

# Tõusnud oksüdatiivse stressi ja häiritud metülatsiooni võime metaboolsed biomarkerid autistlikel lastel.

S Jill James, Paul Cutler, Stepan Melnyk, Stefanie Jernigan, Laurette Janak, David W Gaylor and James A Neurbrander, Am J Clin Nutr 2004;80:1611-7. American Society for Clinical Nutrition.

Eestikeelne tõlge Annely Soots

## ABSTRAKT

**Taust:** Autism on keeruline närvisüsteemi arenguhäire, mis algab sageli varases lapsepõlves. See arvatakse olevat mõjutatud geneetilistest ja keskkondlikest faktoritest. Kuigi ebanormaalne metioniini ja homotsüsteiini metabolism on seotud teiste neuroloogiliste haigustega, ei ole autismi puhul seda rada uuritud.

**Eesmärk:** Uuringu eesmärk oli hinnata plasma metaboliitide kontsentratsiooni, mis iseloomustaksid metioniini transmetülatsiooni ja transsulfuratsiooni radu autismi diagnoosiga lastel.

**Uuringu materjal:** plasma metioniini, S-adenosüülmetsioniini(SAM), S-adenosüülhomotsüsteiini(SAH), adensiini, homotsüsteiini, tsüstioniini, tsüsteiini ja oksüdeeritud ja redutseeritud glutatiooni kontsentratsioonid mõõdeti 20-l autismi diagnoosiga lapsel ja 33-l kontrollgrupi lapsel. Ebanormaalse metabolismi profiili puhul autistlikel lastel kasutati eesmärgipäraselt toitumuslikuks vahelesegamiseks foliinhapet, betaiini ja metüülkobalamiini. *Selgituseks: foliinhape on Eestis registreeritud, teda kasutatakse kaltsiumi soolana normaalsete rakkude kaitseks metotreksaadi kahjulike kõrvaltoimete eest.*

**Tulemused:** Autistlikel lastel olid kontrollgrupi suhtes märkimisväärselt madalamad plasma metioniini, SAM, homotsüsteiini, tsüstioniini, tsüsteiini ja koguglutatiooni sisaldus ja märkimisväärselt kõrgemad SAH, adensiini ja oksüdeeritud glutatiooni kontsentratsioonid. Selline metaboolne profiil on kooskõlas häiritud metülatsioonivõimega (märkimisväärselt madal suhe SAM:SAH'i) ja tõusnud oksüdatiivse stressiga (märkimisväärselt madal redox suhe redutseeritud glutatioonil oksüdeeritud glutatiooni suhtes) autismiga lastel.

**Järeldused:** Autismi arengusse ja kliinilisse manifestatsiooni võivad oma panuse anda tõusnud haavatavus oksüdatiivse stressi suhtes ja vähenenud metülatsiooni võime.

Võtmesõnad: autistlik häire, biomarkerid, oksüdatiivne stress, metülatsioon, metioniin, S-adenosüülmetsioniin, S-adenosüülhomotsüsteiin, adensiin, tsüsteiin, glutatioon

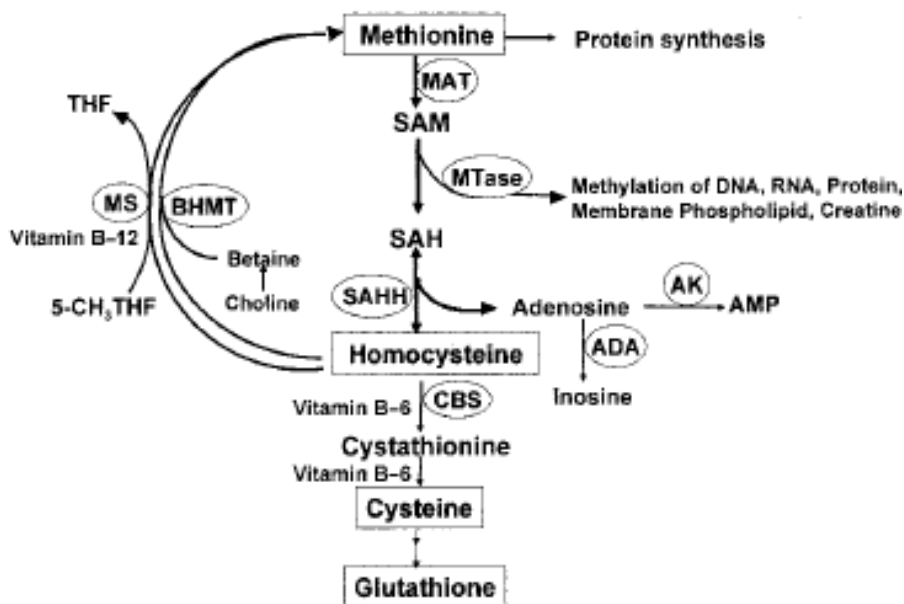
## SISSEJUHATUS

Autism on närvisüsteemi arenguhäire, mida tavaliselt diagnoositakse enne kolmandat eluaastat, mida iseloomustavad sotsiaalse vastastikususe ning kõneoskuste puudulikkus, korduv käitumine ja piiratud huvid (1). Lisaks käitumise häirele on autistidel kõrge mao-sooletrakti haiguste ja düsbioosi (2), autoimmuunhaiguste (3) esinemine ning vaimne mahajäämus (4). Autismi on rohkem poistel kui tüdrukutel, vahekord on 4:1. Geneetikal on roll autistliku häire etioloogias. Seda on rohkem monosügootsetel kaksikutel, risk on suurem õdede-vendade hulgas ja see sündroom on seotud mitmete pärilike haigustega (*see: Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) #209850(autism:5)*)

Autismist on räägitud kui kaasuvast haigusest Rett'i sündroomi (5), nõrga X (6), fenüülketonuuria (7), adenosüülsuktsinaadi lüaasi defitsiidi (8), dihüdropürimidiin dehüdrogenaasi puudulikkuse (9) ja 5'-nukleotidaasi hüperaktiivsuse (10) puhul: kuigi need geneetilised haigused hõlmavad vaid alla 10% autismi juhtudest. Autismi seos geneetilise

puudulikkusega spetsiifiliste ensüümide osas viitab võimalusele, et primaarse autismi puhul geneetiline komponent on väljendunud kui krooniline metaboolne tasakaalutus, mis häirib normaalset närvisüsteemi arengut ja immuunfunktsiooni. Võimalus, et autism on metaboolne fenotüüp, on laialt aktsepteeritud, kuid toetatud vaid üksikute väikeste uuringutega (9, 11-14). Käesolev uuring on ajendatud vaatluste poolt eelmises uuringus: disügootsete kaksikute metaboolne profiil (üks Downi sündroomi ja teine autismiga) oli peaaegu identne metioniini tsükli ja transsulfuratsiooni metaboliitide seisukohast (15). Downi sündroom ehk 21 kromosoomi trisoomia on keeruline geneetiline ja metaboolne haiguse kompleks, millele lisandub sageli autism (16). Meie eelmises uuringus oli Downi sündroomiga lastel madalam metaboliitide tase metioniini tsükli ja kontrollgrupi lastest märkimisväärselt madalam glutatiooni kontsentratsioon (15).

Metioniini tsükkel hõlmab metioniini taastootmist läbi vitamiin-B<sub>12</sub>-st sõltuva metüülgrupi ülekande 5-metüültetradüdrofolaadilt homotsüsteiinile, reaktsiooni katalüüsib metioniini süntaas. Siis võib metioniin saada aktiveeritud metioniin adenosüültransferaasi poolt SAM vormiks, mis on primaarseks metüüldoonoriks paljude rakuliste metüültransferaasi reaktsioonide jaoks, k.a. DNA, RNA, valkude, fosfolipiidide ja neurotransmitterite metüülatsioon. (joonis 1).



Joonis 1. Metioniini tsükkel hõlmab homotsüsteiini remetüülatsiooni metioniiniks kas folaat-vitamiinB<sub>12</sub>-st sõltuva metioniini süntetaasi (MS) reaktsioonis või folaat-vitamiin B<sub>12</sub>-st mittesõltuva betaiin-homotsüsteiini metüültransferaasi (BHMT) reaktsioonis. Metioniin aktiveeritakse siis metioniin adenosüültransferaasi (MAT) poolt S-adenosüülmetioniiniks (SAM), peamiseks metüüldoonoriks rakuliste metüültransferaasi (MTase) reaktsioonide jaoks. Pärast metüülgrupi ülekannet muudetakse SAM S-adenosüülhomotsüsteiiniks, mida metaboliseeritakse edasi pöörduvas reaktsioonis homotsüsteiiniks ja adenosiiniks. Adenosiin võib saada fosforüleeritud adenosiin nukleotiidideks adenosüülmetioniiniks (AK) poolt või kataboliseeritud adenosiiniks adenosüüldeaminatsiooniks (ADA) poolt. Homotsüsteiini võib pidvalt eemaldada metioniini tsüklist pöörduvate muundumistega tsüstatiiniks läbi B<sub>6</sub> vitamiinist sõltuva tsüstatiin beeta-süntetaasi (CBS), tsüstatiin muudetakse tsüsteiiniks, mis on *piiratud määraga* aminohape, mida on vaja tripeptiidi glutatiooni (Glu, Cys, Gly), THF tetrahüdrofolaadid, 5-CH<sub>3</sub>, THF metüültetrahüdrofolaadid, SAHH ehk SAH hüdrolaasi sünteesiks.

Metüülgrupi ülekanne SAM-st erinevate ensüümspetsiifiliste metüülaktseptoriteni resulteerub S-adenosüülhomotsüsteiini SAH moodustumisega. Pöörduv SAH hüdroolüüs homotsüsteiiniks ja adenosiiniks SAH hüdrolaasi (SAHH) reaktsioonis moodustab tervikliku metioniini tsükli. Adenosiin metaboliseeritakse edasi adenosiini kinaasi poolt puriiniks või kataboliseeritakse adenosiin deaminaasi poolt. Homotsüsteiin kas remeteleeritakse metioniiniks või eemaldatakse pöördumatult metioniini tsüklist tsüstationiin-beeta-süntetaasi (CBS) poolt (17).

Kaks tähtsat tulemust metioniini tsükli ringluse languses on **SAM sünteesi vähenemine normaalse metüülatsiooni aktiivsuse jaoks ja vähenenud tsüsteiini ja glutatiooni süntees normaalse antioksidantse aktiivsuse jaoks.**

## VALIM JA MEETODID

### Osalejad

Metaboolse uuringus olid osalejateks 20 autistlikku last ( $x \pm SD$ , vanus: 6,4 $\pm$ 1,5a) ja 33 kontrollgrupi last (vanus: 7,4 $\pm$ 1,3a).

Autismi diagnoos baseerus autistliku häire diagnoosi kriteeriumitel *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (DSM-IV)* järgi ja pediaatrite poolt läbi viidud diagnostilistel intervjuudel. 20-st lapsest olid kõik valged, 14 poissi ja 6 tüdrukut, 19 diagnoositud kui regressiivne autsim ja 1 kui infantiilne autism. Enamusel nendest lastest olid häiritud kõne ja sotsiaalsed oskused ja neil esines gastrointestinaalne distress. Enne uuringut võtsid nendest 16 multivitamiini ja -mineraalainete lisandit, mis sisaldas 400mcg foolhapet ja 3 mcg B12 vitamini. Ükski ei tarvitanud selliseid ravimeid nagu valproiinhape või krambivastaseid ravimeid, mis võiksid mõjutada metioniini ainevahetust. Uuringu osana ei uuritud dieeti, ei kasutatud küsimustikke, mis hindaks toitumist kvantitatiivselt. Seega ei määratletud spetsiifilisi toitumuslikke erinevusi ei gruppide sees ega gruppide vahel. Kontrollgrupi isikud olid terved valgenahalised lapsed ilma krooniliste haiguste ja autismita, kes osalesid samasuguses Downi sündroomi baasuuringus (15). Kontrollgrupi lapsed tarbisid käsimüügi vitamini. Ükski nendest ei tarbinud ravimeid, mis oleksid teadaolevalt mõjutanud metioniini ainevahetust. Välistamise kriteeriumid mõlemas grupis olid alatoitus, aktiivse infektsiooni puudumine ja teadaolevad geneetilised haigused.

Protokoll ja informeeritud nõusolekud vaadati üle Arkansase Ülikooli Meditsiiniteaduste Järevalve Organi poolt. Uuringu detaile tutvustati uuringus osalevate laste vanematele ja nendelt võeti kirjalik nõusolek uuringus osalemiseks.

### Uuringu kava

Metaboolne uuring koosnes kolmest osast.

Esimeses osas määrati plasma metioniini tsükli baaskontsentratsioonid ja transsulfuratsiooni tee metaboliitide kontsentratsioonid 20-l autistlikul ja 33-l kontrollgrupi lapsel, eesmärgiga hinnata seda, kas nende gruppide metaboolse profiilis on märkimisväärsed erinevusi.

Teises osas, toetudes ebanormaalsustele plasma metaboliitide väärtustes, anti kaheksale autistlikule lapsele suukaudseid toidulisandeid: 800mcg foliinhapet ja 1000mg betaiini (anhüdreeritud trimetüülglütsiini) kahel korral päevas eesmärgiga parandada metaboolset profiili nendel autistlikel lastel. Seda nimetati interventsiooniks nr.1.

3 kuu pärast uuriti uuesti verd ja metaboliitide väärtusi võrreldi baasväärtustega.

Kolmanda komponendina süstiti uuringus samadele lastele metüülB<sub>12</sub> vitamini 75mcg/kg kaks korda nädalas kuu aega lisaks suukaudsele foliinhappele ja betaiinile. Seda nimetati vahelesegamiseks nr.2.

Igat last uuriti eraldi.

### **Toidulisandid**

USP-grade (näitab foliinhappe puhtuse astet) foliinhape Douglas Laboratory'ist Pittsburgh'ist või Thorne Research, Inc'st (Dover, ID) anti kaks korda päevas 800mcg-na suukaudselt pulbrina mahla sees.

Betaiin (trimetüülglütsiin, USP-grade) osteti Life Extension Foundation'ist (Fort Lauderdale, FL) ja manustati kaks korda päevas 100mcg pulbrina suu kaudselt mahla sees.

ASP metüülkobalamiin saadi Hopewell Pharmaceuticals (Hopewell, NJ)'st või Unique Pharmaceuticals'st (Temple, TX) süstitava vedelikuna ja manustati subkutaanselt/nahaalusi doosis 75mcg/kg kaks korda nädalas.

### **Proovide käsitlemine ja HPCL meetod**

Tühja kõhuga võetud vereproovid koguti EDTA't sisaldavatesse katsutitesse (B-D Biosciences, Dallas) ja koheselt jahutati jääga enne tsentrifuugimist 4000 xg 10 min 4 kraadi C juures. Plasma *aliquots* pandi krüostaadi katsutisse ja säilitati -80 kraadi juures Celsiuse järgi kuni ekstraktsioonini ja HPLC kvanitifikatsioonini. Metioniini, koguhomotsüsteiini, tsüsteiini ja koguglutatiooni (tGSH) kontsentratsioonini määramiseks kasutati 50mcL värskeltvalmistatud 1,43mml naatrium borohüdriidi/L, sisaldades 1,5mcmol EDTA/L, 66nmol NaOH/L ja 10mc/L isoamüülalkoholi lisati 200mc/L plasmale, et taandada kõik sulfhüdrüülsidemed. Analüüsid inkubeeriti 40 kraadi juures C järgi segajas 30 min. (Orginaalis kirjeldus jätkub).

### **Statistiline analüüs**

Metaboolsed andmed esitati kui keskmised +/-SDs. Statistilised erinevused plasma metaboliitides uuringu ja kontrollgrupi lastel tehti kindlaks, kasutades Student testi, kus olulisuse tase oli seatud 0,05 peale. Teostati erinevuste ühesuunaline analüüs, et kindlaks erinevuste esinemine plasma metaboliitide kontsentratsioonides kolmes punktis: baasväärtused (enne vehelesegamisi), pärast esimest vahelesegamist (foliinhappe ja betaiini manustamise järgselt) ja pärast teist vahelesegamist (foliinhappe ja betaiini ja metüülkobalamiini manustamise järgselt). Individuaalseid baasilisi metaboliitide väärtusi võrreldi väärtustega, mida võeti pärast esimest ja teist vahelsegamist, kasutades paaris-Studenti testi Bonferroni korrigeerimisega. Statistiline analüüs teostati kasutades SIGMASTAT tarkvara programmi kasutades (versioon 2,0, Systat Software Inc, Richmond, CA).

## **TULEMUSED**

### **Baasiline metioniini tsükkel ja transsulfuratsiooni raja metaboliidid.**

Metioniini tsükli ja transsulfuratsiooni raja metaboliitide kontsentratsioonid olid algväärtustena märkimisväärselt erinevad autistlikel lastel ja kontrollgrupi lastel. Metioniini tsükli olid plasma metioniini, SAM ja homotsüsteiini väärtused märkimisväärselt madalamad ja SAH ja adenosini kontsentratsioonid olid märkimisväärselt kõrgemad kui kontrollgrupi lastel (tabel 1.).

	Control children (n = 33)	Autistic children (n = 20)
Methionine (µmol/L)	31.5 ± 5.7 (23–48)	19.3 ± 9.7 (15–25)

SAM (nmol/L)	96.9 _ 12 (77–127)	75.8 _ 16.2 (68–100) <sup>3</sup>
SAH (nmol/L)	19.4 _ 3.4 (16–27)	28.9 _ 7.2 (14–41) <sup>2</sup>
SAM:SAH	5.2 _ 1.3 (4–8)	2.9 _ 0.8 (2–4) <sup>2</sup>
Adenosine (_mol/L)	0.27 _ 0.1 (0.1–0.4)	0.39 _ 0.2 (0.17–0.83) <sup>4</sup>
Homocysteine (_mol/L)	6.4 _ 1.3 (4.3–9.0)	5.8 _ 1.0 (4.0–5.8) <sup>3</sup>
Cystathionine (_mol/L)	0.17 _ 0.05 (0.1–0.27)	0.14 _ 0.06 (0.04–0.2) <sup>5</sup>
Cysteine (_mol/L)	202 _ 17 (172–252)	163 _ 15 (133–189) <sup>2</sup>
tGSH (_mol/L)	7.6 _ 1.4 (3.8–9.2)	4.1 _ 0.5 (3.3–5.2) <sup>2</sup>
Oxidized glutathione (nmol/L)	0.32 _ 0.1 (0.11–0.43)	0.55 _ 0.2 (0.29–0.97) <sup>2</sup>
tGSH:GSSG	25.5 _ 8.9 (13–49)	8.6 _ 3.5 (4–11) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> All values are  $\bar{x}$  \_ SD; range in parentheses. SAM, S-adenosylmethionine;

SAH, S-adenosylhomocysteine; tGSH, total glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

<sup>2–5</sup> Significantly different from control children: <sup>2</sup>  $P$  \_ 0.001, <sup>3</sup>  $P$  \_ 0.01, <sup>4</sup>  $P$  \_ 0.05, <sup>5</sup>  $P$  \_ 0.002.

Tabel 1. Metioniini tsükli ja transsulfuratsiooni metaboliitide võrdlus autistlikel ja kontrollgrupi lastel.

SAM suhe SAH oli autistidel peaaegu 50% madalam kui kontrollgrupi lastel. Märkimisväärne alanemine plasma tsüstationiini ja tsüsteiini kontsentratsioonides esines autistidel, mis oli kooskõlas CBS- vahendatud transsulfuratsiooni vähenemisega. Madala loodetud keskmise plasma tsüsteiini kontsentratsiooniga seotult esines märkimisväärne langus tGSH kontsentratsioonides. GSSG oli tõusnud peaaegu kaks korda ja tGSH:GSSG-sse oli vähenenud 70%.

### Foliinhape ja betaiini manustamine, vahelesegamine nr. 1.

kaheksast isikust koosnev alagrupp osales vahelesegamise uuringus, mis loodi nende metaboolse profiili parandamiseks. Suu kaudu manustati 800mcg foliinhapet ja 1000mg betaiini kahel korral päevas kokku kolm kuud. Siis võeti uus vereproov. Baasväärtuste suhtes olid plasma metioniin, SAM, homotsüsteiin, tsüstationiin, tsüsteiin ja tGSH kontsentratsioonid ja SAM:SAH ja tGSH:GSSG-sse nendel 8 lapsel kõrgemad. (tabel2) Lisaks langesid algselt kõrged SAH ja adenosiiini kontsentratsioonid. Metioniini, SAM, SAH, adenosiiini ja homotsüsteiini tasemed ei olnud statistiliselt kontrollgrupi omadest erinevad, mis näitab, et manustatud foliinhape ja betaiin normaliseerisid metioniini tsükli metaboliitide sisalduse. Kuigi lisandid olid efektiivsed metioniini tsükli metaboliitide kontsentratsioonide muutmisel kontrollgrupiga sarnaseks, ei muutunud tGSH ja GSSG sisaldus ega suhe tGSH:GSSG normaalseks.

### Foliinhape ja betaiini ja metüül-B<sub>12</sub> vitamiini manustamine, vahelesegamine nr. 2

Vahelesegamises nr. 2 lisati foliinhappele ja betaiinile süstitav metüül B<sub>12</sub> vitamiin (75mcg/kg) üheks kuuks, peale mida võeti uuesti vereproov HPLC analüüsiks. Süstitava MB<sub>12</sub> lisamine ei muutnud metioniini, SAM, SAH ja homotsüsteiini taset, mis olid juba muutunud foliinhape ja betaiini poolt. Erinevalt esimesest vahelesegamisest langetas MB<sub>12</sub> lisamine adenosiiini ja GSSG sisaldust ja tõstis edaspidi metioniini, tsüsteiini ja tGSH sisaldust ja suhet tGSH:GSSG ja SAM:SAH.

TABLE 2

Results of intervention trials<sup>1</sup>

Baseline

Intervention 1

Intervention 2

	(n = 8)	(n = 8)	P <sub>2</sub>	(n = 8)	P <sub>3</sub>
Methionine (_mol/L)	19.2 _ 3.5	25.7 _ 3.6	0.04	30.9 _ 7.7	NS
SAM (nmol/L)	75.5 _ 5.0	112.9 _ 20.8	0.008	101.6 _ 20.5	NS
SAH (nmol/L)	27.6 _ 6.1	16.9 _ 6.5	0.002	14.3 _ 7.5	NS
SAM:SAH	2.9 _ 0.8	7.4 _ 4.1	0.004	8.9 _ 4.5	0.04
Adenosine (_mol/L)	0.30 _ 0.2	0.18 _ 0.04	0.08	0.14 _ 0.03	0.002
Homocysteine (_mol/L)	5.4 _ 0.9	6.7 _ 0.7	0.05	7.4 _ 1.7	NS
Cystathionine	0.10 _ 0.02	0.22 _ 0.08	0.01	0.25 _ 0.08	NS
Cysteine (_mol/L)	166 _ 11.4	180 _ 11	0.02	199.3 _ 15	0.002
tGSH (_mol/L)	4.0 _ 0.7	5.0 _ 0.9	0.002	6.7 _ 1.6	0.016
Oxidized glutathione (nmol/L)	0.59 _ 0.2	0.38 _ 0.1	0.08	0.25 _ 0.05	0.008
tGSH:GSSG	7.5 _ 2.3	13.8 _ 3.9	0.008	28.7 _ 7.1	0.002

/ All values are  $\bar{x}$  \_ SD. SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; tGSH, total glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

Intervention

1: 800 \_g folic acid and 1000 mg betaine were administered twice a day from immediately after the baseline blood draw for a period of 3 mo; intervention

2: subcutaneous injection of 75 \_g methylcobalamin/kg was added to folic acid and betaine supplementation for an additional month.

² Intervention 1 compared with baseline.

³ Intervention 2 compared with intervention 1.

## ARUTELU

Autism on keeruline närvisüsteemi arenguhäire, mis arvatakse olevat paljude erinevate faktorite interaktsiooni tulemus: geneetiliste (21), epigeneetiliste (22) ja keskkondlike (23). Murettegev on ilmselge autistliku sündroomiga laste hulga suurenemine 4-5-lt 10000 lapse kohta 1980.datel 30-60-le 10000 lapse kohta 1990.datel (24-27).

See tõusnud esinemissagedus on rahva tervisliku seisundi mõjutaja tulevikus ning kutsunud esile intensiivse autismi etioloogiliste faktorite ja kandidaatgeenide uurimise.

Ebanormaalse folaatide ainevahetuse ja madala glutatiooni kontsentratsiooni tõttu, mida on leitud teiste neuroloogiliste haiguste puhul, k.a. Alzheimeri tõbi, Parkinsoni haigus, skisofreenia ja Downi sündroom (15, 28-31), mõõtsime me metioniini metülatsiooni ja transsulfuratsiooniprotsesside metaboliite autistlikust laste kohordis.

Metaboliitide kontsentratsioon kontrollgrupi laste hulgas oli väärtuste piires, mida on leitud mitmetes eelnevates uuringutes (32-34). Vaadeldud tasakaalutus metioniini ja homotsüsteiini metabolismis autistidest lastel on keeruline ja seda ei saa lihtsalt selgitada ühe kindla tee või isoleeritud geneetilise või toitumusliku puudusega. Metioniini tsükliks esines märkimisväärne langus plasma metioniini, SAM ja homotsüsteiini kontsentratsioonis, mis seostusid adensiini ja SAH sisalduse märkimisväärse tõusuga. Madal metioniini ja SAM kontsentratsioon viitab metioniinsüntetaasi aktiivsuse langusele, kuid langus homotsüsteiini tasemes ei kattu selle interpretatsiooniga. Andmed on paremini seletatavad läbi metioniinsüntetaasi oksüdatiivse inaktiivsiooni kombinatsioonis SAH hüdrolaasi aktiivsuse langusega sekundaarselt adensiini sisalduse tõusule (35, 36). Adensiin seob aktiivsed kohad SAH hüdrolaasis.

Tõusnud adensiini sisaldust on näidatud langetavat SAH aktiivsust (36,37).

Kombineeritud ensüümi defitsiit võib olla kooskõlas leitud SAM languse ja SAH tõusuga. Sel juhul homotsüsteiini sisalduse langus peegeldab adensiinvahendatud langust SAH hüdrolüüsis ja homotsüsteiini sünteesis. Funktsionaalne tagajärg SAH tõusule on paljude rakuliste metüültransferaaside inhibitsioon (38). Madalat metioniini ja SAM kontsentratsiooni kombineerituna tõusnud SAH ja adensiini sisaldusega on varasemalt näidatud seoses madala rakulise metülatsiooni võimega (39). Kahekordne langus autistlike laste puhul SAM:SAH suhtes viitab ka häiritud võimele rakuliseks metülatsiooniks.

Metaboolne muster transsulfuratsiooni tees võib anda parema seletuse ebatavalisele tasakaalutusele metioniini metaboliitide tsükliks. Madal tsüstatiooni, tsüsteiini ja tGSH sisaldus on kooskõlaline vähenenud flux'iga/vooluga läbi transsulfuratsiooni tee. Veelgi enam, märkimisväärne tõus GSSG disulfidi ja 67%-line langus tGSH:GSSG suhtes viitab kroonilisele oksüdatiivsele stressile. Metioniini tsükliks metioniinsüntetaas, betaiin homotsüsteiin metüültransferaas ja metioniin adenosüültransferaas on kõik redokstundlikud

ensüümid, mis on alla-reguleeritud oksüdatiivse stressi poolt (40-42). Metioniini ja SAM reguleeritud CBS aktiivsuse langus võib tõsta vajadust tsüsteiini järgi, muutes selle asendamatuks aminohappeks nende laste puhul. Kuna tsüsteiin on piiratud hulgaga aminohape glutatiooni sünteesiks, siis tema languse tagajärg on madal glutatiooni tase (43, 44).

Tähelepanuväärne langus tsüsteiini ja glutatiooni sisalduses ja tGSH:GSSG suhtes autistlikel lastel viitab tõusnud vastuvõtlikkusele oksüdatiivse stressi suhtes.

Geneetilised või keskkondlikud faktorid (või mõlemad), mis võivad algatada oksüdatiivse stressi ja ebanormaalse metaboolse profiili autistlikel lastel, ei ole selged. Võib olla, et autistlike laste langenud adenosiindeaminaasi aktiivsus ja tõusnud adenosiindeaminaasi polümorfism, mida on näidatud olevat seoses madala adenosiindeaminaasi aktiivsusega, on asjasepuutuvad (14, 45). Vaadeldud tõus adenosiinis võib esineda seetõttu, et on inhibeeritud adenosiinkinaas või tõusnud 5-nukleotidaas, mis mõlemad esinevad oksüdatiivse stressi puhul (46, 47). Tõusnud rakusisene adenosiin inhibeerib glutatiooni sünteesi (48, 49).

Alternatiivselt, geneetiline eelsoodumus keskkondlikele faktoritele või tingimused, mis suurendavad oksüdatiivset stressi, võivad anda panuse ebas normaalsesse metaboolsesse profiili, mida on jälgitud autistlike laste puhul.

Eesmärgipärane toitumuslik vahelesegamine autistide alagrupidis oli spetsiaalselt koostatud metioniini kontsentratsiooni suurendamiseks esimeses vahelsegamise etapis. Betaiin homotsüsteiin transferaas kindlustab folaat-vitamiin B<sub>12</sub> sõltumatu tee maksas ja neerudes, et remetüleerida homotsüsteiin metioniiniks (17). Betaiin (trimetüülglütsiin) lisandina on näidanud ülesreguleerivat betaiin homotsüsteiini transferaasi avaldumist ja aktiivsust metioniini sünteesi suurendamises (50). Kasutati foliinhapet (5-formüül tetrahüdrofolaat), mitte foolhapet, sest see imendub kui redutseeritud metaboliit ja siseneb folaadi metabolismi kui 5,10 metüleen tetrahüdrofolaat, sellega vähendades võimalust edendada folaadi lõksu (51, 52). Nagu tabelis 2 näidatud, oli betaiini ja foliinhappega vahelesegamine edukas, viies kõik metaboliidid metioniini tsükli normaalsetesse väärtustesse ja parandades samaaegselt märkimisväärselt metaboliitide sisaldust transsulfuratsiooni tees. Metioniini, SAM ja homotsüsteiini kontsentratsioonide tõus ja adenosiini ja SAH langus näitavad, et vahelesegamine stimuleeris tõusnud voolutust läbi metioniini tsükli. Lisaks näitab suurenenud tsüstatiini kontsentratsioon, et lisandid olid efektiivsed suurendama CBS aktiivsust, peamiselt SAMi suurenemisest tingitud regulatsiooni paranemisest üles-regulatsiooni tõttu SAM sisalduse tõusust). Seotud tsüsteiini ja glutatiooni sisalduse tõus näitab, et transsulfuratsioon glutatiooniks on paranenud lisandite manustamisega. Adenosiini sisalduse langus on kooskõlas kaasneva vabanenud SAHH inhibitsiooniga ja SAH sisalduse langusega, ja võimalik, et pudelikaela vabanemisega metioniini tsükli ringluses. Adenosiini kontsentratsiooni vähenemise mehhanism ei ole selge. Üks võimalus on, et tsüsteiini või glutatiooni kontsentratsiooni tõus (või mõlema) vähendab vajadust adenosiini kui kaitsva faktori järele oksüdatiivse kahjustuse vastu (53, 54).

Süstitava metüülkobalamiini lisamine protokollis (vahelesegamine nr. 2) baseerus empiirilistel jälgimistel, milles paranes kõne ja kognitsioon (J.A.Neubranderi järgi) ja võimalusel, et see võib edendada metioniini süntetaasi aktiivsust oksüdatiivse stressi tingimustes, asendades oksüdeeritud mitteaktiivset koensüüm B<sub>12</sub> (kob(II)alamiin) või läbi posttranslatsioonalse metioniin süntetaasi regulatsiooni suurenemise (üles-regulatsiooni) või läbi mõlema mehhanismi (55, 56). Üks kuu pärast metüülkobalamiini lisamist olid metioniini kontsentratsioonid kontrollgrupiga sarnased (tabel 1), järgnevalt leiti paranemine adenosiini ja SAH kontsentratsioonides ja SAM:SAH suhtes. Mitteootuspäraselt ja kõige tähelepanuväärselt vähendas MB<sub>12</sub> lisamine oksüdeeritud GSSG sisaldust ja tõstis tGSH kontsentratsiooni ja muutis vahekorda tGSH:GSSG nii, et need ei erinenud kontrollgrupi laste omast (tabel 1). Need positiivsed muutused glutatiooni redox profiilis peegeldab tsüsteiini kui glutatiooni sünteesi jaoks vajaliku piiratud hulgaga aminohappe sisalduse tõusu (44).

Kroonilise oksüdatiivse stressi puhul esineb kõrgem vajadus tsüsteiini (ja kaudselt metioniini) järele. (43). Kolmes hiljutises uuringus autistlikel lastel (57-59) on kirjeldatud madalat oksüdantsete ensüümide aktiivsust, mis annab lisakinnituse sellele, et oksüdatiivne stress on osa autismi etioloogiast. Kui plasma metioniini, tsüsteiini ja glutatiooni langenud kontsentratsioonid, mida leiti selles uuringus autistidel, saavad kinnitust ka suuremahaalsetes uuringutes, siis nende tiolide ainevahetuse metaboliitide madalad sisaldused võivad saada autismi metaboolseteks markeriteks.

Kuigi arstid täheldasid kliinilisi paranemisi kõnes ja kognitiivses funktsioonis, ei hinnatud neid kvantitatiivselt moel ja seetõttu neid antud kokkuvõttes ei käsitleta.

Spetsiifilised dieedialised erinevused gruppide vahel oleksid võinud meie tulemusi mõjutada, kuid me peame ebatõenäoliseks, et autistlikus grupis esinesid ühelaadsed dieedialased erinevused, mille tõttu sellised tulemused saavutati.

Nendes radades esineva tavalise polümorfismi tõusnud sagedus võib olla andnud oma panuse vaadeldavasse metaboolsesse fenotüüpi. Uuringud, mis seda kinnitaksid ja uuringud, mis määraksid kvantitatiivselt kliinilist paranemist, on siiani tegemata. Meie katsed interpreteerida neid esialgseid metaboolseid leide on selgelt spekulatiivsed ja parem arusaamine ebanormaalsest ühe-süsiniku metabolismist nendel lastel vajab lisauurimisi. Võimalus korrigeerida seda metaboolset tasakaalutust eesmärgipärase toitumusliku vahelsegamisega näitab, et autismi teatud aspektid on ravitavad.

Üheksateist kahekümnest uuringus osalenud lapsest olid diagnoositud „regressiivse“ autismina (normaalne areng kuni regressioonini ehk autismi diagnoosini 1,5-3 eluaasta vahel). Nende ebanormaalse metaboolse profiili baasiks võib meie oletusel olla tõusnud haavatavus oksüdatiivsele stressile (keskkondlik, rakusisene või mõlemast faktorist tingitud) ja häiritud metülatsiooni võime, mis võib anda oma panuse regressiivse autismi arengusse ja kliinilisse avaldumisse.

*Ükski autor ei omanud antud uuringus majanduslikku huvi ega konflikti.*

## **Kirjandus**

1. Eigsti IM, Shapiro T. A systems neuroscience approach to autism: biological, cognitive, and clinical perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003;9:205–15.
2. White JF. Intestinal pathology in autism. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:639–49.
3. Sweeten TL, Bowyer SL, Posey DJ, Halberstadt GM, McDougle CJ. Increased prevalence of familial autoimmunity in probands with pervasive developmental disorders. *Pediatrics* 2003;112:E420–4.
4. Bolte S, Poustka F. The relation between general cognitive level and adaptive behavior domains in individuals with autism with and without comorbid mental retardation. *Child Psychiatry Hum Dev* 2002;33:165–72.
5. McKusick VA, ed. Mendelian inheritance in man. A catalog of human genes and genetic disorders. 12th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998. [Daily updated online version, OMIM, available from METABOLIC ABNORMALITIES IN AUTISTIC CHILDREN 1615 the National Center for Biotechnology Information. Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.]
6. Mount RH, Charman T, Hastings RP, Reilly S, Cass H. Features of autism in Rett syndrome and severe mental retardation. *J Autism Dev Disord* 2003;33:435–42.
7. Arrieta I, Nunez T, Gil A, Flores P, Usobiaga E, Martinez B. Autosomal folate sensitive fragile sites in an autistic Basque sample. *Ann Genet* 1996;39:69–74.
8. Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M. Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord* 2003;33:201–4.
9. Jaeken J, Van den BG. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet* 1984;2:1058–61.



10. Page T. Metabolic approaches to the treatment of autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2000;30:463–9.
11. Pesi R, Micheli V, Jacomelli G, et al. Cytosolic 5<sub>n</sub>-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesch-Nyhan syndrome patients. *Neuroreport* 2000;11:1827–31.
12. Rimland B. High dose vitamin B6 and magnesium in treating autism: response to study by Findling et al. *J Autism Dev Disord* 1998;28:581–2.
13. Alberti A, Pirrone P, Elia M, Waring RH, Romano C. Sulphation deficit in “low-functioning” autistic children: a pilot study. *Biol Psychiatry* 1999;46:420–4.
14. Megson MN. Is autism a G-alpha protein defect reversible with natural vitamin A? *Med Hypotheses* 2000;54:979–83.
15. Stubbs G, Litt M, Lis E, et al. Adenosine deaminase activity decreased in autism. *J Am Acad Child Psychiatry* 1982;21:71–4.
16. Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *Am J Hum Genet* 2001;69:88–95.
17. Kent L, Evans J, Paul M, Sharp M. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:153–8.
18. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Haemost* 2000;26:219–25.
19. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny I, Hine RJ, James SJ. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. *J Nutr Biochem* 1999;10:490–7.
20. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, James SJ. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alteration with plasma homocysteine and pyridoxal 5<sub>n</sub>-phosphate concentrations. *Clin Chem* 2000;46:265–72.
21. Keller F, Persico AM. The neurobiological context of autism. *Mol Neurobiol* 2003;28:1–22.
22. Beaudet AL. Is medical genetics neglecting epigenetics? *Genet Med* 2002;4:399–402.
23. London EA. The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. *Environ Health Perspect* 2000;108(suppl 3):401–4.
24. Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 2003;289:49–55.
25. Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P. Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics* 2001;108:1155–61.
26. Destefano F, Bhasin TK, Thompson WW, Yeargin-Allsopp M, Boyle C. Age at first measles-mumps-rubella vaccination in children with autism and school-matched control subjects: a population-based study in metropolitan Atlanta. *Pediatrics* 2004;113:259–66.
27. Steinhausen HC, Gobel D, Breinlinger M, Wohlleben B. A community survey of infantile autism. *J Am Acad Child Psychiatry* 1986;25:186–9.
28. Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev* 2003;8:7–19.
29. Serra JA, Dominguez RO, de Lustig ES, et al. Parkinson’s disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson’s, Alzheimer’s and vascular dementia patients. *J Neural Transm* 2001;108:1135–48.
30. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000;267:4904–11.
31. Muntjewerff JW, Van der Put N, Eskes T, et al. Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. *Psychiatry Res* 2003; 121:1–9.
32. Ono H, Sakamoto A, Sakura N. Plasma total glutathione concentrations in healthy pediatric and adult subjects. *Clin Chim Acta* 2001;312:227–9.
33. Armstrongs MD, Stave U. A study of plasma free amino acids levels: Normal values for children and adults. *Metabolism* 1973;22:561–9.

34. Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J Jr, Lambert M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B-12, and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1469–73.
35. Ueland PM, Helland S. Binding of adenosine to intracellular S-adenosylhomocysteine hydrolase in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1983;258:747–52.
36. Kloor D, Osswald H S-adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:294–7.
37. Kloor D, Lu'dtke A, Stoeva S, Osswald H. Adenosine binding sites at S-adenosylhomocysteine hydrolase are controlled by the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio of the enzyme. *Biochem Pharmacol* 2003;66:2117–23.
38. Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. *Homocysteine in health and disease*. Boston: Cambridge University Press, 2001:63–78.
39. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hines RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318–23.
40. Gulati S, Chen Z, Brody LC, Rosenblatt DS, Banerjee R. Defects in auxiliary redox proteins lead to functional methionine synthase deficiency. *J Biol Chem* 1997;272:19171–5.
41. Castro C, Gratson AA, Evans JC, et al. Dissecting the catalytic mechanism of betaine-homocysteine S-methyltransferase by use of intrinsic tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 2004;43:5341–51.
42. Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, Mato JM. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114:364–71.
43. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489–92.
44. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999;13:1169–83.
45. Bottini N, De Luca D, Saccucci P, et al. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 2001; 3:111–3.
46. Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 1997;81:154–64.
47. Chen YF, Li PL, Zou AP. Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R1808–16.
48. Atmaca M, Fry JR. Adenosine-mediated inhibition of glutathione synthesis in rat isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1423–8.
49. Brodie AE, Reed DJ. Glutathione changes occurring after S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:621–6.
50. Park EI, Renduchintala MS, Garrow TA. Diet-induced changes in hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity are mediated by changes in the steady-state level of its mRNA. *J Nutr Biochem* 1997;8: 541–5.
51. Priest DG, Schmitz JC, Bunni MA, Stuart RK. Pharmacokinetics of leucovorin metabolites in human plasma as a function of dose administered orally and intravenously. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1806–12.
52. Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981;2:337–40.
53. Wu Y, Zheng J, Linden J, Holoshitz J. Genoprotective pathways. Part I. Extracellular signaling through G(s) protein-coupled adenosine receptors prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2004;546:93–102.
54. Almeida CG, De Mendonca A, Cunha RA, Ribeiro JA. Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2003;339:127–30.
55. Gulati S, Brody LC, Banerjee R. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 259:436–42. 1616 JAMES ET AL

56. Olteanu H, Banerjee R. Redundancy in the pathway for redox regulation of mammalian methionine synthase: reductive activation by the dual flavoprotein, novel reductase 1. *J Biol Chem* 2003;278:38310–4.
57. Sogut S, Zoroglu SS, Ozyurt H, et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta* 2003;331:111–7.
58. Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik DI, Sohmen T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67:341–3.
59. Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004;254:143–7.