

## **Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) – biomarkery stresu oksydacyjnego oraz cyklu metylacji i transsulfuracji**

### **Autism spectrum disorder (ASD) – biomarkers of oxidative stress and methylation and transsulfuration cycle**

Aleksandra Waligóra<sup>1</sup>, Sławomir Waligóra<sup>1</sup>, Maria Kozarska<sup>1</sup>,  
Aleksandra Damasiewicz-Bodzek<sup>1</sup>, Piotr Gorczyca<sup>2</sup>,  
Krystyna Tyrpień-Golder<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,  
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra i Zakład Chemii

<sup>2</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,  
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra Psychiatrii

#### **Summary**

Autism spectrum disorder (ASD) affects people from all regions of the globe, regardless of nationality, living standards or social group. Currently, it is assumed that ASD pathogenesis is multifactorial because there is no one specific cause of the disorder. According to literature, ASD may result from genetic defects, metabolic disorders or exposure to environmental factors. There is a number of hypotheses that attempt to explain the intensity of emotional and behavioral symptoms or the increased sensory threshold that is characteristic of ASD. It is suggested that neurological changes may be due to oxidative stress occurring in early brain tissue development and reduced antioxidative barrier. Due to the abnormalities in the synthesis of neurotransmitters, often occurring in ASD, autism is investigated for disorders of vital biochemical processes of methylation and transsulfuration. Finding a biomarker for a disturbed oxidative-reduction equilibrium, methylation pathway pathology, or other reason could be an important diagnostic tool and the base for individual treatment for patients with varying degrees of severity. This work provides a review of the potential biological indicators for ASD taking into account the occurrence of oxidative stress and the methylation and transsulfuration cycles.

**Słowa kluczowe:** autystyczne spektrum zaburzeń, stres oksydacyjny, biomarkery

**Key words:** Autism Spectrum Disorders, biomarkers, oxidative stress

## Wstęp

Zaburzenia ze spektrum autyzmu to termin używany do określenia złożonej grupy jednostek chorobowych, których podstawą są nieprawidłowości neurorozwojowe wpływające na rozwój w obszarach interakcji społecznych, funkcji poznawczych i zdolności komunikacyjnych. Ogromne zainteresowanie tą jednostką chorobową spowodowane jest jej złożoną i nie do końca wyjaśnioną etiopatogenezą. Przyjmuje się, że podłoże autyzmu ma wieloczynnikową naturę. Dotychczas prowadzone badania nad zaburzeniami autystycznymi dostarczyły wielu istotnych informacji na ten temat, lecz mimo trwających od połowy XX wieku wysiłków naukowców z wielu dziedzin nie udało się jednoznacznie ustalić przyczyn tych nieprawidłowości. Pojawiają się hipotezy o wrodzonym charakterze zaburzeń ze spektrum autyzmu, ale symptomów tej choroby nie można wykryć w badaniach prenatalnych. W literaturze przedmiotu podaje się wiele czynników, które mogą mieć wpływ na występowanie autyzmu. Wymienia się w tym kontekście wady genetyczne, nieprawidłowości chromosomalne, choroby metaboliczne, czynniki wirusowe, brak tolerancji immunologicznej czy niedotlenienie spowodowane problemami okołoporodowymi [1–5].

Fenotypowa charakterystyka zaburzeń neurorozwojowych stanowi integralną część postępów w badaniach i praktyce klinicznej. Osoby dotknięte ASD wykazują inną historię „choroby” i różne nasilenie objawów. Hipoteza, że ASD spowodowane jest występowaniem kilku różnych wariacji w obrębie kilku genów o charakterze epigenetycznym, cieszy się coraz większym uznaniem. Uważa się, że interakcje między czynnikami środowiskowymi a genetycznymi, które przyczyniają się do ekspresji genów predysponujących, mają znaczący wpływ na ujawnienie się cech charakterystycznych dla autyzmu. Dany fenotyp, który powstaje w wyniku nieprawidłowych procesów biochemicznych zachodzących pod wpływem czynników epigenetycznych, może być scharakteryzowany przez odmienne profile biomarkerów dla różnych osób [6]. Wyzwaniem i trudnością w identyfikacji biomarkerów w wypadku ASD jest prawidłowe odróżnienie biomarkerów reprezentujących zmiany genetyczne i neurobiologiczne, jakie do niego doprowadziły, od tych, których obecność jest skutkiem występującego zaburzenia.

Na podstawie dostępnej literatury przedmiotu w niniejszym artykule zostały zebrane informacje dotyczące potencjalnych metabolicznych biomarkerów, głównie pod kątem ich znaczenia w ocenie rozwoju zaburzeń zaliczanych do spektrum autyzmu. Jako że są one wskaźnikami stresu oksydacyjnego oraz zaburzeń cyklu metylacji i transulfuracji, wydają się obiecujące, jeśli chodzi o ich przydatność do opracowania spójnego programu terapii farmakologicznej będącej uzupełnieniem psychoterapeutycznych metod leczenia [6, 7].

### Biomarkery stresu oksydacyjnego w autyzmie

Wolne rodniki z jednym niesparowanym elektronem są układami wysoce reaktywnymi o charakterze oksydacyjnym. W warunkach homeostazy istnieje równowaga dynamiczna pomiędzy produkcją wolnych rodników pochodzenia tlenowego i azoto-

wego a antyoksydacyjnymi możliwościami komórki. Fizjologiczne i patofizjologiczne działanie wolnych rodników determinowane jest przez reaktywność samego utleniacza, jego subkomórkową lokalizację, stężenie i czas działania. Reaktywne formy tlenu (*Reactive Oxygen Species* – ROS), w szczególności anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $HO\bullet$ ) i wodoronadtlenkowy ( $HO_2\bullet$ ), pełnią funkcję przekaźników w sygnalizacji komórkowej oraz są zaangażowane w mechanizm niszczenia czynników chorobotwórczych, zarówno podczas wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Stanowią nie tylko pierwszą linię obrony fagocytów przed patogenami, ale też pośrednio aktywują limfocyty T przez zmianę formy utlenienia wewnątrzkomórkowego glutationu bądź przez nasilenie produkcji interleukiny-2 [8–10].

Nadmierne wytwarzanie wolnych rodników tlenowych prowadzi do zaistnienia przewagi potencjału oksydacyjnego, czyli tzw. stresu oksydacyjnego, i w konsekwencji do osłabienia naturalnych mechanizmów detoksykacji ksenobiotyków. W sytuacjach, gdy infekcja i/lub stan zapalny trwają kilka miesięcy lub dłużej, komórki fagocytujące mogą wytwarzać nadmierne ilości wolnych rodników, co prowadzi do niepożądanych uszkodzeń sąsiednich komórek organizmu. Wysokie stężenia ROS inicjują m.in. procesy peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach lipidowych, prowadzą do utleniania łańcuchów polipeptydowych, ich fragmentacji i konwersji reszt aminokwasowych do pochodnych, co obniża w konsekwencji aktywność biologiczną białka. Kwasy nukleinowe, chociaż bardziej odporne na działanie wolnych rodników niż polipeptydy czy fosfolipidy, również są narażone na oksydacyjny wpływ ROS, zwłaszcza w mitochondrialnym materiale genetycznym. Nic DNA ulega uszkodzeniu za pośrednictwem rodnika hydroksylowego  $HO\bullet$  za sprawą modyfikacji zasad azotowych, utleniania deoksyrybozy czy rozrywania wiązań fosfodiesterowych [11–15].

Reaktywne formy azotu (*Reactive Nitrogen Species* – RNS), do których zalicza się m.in. wolne rodniki azotowe:  $NO\bullet$ ,  $NO_2\bullet$  i nadtlenoazotan(III) ( $ONOO^-$ ), analogicznie do ROS mogą przyczyniać się do modyfikacji struktur biologicznych, w szczególności polipeptydów i DNA [16]. Potencjalne działanie mutagenne i genotoksyczne wykazuje wytwarzany w nadmiarze  $NO\bullet$ , tworzący szkodliwe produkty deaminacji DNA, oraz  $ONOO^-$  o działaniu oksydacyjnym.  $NO\bullet$  przy fizjologicznym pH może ulegać autooksydacji do  $N_2O_3$ . Destrukcyjny wpływ  $N_2O_3$  na DNA polega na nitrozowaniu pierwszorzędowych heterocyklicznych amin, pośrednio z wytworzeniem jonów diazoniowych, które ulegając hydrolizie, kończą proces deaminacji. W rezultacie deaminacja adeniny, cytozyny i guaniny prowadzi do powstania odpowiednio hipoksantyny, uracylu i ksantyny. Niestabilna ksantyna może łatwo depurynować, tworząc miejsca pozbawione zasad azotowych, w których dochodzi do rozerwania nici DNA w wyniku działania endonukleaz. Z kolei  $ONOO^-$  może bezpośrednio reagować z deoksyrybozą z wytworzeniem rodnika cukrowego, który w dalszych etapach ulega reakcjom prowadzącym do pęknięcia nici [17].

Stres oksydacyjny pojawiający się w wyniku skumulowanego wpływu toksycznych czynników środowiskowych, które mogą prowadzić do uszkodzenia neuronów u osób predysponowanych genetycznie, może odgrywać kluczową rolę w patogenezie zaburzeń ze spektrum autyzmu. Brak równowagi między utleniaczami a antyoksydantami, będący konsekwencją zaburzeń mitochondrialnych, coraz częściej traktowany

jest jako potencjalny czynnik patogenny w chorobach neurodegeneracyjnych. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że działanie stresu oksydacyjnego wywołuje poważne konsekwencje również dla rozwoju i funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego osób z autyzmem [12, 18].

### Glutation

Ponad 98% całkowitego glutationu (GSH+GSSG) występuje w postaci zredukowanej (GSH), zdolnej do redukcji wolnych rodników, resztę stanowi forma utleniona (*Glutathione disulfide* – GSSG) pod postacią disulfidu oraz S-koniugatów glutationu. Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu waha się od 5 do 10 mM/l. Antyoksydacyjne działanie GSH wiąże się nie tylko z detoksykacją ROS, ale też ze sprzężaniem z toksycznymi elektrofilowymi egzo- i endogennymi substancjami oraz z możliwością chelatowania jonów metali. W komórce eukariotycznej stosunek GSH/GSSG jest wskaźnikiem ogólnego stanu wewnątrzkomórkowego środowiska oksydacyjno-redukcyjnego. Obniżenie poziomu mitochondrialnego glutationu jest związane z neuronalną wrażliwością na stres oksydacyjny. Mózg jest wysoce wrażliwy na stres oksydacyjny głównie z powodu ograniczonej wydajności przeciwutleniaczy, wyższego zapotrzebowania na energię oraz większej zawartości lipidów. Mózg stanowi około 2% masy ciała, ale zużywa aż 20% metabolicznego tlenu. Zdecydowana większość energii jest używana przez neurony. Ze względu na brak potencjału do produkcji glutationu przez neurony mózg ma ograniczoną zdolność do detoksykacji ROS, przez co neurony stanowią pierwszą linię komórek podatną na stres oksydacyjny. U dzieci (0–2 lata) oraz u osób starszych (41–69 lat) stwierdzono znacznie mniejsze stężenie GSH i większe GSSG w erytrocytach w porównaniu z osobami z pozostałych grup wiekowych [19]. Sugeruje się więc, że neurologiczne zmiany wywołane stresem oksydacyjnym występującym we wczesnym okresie rozwoju tkanki mózgowej mogą prowadzić do zaburzeń ze spektrum autyzmu. Liczne badania wykazały korelację między nieprawidłowym stężeniem glutationu w różnych tkankach a występowaniem zaburzeń autystycznych [20]. W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań, których przedmiotem było określenie stężeń glutationu lub stosunków stężeń różnych jego form w materiale biologicznym u osób z ASD i z grup kontrolnych.

Tabela 1. Zestawienie wyników badań, w których oznaczano stężenie GSH lub GSH/GSSG u pacjentów z ASD i osób z grup kontrolnych

Biomarker	Próbka	Wartość średnia [mg/ml] ± SD	Odnosnik z literatury przedmiotu
Wolny GSH/GSSG	Komórki limfoblastyczne	Grupa kontrolna 99,14 ± 33,5 n = 10 Autyzm 61,81 ± 10,6 n = 10; p < 0,001	[21]
	Mitochondria komórek limfoblastycznych	Grupa kontrolna 11,63 ± 3,9 n = 10 Autyzm 5,06 ± 1,3 n = 10; p < 0,001	

dalszy ciąg tabeli na następnej stronie

GSH/GSSG	Wycinek z mózdzku	Grupa kontrolna $103,4 \pm 5,9$ n = 10 Autyzm $48,7 \pm 1,7$ n = 10; p < 0,0001	[22]
	Wycinek pobrany ze skroniowej części kory mózgowej	Grupa kontrolna $113,9 \pm 8,2$ n = 10 Autyzm $44,7 \pm 3,1$ n = 10; p < 0,0001	
GSSG/GSH	Osocze	Grupa kontrolna $0,093 \pm 0,04$ n = 44 Autyzm $14 \pm 0,05$ n = 55; p < 0,0001	[23]
GSH ( $\mu\text{M}$ )	Krew	Grupa kontrolna $242,67 \pm 32,94$ n = 13 Autyzm $161,16 \pm 10,68$ n = 15; p = 0,02	[24]
Wolny GSH/GSSG	Osocze	Grupa kontrolna $7,9 \pm 3,5$ n = 73 Autyzm $4,9 \pm 2,2$ n = 80; p < 0,0001	[25]
GSH/GSSG	Osocze	Grupa kontrolna $28,2 \pm 7,0$ n = 73 Autyzm $14,7 \pm 6,2$ n = 80; p < 0,0001	[26]
Wolny GSH/GSSG	Osocze	Grupa kontrolna $17 \pm 6,8$ n = 42 Autyzm $6 \pm 2$ n = 40; p = 0,001	[26]
GSH/GSSG	Osocze	Grupa kontrolna $47 \pm 18$ n = 42 Autyzm $21 \pm 6$ n = 40; p = 0,001	[26]
GSH/GSSG	Osocze	Grupa kontrolna $26,07 \pm 5,03$ n = 2042 Autyzm $8,03 \pm 2,46$ n = 20; p = 0,001	[27]

SD (Standard Deviation) – odchylenie standardowe; n – liczebność grupy; p – poziom istotności

Wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny powoduje obniżenie zdolności reduktazy glutationowej do odtwarzania zredukowanej postaci glutationu. W celu odzyskania wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks GSSG jest transportowany do osocza. Stąd też podwyższona wartość GSSG i obniżony stosunek GSH/GSSG w osoczu jest

dobrym wskaźnikiem wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego. Niższe stężenie zredukowanej formy glutationu może tłumaczyć także możliwość pojawienia się u pacjentów z rozpoznaniem ASD nawracających infekcji, zapalenia tkanki nerwowej i układu pokarmowego oraz obniżonej zdolności do usuwania toksycznych substancji z organizmu [28].

#### Peroksydaza glutationowa, katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa

Neutralizacja nadmiaru wolnych rodników odbywa się dzięki antyoksydacyjnemu systemowi, który obejmuje działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych przeciwutleniaczy. Głównymi enzymami hamującymi powstawanie najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego są dysmutaza ponadtlenkowa (*Superoxide dismutase* – SOD), katalaza (*Catalase* – CAT) i peroksydaza glutationowa (*Glutathione peroxidase* – GPx) [15, 18].

Dysmutaza ponadtlenkowa to enzym katalizujący dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^{\cdot-}$  do  $H_2O_2$  i  $O_2$ . Hamuje ona również proces peroksydacji lipidów, usuwając rodniki ponadtlenkowe tworzące się podczas niepełnej redukcji  $O_2$ . Toksyczny  $H_2O_2$  będący naturalnym produktem metabolizmu komórkowego stanowi substrat dla katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx), które utrzymują jego niskie stężenie. GPx umożliwia redukcję  $H_2O_2$  i wodoronadtlenków lipidowych w reakcji utleniania GSH do GSSG i wody. Ten selenozależny enzym występuje w cytozolu, a także w mniejszym stężeniu obecny jest w mitochondriach i płynie zewnątrzkomórkowym. Z kolei katalaza katalizuje reakcję rozkładu  $H_2O_2$  do wody i tlenu cząsteczkowego w peroksysomach.  $H_2O_2$  będący produktem reakcji katalizowanej przez SOD jest więc jednocześnie substratem dla reakcji katalizowanych przez CAT i GPx, między którymi występuje efekt współpracy [29].

Przedstawione w tabeli 2 wyniki badań dotyczące oznaczania enzymów antyoksydacyjnych SOD, GPx i CAT wykazują zmienioną aktywność tych enzymów u pacjentów dotkniętych autyzmem. Badania wskaźników stresu oksydacyjnego były prowadzone na próbkach erytrocytów, osocza i surowicy. Eryocyty wydają się w tym wypadku dobrym materiałem ze względu na ich prostą strukturę i stosunkowo duże ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach komórkowych, które mogą ulegać peroksydacji pod wpływem ROS.  $H_2O_2$  może łatwo dyfundować przez błony biologiczne i przedostawać się do osocza lub innych komponentów komórki i tym samym powodować wzrost aktywności przeciwutleniaczy. Zatem wszelkie zmiany aktywności GPx i CAT w komórkach będą także determinowały aktywności tych enzymów w środowisku zewnątrzkomórkowym [33].

Tabela 2. Zestawienie wyników badań, w których oznaczano aktywność SOD i GPx u pacjentów z ASD i osób z grup kontrolnych

Biomarker	Próbka	Wartość średnia $\pm$ SD	Odnosnik z literatury przedmiotu
GPx (U/g Hb)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $24,81 \pm 1,19$ n = 25 Autyzm $19,17 \pm 1,16$ n = 20; p < 0,005	[30]
Gpx (U/g Hb)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $38,01 \pm 5,03$ n = 41 Autyzm $28,72 \pm 2,64$ n = 45; p < 0,05	[31]
Gpx (U/g Hb)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $7,45 \pm 0,65$ n = 9 Autyzm $7,75 \pm 0,93$ n = 12; p > 0,05	[32]
Gpx (U/L)	Osocze	Grupa kontrolna $24,2 \pm 6,3$ n = 30 Autyzm $40,9 \pm 11,3$ n = 27; p < 0,0001	[33]
Gpx (U/dL)	Osocze	Grupa kontrolna $143,85 \pm 61,12$ n = 30 Autyzm $246,88 \pm 99,93$ n = 30; p < 0,05	[34]
Gpx (U/mL)	Osocze	Grupa kontrolna $0,39 \pm 0,08$ n = 41 Autyzm $0,27 \pm 0,04$ n = 45; p < 0,05	[31]
SOD (U/g Hb)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $1321,72 \pm 46,29$ n = 25 Autyzm $987,8 \pm 92,97$ n = 20; p < 0,005	[30]
SOD (U/dL)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $1,24 \pm 0,33$ n = 30 Autyzm $1,51 \pm 0,45$ n = 30; p < 0,05	[34]
SOD (U/g Hb)	Erytrocyty	Grupa kontrolna $971,31 \pm 239,14$ n = 26 Autyzm $2123,59 \pm 543,53$ n = 27; p < 0,001	[35]

dalszy ciąg tabeli na następnej stronie

SOD (U/g Hb)	Eryocyty	Grupa kontrolna 993,17 ± 118,31 n = 41 Autyzm 723,78 ± 90,03 n = 45; p < 0,05	[31]
CAT (k/g Hb)	Eryocyty	Grupa kontrolna 515,77 ± 127,9 n = 26 Autyzm 209,31 ± 61,92 n = 27; p < 0,001	[35]
CAT (U/L)	Surowica	Grupa kontrolna 0,689 ± 0,157 n = 42 Autyzm 2,836 ± 0,479 n = 45; p ≤ 0,001	[36]

SD (Standard Deviation) – odchylenie standardowe; n – liczebność grupy; p – poziom istotności

Wyniki niezależnie przeprowadzonych doświadczeń mających na celu oznaczenie stężenia SOD, GPx i CAT w próbkach krwi u dzieci z syndromem autyzmu wykazały istotne różnice w stężeniu tych enzymów w stosunku do stężeń w próbkach zdrowych dzieci. Uzyskane wyniki nie są jednoznaczne i nie obrazują jasnej tendencji co do aktywności tych enzymów. Upośledzona zdolność antyoksydacyjna, objawiająca się obniżoną aktywnością enzymów, może wynikać z mniejszej ich produkcji lub większego zużycia podczas próby neutralizacji wolnych rodników. Wyczerpanie rezerw przeciwutleniaczy może być spowodowane brakiem odpowiedniego i zrównoważonego spożycia minerałów, w szczególności miedzi i cynku, nadmierną ekspozycją na ksenobiotyki bądź zmianami polimorficznymi w genach kodujących enzymy chroniące komórkę przed pojawieniem się stresu oksydacyjnego [37]. Znacząco niższe stężenia GPx oraz SOD w grupie osób z ASD mogą świadczyć o obniżonej zdolności neutralizacji  $H_2O_2$ , anionorodnika ponadtlenkowego oraz wodoronadtlenków organicznych. Przekroczenie zdolności antyoksydacyjnej w warunkach niedoboru GPx i CAT może prowadzić do poważnych uszkodzeń makrocząsteczek. W niektórych badaniach zanotowano przeciwną zależność, czyli statystycznie większą aktywność enzymów antyoksydacyjnych w grupie osób z ASD. Nadaktywność antyoksydantów tłumaczy się tu jako efekt kompensacyjny, poprzedzający komórkowy stres oksydacyjny [33].

#### Ceruloplazmina i transferyna

Ceruloplazmina hamuje peroksydację lipidów błonowych, zmniejszając stężenie wolnego jonu  $Fe^{2+}$  katalizującego konwersję  $H_2O_2$  do wysoce reaktywnego  $OH\cdot$ . Działa jako ferrokasydaza i zmiatacz anionorodników ponadtlenkowych  $O_2\cdot^-$ , chroniąc przed wolnymi rodnikami wielonienasycone kwasy tłuszczowe występujące w błonach erytrocytów [38].

Transferyna częściowo nasycona jonami żelaza działa jako silny przeciwutleniacz w ludzkim osoczu do czasu, gdy nie nastąpi jej całkowite nasycenie. Wówczas działa jako promotor reakcji Fentona [39]:





W badaniach przeprowadzonych przez Chauhan i wsp. [40] wykazano, że stężenia ceruloplazminy w surowicy trzynastu spośród dziewiętnastu, a w wypadku transferyny u szesnastu z dziewiętnastu badanych dzieci autystycznych były znacząco niższe od stężeń oznaczanych w próbkach pochodzących od zdrowego rodzeństwa.

Co ciekawe, gdy w badaniu oznaczano ceruloplazminę i transferynę, najniższe stężenia owych enzymów dotyczyły tych osób autystycznych, u których odnotowano najslabsze zdolności językowe. Dzieci autystyczne, które nie straciły umiejętności językowych, wykazywały stężenia ceruloplazminy i transferyny w surowicy zbliżone do stężeń swojego zdrowego rodzeństwa [40].

### 8-izoprostan

8-izoprostan należący do grupy  $\text{F}_2$ -izoprostanów uważany jest za jeden z najbardziej czułych markerów utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i dysfunkcji układu redoks.  $\text{F}_2$ -izoprostany powstają na skutek nieenzymatycznego utleniania kwasu arachidonowego w fosfolipidach zgodnie z mechanizmem wolnorodnikowym. Prawidłowy zakres stężeń 8-izoprostanu w ludzkiej krwi wynosi od 20 do 80 pg/ml. Podwyższone stężenia  $\text{F}_2$ -izoprostanów oznaczono w płynach biologicznych pacjentów cierpiących m.in. na astmę alergiczną, chorobę Alzheimera, arteriosklerozę i hipercholesterolemię, cukrzycę typu I i II, płasawicę Huntingtona, nadciśnienie płucne, cholestazę czy zespół ostrej niewydolności oddechowej [41].

El-Ansary i Al-Ayadhi [42] zmierzili stężenia 8-izoprostanu w próbkach osocza 20 osób z syndromem autyzmu w wieku od 4 do 12 lat i 19 osób z grupy kontrolnej. Średnie stężenie 8-izoprostanu w grupie badanej było o 45,65% wyższe w stosunku do grupy kontrolnej. Hipotezę o większym narażeniu dzieci z autyzmem na stres oksydacyjny sprawdzali również Ming i wsp. [43]. Autorzy mierzyli stężenie 8-izoprostanu w próbkach moczu pochodzących od 33 osób z grupy badanej i 29 osób z grupy kontrolnej. Średnie stężenie 8-izoprostanu w moczu dla grupy badanej było znacząco wyższe ( $32,92 \pm 1,98$ , ng/mol kreatyniny) niż dla grupy kontrolnej ( $5,71 \pm 0,98$  ng/mol kreatyniny).

W badaniach przeprowadzonych przez Qasem i wsp. [44] wykryto obecność 8-izoprostanu w próbkach krwi dzieci autystycznych w stężeniach znacznie przekraczających górną granicę prawidłowego zakresu. W ww. badaniu wzięło udział 44 dzieci z ASD w wieku od 4 do 7 lat. Pacjenci zostali poddani diagnozie według skali oceny autyzmu dziecięcego (*Childhood Autism Rating Scales – CARS*), umożliwiającej określenie stopnia zaawansowania autyzmu od lekkiego przez umiarkowany do znacznego. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano czterokrotny wzrost 8-izoprostanu w krwi dzieci autystycznych w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano znacznych różnic w stężeniach 8-izoprostanu w grupach różniących się stopniem zaawansowania syndromu autystycznego. Natomiast różnica stężeń 8-izoprostanu obecnego w krwi była istotna statystycznie przy porównywaniu grup wiekowych. Istnieją więc podejrzenia, że stres oksydacyjny ma znaczenie w patogenezie autyzmu wówczas, gdy występuje on w początkowych latach życia [44].

## L-karnityna

L-karnityna (*L-Carnitine* – LC) ułatwia beta-utlenianie kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach oraz usuwanie z mitochondriów średnio- i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych mających – gdy są w nadmiarze – działanie toksyczne. Wyniki niektórych badań przeprowadzanych w warunkach *in vitro* wykazują, że LC pełni funkcję zmiatacza wolnych rodników i chroni przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego [45–48].

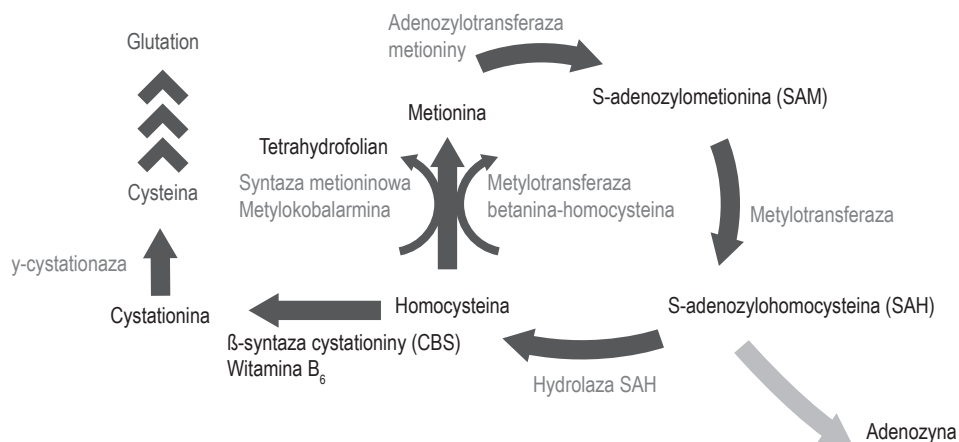
W pracy Filipek i wsp. [49] zostały przedstawione wyniki badań oznaczania m.in. całkowitej i wolnej L-karnityny w surowicy stu pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem ASD. Średnie stężenie całkowitej i wolnej L-karnityny było znacząco niższe u dzieci z syndromem autystycznym w stosunku do zakresu określającego normę. Niedoborowi L-karnityny towarzyszył znaczący wzrost stężenia alaniny (u 80% pacjentów wykryto stężenie większe niż średnia  $\pm SD$ ,  $p < 0,001$ ) i amoniaku (u 78% pacjentów wykryto stężenie większe niż średnia  $\pm SD$ ,  $p < 0,001$ ) w surowicy. Jako jedną z teoretycznych przyczyn występowania niedoborów L-karnityny w organizmach dzieci z ASD autorzy podają zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów [49].

## Biomarkery cyklu metylacji i transsulfuracji

Metylacja to proces polegający na addycji grupy metylowej do cząsteczki substratu bądź substytucji atomu lub grupy atomów grupą metylową  $-CH_3$ . Metylacja odgrywa zasadniczą rolę w wielu zróżnicowanych procesach biochemicznych. Ma znaczenie chociażby w metabolizmie neurotransmiterów np. dopaminy, noradrenaliny czy serotoniny. Zachodzi podczas procesów naprawczych DNA i RNA, syntezy niektórych fosfolipidów (np. lecytyn), hormonów (np. melatoniny) lub silnych antyoksydantów takich jak glutation. Ponadto w wyniku metylacji w wątrobie przeprowadzane są liczne procesy enzymatyczne mające na celu detoksykację ksenobiotyków [50].

Metylacja zachodzi również podczas szlaku metabolicznego metioniny – egzogenego aminokwasu. Początkowo metionina ulega konwersji do S-adenozylometioniny (SAM), która w dalszym etapie przekazuje grupę metylową cząsteczce akceptorowej, np. cząsteczce neuroprzekaźnika, białka, fosfolipidu lub zasadzie azotowej nukleotydów. S-adenozylometionina w wyniku działania metylotransferazy zostaje pozbawiona grupy metylowej, dając S-adenozylhomocysteinę (SAH), która ulega hydrolizie do homocysteiny i adenozyliny. Homocysteina może zostać przekształcona ponownie w metioninę w wyniku reakcji katalizowanych przez syntazę metioninową i metylokobalaminę (witamina  $B_{12}$ ), bądź też może zostać wykorzystana jako substrat do syntezy cysteiny w procesie transsulfuracji. Dawcą grupy metylowej dla homocysteiny w procesie metylacji jest aktywna forma kwasu foliowego, czyli 5-metylotetrahydrofolian (5-MTHF). Podczas transsulfuracji powstaje pośrednio cystationina. Reakcja syntezy cystationiny z homocysteiną katalizowana jest przez witaminę  $B_6$  oraz  $\beta$ -syntazę cystationiny (CBS). Cystationina w obecności  $\gamma$ -cystationazy jest hydrolizowana do cysteiny (Cys), która może zostać wykorzystana do produkcji glu-

tationu. Homocysteina może być zatem remetylowana w celu regeneracji metioniny we wszystkich komórkach za pomocą syntazy metioninowej zależnej od 5-MTHF i B<sub>12</sub> lub metylotransferazy betaina-homocysteina w wątrobie i nerkach ludzi. Trzecią drogą usuwania homocysteiny jest nieodwracalny szlak transsulfuracji zależny od witaminy B<sub>6</sub> i syntazy cystationiny β, w którym homocysteina jest trwale usuwana z cyklu metioniny (rys. 1) [51].



Rysunek 1. Uproszczony schemat cyklu demetylacji metioniny i transsulfuracji homocysteiny [51]

Zaburzenia cyklu transmetylacji i transsulfuracji są uwarunkowane czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Zdolność komórek do metylacji jest uzależniona w dużej mierze od czynników dietetycznych, a przede wszystkim od podaży metioniny, kwasu foliowego oraz witamin B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub>. Genetyczne polimorfizmy mogą działać synergistycznie z niedoborami żywieniowymi, zakłócając naturalne mechanizmy regulacyjne metabolitów, konsekwentnie nasilając przy tym stres oksydacyjny i przyczyniając się do rozwoju patologii metabolicznej. Spośród powszechnych polimorfizmów związanych z ryzykiem występowania autyzmu polimorfizm reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR) jest jedną z najczęściej badanych korelacji genetycznych z autyzmem. MTHFR katalizuje reakcję redukcji 5,10-metylenotetrahydrofolianu do niezbędnego w usuwaniu nadmiaru homocysteiny 5-metylotetrahydrofolianu. W szczególności polimorfizm 677C>T oraz 1298A>C genu MTHFR jest uważany za czynnik ryzyka schorzeń neurodegeneracyjnych, które mogą się przyczyniać do zachodzenia mechanizmów epigenetycznych modyfikujących ekspresję genów [52]. Nieprawidłowy metabolizm metioniny, homocysteiny oraz kwasu foliowego może mieć również przyczynę w polimorfizmie genu kodującego CBS. Obniżenie aktywności tego enzymu wywołuje homocystynurię, objawiającą się m.in. zaburzeniami neurozwyrodnieniowymi, dysfunkcjami układu ruchu czy krążenia. Polimorfizm C699T związany

z obniżoną aktywnością CBS i podwyższonymi stężeniami homocysteiny wykazuje istotny związek z wysokim wynikiem CARS pacjentów z syndromem autyzmu [53].

Stężenie homocysteiny we krwi zależy od wielu czynników, w tym od diety, płci, wieku, stosowanych używek. Zwykle jest niskie, o ile szlak metylacji zależny od metylokobalaminy i kwasu foliowego w postaci 5-metylotetrahydrofolianu i szlak transsulfuracji zachodzi prawidłowo. Złożony metabolizm homocysteiny w organizmie jest wysoce zależny od kofaktorów pochodzących z witamin. Niedobory witaminy B<sub>12</sub>, aktywnej formy kwasu foliowego i witaminy B<sub>6</sub>, choliny oraz trimetyloglicyny są powiązane z hiperhomocysteinemią. Z tego powodu proces transformacji biochemicznej nie działa prawidłowo, a homocysteina gromadzi się w organizmie, powodując uszkodzenie komórek. Hiperhomocysteinemia jest uważana za niezależny czynnik ryzyka dla wielu stanów patologicznych w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym dla zaburzeń ze spektrum autyzmu [54].

Paśca i wsp. [55] zmierzili m.in. stężenia homocysteiny całkowitej w osoczu 21 dzieci, w tym 12 z syndromem autyzmu. Stężenia homocysteiny badanych osób były wyższe ( $9,83 \pm 2,75 \mu\text{mol/L}$ ) w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej ( $7,51 \pm 0,93 \mu\text{mol/L}$ ). C. Puig-Alcaraz i wsp. [56] oznaczyli stężenie homocysteiny w moczu u 35-osobowej grupy badanej i 34-osobowej grupy kontrolnej. Wykazali również znaczącą różnicę ( $p < 0,05$ ) w stężeniach homocysteiny u osób z ASD ( $2,24 \pm 3,50 \text{ mmol/mol}$  kreatyniny) w porównaniu z osobami zdrowymi ( $0,9 \pm 0,58 \text{ mmol/mol}$  kreatyniny). Przeprowadzona analiza korelacji wykazała istotny związek między stężeniem homocysteiny a nasileniem zaburzeń umiejętności komunikacyjnych (Spearman  $r = 0,453$ ;  $p < 0,05$ ) [56]. Natomiast badania przeprowadzone przez Kałużną-Czaplińską i wsp. [57] potwierdziły korzystny wpływ stosowania witamin B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub>, a także kwasu foliowego w celu redukcji stężenia homocysteiny w moczu u dzieci z autyzmem. Suplementacja witaminami B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub> była skuteczniejsza w obniżaniu stężenia homocysteiny przy jednoczesnym podawaniu kwasu foliowego. Poziom homocysteiny w moczu autystycznych dzieci przed suplementacją witaminami wynosił  $2,41 \pm 1,10 \text{ mmol/mol}$  kreatyniny, a po leczeniu  $1,13 \pm 0,44 \text{ mmol/mol}$  kreatyniny [57].

Zaburzenie przemian metabolicznych homocysteiny u dzieci autystycznych jest złożone i niełatwo je wytłumaczyć nieprawidłowością w przebiegu pojedynczego szlaku metabolicznego. Dlatego przy niewydajnej transmetylacji obserwuje się istotny wzrost stężenia nie tylko samej homocysteiny, ale też SAH, przy jednoczesnym spadku stężenia metioniny i SAM. Reakcja hydrolizy SAH do adenozyiny i homocysteiny jest łatwo odwracalna i zachodzi z ustaleniem stanu równowagi dynamicznej. W rzeczywistości jedynym powodem, dla którego ta reakcja przebiega w kierunku hydrolitycznym, jest skuteczne usuwanie produktu. Zakłócenia metaboliczne, skutecznie utrudniające usuwanie homocysteiny i adenozyiny, prowadzą zatem do zwiększenia SAH. Obniżona wartość SAM/SAH, objawiająca się jako zaburzenie cyklu metylacji i wyrażająca osłabioną zdolność do metylacji komórkowej, może stanowić istotny wskaźnik zmian profilu metabolicznego u dzieci z autyzmem [58, 59].

Melnyk i wsp. [58] wykazali obniżony średni stosunek SAM/SAH w osoczu oraz obniżoną średnią procentową zawartość 5-metylocysteiny w DNA u 68 dzieci z autyzmem w odniesieniu do 40-osobowej grupy osób będących rodzeństwem bada-

nych. Zaobserwowali również podwyższoną zawartość utlenionego glutationu oraz 8-oksy-deoksyguanozy (markera oksydacyjnego uszkodzenia DNA) w grupie badanej w porównaniu z grupą zdrowego rodzeństwa. W swojej pracy podtrzymują oni hipotezę, jakoby osłabione zdolności antyoksydacyjne i metylacyjne komórek miały wpływać na ekspresję genów epigenetycznych, a prooksydanty środowiskowe i genetyczne czynniki ryzyka miały działać poprzez zmiany w przebiegu metylacji DNA i reakcje utleniania wywołujące uszkodzenia w podatnych genach.

Także w pracy James i wsp. [59] zmierzony średni stosunek SAM/SAH dla grupy badanej (20 osób) był prawie o 50% mniejszy w porównaniu z wartościami tego wskaźnika dla grupy kontrolnej (33 osoby). Dodatkowe pomiary stężeń metabolitów uczestniczących w cyklu transsulfuracji ułatwiają znalezienie przyczyn braku równowagi w cyklu metioniny. Niskie stężenia cystationiny, cysteiny, całkowitego glutationu są zgodne z obniżeniem częstości zachodzenia przemian homocysteiny za pośrednictwem CBS [59]. Cysteina (aminokwas limitujący syntezę glutationu w postaci wolnej) oraz jej utleniona forma – cystyna (Cys-S) stanowią główny zewnątrzkomórkowy bufor redoks. Przypuszcza się, że podobnie do wewnątrzkomórkowego buforu redoks (GSH/GSSG) stosunek (CyS/CyS-S) będzie odpowiednio niższy podczas stresu oksydacyjnego wśród osób z autyzmem. Analiza próbek osocza potwierdziła obniżoną zawartość cysteiny ( $202 \pm 17 \mu\text{mol/L}$  dla grupy kontrolnej,  $163 \pm 15 \mu\text{mol/L}$  dla grupy badanej), której towarzyszyło prawie dwukrotnie podwyższone stężenie GSSG. Wartość stosunku całkowitego glutationu do utlenionego była zatem o ok. 70% mniejsza dla grupy badanej. Synteza GSH jest niewystarczająca wówczas, gdy stężenia jego prekursorów metabolicznych są zbyt niskie, dlatego konsekwentny spadek stężenia cysteiny u dzieci autystycznych sugeruje zwiększoną wrażliwość na stres oksydacyjny [59].

### Podsumowanie

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) są złożone, niejednorodne, i jak się powszechnie uważa, mają podłoże genetyczne. Mimo licznych doniesień sugerujących wysoki poziom dziedziczenia autyzmu wciąż nie wytypowano konkretnych genów bezpośrednio odpowiedzialnych za to spektrum zaburzeń. W nawiązaniu do genetycznych i epigenetycznych czynników prowadzących do autyzmu w piśmiennictwie zaproponowano do tej pory wiele hipotez, na których tle możliwe jest poszerzenie kryteriów diagnostycznych i opracowanie dokładniejszych procedur wykrywania tego zespołu zaburzeń. Ale też wciąż istotnym celem przy poszukiwaniu nowych biomarkerów autyzmu odzwierciedlających zmiany neurobiologiczne jest przede wszystkim zdefiniowanie i zrozumienie procesów wywołujących autyzm, a nie tych, które są jego następstwami.

Niewątpliwie dostępnym jest sporo badań dostarczających dowodów na związek stresu oksydacyjnego z autyzmem. Szlaki metaboliczne zaburzające równowagę oksydacyjno-redukcyjną w komórkach, jak również stężenia poszczególnych przeciwutleniaczy biorących udział w mechanizmach obronnych przed reaktywnymi formami tlenu i azotu są przedmiotem wielu analiz. Stres oksydacyjny wywołwany dysfunkcją mitochondriów bądź czynnikami środowiskowymi nasila destrukcyjne procesy neurologiczne lub zaburzenia metylacji, które mogą się przyczynić do rozwoju chorób

neuropsychiatrycznych. Pomiary stężenia zredukowanego glutationu oraz stosunku GSH/GSSG pozwalają oszacować, w jakim stopniu organizmy osób z syndromem autyzmu są narażone na stres oksydacyjny oraz czy ich komórkowe mechanizmy obrony antyoksydacyjnej są tak samo wydajne jak u zdrowych osób. Autorzy niezależnych badań, w których oznaczano stężenie zredukowanej formy glutationu w próbkach krwi osób, u których zdiagnozowano autyzm, są zgodni co do tego, że ten podstawowy przeciwutleniacz występuje u nich w istotnie mniejszym stężeniu niż u zdrowych ludzi. Sugeruje to, że stres oksydacyjny mógł być czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju autyzmu. Hipotezę tę wspierają też wyniki przeprowadzonych badań, w których oznaczano inne biomarkery zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, obserwując przy tym istotne statystycznie różnice w stężeniach pomiędzy dziećmi z grupy badanej (ASD) i kontrolnej. Wyższe stężenie 8-izoprostanu oraz niższe stężenia L-karnityny, ceruloplazminy i transferryny u dzieci autystycznych powiązано z występowaniem zaburzeń językowych, charakterystycznych dla tej grupy zaburzeń. Inne potencjalne markery, takie jak enzymy SOD, GPx i CAT, również są przedmiotem analiz w badaniach dotyczących związku stresu oksydacyjnego z autyzmem. W ich wypadku wyniki badań różnią się wszakże znacząco i dają sprzeczne wnioski, toteż nie można ich traktować jako biomarkerów specyficznych dla autyzmu. Niemniej jednak rezultaty przytoczonych badań przedstawiają istotną różnicę stężeń tych przeciwutleniaczy u osób z autyzmem w porównaniu ze zdrowymi dziećmi.

W ostatnich latach zwrócono także uwagę na występowanie u osób z autyzmem zaburzeń szlaku metabolicznego metioniny, który ma fundamentalne znaczenie m.in. w kontroli ekspresji genów, detoksykacji ksenobiotyków oraz produkcji glutationu, neuroprzekazników i komórek odpornościowych. Odbiegające od normy poziomy homocysteiny, SAM/SAH lub cysteiny w osoczu osób autystycznych są dowodem na upośledzoną zdolność do kooperacji współzależnych procesów metylacji i transsulfuracji oraz wynikających z tego konsekwencji m.in. dla układu nerwowego. Zależność ta nie jest niestety domeną jedynie autyzmu, ale dotyczy również innych chorób o podłożu neurodegeneracyjnym.

Chociaż wyniki badań sugerują obniżoną „zdolność” komórkowej metylacji i utrzymania prawidłowego stanu antyoksydacyjnego wśród osób dotkniętych autyzmem, warto pamiętać, że analizę płynów ustrojowych przeprowadzono po rozpoznaniu schorzenia. Zatem nie można jednoznacznie stwierdzić, czy obserwowane zaburzenia metylacji i zdolności utrzymywania naturalnej równowagi redoks w organizmie przyczyniają się do patogenezы autyzmu, czy są po prostu wynikiem patofizjologii występującego schorzenia.

Różnorodność neurologicznych, metabolicznych epigenetycznych procesów kreujących zaburzenia typowe dla zespołu ASD sprawia, że podjęcie skutecznej terapii klinicznej wiąże się z koniecznością prowadzenia indywidualnej terapii fenotypowej. Dotychczas nie określono jednego uniwersalnego profilu biomarkerów. Strategia dobierania odpowiedniej i skutecznej terapii klinicznej opartej na kompleksowym oznaczaniu biologicznych wskaźników ASD wydaje się jednak odpowiednia i można sądzić, że ma większą wartość niż w wypadku indywidualnego oznaczania biomarkera powiązanego z pojedynczym czynnikiem ryzyka.

## Piśmiennictwo

1. Yates K, Le Couteur A. *Diagnosing autism*. Paediatr. Child Health 2009; 19(2): 55–59.
2. Karpińska D. *Deficyt teorii umysłu w autyzmie. Symptomy i uwarunkowania*. W: *Neurokognitywistyka w patologii i zdrowiu 2009–2011*. Annales Academiae Medicae Stetinensis 2011; 57(Sympozja 1): 60–67.
3. Rybakowski F, Białek A, Chojnicka I, Dziechciarz P, Horvath A, Janas-Kozik M i wsp. *Zaburzenia ze spektrum autyzmu – epidemiologia, objawy, współzachorowalność i rozpoznawanie*. Psychiatr. Pol. 2014; 48(4): 653–665.
4. Gerhant A, Olajossy M, Olajossy-Hilkesberger L. *Neuroanatomiczne, genetyczne i neurochemiczne aspekty autyzmu dziecięcego*. Psychiatr. Pol. 2013; 47(6): 1101–1111.
5. Goodman R, Scott S. *Psychiatria dzieci i młodzieży*. Wrocław: Elsevier Urban & Partner; 2000.
6. Goldani A, Downs S, Widjaja F, Lawton B, Hendren R. *Biomarkers in autism*. Front. Psychiatry 2014; 5: 100.
7. Gorczyca P, Kapinos-Gorczyca A, Ziora K, Oświęcimska J. *Photoanthropometric study of dysmorphic features of the face in children with autism and Asperger syndrome*. Iran J. Psychiatry 2012; 7(1): 41–46.
8. Hallmann A. *Ocena cytotoksycznego działania menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru w komórkach choriocarcinoma*. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny; 2008.
9. Sroka J, Madeja Z. *Udział reaktywnych form tlenu i reduktazy tioredoksyny w regulacji migracji komórek*. Post. Bioch. 2009; 55(2): 145–152.
10. Przybylska D, Kosieniak G. *Rola oksydazy NADPH NOX4 w regulacji procesów proliferacji, starzenia i różnicowania komórek*. Post. Bioch. 2014; 60(1): 69–73.
11. Shichiri M, Yoshida Y, Niki E. *Unregulated lipid peroxidation in neurological dysfunction*. W: Watson R. red. *Omega-3 fatty acids in brain and neurological health*. London: Academic Press; 2004. S. 31–55.
12. Alfadda A, Salam R. *Reactive oxygen species in health and disease*. J. Biomed. Biotechnol. 2012; 2012: 936486.
13. Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol. Rev. 2002; 82(1): 47–95.
14. Sharma P, Jha A, Dubey R, Pessarakli M. *Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions*. J. Bot. 2012; 2012: 217037.
15. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacogn. Rev. 2010; 4(8): 118–126.
16. Alvarez B, Radi R. *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids. 2003; 25(3–4): 295–311.
17. Burneya S, Caulfielda J, Nilesb J, Wishnokb J, Tannenbaumab S. *The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite*. Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 1999; 424(1–2): 37–49.
18. Geier D, Kern J, Geier M. *A prospective study of oxidative stress biomarkers in autistic disorders*. E. J. Appl. Psychol. 2009; 5(1): 2–10.
19. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. *Age-related changes in the glutathione redox system*. Cell Biochem. Funct. 2002; 20(1): 61–66.
20. Chauhan A, Chauchan V. *Oxidative stress in autism*. Pathophysiology 2006; 13(3): 171–181.

21. James S, Rose S, Melnyk S, Jernigan S, Blossom S, Pavliv O i wsp. *Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism*. The FASEB J. 2009; 23(8): 2374–2383.
22. Chauhan A, Audhya T, Chauchan V. *Brain region-specific glutathione redox imbalance in autism*. Neurochem. Res. 2012; 37(8): 1681–1689.
23. Adams J, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin R, Quig D, Geis E i wsp. *Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity*. Nutr. Metab. 2011; 8(8): 34.
24. Pasca S, Dronca E, Kaucsar T, Craciun E, Endreffy E, Ferencz B i wsp. *One carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders*. J. Cell Mol. Med. 2009; 13(10): 4229–4238.
25. James S, Melnyk S, Jernigan S, Cleves M, Halsted C, Wong D i wsp. *Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism*. Am. J. Med. Genet B. Neuropsychiatr. Genet. 2006; 141B(8): 947–956.
26. James S, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv O i wsp. *Efficacy of methylcobalamin and folic acid treatment on glutathione redox status in children with autism*. Am. J. Clin. Nutr. 2009; 89(1): 425–430.
27. Al-Yafee Y, Al-Ayadhi L, Haq S, El-Ansary A. *Novel metabolic biomarkers related to sulfur dependent detoxification pathways in autistic patients of Saudi Arabia*. BMC Neurol. 2011; 11: 139.
28. James SJ. *Oxidative stress and the metabolic pathology of autism*. W: Zimmerman AW red. *Autism: Current theories and evidence*. Humana Press; 2008. S. 245–268.
29. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams J, Domenici E, Dalla Bernardina B i wsp. *Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses*. Free Radic. Biol. Med. 2012; 52(10): 2128–2141.
30. Meguid N, Dardir A, Abdel-Raouf E, Hashish A. *Evaluation of oxidative stress in autism: defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation*. Biol. Trace Elem. Res. 2011; 143(1): 58–65.
31. Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik D, Sohmen T. *Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2002; 67(5): 341–343.
32. Pasca S, Nemes B, Vlase L, Gagyi C, Dronca E, Miu A i wsp. *High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism*. Life Sci. 2006; 78(19): 2244–2248.
33. Söğüt S, Zoroğlu S, Ozyurt H, Yilmaz H, Ozuğurlu F, Sivasli E i wsp. *Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism*. Clin. Chim. Acta. 2003; 313(1–2): 111–117.
34. Al-Gadani Y, El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L. *Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children*. Clin. Biochem. 2009; 42(10–11): 1032–1040.
35. Zoroğlu S, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O i wsp. *Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism*. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2004; 254(3): 143–147.
36. González-Fraguela M, Hung M-L, Vera H, Maragoto C, Noris E, Blanco L i wsp. *Oxidative stress markers in children with autism spectrum disorders*. Br. J. Med. Med. Res. 2013; 3(2): 307–317.
37. Ming X, Johnson WG, Stenroos ES, Mars A, Lambert GH, Buyske S. *Genetic variant of glutathione peroxidase 1 in autism*. Brain Dev. 2010; 32(2): 105–109.
38. Essa M, Guillemin G, Waly M, Al-Sharbati M, Al-Farsi Y, Hakkim F i wsp. *Reduced levels of antioxidant proteins in children with autism in Oman*. Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis. 2012; 2(1): 53–56.



39. Yu B. *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. *Physiol. Rev.* 1994; 74(1): 139–162.
40. Chauhan A, Chauhan V, Brown W, Cohen I. *Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin – the antioxidant proteins*. *Life Sci.* 2004; 75(21): 2539–2549.
41. Milne L, Musiek E, Morrow J. *F2-Isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: An overview*. *Biomarkers* 2005; 10(1): 10–23.
42. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. *Lipid mediators in plasma of autism spectrum disorders*. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 160.
43. Ming X, Stein T, Brimacombe M, Johnson W, Lambert G, Wagner G. *Increased excretion of a lipid peroxidation biomarker in autism*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2005; 73(5): 379–384.
44. Qasem H, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. *Cysteinyl leukotriene correlated with 8-isoprostane levels as predictive biomarkers for sensory dysfunction in autism*. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 130.
45. Lee BJ, Lin JS, Lin YCh, Lin PT. *Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: A randomized, placebo-controlled trial*. *Nutr. J.* 2014; 13: 79.
46. Sener G, Paskaloğlu K, Satiroglu H, Alican I, Kaçmaz A, Sakarcan A. *L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 43(5): 698–705.
47. Gülçin I. *Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine*. *Life Sci.* 2006; 78(8): 803–811.
48. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. *L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations*. *Nutrition* 2011; 27(6): 693–699.
49. Filipek PA, Juranek J, Nguyen MT, Cummings Ch, Gargus JJ. *Relative carnitine deficiency in autism*. *J Autism. Dev. Disord.* 2004; 34(6): 615–623.
50. Audhya T. *Role of B vitamins in biological methylation*. *Health Diagnostics and Research Institute*; 2012.
51. Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky V, Waly M. *How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis*. *Neurotoxicology.* 2008; 29(1): 190–201.
52. Sener E, Oztop D, Ozkul Y. *MTHFR gene C677T polymorphism in autism spectrum disorders*. *Genet. Res. Int.* 2014; 2014: 698574.
53. El Shafae M, Sabry J, Behiry E, Elshahat S, Zaki M, Esmail N. *Association of cystathionine beta synthase gene polymorphism with cognitive disorders in autistic children*. *J. Innov. Pharmacut. Biol. Sci.* 2017; 4(3): 20–24.
54. Sharma M, Tiwari M, Tiwari K. *Hyperhomocysteinemia: Impact on neurodegenerative diseases*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2015; 117(5): 287–296.
55. Paşca S, Nemeş B, Vlase L, Gagyi C, Dronca E, Miu AC i wsp. *High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism*. *Life Sci.* 2006; 78(19): 2244–2248.
56. Puig-Alcaraz C, Fuentes-Albero M, Calderón J, Garrote D, Cauli O. *Increased homocysteine levels correlate with the communication deficit in children with autism spectrum disorder*. *Psychiatry Res.* 2015; 229(3): 1031–1037.
57. Kałużna-Czaplińska J, Michalska M, Rynkowski J. *Vitamin supplementation reduces the level of homocysteine in the urine of autistic children*. *Nutr. Res.* 2011; 31(4): 318–321.

- 
58. Melnyk S, Fuchs G, Schulz E, Lopez M, Kahler S, Fussell J i wsp. *Metabolic imbalance associated with methylation dysregulation and oxidative damage in children with autism*. J. Autism Dev. Disord. 2012; 42(3): 367–377.
  59. James S, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor D i wsp. *Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism*. Am. J. Clin. Nutr. 2004; 80(6): 1611–1617.

Adres: Aleksandra Waligóra  
Katedra i Zakład Chemii  
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
41-808 Zabrze ul. Dr. H. Jordana 19  
e-mail: awaligora@sum.edu.pl

Otrzymano: 18.07.2017  
Zrecenzowano: 15.11.2017  
Otrzymano po poprawie: 4.04.2018  
Przyjęto do druku: 15.04.2018