

ИСКУСТВА И НОВИНИ ОД СВЕТОТ

**ПОДИГАЊЕ НА С-РЕАКТИВЕН ПРОТЕИН
НА СЕРУМОТ И S100 ПРОТЕИНИ ЗА
СИСТЕМСКОТО ВОСПАЛЕНИЕ КАЈ
ДЕЦАТА СО АУТИЗАМ**

Вијендра К. СИНГ

Институт за Биологија, Државен
Универзитет во Јута, Логан, САД

Резиме

Патогенезата на аутизмот, невролошко нарушување што сериозно влијае врз малите деца, може да ги вклучи воспаленијата и автоимунитетот. Во овој извештај, се испитува дистрибуцијата на С-реактивниот протеин во акутна фаза (CRP) и S100 протеините кај нормални и децата со аутизам. Нивото на нивниот серум е мерено со проба на имуноатсорбент врзан со ензими (ELISA). Кај децата со аутизам се најдени значително повиооки од нормални нивоа на CRP ($p=0.005$) и S100 ($p=0.03$) протеини. Постоенето на подигнатите нивоа на CRP и S100 протеини кај децата со аутизам е одличен знак за системско воспаление што може да придонесе за невропатологија на ова нарушување на мозокот.

Клучни зборови: аутизам; С-реактивен протеин; S100 протеини; воспаление; одговор на акутна фаза; автоимунитет; нарушувања на мозокот

Адреса за сепаратите:

Вијендра СИНГ
914 Sudden Valley
Bellingham, WA 98229
USA
E-mail: singhvk@cc.usu.edu

world experience and current events

**ELEVATION OF SERUM C-REACTIVE
PROTEIN AND S100 PROTEINS FOR SYSTEMIC
INFLAMMATION IN AUTISTIC CHILDREN**

Vijendra K. SINGH

Department of Biology, Utah State University,
Logan, USA

Abstract

The pathogenesis of autism, a neurological disorder severely affecting young children, may involve inflammation and autoimmunity. In this report, the distribution of acute-phase C-reactive protein (CRP) and S100 proteins was examined in normal and autistic children. Their serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Autistic children were found to have significantly higher than normal levels of CRP ($p=0.005$) and S100 proteins ($p=0.03$). The existence of elevated levels of CRP and S100 proteins in autistic children is an excellent sign of systemic inflammation that may contribute to the neuropathology of this brain disorder.

Key Words: Autism; C-reactive protein; S100 proteins; Inflammation; Acute-phase response; Autoimmunity; Brain disorders

Address requests for reprint to:

Vijendra SINGH
914 Sudden Valley
Bellingham, WA 98229
USA
E-mail: singhvk@cc.usu.edu

Вовед

Аутизмот сега општо е признат како биолошко нарушување на развојниот нервен систем (ЦНС). Тој не се идентификува со некоја специфична невропатологија или биомаркер туку главно со клиничка дијагноза што се потпира на различни невролошки и нарушувања во однесувањето, вклучувајќи дефицити на повисоки ментални функции како што се социјална интеракција, јазик, комуникација, имагинација и когниција. Постојат неколку хипотези, но причината за нарушувањето не е многу разјаснето. Меѓу придонесувачките фактори, имуните фактори како што се автоимунитетот, проинфламаторните и регулаторните цитокини можат да ја играат фундаменталната улога за патогенезата на аутизмот (1-8). Во сегашнава студија, серумскиот CRP и S100 протеини (и подвидовите алфа и бета) се профилирани кај децата со аутизам зашто тие се одговор на акутна фаза на прототипски реактанти и добро познати сурогатски маркери на системското воспаление (9-17). Како што е опишано во овој труд, децата со аутизам имаат повисоки од нормални нивоа на овие протеини во акутна фаза, што имплицира можно инволвирање на системско инфламаторниот одговор кај аутизмот.

Материјали и методи

Студијата вклучува вкупно 82 деца: 41 дете со аутизам (средна возраст 6.7 години; 34 машки и 7 женски) и 41 нормално дете (средна возраст 7.4 години; 25 машки и 16 женски). Децата со аутизам во оваа студија имаат цврста дијагноза на аутизам но студијата ги исклучува другите дијагнози како што се первазивната развојна неспособност - не поинаку специфицирана (PDD-NOS), Аспергеровиот синдром, Дауновиот синдром или идиопатска ментална ретардација [1-5]. Клиничката дијагноза на аутизмот беше главно утврдена со помош на Прирачникот за дијагностички и статистички ментални нарушувања, четврто издание (DSM-IV).

Introduction

Autism is now commonly recognized as a biological disorder of the developing central nervous system (CNS). It is identified not by any specific neuropathology or biomarker but mainly by clinical diagnosis relying on various neurological and behavioral impairments, including deficits of higher mental functions such as social interaction, language, communication, imagination and cognition. There are several hypotheses but the cause of the disorder is not very well understood. Among contributing factors, the immune factors such as autoimmunity, pro-inflammatory and regulatory cytokines might play a fundamental role in the pathogenesis of autism (1-8). In the present study, serum CRP and S100 proteins (both the alpha- and beta- subtypes) were profiled in autistic children because they are the prototypic acute-phase response reactants and well-known surrogate markers of systemic inflammation (9-17). As described in this paper, autistic children had higher than normal levels of these acute-phase proteins, which imply possible involvement of a systemic inflammatory response in autism.

Materials and Methods

The study included a total of 82 children: 41 autistic children (mean age 6.7 yrs; 34 male and 7 female) and 41 normal children (mean age 7.4 yrs; 25 male and 16 female). Autistic children in this study had a firm diagnosis of autism but the study excluded other diagnoses such as the pervasive developmental disability-not otherwise specified (PDD-NOS), Asperger's syndrome, Down's syndrome or idiopathic mental retardation [1-5]. The clinical diagnosis of autism was established mainly by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV).

Нормалните деца се со цврсто физичко здравје без никаков знак на болест на мозокот или ментална болест или некоја друга позната ментална состојба. Колку што беше можно, субјектите се поврзуваа според возраста и полот. Меѓутоа, никој не беше одбиен да учествува заради раса, возраст или пол освен ако не беше во опсегот на нашето истражување. За да се почитува правилото за приватност од Законот за преносливост и одговорност на здравственото осигурување (HIPAA), добивме потребна дозвола од Институтскиот ревизорски одбор на Државниот универзитет во Јута и порано од Универзитетот во Мичиген. Во времето на собирање на крв, нормалните и децата со аутизам беа на нулта линија без никакви пропишани лекови и ниту едно немаше некаква историја на кардиоваскуларна болест. Сегашната студија ги користеше примероците од претходно собран серум кои беа зачувани замрзнати на -20°C без повторливи циклуси на смрзување и топење (18-22). Хуманиот серумски CRP беше мерен со ELISA користејќи комерцијално купени опреми (Biomed, Foster City, CA). Пробната процедура на CRP вклучувајќи ги податоците за интерпретација беше стриктно според инструкциите на производителот на опремата. Нивото на серумот на S100-алфа и S100-бета протеини се мереше со методата ELISA како што претходно беше опишано (15). Примероците од серумот беа анализирани на „двојно слеп“ начин и шифрата беше отворена откако анализата беше компетирана. Податоците беа дадени како средна вредност од групата \pm стандардна грешка (S.E.) од средна вредност и статистичката важност ($p \leq 0.05$) беше евалуирана со тестовите на студенти.

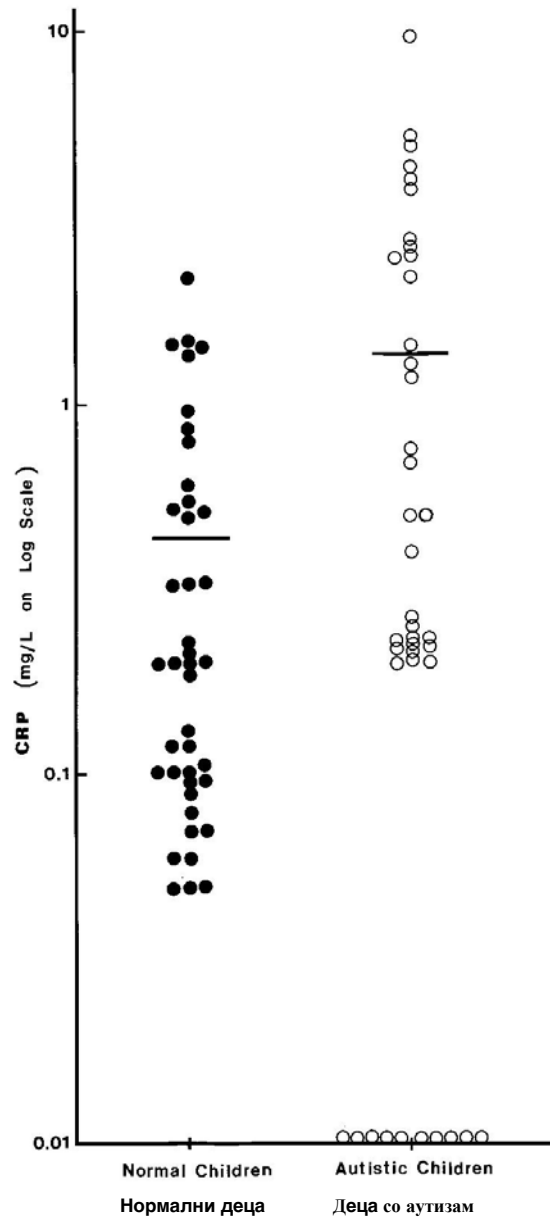
Резултати и дискусија

Експерименталните податоци за серумскиот CRP кај нормалните и децата со аутизам е прикажан на сл. 1. И двете групи имаа забележливи нивоа на CRP но околу една четвртина од децата со аутизам (10 од 41) имаа двај забележливо количество на протеин.

Normal children were those having a firm physical health without any sign of brain disease or mental illness or any other known medical condition. As far as possible, the subjects were matched for age and gender. However, no one was denied participation in the study because of the race, age or gender factors except those beyond the scope of our research. To comply with the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) Privacy Rule, we obtained necessary permission of the Institutional Review Board (IRB) at Utah State University and formerly at the University of Michigan. At the time of blood collection, both the normal as well as the autistic children were at the baseline without any prescription medications and none had the history of any cardiovascular disease. The present study utilized previously collected serum samples that were preserved frozen at -20°C without repetitive cycles of freezing and thawing (18-22). Human serum CRP was measured by ELISA using the commercially bought kits (Biomed, Foster City, CA). The CRP assay procedure including the data interpretation was strictly in compliance with the kit manufacturer's instructions. The serum level of S100-alpha and S100-beta proteins was measured by ELISA method as described previously (15). Serum samples were analyzed in a double-blind fashion and the code was broken after the analysis has been completed. The data are given as the mean of the group \pm standard error (S.E.) of the mean and the statistical significance ($p \leq 0.05$) was evaluated by the Student's t test.

Results and Discussion

The experimental data for serum CRP in normal and autistic children are shown in Fig. 1. Both groups of children had detectable levels of CRP but about one-quarter of the autistic children (10 out of 41) had a barely detectable amount of this protein.



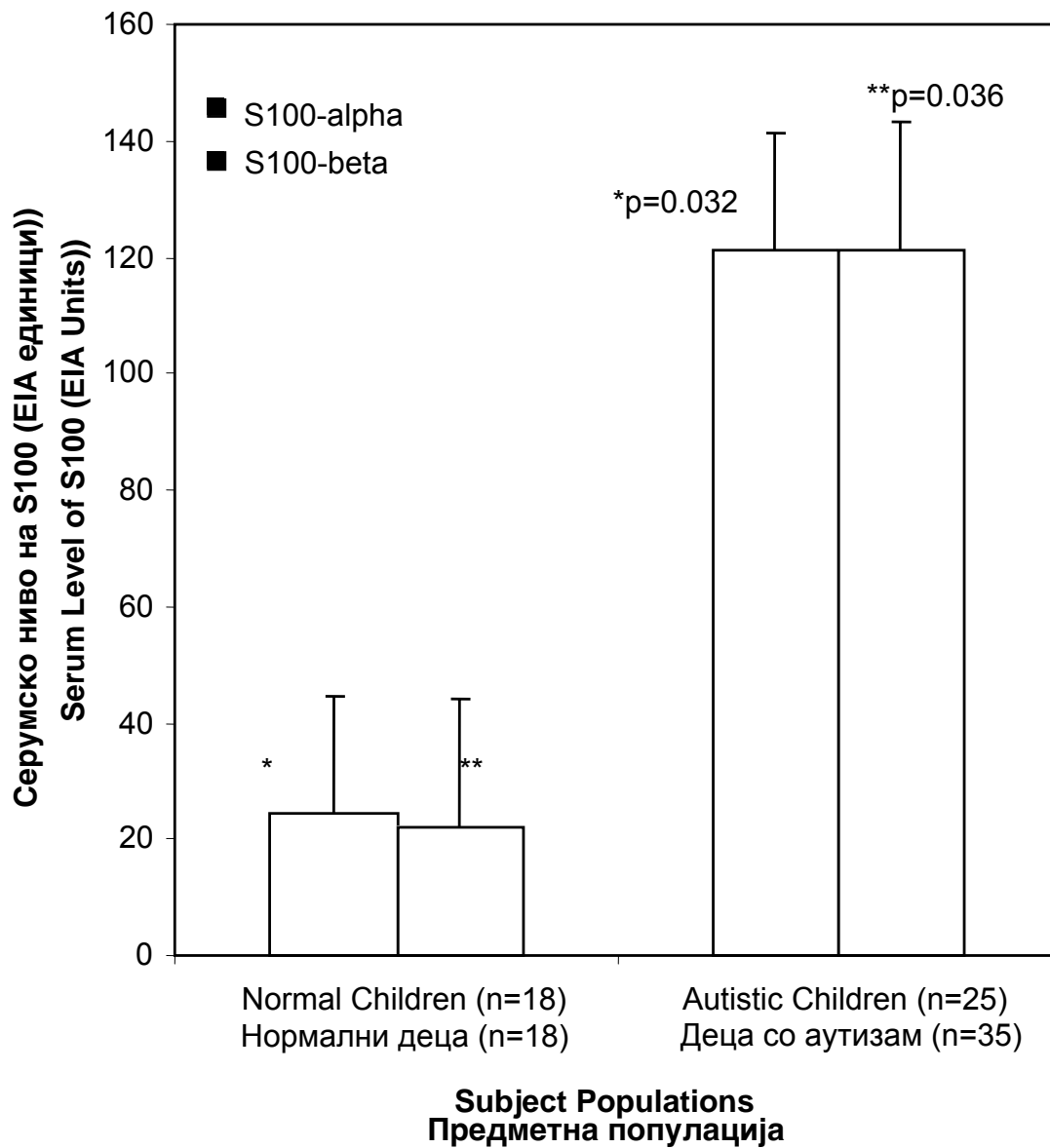
Слика 1. Дисџрибуција на серумскиот CRP кај нормални и деца со аутизам. Левиот панел покажува податоци за нормални деца (солидни кружови) додека десниот панел покажува податоци за децата со аутизам (ошворени кружови). Аритметичката средина за секоја група е прикажана со хоризонтална линија. Децата со аутизам ($n=41$) имаат значително ($p=0.005$) повисоко ниво на CRP отколку нормалните деца ($n=41$).

Figure 1. Distribution of serum CRP in normal and autistic children. The left hand panel shows data points for normal children (solid circles) whereas the right hand panel shows data points for autistic children (open circles). The arithmetic mean for each group is shown by horizontal bar. Autistic children ($n=41$) had a significantly ($p=0.005$) higher level of CRP than the normal children ($n=41$).

Како група, децата со аутизам (1.373 ± 0.318) имаа значително ($p=0.005$) повисоко ниво на CRP отколку нормалните деца (0.417 ± 0.078). Ова значи дека имаше приближно 3.5-пати зголемување на CRP кај деца со аутизам. Податоците од лабораторијата за S100 протеини се опишани на слика 2. Нивото на подвидовите алфа и бета беше значително повисоко кај децата со аутизам споредено со нормалните деца (околу 6-пати зголемување; со p вредности 0.032 и 0.036 за S100-алфа и S100-бета посебно, со тестот за студенти). Највообичаено, индукцијата на имуно-посредни болести вклучува имуно-активирање како почетен настан. Така, имуно-активирањето е еден од примарните настани при воспаленијата, вирусните инфекции и автоимуните реакции. Имуно-активирањето обично се манифестира со спонтан акумуляција на протеини во акутната фаза и про-инфламаторните цитокини во циркулација. CRP е класичен протеин во акутната фаза што брзо се акумулира во крвта во текот на инфламаторните одговори (9-11). Иако не е специфичен за некоја болест, овој протеин општо се смета како маркер-застапник на системското воспаление што ги придружува хроничните болести, посебно коронарно артериската болест (9-11). S100 протеинот, протеин за врзување на калциумот со афинитет за врзување на цинкот исто така, оригинално беше откриен во мозокот (12). Тој постои во два подвида, имено S100-алфа и S100-бета. Потоа, беше откриено дека протеинот има многу поширока распределба на ткивото, вклучувајќи го и серумот на крвта (15-17), периферни крвни мононуклеарни клетки (13) и антиген-презентирачки клетки (12, 13). Во последниве години, откриено е дека S100 протеинот на серумот исто така е реактант во акутна фаза за инфламаторните реакции, посебно кај повреда на мозокот и невролошките состојби како што се шизофренијата (16), Алцхајмеровата болест (14, 15), Дауновиот синдром (14) и СИДА деменција комплекс (17).

As a group, autistic children (1.373 ± 0.318) had a significantly ($p=0.005$) higher level of CRP than the normal children (0.417 ± 0.078). This means that there was approximately 3.5-fold increase of CRP in children with autism. The laboratory data for S100 proteins are described in Figure 2. The level of both the alpha- and beta- subtypes was significantly higher in autistic children as compared to normal children (about 6-fold increase; p values being 0.032 and 0.036 for S100-alpha and S100-beta, respectively, by the Student's t test).

Most commonly, the induction of immune-mediated diseases involves immune activation as the initial events. Thus immune activation is one of the primary events in inflammation, viral infections and autoimmune reactions. Immune activation is commonly manifested by the spontaneous accumulation of acute-phase proteins and pro-inflammatory cytokines in the circulation. CRP is the classic acute-phase protein that rapidly accumulates in blood during inflammatory responses (9-11). Although not specific of any disease, this protein is commonly regarded as a proxy marker of systemic inflammation that accompanies chronic diseases, in particular the coronary artery disease (9-11). The S100 protein, a calcium binding protein with affinity for binding zinc also, was originally found in the brain (12). It exists in two main subtypes, namely the S100-alpha and S100-beta. Subsequently, the protein was found to have a much wider tissue distribution, including the blood serum (15-17), peripheral blood mononuclear cells (13) and antigen-presenting cells (12, 13). In recent years, serum S100 protein has also been found to be an acute-phase reactant for inflammatory reactions, particularly in brain injury and neurological conditions such as schizophrenia (16), Alzheimer's disease (14, 15), Down's syndrome (14) and AIDS dementia complex (17).



Слика 2. Дисџрибуција на серумскиите S100 протеини кај нормални и деца со аутизам. Нивоите на серумот на S100-алфа (темна боја) и S100-бета (светла боја) е прикажано за нормалните деца (левиот столб) и за децата со аутизам (десниот столб). Податоците се презентирани како аритметичка средина \pm S.E. за секоја група. Децата со аутизам ($n=25$) имаа значително повисоко ниво на S100-алфа ($p=0.032$) и S100-бета ($p=0.036$) отколку нормалните деца ($n=18$).

Figure 2. Distribution of serum S100 proteins in normal and autistic children. The serum level of S100-alpha (dark color) and S100-beta (light color) is shown for normal children (left hand bars) and autistic children (right hand bars). Data are presented as the arithmetic mean \pm S.E. for each group. Autistic children ($n=25$) had a significantly higher level of S100-alpha ($p=0.032$) and S100-beta ($p=0.036$) than the normal children ($n=18$).

Бидејќи аутизмот исто така е нарушување на мозокот со невролошки дефицити и проинфламаторните цитокини се поврзани; ние го простудиравме S100 протеинот кај децата со аутизам. Како што е овде кажано, и двата подвида алфа и бета на S100 протеинот беа значително подигнати кај деца со аутизам, наод кој е прилично постојан со случајна улога на системското воспаление во ова нарушување на мозокот. Пред неколку години, ние први демонстриравме дека аутизмот инволвира имуни фактори како што се автоимунитетот (на пр. Специфичните автоантитела на мозокот) и проинфламаторните цитокини (на пр. интерферонот- γ и интерлеукинот-12) давајќи му предност на Th-1 имуниот одговор (1-3). Тоа нè доведе до претпоставка дека аутизмот инволвира имуно активирање на одговорот на инфламаторниот систем (2-4). Сега воспалението е исто така опсервирано од други истражувачи (23), иако овие истражувачи не ги цитираат нашите студии што многу порано ги објавивме (2, 24). Понатаму, како што е опишано во сегашнава студија, аутизмот веројатно може да инволвира системски инфламаторен одговор. Импулсивниот агент за овој инфламаторен одговор не е сè уште познат но може да резултира од имуното активирање од вирусна инфекција или микробска инфекција. И покрај тоа што оваа можност останува за испитување, постојат значителни лабораториски податоци и експериментална евиденција што го имплицира вирусот на мали сипаници во овој одговор (3, 18-20). Како што е изложено на друго место, добиената инфекција на мали сипаници од вакцината на мали сипаници-заушки-рубеола (MMR) може да го поттикне системскиот инфламаторен одговор (19-20), главно зашто овој вирус е познат поттикнувач на проинфламаторните цитокини (25) и покажа позитивна корелација со автоантителата на мозокот кај деца со аутизам (3, 18-20). Засега, меѓутоа, двата вида лабораториски студии не дадоа поддршка на улогата на тимеросалот во автоимуната подгрупа на аутизмот (21, 22).

Since autism is also a brain disorder with neurological deficits and pro-inflammatory cytokines have been linked, we studied S100 protein in autistic children. As reported here, both the alpha and beta- subtypes of S100 protein were significantly elevated in children with autism, a finding that is quite consistent with the causal role of systemic inflammation in this brain disorder.

Several years ago, we were the first to demonstrate that autism involves immune factors such as autoimmunity (e.g., brain-specific autoantibodies) and pro-inflammatory cytokines (e.g., interferon- γ and interleukin-12) favoring a Th-1 immune response (1-3) This led us to postulate that autism involves immune activation of the inflammatory response system (2-4). The inflammation has now been observed by other researchers (23) also even though these researchers did not cite our research studies that we published well in advance (2, 24). Furthermore, as described in the present study, autism may possibly involve a systemic inflammatory response. The trigger agent for this inflammatory response is not presently known but it might result from immune activation by a virus infection or microbial infection. While this possibility remains to be investigated, there is considerable laboratory data and experimental evidence to implicate measles virus in this response (3, 18-20). As outlined elsewhere, an acquired measles infection from the measles-mumps-rubella (MMR) vaccine might induce a systemic inflammatory response (19, 20), mainly because this virus is a well-known inducer of the pro-inflammatory cytokines (25) and it showed positive correlation with brain autoantibodies in autistic children (3, 18-20). To this end, however, two types of laboratory studies did not lend support to the role of thimerosal in the autoimmune subset of autism (21, 22).

Понатаму, земајќи ја предвид опсервацијата дека статинската терапија ги намалува вредностите на CRP кај кардиоваскуларните пациенти (9-11), можеби повредно ќе биде дизајнирањето на добро контролирана студија за да се евалуира дали оваа терапија би можела потенцијално да биде корисна за да им помогне на пациентите со аутизам со подигнато ниво на CRP. Во заклучокот, базиран на некои согледувања од имунолошки студии и автоимунитетот на мозокот (1-8), предизвикувачки е да се шпекуира дека инфламаторниот одговор поттикнат од вирус би можел да биде одговорен за индукција на автоимунитетот кај аутизмот. Додека добиената инфекција од мали сипаници од MMR имунизација е добра можност, другите остануваат да се истражуваат. Во прилог на ова, внимателно дизајнираната основа и клиничките студии се оправдување за понатамошно идентификување и карактеризирање на улогата на системското воспаление кај патогенезата на аутизмот.

Признание

Огромно признание за огромната поддршка на проектот Автоимунитетот кај аутизмот, Институтот за истражување на аутизам и Фондацијата Dudley T. Dougherty.

Furthermore, by considering the observation that statin therapy lowers CRP values in cardiovascular patients (9-11), it might be worth designing a well-controlled study to evaluate if this therapy could potentially be useful in helping autistic patients with elevated levels of CRP. In conclusion, based on several lines of immunological studies and brain autoimmunity (1-8), it is tempting to speculate that a virus-induced inflammatory response might be responsible for the induction of autoimmunity in autism. While an acquired measles infection from MMR immunization is a good possibility, others remain to be investigated. In addition, carefully designed basic and clinical studies are warranted to further identify and characterize the role of systemic inflammation in the pathogenesis of autism.

Acknowledgments

The grant support of The Autism Autoimmunity Project, Autism Research Institute and Dudley T. Dougherty Foundation is gratefully acknowledged.

Луїерайура / References

1. **Singh VK, Warren RP, Odell JD, Cole P, Warren L.** Antibodies to myelin basic protein in children with autistic disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1993; 7: 97-103.
2. **Singh VK.** Plasma increase of interleukin-12 and interferon- γ : pathological significance in autism. *J. Neuroimmunol.*, 1996; 66: 143-145.
3. **Singh VK.** Neuro-immunopathogenesis in autism. Berczi I, Gorczynski RM, eds. In: *NeuroImmune Biology: New Foundation of Biology*, Netherlands: Elsevier BV Publishing, 2001; 1: 443-454.
4. **Singh VK.** Cytokine regulation in autism. Kronfol Z, ed. In: *Cytokines and Mental Health*, Boston: Kluwer Academic Publishers, Boston, 2003; 369-383.
5. **Singh VK.** Rehabilitation of autism by immune modulation therapy. *J. Spec. Educ. Rehab.*, 2004; 3-4: 161-178.
6. **Gupta S, Aggarwal S, Rathanravan B, Lee T.** Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J. Neuroimmunol.*, 1998; 85: 106-109.
7. **Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M.** Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology*, 2002; 45: 1-6.
8. **Jyonouchi H, Sun S, Le H.** Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J. Neuroimmunol.*, 2001; 120: 170-179.
9. **Tzoulaki I, Murry GD, Lee AJ, et al.** C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh artery study. *Circulation*, 2005; 112: 976-983.
10. **Ridler PM, Rifai N, Clearfield M, et al.** Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *New Eng. J. Med.*, 2001; 344: 1959-1965.
11. **Taniguchi H, Momiyama Y, Ohmori R, Yonemura A, Yamashita T, Tamai S, Makamura H, Ohsuzu F.** Associations of plasma C-reactive protein levels with the presence and extent of coronary stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Arteriosclerosis*, 2005; 178: 173-177.
12. **Fano G, Biocca S, Fulle S, et al.** The S-100: A protein family in search of a function. *Progress in Neurobiology*, 1995; 46: 71-82.
13. **Singh VK, Cheng JF.** Immunoreactive S100 proteins in blood immunocytes and brain cells. *J. Neuroimmunol.*, 1996; 64: 135-139.
14. **Griffin WT, Stanley LC, Ling C, et al.** Brain interleukin-1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 7611-7615.
15. **Singh VK.** Neuroautoimmunity: Pathological implications for Alzheimer's disease. *Gerontology*, 1997; 43: 79-94.
16. **Rothermundt M, Missler U, Arolt V, et al.** Increased S100-beta blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Molecular Psychiatry*, 2001; 6: 445-449.
17. **Pemberton LA, Brew BJ.** Cerebrospinal fluid S-100-beta and its relationship with AIDS dementia complex. *J. Clin. Virol.*, 2001; 22: 249-253.
18. **Singh VK, Lin SY, Yang VC.** Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1998; 89: 105-108.
19. **Singh VK, Lin XE, Newell E, Nelson C.** Abnormal measles-mumps-rubella antibodies and CNS autoimmunity in children with autism. *J. Biomed. Sci.*, 2002; 461: 359-364.
20. **Singh VK, Jensen R.** Elevated levels of measles antibodies in children with autism. *Ped. Neurol.*, 2003; 28: 292-294.
21. **Singh VK, Rivas WH.** Detection of antinuclear and antilaminin antibodies in autistic children who received thimerosal-containing vaccines. *J. Biomed. Sci.*, 2004; 11: 607-610.
22. **Singh VK, Hansen J.** Assessment of metallothionein and antibodies to metallothionein in normal and autistic children having exposure to vaccine-derived thimerosal. *Ped. Aller. Immunol.* 2005; Early Online (DOI: 10.1111/j.1399-3038.2005.00348.x).
23. **Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA.** Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.*, 2005; 57: 67-81.
24. **Singh VK, Warren RP, Odell JD, et al.** Changes of soluble interleukin-2, interleukin-2-receptor, T8 antigen, and interleukin-1 in the serum of autistic children. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1991; 61: 448-455.
25. **Pabst HF, Spady DW, Carson MM, et al.** Kinetics of immunologic responses after primary MMR vaccination. *Vaccine*, 1997; 15: 10-14.

ПРАЗНА СТРАНИЦА