

Toitumusliku sekkumise põhjused ja tulemused autismi korral.

Peptiidid ja autism.

K.L Reichelt MD, PhD

Institute of Pediatric Research, Univ. of Oslo, Rikshospitalet , N-0027 Oslo;

Võtmetõrminid: autism, eksorfiinid, peptiidid, häirunud toitumine

Kokkuvõte:

Eesmärk: Lapsepõlve pervasiivse arenguhäire puhul on võimalik demonstreerida peptiidide ja peptiidisarnaste spetsiifiliste ühendite hulga tõusu uriinis. Lisaks sellele viitab IgA antikehade hulga tõus võrreldes kontrollgrupiga sellele, et teatud toiduproteiinid on olulised. Kuna üha rohkem tõendeid viitab soole üldisele limaskestast põletikule, eeldatakse imendunud peptiidide suurenenud hulka.

Meetod: Peptiidid on eraldatud HPLC-ga, mõned nendest identifitseeritud co-kromatograafia, immunoloogilise analüüsi ja mass-spektromeetriaga. IgA antikehad toiduproteiinide vastu on määratud rutiinse tehnikaga.

Tulemused: Leiti kattuvad peptiidide piikide mustrid ja üldine peptiidide taseme tõus. Mõned nendest peptiididest on opioidid, millest üks suurendab serotoniini imedumist. IgA antikehad gliadiini, gluteeni ja kaseiini vastu on autistide grupis statistiliselt kõrgemad.

Järeldus: Peptiidide hulga tõus, tõusnud eksorfiinide eritumine ja ka IgA antikehade tõusnud hulk viitab soolestikust suuremale imendumisele ning proteiinil baseeruvale keskkondlikule mõjule autismi puhul, peptiididele kui patoloogia vahendajatele.

Sissejuhatus

Mitmed laboratooriumid on leidnud uriini peptiidide hulga tõusu autistliku sündroomi (tabel 1) või lapsepõlve pervasiivse arenguhäire puhul, eriti just hilise algusega regressiooniga tüübi puhul. Siiski on autistlikul spektril alati lisaks ka teisi etioloogilisi tegureid. Osad leitud peptiididest on ilmselt eksorfiinid (1-6). Nende lõplik struktuur on saadud mass-spektromeetria ja fragmentatsioon-mass-spektromeetria abil (5,6). Peptiididele on teostatud ka co-kromatograafia ja immuunanalüüs. On kirjeldatud ka haruldasi d-aminohappeid sisaldavaid eksorfiine (5). Samuti on leitud opioidide taseme tõusu seerumis ja tserebrospinaalses vedelikus (CSF) (7, 8), osad nendest opioididest on veise kasomorfiinid (1,4,5,6). On ka tuvastatud gliadiini-, gluteeni- ja kaseiinivastaste IgA antikehade hulga tõusu (4, 9-11). Seetõttu on kasutatud dieeti, mis on vaba nendest proteiinidest koos käitumise testidega enne ja pärast dieediga sekkumist.

Meetodid

Sertifitseeritud lastepsühhiaatrite ja -psühholoogide poolt pandud diagnoosid baseerusid DSM 3 ja hiljem ICD 10 või DSM IV (peaaegu seesama) klassifikatsioonidel.

Uriin: Analüüsi aluseks on 10 ml esimest hommikust uriini. See oli külmutatud ja saadetud meie laborisse Styrofoam karpides. Määrati uriini kreatiniin, ning 600 µl uriini filtreeriti tsentrifuugimise teel 3000 x g 20 min jooksul, kasutades Spin-X Costar tsentrifuugi Tube filtreid (0.22µm cellulose acetate) 2 ml polüpropüleenist katsutites (Corning Inc. Corning , NY 14831, USA). Analüüsi jaoks kasutati tavapäraselt filtreeritud uriini, mis vastas 250 nanomoolile kreatiniinile.

Uriini analüüs: Me kasutasime automaatset proovi aplikaatorit ja termostaatilist kontrolli 30° C juures, HPLC aparati Hewlet Packard'ilt (Agilent series 1100). Kolonniks oli Vydac C-.18 pöördfaasi kolonn (0.4x 20 cm). Peptiidide sidemed määrati 215 nanomeetrilisel lainepikkusel,

aromaatsed kõrvalproduktid 280 nanomeetrisel. Viimased on olulised, sest paljud ravimid sisaldavad aroomaatseid gruppe ja on seega tuvastatavad. Voolukiirus oli 1 ml minutis, trifluoroatseethappe gradiendid (10mM) atsetonitriili vastu (detailid vt 6).

Antikehade analüüs: IgA antikehi analüüsiti veeniverest. IgA and IgG antikehad määrati gliadiini ja gluteeni vastu ja IgA lact-albumiini, lacto-globuliini, kaseiini ja ov-albumiini vastu, kasutades ELISAt nagu kirjeldatud (12,13) Oslo Fürsts laboratooriumi poolt.

Enne ja pärast sekkumist teostati kaks testiseeriat. Esimene: 15 lapse avatud testimine, kordustestimisega peale ½ aastat, 1 aastat ja 4 aastat. Teine: pimetest juhuslikult määratud paaridega 10-st eksperimentaalsest lapsest ja 10-st kontroll-lapsest, kellest kõik olid autistid. Neid jälgiti 1 aasta.

Tulemused

Kaks last sama diagnoosiga ja sama hindamise skooriga võivad omada erinevaid peptiidide mustreid. Sündroom on selgelt väga heterogeenne, vaatamata sellele, et peptiidide tõus on tavaline. Indolyl-3- acryloyl glycine (IAG), leitud Sunderland grupi poolt (14) näib olevat peamine ja parim C.P.D.D.(Childhood onset pervasive developmental disorder) marker. Autistlike laste ja kontrollgrupi laste näitajate osaline kattumine teeb diagnoosimise uriini profiili järgi võimatuks (Sponheim et al 2006). See on põhjendatud, sest peptiidide kontsentratsioon peaks esmalt ületama neerude tagasiimedumise võime. Seetõttu ainult 1/5 juhtudest näitab selget peptiidide tõusu uriinis.

Tabel 1 näitab peptiidide taste autistliku sündroomi ja kontrollgrupi lastel. Erinevused on statistiliselt olulised. See, et tegemist on peptiidisarnaste ühenditega, on laialdaselt dokumenteeritud (15).

Osad peptiidid ilmutavad opioidset aktiivsust (1, 4-6,11,16). Ka nende mass-spektromeetria näitab, et osad nendest on eksorfiinid (5,6). Need kattuvad teiste gruppide poolt saadud andmetega (4,5).

Edasi keskendutakse peptiidide taseme vähendamisele toidus (4,6,16), kuna neil võib olla toitumuslik päritolu.

Immuunanaliüs

Nagu näha tabelis 2, on IgA antikehad gliadiinile, gluteenile ja kaseiinile märkimisväärselt erinevad kontrollgrupist. See viitab nende proteiinide tõusnud läbilaskvusele ilma tsöliaakiata (negatiivne endomütsiumi või transglutaminaasi test). Seega esineb siiski teatud spetsiifilisus, sest IgA antikehad laktalbumiini, laktoglobuliini ja ovalbumiini vastu ei ole statistiliselt erinevad autistliku sündroomi ja kontrollgrupi puhul. Samasuguseid andmeid on ka teised esitanud (1,4,9,10).

Dieedi tulemused

Joonisel on näidatud muster patsiendi jaoks enne ja pärast dieeti, tabelis on demonstreeritud dieedi kvantitatiivsed aspektid pärast esimest ja teist aastat. Selge statistiline alanemine on mõõdetud käitumuslikus patoloogias p väärtusena promillides (17,18). Muutused on sarnased teiste gruppide poolt publitseeritutele (4,10, 19,20). Nagu kirjeldatud (6), seletavad leitud peptiidid häiret, sest opioidne efekt on psühhosogeenne (Lindström et al 1966; Reichelt et al 1982). Edaspidine mõõdetud regressioon neil, kes katkestasid dieedi ja muutuste puudumine dieedil mitteolnud kontrollgrupil näitas selgelt, et dieet on efektiivne. Viimane internetiuurimus toob samuti esile selle järelduse (Klaveness and Bigam).

Kuna neuroaktiivsed peptiidid on varajasel ilmnemisel pikaajalise mõjuga (22,23) ja paljud opioidid omavad troofilist mõju (24-25) ning on epileptogeensed (26), arvame me, et on oluline alustada dieediga nii ruttu kui võimalik. Lisandina vitamiinide, küllaldase valgu ja

tursamaksaõli andmine ei ole kahjulik ja on ka pärast paljusid aastaid küllaltki ohutu. Seda ei saa öelda enamuse ravimite kohta.

Tabel 1: Autismi kvantitatiivsed aspektid 8 erineva maa prepuberteedis lastel, leitud aastatel 1995 kuni 1998 meie laboratooriumis.

Diagnoos	autism	normaalne
Vanusevahe	2- 14	3-14
N	315	161
Peptiidide tase (keskmine)	720	346
SD	471	108
95% CI		
Madalaim väärtus	560	320
Kõrgeim	773	360
P=	0.001	

Ühikud on *Abs units in μm^2 under the UV 215 nm*. Autistlikud lapsed erinesid kontrollgrupi lastest, $p= 0.001$

Tabel 2. Autistliku sündroomi immuunandmed.

	GliadinIgA		GlutenIgA		CaseinIgA	
	Aut.	Cont	Aut.	Cont	Aut.	Cont
Mean	0.29	0.05	0.29	0.05	0.81	0.12
Median	0.085	0.05	0.09	0.04	0,145	0.070
N	60	34	60	34	62	34
95%CI						
Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Max	2.57	0.14	2.10	0.14	2.40	0.44
P	0.048		0.009		0.01	

CI = confidence interval. Antikehad mõõdeti ELISA –ga seerumist (12,13). Autistlike isikute vanus oli 11.3 ± 7 ; kontrollgrupi vanus 12 ± 6 aastat.

Tabel 3: 1 ja 4 aastat sekkumine

TEST	Algne	1 aasta ~ SKOOR	4 aasta SKOOR	N	P
C-RAVEN:	6.8 ± 2.8	$+8.6\pm 2.8$	$+8.6\pm 3.2$	12	0.005*
ITPA:	25.7 ± 5.5	$+2.7\pm 2.5$	$+6.1\pm 2.8$	10	0.005*
TAFJORD SHEME:					
1.Sotsiaalne					
interaktsioon	53.7 ± 15.2	$+12.1\pm 5.9$		14	0.005
2: Keel	71.0 ± 15.2	$+8.7\pm 6.5$		14	0.005

3: Strukturaalne võimekus	56.7±17.1	+9,1±5.4	14	0.001
4: Sensorne / Motoorne	72.9±12.3	+ 7.2± 4.5	14	0-001
DIPAB:				
A: Sotsiaalne isolatsioon	8.5±3.3	-6.1±2.7	14	0.005
B: Veider käitumine	5.3±2.2	-5.3±1.22	14	0.005
PEPTIIDIDE TASEMED (<i>as µmoles /24h diuresis and hydrolysis released amino acids</i>).	26.89±12	-10.7±13	14	0.016

Raven C jõudis maksimumtasemele 1 aasta pärast, samal ajal kui Illinoisi psühholingvistilise võimekuse test (ITPA) paranes rohkem kui 4 aastaga, ilmselt peegeldades õppimise(keele) edenemise palju komplekssemat iseloomu. DIPAB = Haracopos skeem: ("Laste Psühholingvistilise Käitumise diagnoos"). Peptiidide tasemed langesid ja nendele järgnes sümptomide vähenemine. Tafjord on Norra skeem, mis registreeris mängu, interaktsiooni, struktuurilise võimekuse ja sensoorse/motoorse käitumise mängu ajal. Detaile vt (1-19). Kasutati Mann Whitney U testi, *- näitab nelja aasta olulisust

Table 4. Pime paaris- ja kontrollitud toitumuslik vahelesegamine (13)

	Autsitlikud sümptomid		Oluline.	N
	Enne	Pärast		
Diet group	12.5±2.2	5,6±2,4	0.005	10
Cont. group	11.5±3.9	11.2±5	0.798	10
	Mitteverbaalne kognitiivne tase			
Diet group	81.0±35.9	86.7±38,5	0.03	9
Cont group	84.6±36.6	74.3±31.4	0.5	9
	Lingvistiline vanus			
Diet group	55.4±32.3	66.6±35.1	0.015	9
Cont group	47.8±23.9	55.7±28.3	0.035	9
	Motoorsed probleemid			
Diet group	29.3±13.1	26.3±11,5	0.004	10
Cont group	24.7±14.6	27.8±12.2	0.04	10

Non parametric MannWhitney U test after 1 year two tailed.(14).

Järeldus

Peptiide eritatakse suuremas hulgas eriti regressiivse autismi korral ja osad nendest on opioidid. Uriinis eritavad peptiidid võivad seletada sotsiaalset isolatsiooni (mida võib oodata opioidsetelt peptiididelt) (27). Ka troofilised muutused autistide ajus (28,29) võivad olla opioidsete peptiidide tõttu, sest need mõjutavad aju küpsemist (25,30). Veel on leitud Fos antigeeni sellistes võtmetuumades nagu n. accumbens ja inferior colliculus superior ja inferioris, põhjustatud IV kasomorfiin 1-7 poolt (30), ja autistidele iseloomuliku käitumise indutseerimist (31,32). Kuna immuunokompetentsed rakud omavad opioidseid retseptoreid

(33), siis oli eeldatav ka immunoloogiliste muutuste esinemine. Toitumusliku vahelesegamise eksperimendi tulemused viitavad selgelt, et gluteeni-, gliadiini- ja kaseiinivaba dieet on efektiivne hüperpeptiduuriaga autismi korral. Seda toetab oraalse peptidaasiravi mõju, mis suurendab proteiinide ja peptiidide lõhustamist (34).

Viited

1. Anderson, R.J., Bendel, D.J., Garnet, I., Groundwater, P.W., Lough, J., Mills, M.J., Savery, D., and Shattock, P.(2002) Identification of indolyl-3-acryloylglycine in the urine of people with autism. *J. Pharmacy and Pharmacol.* **54**, 295-298.
2. Cade, R.J., Privette, R.M., Fregly, M., Rowland, N., Sun, Z., Zele, V., Wagemaker, H., and Edelstein, C..(2000) Autism and schizophrenia: Intestinal disorders. *Nutritional Neuroscience* **3**, 57-72.
3. Shanahan, M.R , Venturini, A.J. , Daiss, J.L. and Friedman, A.E.(2000) Peptide diagnostic markers for human disorders. *European Patent application* . **EP 0 969 015** A2 1-44,1-44
4. Gillberg, C., Terenius, L.,and Lønnerholm, G.(1985) Endorphin activity in childhood psychosis. *Arch Gen Psychiat* **42**, 780-783.
5. Israngkun, P., Newman, H.A., Patel, S.T., Duruibe, V.A., and Abou-Issa, H.(1986) Potential biochemical markers for infantile autism. *Neurochem Pathol.* **5**, 51-70.
6. LeBoyer M, Bouard MP, Racasens C, Philippe A., Guillod-Bataille M, Bondeaux D. Tabuteau F, Fugas M, Panksepp J , Lauoy J-M. Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *Am J Psychiat* 1994; 151: 1797-801
7. Lucarelli, S., Frediani, T., Zingoni, A.M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Quintieri, F., Barbato, M., D'Eufemia, P. and Cardi, E.(1995) Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med* **37**, 137-141.
8. Reichelt, K.L., Ekrem, J.,and Scott, H.(1990) Gluten, milk proteins and autism: dietary intervention effects on behavior and peptide secretion. *J Appl Nutrition* **42**, 1-11.
9. Reichelt, K.L., Knivsberg, A-M., Lind, G., Nødland, M.(1991) Probable etiology and possible treatment of childhood autism. *Brain Dysfunct* **4**, 308-319.
10. Reichelt, W.H. and Reichelt, K.L.(1997) The possible role of peptides derived from food proteins in diseases of the nervous system. In *Epilepsy and other Neurological Disorders in coeliac Disease*. Gobbi G :edit. pp225-235. John Libbey & Comp. London. UK.
11. Reichelt, W.H., Stensrud, M.B., and Reichelt, K.L. (1998) Peptide excretion in celiac Disease. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **26**, 305-309
12. Reichelt, K.L. and, Knivsberg, A-M.(2003). Can the pathophysiology of Autism be Explained by the nature and the discovered urine peptides? *Nutr. Neuroscience* **6**, 19-28.
13. Scott H, Rognum TO, Midtvedt TJ, Brandtzaeg P. Age related changes in human serum antibodies to dietary and colonic bacteria antigens measured by enzyme-linked immunoabsorbant assay. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1985a, 93: 65-70.
14. Scott, H., Rognum, T.O.,and Brandtzaeg, P.(1985b) Performance testing of antigen coated polystyrene micro-plates for ELISA measurements of serum antibodies to bacterial and dietary antigens. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* **93**,117-123.
15. Shattock, P., Kennedy, A., Rowell, F. and Berney, T.(1990) Role of neuropeptides in autism and their relationship with classical neurotransmitters. *Brain Dysfunct* **3** 328-345.
16. Knivsberg A-M, Wiig K, Lind G, Nødland M and Reichelt KL (1990) Dietary intervention in Autistic syndromes. *Brain Dysfunction*, 1990;3 315-327
17. Knivsberg A-M, Reichelt KL, Høien T, Nødland M . A Randomized ,controlled study of dietary intervention in Autistic syndromes. *Nutr.Neuroscience* 2002;5:251-261

18. Knivsberg A-M., Reichelt KL , Nødland M, Høien T . Autistic syndromes and diet: a follow –up study. *Scand J. Educat. Res.* 1995; 39: 223-236
19. Whiteley P, Rodgers J, Savery D, Shattock P. A gluten-free diet as an intervention for autism and associated spectrum disorders: preliminary findings. *Autism* 1999; 3: 45-65.
20. Kniker WT, Andrews A, Hundley A, Garver C . The Possible role of Intolerance to Milk/dairy and wheat/gluten foods in older children and adults with autism spectrum disorder. In ‘2001: An Autism odyssey’. (The autism Res. Unit, Sunderland Univ: edit) .2001:pp 183-191.
21. Klaveness J , Bigam J . The GFCF Kids diet survey. In ‘Building bridges.’ (The autism Res Unit,Sunder land Univ. :edit) 2002;pp77-84
- 22: Meyerson BJ..Höglund U. Neuropeptides and behaviour:The behavioural effects of neonatal exposure to peptides and peptide antagonists. In ‘Hormones,Brain and Behaviour in Vertebrates I’ (J Balthazart:ed) Karger ,Basel.1990;8:pp205-214
23. Gschanes A, Windisch M. Early postnatal treatment of peptide preparations influences spatial navigation of young and adult rats. *Behav Brain Res* 1999; 100: 161-6
24. Zagon IS, McLaughlin PJ. Endogenous opioid systems regulate cell proliferation in the developing rat brain. *Brain Res* 1987; 412: 68-72
25. Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Compar Neurobiol* 1989; 281, 13-22
26. Siggins GR, Henriksen SJ, Chavkin CA and Gruol D. Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system:cellular mechanisms.*Adv neurology* 1986;44:501-512:
27. Panksepp J, Normansell L, Sivily S, Rossi J, Zolovick AJ. Casomorphins reduce separation distress in chickens. *Peptides* 1978; 5: 829-31
28. Hashimoto T, Tayama M, Masahito, M, Sakorama N, Yoshimoto T, Murakawa K. Reduced brain stem size in children with autism. *Brain and Development* 1992; 14: 94-7
29. Courchesne E, Townsend J, Saitoh, O. The brain in infantile autism: Posterior fossa structures are abnormal. *Neurology* 1994; 44: 214-23.
30. Sun Z, Cade RJ, Fregly MJ, Privette RM. Beta-casomorphin induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. *Autism* 1999; 3: 67-83
31. Hole K, Bergslien AA, Jørgensen H, Berge O-G, Reichelt KL, and Trygstad OE . A peptide containing fraction from schizophrenia which stimulates opiate receptors and inhibits dopamine uptake. *Neuroscience.* 1979; 4: 1139-1147
32. Sun Z and Cade JR. A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioural changes in rats. *Autism* 1999; 3: 85-95
33. Singh VK. Neuropeptides as native immune modulators. *Progress in Drug Res* 1995; 45: 10-31
34. Brudnak MA, Rimland B, Kerry RE, Dailey M, Taylor R, Stayton B, Walckman F, W, Walckman M, Pangborn J,Buchholz I.Enzyme-based therapy for autism spectrum disorders-is it worth another look? *Med Hypothesis* 2002;58: 422-428.