

ANALISIS GEN GSTM1 NULL, GSTT1 NULL, RASIO GSH/GSSG DAN KADAR LOGAM BERAT TERHADAP DERAJAT AUTISM SPEKTRUM DISORDER

GSTM1 null gene, GSTT1 null gene, GSH/GSSG ratio and Heavy Metal concentration of Autism Spectrum Disorder in Java

Donna Hermawati¹, Mahayu Dewi A^{1,2}, Agustini Utari^{2,3}, Tri Indah Winarni³, Sultana MH Faradz³

¹Bagian Biologi Kedokteran dan Biokimia Fakultas Kedokteran UNDIP; ²Center for Biomedical Research (CEBIOR), FK UNDIP; ³Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP

ABSTRACT

Background : Autism Spectrum Disorder (ASD) is an behavioral disorder included in multifactorial disease. Several theory said that genetics factor, parental age, immunologic dysfunction, chemical induced, heavy metal intoxication and oxidative stress are related to ASD. A study about genetics and environmental factor is very important. High polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes were reported in autism population. The measurement of heavy metal concentration in hair specimen has been done to know excretion ability of the body. GSTM1 null and GSTT1 null polymorphism in subjects with autism, reflect individual vulnerability for environmental induced, such as heavy metal.

Objectives : The objectives of this study was to know the frequency of GSTM1 null and GSTT1 null of ASD patients compare to the wildtype and the heavy metal concentration (Pb and Hg) of ASD patients

Methods: Blood samples and hair specimen were collected from thirty eight autism children of Autism School in Semarang, Surakarta and Probolinggo. The Multiplex Polymerase Chain Reaction was used to analyze GSTM1 and GSTT1 gene. The GSH and GSSG concentration were done using ELISA. Heavy metal (Pb) concentration of hair specimen were done using Atomic Absorption Spectrophotometer.

Results : The higher frequency of GSTM1 null & GSTT1 null were obtained in ASD children compared to the wildtype. The average of Pb concentration reached beyond the maximum standart (3,34 ppm).

ABSTRAK

Latar Belakang: Beberapa teori menyatakan bahwa kemungkinan penyebab ASD adalah faktor genetik, umur orang tua, disfungsi imun, problem gastrointestinal, kerusakan otak dini, paparan bahan kimia kronik, keracunan logam berat dan stres oksidatif. Penelitian terhadap faktor genetik dan lingkungan sebagai kemungkinan penyebab ASD perlu dilakukan. Faktor genetik difokuskan pada gen GSTM1 dan GSTT1 karena gen ini polimorfisme dan prevalensinya tinggi. Pengukuran kadar logam berat dalam rambut dilakukan untuk mengetahui kemampuan mengekskresi logam berat. Jika ditemukan adanya gen GSTM1 null dan GSTT1 null maka individu tersebut lebih rentan terhadap paparan polutan lingkungan, dalam hal ini logam berat.

Material dan metode: Sampel darah & rambut diambil dari 38 anak ASD di Sekolah Autis di Semarang, Probolinggo & Solo. Pemeriksaan gen GSTM1 & GSTT1 menggunakan metode Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR). Pemeriksaan kadar GSH & GSSG dilakukan dengan ELISA sedangkan kadar logam berat rambut menggunakan Mercury Analyzer (untuk Hg) dan Atomic Absorption Spectrophotometer (untuk Pb, Cd & Ni).

Hasil: Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa frekuensi GSTM1 null & GSTT1 null pada pasien ASD lebih tinggi dibanding wild type. Nilai rata-rata kadar Hg (42,21 ppb) masih dibawah standar maksimum. Tetapi nilai rata-rata kadar Pb (3,34 ppm) diatas standar maksimum. Perbedaan hasil seperti tersebut di atas kemungkinan karena kondisi lingkungan dimana paparan logam Pb lebih tinggi dibanding ketiga logam lainnya. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian selanjutnya dengan jumlah sampel yang lebih besar dan dilakukan di daerah yang paparan logam beratnya cukup besar.

Kata kunci: Autism spectrum disorder, gen GSTM1 Null, GSTT1 Null, Kadar logam berat

PENDAHULUAN

Autism Spectrum Disorder (ASD) merupakan kelainan neurodevelopmental yang ditandai dengan adanya kegagalan interaksi sosial, kesulitan berkomunikasi dan adanya tingkah laku repetitif dan restriktif dengan onset sebelum usia 3 tahun.¹ Penyebab definitif autis belum diketahui. Diperkirakan bahwa ASD disebabkan oleh interaksi antara faktor genetik dan lingkungan. Sampai saat ini masih terus dilakukan studi faktor genetik dan lingkungan sebagai kemungkinan faktor penyebab autis. Beberapa teori menyatakan bahwa kemungkinan penyebab ASD adalah faktor genetik, umur orang tua, disfungsi imun, problem gastrointestinal, kerusakan otak dini, paparan bahan kimia kronik, keracunan logam berat dan stres oksidatif.²

Pada penelitian ini kami fokuskan pada kemungkinan genetik dan lingkungan sebagai penyebab ASD terutama paparan logam berat. Logam berat menimbulkan masalah lingkungan, diantaranya adalah Cd, Hg, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Co, V, Ti, Fe, Mn, Ag and Sn (Tin). Perhatian lebih pada Hg, Cd dan Pb karena efeknya terhadap lingkungan dan makhluk hidup paling toksik.³

Lead (Pb) merupakan salah satu contoh dari polusi logam antropogenik. Konsentrasi Pb meningkat selama era industri dan meningkat pesat sejak penambahan bahan bakar gasolin pada kendaraan bermotor.⁴ Neurotoksisitas paparan merkuri dosis rendah sudah dilaporkan dan studi mengindikasikan merkuri sebagai etiologi berbagai macam gangguan belajar dan perkembangan^{5,6} termasuk juga autism.⁷

Bukti-bukti mendukung adanya peran stres oksidatif pada autism⁸ yang mempengaruhi perkembangan otak selama kehamilan atau sesudah kelahiran dan berkontribusi terhadap ekspresi fenotip ASD.⁹ Beberapa laporan mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa oxidative stress berperan dalam patologi autism.^{10,11} Studi melaporkan bahwa pada autism kadar total glutathion (tGSH) plasma rendah, kadar oxidized glutathion (GSSG) meningkat dan rasio tGSH terhadap GSSG rendah.^{2,10,12} Hal ini menyebabkan menurunnya kemampuan untuk mengekskresi logam-logam termasuk didalamnya merkuri, dimana glutathion merupakan substansi utama dalam detoksifikasi.¹³

Gen Glutathione s-transferase mu (GSTM1) dan Glutathione s-transferase theta (GSTT1) dikenal dengan prevalensi & polimorfisme-nya yang tinggi. Variasi pada gen ini menyebabkan perubahan pada suseptibilitas individu terhadap karsinogen dan toksin.¹⁴ Delesi homozigot pada gen ini yang sering disebut dengan GSTM1 null dan GSTT1 null menyebabkan penurunan aktivitas enzim Glutathion s-transferase.¹⁵

Konsentrasi merkuri pada rambut meningkat secara signifikan pada individu dengan genotip dobel delesi (GSTT1-/- dan GSTM1-/-) dibanding dengan wild type. Studi menunjukkan bahwa genotip GSTM1 dan GSTT1 wildtype berasosiasi dengan kadar merkuri darah yang lebih rendah dibandingkan GSTM1 dan GSTT1 delesi.¹⁶ Hubungan antara GSTM1 null dengan autism juga telah dilaporkan.¹⁷

Melihat adanya peningkatan insidens ASD dan paparan toksin lingkungan dari tahun ke tahun, penelitian terhadap faktor genetik dan lingkungan sebagai kemungkinan penyebab ASD perlu dilakukan. Faktor genetik kami fokuskan pada gen GSTM1 dan GSTT1 karena gen ini polimorfisme dan prevalensinya tinggi. Pengukuran kadar logam berat dalam rambut dilakukan untuk mengetahui kemampuan mengekskresi logam berat. Jika ditemukan adanya gen GSTM1 null dan GSTT1 null maka individu tersebut lebih rentan terhadap paparan polutan lingkungan, dalam hal ini logam berat.

METODE

Populasi penelitian ini adalah semua anak laki-laki dan perempuan umur 3-19 tahun disekolah berkebutuhan khusus (SLB dan Sekolah Autis) di Semarang, Solo & Probolinggo. Sampel dipilih secara *purposive* yang memenuhi kriteria inklusi & eksklusi untuk sampel ASD.

Pengumpulan Data dan Sampel

Data pasien ASD diambil dari sekolah berkebutuhan khusus (SLB dan Sekolah Autis) termasuk data alamat rumah dan nomor telepon. Kemudian dilakukan pemeriksaan awal dengan menggunakan formulir catatan medis khusus yang kami buat meliputi informasi tentang riwayat keluarga, riwayat kehamilan, kelahiran, persalinan, tumbuh kembang anak, imunisasi dan perilaku pasien serta informasi lainnya. Diagnosis Autism Spectrum Disorder berdasarkan kriteria Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Derajat ASD dibagi menjadi ringan sedang dan berat dengan menggunakan CARS (Childhood Autism Rating Scale). Pasien ASD yang memenuhi kriteria diberikan *informed consent* dan surat pernyataan persetujuan mengikuti penelitian. Setelah ada persetujuan dari orang tua, pasien kemudian diambil darah tepi sebanyak 5-10 cc yang kemudian ditampung dalam tabung EDTA & PLAIN. Sampel rambut (kurang lebih 2 gr) diambil dari bagian belakang leher dekat dengan akar rambut, sepanjang 3-5 cm, masukkan dalam kantong plastik klip.

Pemeriksaan gen GSTM1 & GSTT1

Sampel darah EDTA kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan metode saturasi garam. Untuk mengamplifikasi gen GSTM1 digunakan primers forward (5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG -3') dan reverse (5'-CTGGATTGTAGCAGA TCATGC -3').³⁶ Sebagai marker adalah β -globin dengan primers forward (5'-ACACA ACTGTGTTCACTAGC-3') dan reverse (5'-CAACTTCATCCACGT TCACC -3').³⁷ PCR dilakukan dengan total volume 50 μ l yang terdiri dari 100 ng DNA dari tiap pasien, *PCR buffer* yang terdiri dari 3,3 mmol/l MgCl₂, 200 μ mol/l dNTP's, 1,25 IU taq Polymerase, 0,5 μ mol/l primers gen GSTM1 dan 0,2 mol/l primers β -globin. Amplifikasi primer dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : denaturasi awal selama 12 menit pada suhu 94⁰ C. Diikuti dengan 40 siklus pada 94⁰ C selama 15 detik; 60⁰ C selama 30 detik dan 72⁰ C selama 1 menit. Kemudian ekstension final pada suhu 72⁰ C selama 7 menit. Untuk mengamplifikasi gen GSTT1 digunakan primers forward (5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3') dan reverse (5'-

TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3').³⁶ PCR dilakukan dengan total volume 50 µl yang terdiri dari 100 ng DNA dari tiap pasien, *PCR buffer* yang terdiri dari 3,3 mmol/l MgCl₂, 200 µmol/l dNTP's, 1,25 IU taq Polymerase, 0,5 µmol/l primers gen GSTM1 dan 0,2 mol/l primers β-globin . Amplifikasi primer dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : denaturasi awal selama 12 menit pada suhu 94⁰ C. Diikuti dengan 40 siklus pada 94⁰ C selama 15 detik; 60⁰ C selama 30 detik dan 72⁰ C selama 1 menit. Kemudian ekstension final pada suhu 72⁰ C selama 7 menit. Amplifikasi menggunakan GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, USA). Hasil amplifikasi kemudian dianalisa dengan 2 % agarose gel elektroforesis yang mengandung ethidium bromide atau polyacrylamide gel dengan silver staining untuk mengetahui hasil PCR. Besar produk kontrol (β-globin) 110 bp, produk GSTM1 273 bp dan GSTT1 459 bp.

Pemeriksaan kadar logam berat dalam rambut (Pb, Cd, Ni)

Sampel rambut dibersihkan dengan detergen netral selama 30 menit, kemudian dicuci dengan aquadest dan aquabidest, lalu keringkan. Timbang rambut sampai kurang lebih 20 mg, digesti dalam larutan 2 ml L-cysteine (1%), 4 ml NaOH (45%) dan 14 ml NaCl (1%). Setelah itu larutan dipanaskan pada suhu 90-95 ° C selama 20 menit agar larutan homogen. Analisa pada panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd, 193,7 nm untuk Ni dan 283.3 nm untuk Pb dengan Atomic Absorption Spectrophotometer (K. Ask Bjornberg et al, 2003).

Pemeriksaan kadar merkuri :

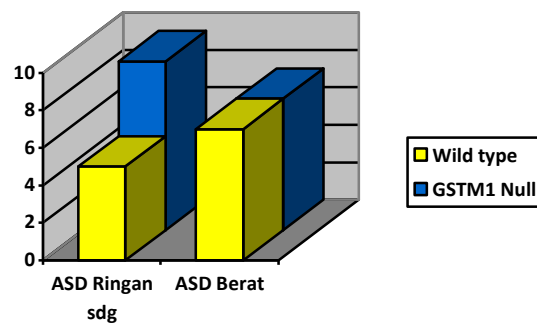
Sampel rambut ditimbang & masukkan dalam Erlenmeyer 100 ml. Tambahkan 10 ml HNO₃ : HClO₄ (1 : 1). Panaskan di atas hotplate hingga jernih dan keluar asap putih. Saring dan tepatkan 50 ml dengan labu takar. Buat blanko dengan perlakuan sama tanpa sampel. Ambil sampel dengan labu takar 10 ml, masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan KMnO₄ 0.1% sebanyak 0.1 ml dan campurkan. Tambahkan Hydroxylaminehydrochloride 0.1 ml dan gojog. Setelah itu tambahkan 0.5 ml SnCl₂.2H₂O. Masukkan dalam Merkuri Analyzer dan ukur kadar merkuri pada panjang gelombang 253,7 nm.

Pemeriksaan GSH, GSSG dan tGSH dalam serum dilakukan sesuai dengan prosedur dalam Glutathione Assay kit dengan menggunakan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

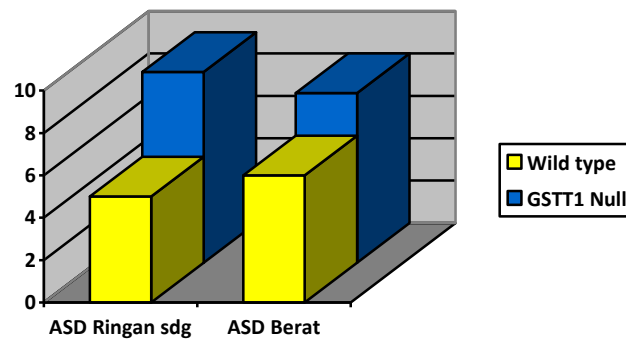
HASIL

Pada penelitian ini didapatkan sampel 38 anak ASD, yang terdiri dari 34 anak (89.4%) berjenis kelamin laki-laki dan 4 anak perempuan (10.6%). Dari 38 anak ASD tersebut, 20 anak

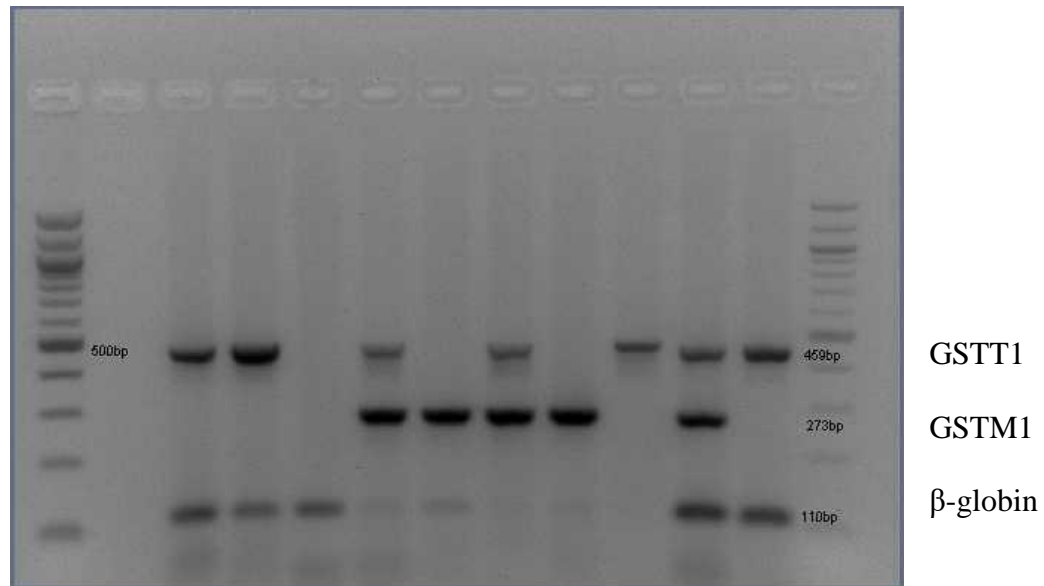
termasuk ASD derajat ringan sedang dan 18 anak ASD derajat berat. Yang sudah dilakukan pemeriksaan gen GSTM1 & GSTT1 sebanyak 28 anak. Frekuensi gen GSTM1 Null pada pasien ASD derajat ringan sedang lebih tinggi (64.3%) dibandingkan dengan wild type (35.7%). Sedangkan pada pasien ASD derajat berat, frekuensi gen GSTM1 Null (50%) sama dengan wild type (50%) [lihat gambar 1]. Frekuensi gen GSTT1 Null pada pasien ASD derajat ringan sedang lebih tinggi (64.3%) dibandingkan dengan wild type (35.7%). Sedangkan pada pasien ASD derajat berat, frekuensi gen GSTT1 Null (57,1%) juga lebih besar daripada wild type (42,9%). [lihat gambar 2]



Gambar 1. Diagram frekuensi gen GSTM1 pada pasien ASD



Gambar 2. Diagram frekuensi gen GSTT1 pada pasien ASD



Gambar 4. Hasil PCR Gen GSTM1 & GSTT1
Lane 1 : GSTT1 positif; GSTM1 null
Lane 3 : GSTT1 null; GSTM1 null
Lane 5 : GSTT1 null; GSTM1 positif
Lane 9 : GSTT1 positif; GSTM1 positif

Dari 38 pasien ASD, terdapat 23 anak yang sampel rambutnya memenuhi syarat untuk pemeriksaan kadar logam berat yaitu mempunyai berat 2 gram. Pemeriksaan kadar Hg dalam rambut dilakukan dengan Mercury Analyzer, sedangkan pemeriksaan Pb, Cd dan Ni menggunakan AAS (Atomic Absorption Spectrophotometer). Pada pemeriksaan kadar Cd dan Ni, seluruh sampel hasilnya sama yaitu < 0.03 ppm utk kadar Ni dan < 0.01 ppm utk kadar Cd. Sedangkan pada pemeriksaan kadar Pb terdapat 8 sampel yang hasilnya < 0.01 ppm. Pemeriksaan kadar Hg rambut, didapatkan 1 sampel yang nilainya < 0.01 ppb. Nilai rata-rata kadar Hg & Pb dalam rambut pada 34 pasien ASD adalah 42.21 ppb dan 3.34 ppm. Sedangkan nilai rata-rata kadar Hg rambut pada ASD ringan sedang sebesar 44.649 ppb dan pada ASD berat 39.29 ppb. Nilai rata-rata kadar Pb rambut untuk pasien ASD ringan sedang adalah 2.885 ppm dan ASD berat 3.163 ppm.

Pemeriksaan kadar glutathione total (tGSH), oxidized glutathione (GSSG) dan reduced glutathione (GSH) dalam serum dilakukan pada 38 anak ASD dengan menggunakan GSH/GSSG Assay Kit dan hasilnya dibaca pada ELISA reader. Pada pemeriksaan tGSH serum didapatkan 5 sampel yang tidak terdeteksi dan pemeriksaan GSSG didapatkan 11 sampel yang tidak terdeteksi, sedangkan GSH serum terdapat 22 sampel yang tidak terdeteksi.

Nilai rata-rata kadar tGSH serum adalah 3.83 μM , nilai rata-rata GSSG serum sebesar 1.49 μM dan nilai rata-rata GSH serum adalah 2.95 μM .

Hasil analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan antara kadar Pb dalam rambut pada anak Autism Spectrum Disorder derajat ringan sedang dibandingkan dengan derajat berat ($p > 0.05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar Pb dalam rambut pada anak ASD dengan gen GSTM1 dan GSTT1 wildtype dibandingkan dengan GSTM1 Null dan GSTT1 Null.

DISKUSI

Penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah pasien ASD yang berjenis kelamin laki-laki jauh lebih banyak dibandingkan perempuan dengan perbandingan 1:21. Nilai perbandingan ini jauh lebih kecil dibandingkan studi yang sudah ada yaitu dengan perbandingan 1 : 4 antara laki-laki dan perempuan. Gen Glutathione s-transferase mu (GSTM1) dan Glutathione s-transferase theta (GSTT1) merupakan gen dengan prevalensi & polimorfisme yang tinggi.²¹ Di India frekuensi gen GSTM1 lebih rendah (30.4-35.4%) dibandingkan dengan ras Asia lain seperti Korea (53% dan 56%)²⁶ dan kaukasian (49-53.8%).²⁷ Sedangkan frekuensi gen GSTT1 null pada kaukasian sebesar 11-18%²⁸, sedang populasi ras Cina di Taiwan sebesar 47%, di Shanghai 49%²⁹ dan 44% pada populasi Kitakyushu di Jepang.³¹

Hasil penelitian ini menunjukkan frekuensi gen GSTM1 Null pada pasien ASD derajat ringan sedang sebesar 64.3 % dan pada ASD derajat berat sebesar 50%. Pada ASD derajat ringan sedang frekuensi gen ini lebih tinggi dibandingkan wild type (35.7%). Sedangkan frekuensi gen GSTT1 Null pada pasien ASD derajat ringan sedang adalah 64,3 % dan pada ASD berat sebesar 57%. Dimana frekuensi ini lebih tinggi dibandingkan dengan wild type (35.7% pada ASD ringan sedang; 42.9% pada ASD berat). Meskipun dengan perbedaan yang tidak terlalu besar. Data frekuensi di atas, hampir sama dengan data frekuensi gen GSTM1 null & gen GSTT1 null pada populasi penelitian-penelitian sebelumnya, terutama di Asia.

Faktor risiko penyebab autisme diantaranya adalah paparan logam berat. Sebuah studi kohort kros-seksional di Universitas Northern Iowa dan studi oleh Bernard et al tahun 2001 menyatakan bahwa ada hubungan kausal antara paparan merkuri dengan gejala autisme.^{12,20} Pada penelitian ini didapatkan nilai rata-rata kadar Hg & Pb dalam rambut pada 34 pasien ASD adalah 42.21 ppb dan 3.34 ppm. Sedangkan nilai rata-rata kadar Hg rambut pada ASD

ringan sedang sebesar 44.649 ppb dan pada ASD berat 39.29 ppb. Nilai rata-rata kadar Pb rambut untuk pasien ASD ringan sedang adalah 2.885 ppm dan ASD berat 3.163 ppm. Nilai kadar logam berat pada rambut tersebut di atas standard maksimum yaitu $\leq 12 \mu\text{g/gr}$ (≤ 0.012 ppm) untuk Pb dan dibawah standar maksimum yaitu 88 ppb untuk Hg. Tetapi ada 6 anak ASD yang kadar Hg rambut di atas standar maksimum. Pada pemeriksaan kadar Cd dan Ni, seluruh sampel hasilnya sama yaitu < 0.03 ppm utk kadar Ni dan < 0.01 ppm utk kadar Cd. Sedangkan pada pemeriksaan kadar Pb terdapat 8 sampel yang hasilnya < 0.01 ppm. Pemeriksaan kadar Hg rambut, didapatkan 1 sampel yang nilainya < 0.01 ppb.

Kesimpulan & saran

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa frekuensi GSTM1 null & GSTT1 null pada pasien ASD lebih tinggi dibanding wild type. Nilai rata-rata kadar Pb dalam rambut di atas standar maksimum, tetapi nilai rata-rata kadar Hg dalam rambut masih dibawah standar maksimum. Hal ini berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya. Dimana kadar Hg rambut pada ASD meningkat. Perbedaan hasil seperti tersebut di atas kemungkinan karena perbedaan ras, kondisi lingkungan & jumlah sampel yang kecil. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian selanjutnya dengan jumlah sampel yang lebih besar dan dilakukan di daerah yang paparan logam beratnya cukup besar.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini dapat terselenggara melalui bantuan Hibah Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran (Risbin Iptekdok) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Ucapan terima kasih kepada pimpinan dan staf ASA Center Surakarta, Taman Pelatihan & Pengembangan ABK Permata Probolinggo dan Center for Biomedical Research (CEBIOR) FK Undip, atas bantuannya selama proses perijinan dan pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook Jr. EH, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin SW, Tuchman RF, Volkmar FR. 1999. The screening and

- diagnosis of autistic spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 29 (6): 439-485.
2. James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M. A., Halsted, C. H., Wong, D. H., Cutler, P., Bock, K., Boris, M., Bradstreet, J. J., Baker, S. M., & Gaylor, D.W. 2006. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 141: 947-956.
 3. Nieboer E, Richardson DHS.1980.The replacement of the nondescript term “heavy metals” by the biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut B1*:3-26.
 4. Harrison RM, Laxen DPH.1981. *Lead Pollution, Causes and Control*. Chapman and Hall, London.
 5. Ramirez, G., Pagulayan, O., Akagi, H., et al., 2003. Tagum study II: follow-up study at two years of age after prenatal exposure to mercury. *Pediatrics* 111 (3):289–295.
 6. Grandjean P, Harari R, Barr D, Debes F. 2005. Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics* 117(3):546–556.
 7. Bernard S, Enayati A, Redwood L, Roger H, Binstock T. 2001. Autism: a novel form of mercury poisoning. *Med Hypotheses*. 56 : 462-471.
 8. Söğüt S, Zoroğlu SS, Ozyurt H, Yilmaz HR, Ozuğurlu F, Sivasli E, Yetkin O, Yanik M, Tutkun H, Savas, HA, Tarakçıoğlu M, Akyol O.2003. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta*. 331(1–2):111-117.
 9. Coles BF, Kadlubar FF.2003. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors*.17(1–4):115-130.
 10. Chauhan A, Chauhan V. 2006. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. 13 : 171-181.
 11. Kern JK, Jones AM. 2006. Evidence of toxicity, oxidative stress, and neuronal insult in autism. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9(6):485–499.
 12. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, et al.2004. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 80(6):1611–1617.
 19. Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE. 2003. Reduced levels of mercury in the first baby haircuts of autistic children. *Int J Toxicol* 22 : 277-285.
 20. Hayes JD, Pulford DJ. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.30:445 – 600.
 21. Parl FF. 2005. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett*. 221:123-129.
 22. Gundacker, C., Komarnicki, G., Jagiello, P., Gencikova, A., Dahmen, N., Wittmann, K.J. & Gencik, M. 2007. Glutathione-s-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. *Science of the Total Environ*. 385 : 37-47.
 23. Buyske, S., Williams, T.A., Mars, A.E., Stenroos, E.S., Ming, S.X., Wang, R., Sreenath, M., Fatura, M., Reddy, C., Lambert, G.H., Johnson, W.G.. 2006. Analysis of case-parent trios at a locus with a deletion allele: association of GSTM1 with autism. *BMC Genet*. 7 : 2156–2158.