga laste käitumist. See võib tähendada, et immuunsust mõjutavad toitumislikud sekkumised (polüküllastumata rasvhapped ja pre- või probiootikumid), allergeenide vaba toitumine ja ravimid (nuumraku stabiliseerijad ja põletikuvastased või immuunsust alla suruvad immuunsupressiivsed ravimid) mao-sooletrakti põletike raviks võivad samuti olla kasulikud autistliku käitumise ravimisel.

Tihti on välja toodud täiendava ja alternatiivse meditsiini kasutamist (Complementary and Alternative Medicine, CAM) ASH-ga laste puhul (Golnik and Ireland, 2009; Hanson et al., 2007; Harrington et al., 2006; Levy et al., 2003; Levy and Hyman, 2003; Weber and Newmark, 2007; Wong and Smith, 2006). Sellise ravi näideteks on vitamiinide ja mineraalainete preparaatide kasutamine, sekretiini, melatoniini ning gluteeni- ja kaseiinivaba toitumise kasutamine (Levy et al., 2003). Praeguseks on u.50% ASH-ga laste vanematest proovinud CAM kasutamist (Levy and Hyman, 2003) ning pooled neist kasutavad gluteeni- ja kaseiinivaba toitumist (Levy et al., 2003).

Hiljutise uuringu tulemused näitavad, et gluteeni- ja piimavaba toitumine parandab ASH laste käitumist (Whiteley et al., 2010). See viitab toiduga seotud ülitundlikkuse või allergia olemasolule autistide hulgas. Gluteeni- ja piimavaba toitumise kõrval võib lisana kasutada vabade aminohapete segu, et ära hoida toitainete puudust. Eliminatsioonidieedile lisaks võivad autistliku käitumise ning sellega seotud mao-sooletrakti sümptomite puhul kasuks tulla toidulisanditena oomega-3 rasvhapped ning pre- ja probiootikumid tänu nende mõjule kesknärvisüsteemile, immuunsüsteemile ja/või soolestiku mikrobioota profiilile.

Järjest rohkem on tõendeid selle kohta, et prebiootikumidel on toime mitte ainult soole limaskestale, vaid ka süsteemsele immuunsusele. Prebiootikumid on mitteseeditavad toiduosakesed, mis mõjuvad soodsalt peremeesorganismile, stimuleerides selektiivselt Bifidobakterite ja piimhappebakterite kasvu ja/või aktiivsust käärsooles, mis on terve soolestiku mikrofloora olulised markerid (Costalos et al., 2008; Frece et al., 2009; Langlands et al., 2004). Asjatundjate arvamused prebiootikumide kohta on saanud alguse nende võimest stimuleerida rinnapiima kasulikke toimeid (Boehm et al., 2004a,b; van Hoffen et al., 2009). Inimpäritolu piim soosib “bifidus flora” kasvu, mis aktiveerib immuunsüsteemi ja kaitseb patogeenide eest. Hiljutine uuring toob välja, et prebiootikumidel on pikaajaline bifidogeenne toime imikute soolestikus (Salvini et al., 2011).

Mitteseeduvad oligosahhariidid on näited prebiootikumidest, mis koosnevad looduslikest suhkru algühikutest monoosidest (näiteks glükoos, fruktoos ja galaktoos). Selliseid oligosahhariide peensoole ülemises osas ei hüdrolyüsita ja nad jõuavad jämesoolde, et olla substraatideks bakterite metabolismis (Engfer et al., 2000). Mitmed uuringud on näidanud mitteseeduvate oligosahhariidide kasulikkust haiguse arenegus ja immuunsuse seisundis, sealhulgas hiire allergia mudelites (Schouten et al., 2010) ja allergiaravi kliinilistes uuringutes (van Hoffen et al., 2009). Suu kaudu manustatud mitteseeduvate süsivesikute immuunmoduleerivad mõjud ja potentsiaalsed toimimismehhanismid on välja toodud uurimuses Vos et al. (2007). Kuna ASH patsientide mikrofloora profiil on rikastatud patogeeniliste bakteriliikidega (Finegold et al., 2002, 2010; Parracho et al., 2005; Song et al., 2004), siis need võivad ägestada haigust (Sandler et al., 2000) ning patsiendid võivad kasu saada prebiootilistest toidulisanditest.

Probiootikumid võivad samuti olla üheks valikuks ASH patsientide mao-sooletrakti probleemide puhul. Kuigi probiootikumidega teostatud funktsionaalsete uuringute tulemustest ei saa teha usaldusväärseid järeldusi, kinnitavad mõned tõendid, et probiootilised toidulisandid on seotud vähenenud riskiga haigestuda mittespetsiifilistesse mao-sooletrakti infektsioonidesse ning on seotud harvemate koolikavalude või ärrituvusega (Braegger et al., 2011). ASH patsientide puhul täheldati kasuliku Bifidobakteri madalamat taset. Seda bakterit seostatakse ka toiduallergia ja



põletikuliste soolehaigustega, oletades, et nende madal tase võib olla märk ASH puhul esinevast gastrointestinaalsest immuunhäiretest. Veelgi enam, ASH patsientidel täheldati ka suurenenud soole läbilaskvust. Kuna probiootikumid arvatakse vähendavat soole läbilaskvust ja taastavat “tervet” soolestikku (Bodera and Chcialowski, 2009; Ramakrishna, 2009; Reid et al., 2011), võib probiootikumidel olla soodne mõju autistidest patsientide mao-sooletrakti probleemidele ja käitumishäiretele.

Veel üks toitumisalane sekkumine, mis võib ASH puhul kasulik olla, on polüküllastumata rasvhapete (PUFAs) tarbimine. ASH patsientide puhul on korduvalt täheldatud oomega-3 rasvhapete alanenud taset perifeersetes vererakkudes (Bell et al., 2004; Vancassel et al., 2001). Peale ravimist oomega-3 rikka kalaõliga rasvhapete tase tõusis ja oli näha vähenenud oomega-6:omega-3 suhet (Meguid et al., 2008). Veelgi enam, peale ASH patsientide kalaõliga ravimist oli näha märkimisväärset paranemist käitumises.

Polüküllastumata rasvhapete mõju autistlikule käitumisele võib avalduda läbi kahe erineva mehhanismi. Polüküllastumata rasvhapped astesevad müeliintupes, närvirakkude membraanide fosfolipiidides (Agostoni et al. 1995), kus nad moduleerivad membraani voolavust ja sellega ka neuronaalset funktsioneerimist, sealhulgas retseptorite funktsioone ning neurotransmitterite vabastamist ja tagasivõttu (Murphy, 1990). Oomega-3 rasvhapete vähesus viib õpiraskuste ja mälukaotuseni (Lauritzen et al., 2001). Peale mõju ajule on leitud, et oomega-3 rasvhapped moduleerivad immuunvastust. Oomega-3 rasvhappeid võidakse sisse haarata ka immuunrakkude membraanidesse, kus nad moduleerivad rakkudevahelisi radu, viies põletikuvastase vastuseni (Calder, 2010).

Seda põletikuvastast vastust vahendatakse paljude iseseisvate mehhanismide poolt. Esmalt tuleneb oomega-3 mõju sellest, et ta vahetab välja põletikku tekitava propõletikulise oomega-6 rea rasvhappe arahhidoonhappe. Teiseks suurendavad oomega-3 rasvhapped resolviinide tootmist, mis võivad lahendada põletikku (Serhan et al., 2008). Kolmandaks, oomega-3 rasvhapped vähendavad adhesioonimolekulide tootmist ja hoiavad ära monotsüütide ja makrofaagide kleepumise (De Caterina and Libby, 1996; Miles et al., 2000). Lõpuks, oomega-3 rasvhapped vähendavad põletikuliste tsütokiinide tootmist (Calder, 2008). See tähendab, et oomega-3 toidulisandite kasutamine võib olla ASH patsientide puhul tulemuslik, kuna oomega-3 rasvhapped võivad mõjutada neuronalseid vastuseid kas otseselt või kaudselt läbi immuunsüsteemi ja mao-sooletrakti.

Tänapäeval sisaldab ASH ravi käitumis-, kasvatus- ja farmakoloogilist teraapiat. Autismiga seonduvate sümptomite puhul ei ole ükski ravim osutunud efektiivseks. Kuna aga paljud käitumisjooned on sarnased serotoniiniga seotud häiretele ja kuna ühe kolmandikul autistidel on vereplasmas kõrge serotoniinitase, on tihti ASH patsientidele välja kirjutatud SSRId (selektiivsed serotoniini tagasihaarde inhibiitorid). Oletatakse, et mao-sooletrakti häired ASH patsientidel viivad kõrge serotoniinitasemeni soolestikus. Seda peegeldub veres hüperserotoneemias ning see viib vähenenud trüptofaani saadavusele aju jaoks, mis omakorda viib vähenenud serotoniinisünteesile ajus. Selle hüpoteesi järgi on efektiivsem soovitus kombineerida SSRId toitumise korrigeerimisega. Tugev soolestiku-aju ühendus, mida siinses ülevaates on kirjeldatud, toob välja kaaluka võimaluse ravida aju läbi soolestiku ja immuunsüsteemi, kasutades toitumislikke sekkumisi.

## TÄNUSÕNAD

Caroline G.M. de Theije osalemine on finantseeritud Danone Uurimiskeskuse Spetsiaalse Toitumise Keskuse poolt.

Sofia Lopes da Silva, Patrick J. Kamphuis ja Johan Garssen on Danone Uurimiskeskuse Spetsiaalse Toitumise Keskuse töötajad.

## VIITED

Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quiq, D., Rubin, R.A., 2011. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism — comparisons to neurotypical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 11, 22–34.

Adlerberth, I., Strachan, D.P., Matricardi, P.M., Ahrné, S., Orfei, L., Åberg, N., Perkin, M.R., Tripodi, S., Hesselmar, B., Saalman, R., Coates, A.R., Bonanno, C.L., Panetta, V., Wold, A.E., 2007. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 343–350.

Afzal, N., Murch, S., Thirrupathy, K., Berger, L., Fagbemi, A., Heuschkel, R., 2003. Constipation with acquired megarectum in children with autism. *Pediatrics* 112, 939–942.

Agostoni, C., Riva, E., Trojan, S., Bellu, R., Giovannini, M., 1995. Docosahexaenoic acid status and developmental quotient of healthy term infants. *Lancet* 346, 638.

Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165–179.

American-Psychiatric-Association, 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. DSM-IV 4th edn.* American Psychiatric Press, Washington DC.

Anderson, G.M., Freedman, D.X., Cohen, D.J., Volkmar, F.R., Hoder, E.L., McPhedran, P., Minderaa, R.B., Hansen, C.R., Young, J.G., 1987. Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *J. Child Psychol. Psychiatry* 28, 885–900.

Angelidou, A., Francis, K., Vasiadi, M., Alysandratos, K.D., Zhang, B., Theoharides, A., Lykouras, L., Sideri, K., Kalogeromitros, D., Theoharides, T.C., 2010. Neurotensin is increased in serum of young children with autistic disorder. *J. Neuroinflammation* 7, 48.

Ashwood, P., Wakefield, A.J., 2006. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J. Neuroimmunol.* 173, 126–134.

Ashwood, P., Anthony, A., Pellicer, A.A., Torrente, F., Walker-Smith, J.A., Wakefield, A.J.,

2003. Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J. Clin. Immunol.* 23, 504–517.

Ashwood, P., Enstrom, A., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R.L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Pessah, I.N., de Water, J.V., 2008. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *J. Neuroimmunol.* 204, 149–153.

Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., Van de Water, J., 2011a. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav. Immun.* 25, 40–45.

Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I.N., Van de Water, J., 2011b. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J. Neuroimmunol.* 232, 196–199.

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Dhabhar, F.S., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R.C., Bucala, R., 1998. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol. Med.* 4, 217–230.

Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., Rutter, M., 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* 25, 63–77.

Banks, W.A., Erickson, M.A., 2010. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 37, 26–32.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Gutierrez, E.G., 1994. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 179, 53–56.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Brennan, J.M., Vallance, K.L., 1999. Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood-brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. *Exp. Neurol.* 156, 165–171.

Bauer, J., Rauschka, H., Lassmann, H., 2001. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia* 36, 235–243.

Bauer, B., Hartz, A.M.S., Miller, D.S., 2007. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol. Pharmacol.* 71, 667–675.

Bauman, M.L., Kemper, T.L., 2003. The neuropathology of the autism spectrum disorders: what have we learned? *Novartis Found. Symp.* 251, 112–122 Discussion 122-118, 281-197.

Bell, J.G., MacKinlay, E.E., Dick, J.R., MacDonald, D.J., Boyle, R.M., Glen, A.C., 2004. Essential fatty acids and phospholipase A2 in autistic spectrum disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71, 201–204.

- Black, C., Kaye, J.A., Jick, H., 2002. Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism: nested case-control study using data from the UK General Practice. *Research Database. BMJ* 325, 419–421.
- Bodera, P., Chcialowski, A., 2009. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3, 58–64.
- Boehm, G., Jelinek, J., Knol, J., M'Rabet, L., Stahl, B., Vos, P., Garssen, J., 2004a. Prebiotics and immune responses. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39 (Suppl. 3), S772–S773.
- Boehm, G., Jelinek, J., Stahl, B., van Laere, K., Knol, J., Fanaro, S., Moro, G., Vigi, V., 2004b. Prebiotics in infant formulas. *J. Clin. Gastroenterol.* 38, S76–S79.
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Piescik, M., Puntis, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D., van Goudoever, J., 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 52, 238–250.
- Bugno, M., Witek, B., Bereta, J., Bereta, M., Edwards, D.R., Kordula, T., 1999. Reprogramming of TIMP-1 and TIMP-3 expression profiles in brain microvascular endothelial cells and astrocytes in response to proinflammatory cytokines. *FEBS Lett.* 448, 9–14.
- Burgess, N.K., Sweeten, T.L., McMahon, W.M., Fujinami, R.S., 2006. Hyperserotoninemia and altered immunity in autism. *J. Autism Dev. Disord.* 36, 697–704.
- Butler, M.G., Dasouki, M.J., Zhou, X.P., Talebizadeh, Z., Brown, M., Takahashi, T.N., Miles, J.H., Wang, C.H., Stratton, R., Pilarski, R., Eng, C., 2005. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J. Med. Genet.* 42, 318–321.
- Calder, P.C., 2008. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 885–897.
- Calder, P.C., 2010. Rationale and use of n-3 fatty acids in artificial nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 565–573.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., Watanabe, Y., 1996. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res.* 733, 263–272.
- Chugani, D.C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J.J., Lee, J., Chugani, H.T., 1999. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann. Neurol.* 45, 287–295.

Costalos, C., Kapiki, A., Apostolou, M., Papathoma, E., 2008. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early Hum. Dev.* 84, 45–49.

Courchesne, E., Carper, R., Akshoomoff, N., 2003. Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *Jama* 290, 337–344.

Coutinho, A.M., Sousa, I., Martins, M., Correia, C., Morgadinho, T., Bento, C., Marques, C., Ataíde, A., Miguel, T.S., Moore, J.H., Oliveira, G., Vicente, A.M., 2007. Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Hum. Genet.* 121, 243–256.

Croen, L.A., Grether, J.K., Yoshida, C.K., Odouli, R., Van de Water, J., 2005. Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case–control study. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 159, 151–157.

De Caterina, R., Libby, P., 1996. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 31, S57–S63 (Suppl).

de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Froli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., Militerni, R., Bravaccio, C., 2010. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 418–424 (410.1097/MPG.1090b1013e3181dcc1094a1095).

de Vries, H.E., Moor, A.C.E., Blom-Roosemalen, M.C.M., de Boer, A.G., Breimer, D.D., van Berkel, T.J.C., Kuiper, J., 1994. Lymphocyte adhesion to brain capillary endothelial cells in vitro. *J. Neuroimmunol.* 52, 1–8.

Deli, M.A., Descamps, L., Dehouck, M.P., Cecchelli, R., Joo, F., Abraham, C.S., Torpier, G., 1995. Exposure of tumor necrosis factor- $\alpha$  to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J. Neurosci. Res.* 41, 717–726.

D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., Giardini, O., 1996. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr.* 85, 1076–1079.

Ecker, C., Marquand, A., Mourao-Miranda, J., Johnston, P., Daly, E.M., Brammer, M.J., Maltezos, S., Murphy, C.M., Robertson, D., Williams, S.C., Murphy, D.G., 2010. Describing the brain in autism in five dimensions—magnetic resonance imaging-assisted diagnosis of autism spectrum disorder using a multiparameter classification approach. *J. Neurosci.* 30, 10,612–10,623.

Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D.J., Ramesh, V., Silva, A.J., 2008. Reversal of learning deficits in a *Tsc2*<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nat. Med.* 14, 843–848.

Elder, J., Shankar, M., Shuster, J., Theriaque, D., Burns, S., Sherrill, L., 2006. The glutenfree, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *J. Autism Dev. Disord.* 36, 413–420.

Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., di Nemi, S.U., Politi, P., 2010. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci. Lett.* 471, 162–165.

Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., Daniel, H., 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1589–1596.

Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556–562.

Finegold, S.M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.-L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E.M., Collins, M.D., Lawson, P.A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T.J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., Shah, H., Haake, D.A., Manning, P., Kaul, A., 2002. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin. Infect. Dis.* 35, S6–S16.

Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh, D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D.R., Green Iii, J.A., 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16, 444–453.

Fingar, D.C., Blenis, J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151–3171.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Beganovic, J., Lebos, A., Suskovic, J., 2009. Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *J. Dairy Res.* 76, 98–104.

Furlano, R.I., Anthony, A., Day, R., Brown, A., McGarvey, L., Thomson, M.A., Davies, S.E., Berelowitz, M., Forbes, A., Wakefield, A.J., Walker-Smith, J.A., Murch, S.H., 2001. Colonic CD8 and  $\gamma\delta$  T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J. Pediatr.* 138, 366–372.

Galli-Carminati, G., Chauvet, I., Deriaz, N., 2006. Prevalence of gastrointestinal disorders in adult clients with pervasive developmental disorders. *J. Intellect. Disabil. Res.* 50, 711–718.

Genuis, S.J., 2009. Is autism reversible? *Acta Paediatr.* 98, 1575–1578.

Golnik, A.E., Ireland, M., 2009. Complementary alternative medicine for children with autism: a physician survey. *J. Autism Dev. Disord.* 39, 996–1005.

Goorden, S.M., van Woerden, G.M., van der Weerd, L., Cheadle, J.P., Elgersma, Y., 2007.

Cognitive deficits in *Tsc1*<sup>+/-</sup> mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann. Neurol.* 62, 648–655.

Grigorenko, E.L., Han, S.S., Yrigollen, C.M., Leng, L., Mizue, Y., Anderson, G.M., Mulder, E.J., de Bildt, A., Minderaa, R.B., Volkmar, F.R., Chang, J.T., Bucala, R., 2008. Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. *Pediatrics* 122, e438–e445.

Gupta, S., Aggarwal, S., Rathanravan, B., Lee, T., 1998. Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J. Neuroimmunol.* 85, 106–109.

Gurney, J.G., McPheeters, M.L., Davis, M.M., 2006. Parental report of health conditions and health care use among children with and without autism: national survey of children's health. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 160, 825–830.

Gutierrez, E.G., Banks, W.A., Kastin, A.J., 1993. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J. Neuroimmunol.* 47, 169–176.

Hanley, H.G., Stahl, S.M., Freedman, D.X., 1977. Hyperserotonemia and amine metabolites in autistic and retarded children. *Arch. Gen. Psychiatry* 34, 521–531.

Hanson, E., Kalish, L.A., Bunce, E., Curtis, C., McDaniel, S., Ware, J., Petry, J., 2007. Use of complementary and alternative medicine among children diagnosed with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 37, 628–636.

Harrington, J.W., Rosen, L., Garnecho, A., Patrick, P.A., 2006. Parental perceptions and use of complementary and alternative medicine practices for children with autistic spectrum disorders in private practice. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 27, S156–S161.

Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945.

Hertz-Picciotto, I., Delwiche, L., 2009. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology* 20, 84–90.

Horvath, K., Papadimitriou, J.C., Rabsztyn, A., Drachenberg, C., Tildon, J.T., 1999. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *J. Pediatr.* 135, 559–563.

Hsu, C.L., Lin, C.Y., Chen, C.L., Wang, C.M., Wong, M.K., 2009. The effects of a gluten and casein-free diet in children with autism: a case report. *ChangGungMed. J.* 32, 459–465.

Ibrahim, S.H., Voigt, R.G., Katusic, S.K., Weaver, A.L., Barbaresi, W.J., 2009. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics* 124, 680–686.

Jaeger, L.B., Dohgu, S., Sultana, R., Lynch, J.L., Owen, J.B., Erickson, M.A., Shah, G.N., Price,

T.O., Fleegal-Demotta, M.A., Butterfield, D.A., Banks, W.A., 2009. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid [beta] protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Behav. Immun.* 23, 507–517.

Johnson, C.P., Myers, S.M., 2007. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 120, 1183–1215.

Jyonouchi, H., Geng, L., Ruby, A., Reddy, C., Zimmerman-Bier, B., 2005. Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J. Pediatr.* 146, 605–610.

Jyonouchi, H., Geng, L., Cushing-Ruby, A., Quraishi, H., 2008. Impact of innate immunity in a subset of children with autism spectrum disorders: a case control study. *J. Neuroimmunol.* 5, 52.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrientsensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.

Kim, M.S., Kuehn, H.S., Metcalfe, D.D., Gilfillan, A.M., 2008. Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J. Immunol.* 180, 4586–4595.

King, C.R., 2011. A novel embryological theory of autism causation involving endogenous biochemicals capable of initiating cellular gene transcription: a possible link between twelve autism risk factors and the autism 'epidemic'. *Med. Hypotheses* 76, 653–660.

Knivsberg, A.M., Reichelt, K.L., HØien, T., NØdland, M., 2002. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr. Neurosci.* 5, 251–261.

Langlands, S.J., Hopkins, M.J., Coleman, N., Cummings, J.H., 2004. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut* 53,1610–1616.

Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., Michaelsen, K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* 40, 1–94.

Levy, S.E., Hyman, S.L., 2003. Use of complementary and alternative treatments for children with autistic spectrum disorders is increasing. *Pediatr. Ann.* 32, 685–691.

Levy, S.E., Mandell, D.S., Merhar, S., Ittenbach, R.F., Pinto-Martin, J.A., 2003. Use of complementary and alternative medicine among children recently diagnosed with autistic spectrum disorder. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 24, 418–423.

Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A.M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X.-M., Ji, L., Brown, T., Malik, M., 2009. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.* 207, 111–116.



Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959–964.

London, E.A., 2000. The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 401–404.

Lucarelli, S., Frediani, T., Zingoni, A.M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Quintieri, F., Barbato, M., D'Eufemia, P., Cardi, E., 1995. Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med.* 37, 137–141.

Luyster, R., Gotham, K., Guthrie, W., Coffing, M., Petrak, R., Pierce, K., Bishop, S., Esler, A., Hus, V., Oti, R., Richler, J., Risi, S., Lord, C., 2009. The Autism Diagnostic Observation Schedule—toddler module: a new module of a standardized diagnostic measure for autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 39, 1305–1320.

McDougle, C.J., Naylor, S.T., Cohen, D.J., Aghajanian, G.K., Heninger, G.R., Price, L.H., 1996. Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 53, 993–1000.

McEwen, B.S., Tanapat, P., Weiland, N.G., 1999. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinology* 140, 1044–1047.

McLay, R.N., Kastin, A.J., Zadina, J.E., 2000. Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: a possible mechanism for diminished fever in aging. *Neuroimmunomodulation* 8, 148–153.

Meguid, N.A., Atta, H.M., Gouda, A.S., Khalil, R.O., 2008. Role of polyunsaturated fatty acids in the management of Egyptian children with autism. *Clin. Biochem.* 41, 1044–1048.

Miles, E.A., Wallace, F.A., Calder, P.C., 2000. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. *Atherosclerosis* 152, 43–50.

Millward, C., Ferriter, M., Calver, S., Connell-Jones, G., 2008. Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database Syst. Rev.* Issue 2, Art. No:CD003498, 1–27.

Minderaa, R.B., Anderson, G.M., Volkmar, F.R., Akkerhuis, G.W., Cohen, D.J., 1987. Urinary 5-hydroxyindoleacetic acid and whole blood serotonin and tryptophan in autistic and normal subjects. *Biol. Psychiatry* 22, 933–940.

MMWR, 2009. Prevalence of autism spectrum disorders — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill. Summ.* 58, 1–20.

Molloy, C.A., Morrow, A.L., Meinzen-Derr, J., Schleifer, K., Dienger, K., Manning-Courtney,

P., Altaye, M., Wills-Karp, M., 2006. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J. Neuroimmunol.* 172, 198–205.

Mouridsen, S.E., Rich, B., Isager, T., 2009. A longitudinal study of gastrointestinal diseases in individuals diagnosed with infantile autism as children. *Child Care Health Dev.* 36, 437–443.

Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.

Mulder, E.J., Anderson, G.M., Kemperman, R.F., Oosterloo-Duinkerken, A., Minderaa, R.B., Kema, I.P., 2010. Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid, serotonin and 6-sulphatoxymelatonin in normoserotonemic and hyperserotonemic autistic individuals. *Neuropsychobiology* 61, 27–32.

Murphy, M.G., 1990. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J. Nutr. Biochem.* 1, 68–79.

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T., Hasko, J., Krizbai, I.A., 2010. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 57, 556–564.

Okada, K., Hashimoto, K., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Tsuchiya, K.J., Sekine, Y., Suda, S., Suzuki, K., Sugihara, G., Matsuzaki, H., Sugiyama, T., Kawai, M., Minabe, Y., Takei, N., Mori, N., 2007. Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 187–190.

Pan, W., Banks, W.A., Kastin, A.J., 1997. Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. *J. Neuroimmunol.* 76, 105–111.

Pang, K., Croaker, G., 2011. Constipation in children with autism and autistic spectrum disorder. *Pediatr. Surg. Int.* 27, 353–358.

Parracho, H.M.R.T., Bingham, M.O., Gibson, G.R., McCartney, A.L., 2005. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol.* 54, 987–991.

Peeters, B., Benninga, M.A., Loots, C.M., van der Pol, R.J., Burgers, R.E., Philips, E.M., Wepster, B.W., Tabbers, M.M., Noens, I.L., 2011. PD-G-0181: autism spectrum disorders and autism spectrum symptoms in children with functional defecation disorders. 44th annual meeting ESPGHAN Sorrento (Italy).

Persidsky, Y., Stins, M., Way, D., Witte, M.H., Weinand, M., Kim, K.S., Bock, P., Gendelman, H.E., Fiala, M., 1997. A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J. Immunol.* 158, 3499–3510.

Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., Antel, J.P., 2001. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145–155.

- Ramakrishna, B.S., 2009. Probiotic-induced changes in the intestinal epithelium: implications in gastrointestinal disease. *Trop. Gastroenterol.* 30, 76–85.
- Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., Busscher, H.J., 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 27–38.
- Reyes, T.M., Fabry, Z., Coe, C.L., 1999. Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli. *Brain Res.* 851, 215–220.
- Rijnierse, A., Nijkamp, F.P., Kraneveld, A.D., 2007. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol. Ther.* 116, 207–235.
- Rosner, M., Hanneder, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., Hengstschlager, M., 2008. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat. Res.* 659, 284–292.
- Salvini, F., Riva, E., Salvatici, E., Boehm, G., Jelinek, J., Banderali, G., Giovannini, M., 2011. A specific prebiotic mixture added to starting infant formula has long-lasting bifidogenic effects. *J. Nutr.* 141, 1335–1339.
- Sandhu, B., Steer, C., Golding, J., Emond, A., 2009. The early stool patterns of young children with autistic spectrum disorder. *Arch. Dis. Child.* 94, 497–500.
- Sandler, R.H., Finegold, S.M., Bolte, E.R., Buchanan, C.P., Maxwell, A.P., Vaisanen, M.L., Nelson, M.N., Wexler, H.M., 2000. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J. Child Neurol.* 15, 429–435.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., Sabatini, D.M., 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168.
- Schain, R.J., Freedman, D.X., 1961. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J. Pediatr.* 58, 315–320.
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., Przewlocki, R., 2008. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33, 728–740.

Schouten, B., van Esch, B.C., Hofman, G.A., Boon, L., Knippels, L.M., Willemsen, L.E., Garssen, J., 2010. Oligosaccharide-induced whey-specific CD25(+) regulatory T-cells are involved in the suppression of cow milk allergy in mice. *J. Nutr.* 140, 835–841.

Schumann, C.M., Bloss, C.S., Barnes, C.C., Wideman, G.M., Carper, R.A., Akshoomoff, N., Pierce, K., Hagler, D., Schork, N., Lord, C., Courchesne, E., 2010. Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism. *J. Neurosci.* 30, 4419–4427.

Schwartz, A., Jacobi, M., Frick, J.-S., Richter, M., Rusch, K., Köhler, H., 2010. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 157, 240–244 (e241).

Sengupta, S., Peterson, T.R., Sabatini, D.M., 2010. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* 40, 310–322.

Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual antiinflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361.

Singh, V.K., 1996. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J. Neuroimmunol.* 66, 143–145.

Smith, R.A., Farnworth, H., Wright, B., Allgar, V., 2009. Are there more bowel symptoms in children with autism compared to normal children and children with other developmental and neurological disorders?: a case control study. *Autism* 13, 343–355.

Song, Y., Liu, C., Finegold, S.M., 2004. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6459–6465.

Stanimirovic, D., Satoh, K., 2000. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 10, 113–126.

Theoharides, T.C., 2009. Autism spectrum disorders and mastocytosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 22, 859–865.

Theoharides, T.C., Donelan, J.M., Papadopoulou, N., Cao, J., Kempuraj, D., Conti, P., 2004. Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 563–568.

Torrente, F., Ashwood, P., Day, R., Machado, N., Furlano, R.I., Anthony, A., Davies, S.E., Wakefield, A.J., Thomson, M.A., Walker-Smith, J.A., Murch, S.H., 2002. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol. Psychiatry* 7, 375–382 (334).

Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G., Gottschalk, M., 2003. Proinflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 49–58.

- Valenta, R., 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 446–453.
- Valicenti-McDermott, M., McVicar, K., Rapin, I., Wershil, B.K., Cohen, H., Shinnar, S., 2006. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 27, S128–S136.
- van Hoffen, E., Rüter, B., Faber, J., M'Rabet, L., Knol, E.F., Stahl, B., Arslanoglu, S., Moro, G., Boehm, G., Garssen, J., 2009. A specific mixture of short-chain galactooligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy* 64, 484–487.
- Vancassel, S., Durand, G., Barthelemy, C., Lejeune, B., Martineau, J., Guilloteau, D., Andres, C., Chalon, S., 2001. Plasma fatty acid levels in autistic children. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 1–7.
- Vandereycken, W., 2003. *Handboek psychopathologie- Deel 1 Basisbegrippen*. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten.
- Vanderploeg, R., Panaccione, R., Ghosh, S., Rioux, K., 2010. Influences of Intestinal bacteria in human inflammatory bowel disease. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 977–993.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* 57, 67–81.
- Verma, S., Nakaoka, R., Dohgu, S., Banks, W.A., 2006. Release of cytokines by brain endothelial cells: a polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.* 20, 449–455.
- Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot (Tokyo)* 28, 721–726.
- Vojdani, A., Mumper, E., Granpeesheh, D., Mielke, L., Traver, D., Bock, K., Hirani, K., Neubrandner, J., Woeller, K.N., O'Hara, N., Usman, A., Schneider, C., Hebroni, F., Berookhim, J., McCandless, J., 2008. Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: the role of glutathione, IL-2 and IL-15. *J. Immunol.* 205, 148–154.
- Vos, A.P., M'Rabet, L., Stahl, B., Boehm, G., Garssen, J., 2007. Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit. Rev. Immunol.* 27, 97–140.
- Wakefield, A.J., Ashwood, P., Limb, K., Anthony, A., 2005. The significance of ileo-colonic lymphoid nodular hyperplasia in children with autistic spectrum disorder. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 827–836.

Warren, R.P., Margaretten, N.C., Pace, N.C., Foster, A., 1986. Immune abnormalities in patients with autism. *J. Autism Dev. Disord.* 16, 189–197.

Watkins, L.R., Maier, S.F., 2003. GLIA: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 973–985.

Weber, W., Newmark, S., 2007. Complementary and alternative medical therapies for attention-deficit/hyperactivity disorder and autism. *Pediatr. Clin. North Am.* 54,983–1006 (xii).

Whiteley, P., Haracopos, D., Knivsberg, A.M., Reichelt, K.L., Parlar, S., Jacobsen, J., Seim, A., Pedersen, L., Schondel, M., Shattock, P., 2010. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr. Neurosci.* 13, 87–100.

Williams, K., Wheeler, D.M., Silove, N., Hazell, P., 2010. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.* Issue 8, Art. No: CD004677, 1–35.

Willing, B.P., Gill, N., Finlay, B.B., 2010. The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut Microbes* 1, 213–223.

Wispelwey, B., Lesse, A.J., Hansen, E.J., Scheld, W.M., 1988. Haemophilus influenzae lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat. *J. Clin. Invest.* 82, 1339–1346.

Wong, H.H., Smith, R.G., 2006. Patterns of complementary and alternative medical therapy use in children diagnosed with autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 36, 901–909.

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484.

Xaio, H., Banks, W.A., Niehoff, M.L., Morley, J.E., 2001. Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res.* 896, 36–42.

Xu, G., Xia, J., Hua, X., Zhou, H., Yu, C., Liu, Z., Cai, K., Shi, J., Li, H., 2009. Activated mammalian target of rapamycin is associated with T regulatory cell insufficiency in nasal polyps. *Respir. Res.* 10, 13.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E.H., Lenardo, M.J., 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942–946.

Yuskaitis, C.J., Beurel, E., Jope, R.S., 2010. Evidence of reactive astrocytes but not peripheral immune system activation in a mouse model of Fragile X syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 1006–1012.

Zhang, W., Smith, C., Shapiro, A., Monette, R., Hutchison, J., Stanimirovic, D., 1999. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J. Neuroimmunol.* 101, 148–160.

Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C.H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C.M., Parada, L.F., 2009. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *J. Neurosci.* 29, 1773–1783.

Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Lord, C., Rogers, S., Carter, A., Carver, L., Chawarska, K., Constantino, J., Dawson, G., Dobkins, K., Fein, D., Iverson, J., Klin, A., Landa, R., Messinger, D., Ozonoff, S., Sigman, M., Stone, W., Tager-Flusberg, H., Yirmiya, N., 2009. Clinical assessment and management of toddlers with suspected autism spectrum disorder: insights from studies of high-risk infants. *Pediatrics* 123, 1383–1391.