

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA FRANCE - ŠTIGLIC

Biokemični označevalci pri spektru avtističnih motenj

Biochemical markers in autism spectrum disorder

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2011

Eksperimentalni del magistrskega dela je potekal na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Komisija za zagovor

Izr. prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, predsednica

Doc. dr. Barbara Ostanek, članica

Prof. dr. Joško Osredkar, mentor

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku mojega magistrskega dela.

Mojim najdražjim Franciju, Sari in Zarji.

Izjava

Podpisana Alenka France – Štiglic izjavljam, da sem magistrsko delo z naslovom: Biokemični označevalci pri spektru avtističnih motenj opravila sama pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Alenka France – Štiglic, mag. farm.

# Vsebina

## Povzetek

## Abstract

## Seznam okrajšav

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Avtizem in spekter avtističnih motenj (SAM).....	1
1.1.1. Zgodovina .....	2
1.1.2. Prevalenca .....	2
1.1.3. Znaki avtizma, postavljanje diagnoze in zdravljenje.....	3
1.1.4. Soobolevnost in spremljajoče težave .....	5
1.1.5. Etiologija SAM .....	6
1.1.5.1 Genetski dejavniki .....	7
1.1.5.2 Dejavniki okolja.....	8
1.2. Težke kovine .....	9
1.2.1. Živo srebro .....	9
1.2.1.1 Toksikokinetika živega srebra .....	10
1.2.1.2 Klinična slika izpostavljenosti živemu srebru .....	10
1.2.1.3 Mehanizmi toksičnega delovanja .....	12
1.2.2. Svinec .....	13
1.2.2.1 Toksikokinetika svinca.....	13
1.2.2.2 Klinična slika pri izpostavljenosti organizma svincu .....	14
1.2.2.3 Mehanizmi toksičnega delovanja svinca .....	15
1.2.3. Aluminij .....	16
1.2.3.1 Toksikokinetika aluminija.....	16
1.2.3.2 Klinična slika pri izpostavljenosti organizma aluminiju .....	16
1.2.3.3 Mehanizmi toksičnega delovanja aluminija .....	17
1.2.4. Baker .....	18
1.2.4.1 Presnova bakra .....	18
1.2.4.2 Klinična slika pri pomanjkanju in obremenitvi organizma z bakrom .....	18
1.2.4.3 Mehanizmi toksičnega delovanja in pomanjkanja bakra .....	19
1.2.5. Cink.....	20
1.2.5.1 Presnova cinka .....	20
1.2.5.2 Klinična slika pri pomanjkanju in obremenitvi organizma s cinkom .....	21
1.2.5.3 Mehanizmi toksičnega delovanja in pomanjkanja cinka .....	21
1.3. Porfirini .....	22
1.3.1. Sinteza in izločanje porfirinov .....	22
1.3.2. Motnje v presnovni poti porfirinov .....	24
1.4. Težke kovine, elementi v sledovih in porfirini v povezavi s SAM.....	26
1.5. Analizne metode .....	27
1.5.1. Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS) .....	27
1.5.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	28
<b>2. Namen dela</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Eksperimentalno delo</b> .....	<b>32</b>
3.1. Preiskovanci.....	32
3.2. Vzorci .....	32
3.3. Delovno okolje, instrumenti in laboratorijski pribor .....	33
3.4. Reagenti, standardi in kontrolni material .....	34
3.5. Merjenje analitov .....	35
3.5.1. Živo srebro v polni krvi in urinu.....	35
3.5.1.1 Instrumenti, oprema in delovno okolje .....	35
3.5.1.2 Reagenti, standardi in kontrolni material.....	36
3.5.1.3 Postopek predpriprave vzorcev in meritve živega srebra .....	36
3.5.2. Svinec v polni krvi .....	37
3.5.3. Aluminij v serumu .....	38
3.5.4. Baker v serumu.....	38
3.5.5. Cink v serumu.....	38

3.5.6. Porfirini v urinu .....	39
3.5.7. Kreatinin v urinu .....	41
3.6. Statistična analiza .....	41
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>43</b>
4.1. Optimiziranje delovnega postopka in ocena analizne metode za živo srebro .....	43
4.2. Preiskovanci .....	44
4.3. Težke kovine .....	45
4.4. Porfirini .....	52
<b>5. Razprava .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Sklepi.....</b>	<b>65</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>67</b>

## Povzetek

Avtizem je razvojna, pervazivna nevrološko-biološka motnja, za katero so značilne motnje v socialnih stikih, težave z verbalno in neverbalno komunikacijo ter nenavadne, ponavljajoče in zelo omejene spretnosti in zanimanja. Ker se fenotipsko izraža na zelo različne načine in zaradi zelo širokega spektra kliničnih značilnosti avtizma, so strokovnjaki uvedli terminologijo »spekter avtističnih motenj« ali SAM. Prevalenca SAM se giblje od 9 do 11,6 na 1000 otrok. Razmerje med dečki in deklicami se giblje med 2:1 in 6,5:1. Podatki študij, ki so bile objavljene v zadnjih petdesetih letih, prepričljivo kažejo, da so za razvoj SAM odločilni genetski dejavniki, vendar predvidevajo, da so v razvoj SAM vpleteni tudi dejavniki okolja. Zelo pogosto kot dejavnike okolja raziskujejo infekcije, cepiva, zdravila in številne težke kovine, najpogosteje med njimi živo srebro, svinec, aluminij, cink in baker, vendar vzroki nastanka bolezni ostajajo večinoma neznani. Čeprav je avtizem nevrobiološka motnja, diagnostika sloni predvsem na zdravniških pregledih z zbiranjem natančnih anamnestičnih podatkov o razvoju otroka, opazovanjem otroka v različnih razmerah ter psihološkem testiranju. Trenutno še nimamo biološkega testa ali specifičnega označevalca, s katerim bi jo lahko diagnosticirali.

V naši raziskavi smo v skupini s spektrom avtističnih motenj vključili 86 otrok, v kontrolni skupini, ki so jo sestavljali otroci z drugimi nevrološkimi motnjami pa 21 otrok. Želeli smo ugotoviti ali obstajajo razlike v koncentracijah živega srebra, svinca, aluminija, cinka in bakra v krvi ter posameznih porfirinskih frakcijah v urinu med skupino s spektrom avtističnih motenj in kontrolno skupino ter populacijskimi vrednostmi otrok, starih od 1 do 15 let. Živo srebro v krvi smo določali z atomsko absorpcijsko spektroskopijo hladnih par, svinec v krvi in aluminij v serumu smo določali z metodo elektrotermične atomske absorpcijske spektrometrije. Cink in baker v serumu smo določali z metodo plamenske absorpcijske spektrometrije. Posamezne frakcije porfirinov v urinu smo določali z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

Naši rezultati kažejo, da so povprečne vrednosti živega srebra v krvi, aluminija v serumu in svinca v krvi pri skupini SAM nekoliko višje kot pri kontrolni skupini, vendar statistično značilnih razlik nismo našli. Povprečne vrednosti bakra, cinka in

razmerja med bakrom in cinkom v serumu so pri skupini SAM nižje kot pri kontrolni skupini, vendar razlike niso bile statistično značilne. Primerjava vrednosti skupine SAM z vrednostmi populacije otrok starih med 1 in 15 let pa je pokazala, da so vrednosti v skupini SAM za živo srebro v krvi, aluminij in baker statistično značilno višje, za cink pa značilno nižje glede na populacijske vrednosti otrok, starih med 1 in 15 leti.

Kot biološke označevalce za toksične učinke težkih kovin smo v urinu določili tudi celokupne porfirine in porfirinske frakcije. Primerjave porfirinskih frakcij med skupino SAM in kontrolno skupino so pokazale, da med skupinama ni statistično pomembnih razlik, z izjemo pentakarboksiporfirina, ki je v skupini SAM značilno višji. V primerjavi s povprečnimi vrednostmi za tipično nevrolško razvite otroke so vrednosti naše skupine SAM za uroporfirin, heptakarboksiporfirin, heksakarboksiporfirin, pentakarboksiporfirin in koproporfirin višje. Ugotovili smo negativno statistično pomembno povezavo med serumskim cinkom in koproporfirinom I ter celokupnimi porfirini. Statistično pomembno pozitivno povezavo smo ugotovili med živim srebrom v urinu, izraženim na kreatinin, in razmerjem koproporfirin III / koproporfirin I.

Študija predstavlja prvo raziskavo biokemičnih dejavnikov pri osebah z spektrom avtističnih motenj v Sloveniji in je pomembna obogatitev na tem področju tudi v mednarodnem prostoru, kjer so bile izvedene že številne podobne raziskave, vendar večinoma brez primerjave z ustrežno kontrolno skupino, ki je bila v naši raziskavi sestavljena iz otrok z različnimi drugimi nevrolškimi motnjami.

## Abstract

Autism spectrum disorders (ASD) are pervasive neural developmental disorders characterized by varying degrees of impairment in communication skills, social interactions, and restricted, repetitive and stereotyped patterns of behavior. Autism spectrum disorders prevalence is approximately 9 to 11,6 per 1000 children and it affects more boys than girls (from 2:1 to 6,5:1). Autism spectrum disorders have a strong genetic basis, but there are possible environmental factors that also contribute to ASD such as heavy metals, drugs and other toxins, infections and vaccines. Most frequently mentioned heavy metals are mercury, lead, aluminum, copper and zinc. Although ASD have neuro-biological base there are no biological tests or specific biochemical markers for ASD.

The main scope of our study was to discover differences in concentrations of toxic metals such as mercury, lead, aluminum, copper and zinc in blood between group of children with ASD, control group, which consisted of children with neurological disturbances other than ASD and population group, which consisted of children aged between 1 and 15 years. Comparison of urine porphyrins in group with ASD with those of control group was performed too. The study included 86 ASD children and 21 children in control group. Determinations of mercury, aluminum, lead, copper and zinc were performed by atomic absorption spectrometry. Analysis of urinary porphyrins was performed by high performance liquid chromatography.

There were no statistical differences in concentrations of toxic metals between ASD group and control group, but there were significant differences when comparing the concentrations between ASD group and population group. Mercury, lead, aluminum and copper were significantly higher and zinc were significantly lower in the ASD group.

Porphyrins in urine were determined as biological markers of intoxication with heavy metals. There were no statistical differences between the ASD group and control group except for pentacoproporphyrin which was significantly higher in the ASD group. Comparing porphyrins in the ASD group to group of children with normal neurological development we found significantly higher concentrations for uroporphyrin, heptacarboxyporphyrin, hexacarboxyporphyrin, pentacarboxyporphyrin and coproporphyrin in the ASD group. Significant

connection between mercury in urine and ratio between coproporphyrin III and coproporphyrin I was discovered.

This study is first investigation of possible biochemical markers in ASD in Slovenia and it is also the first one to include children with neurological disorder other than ASD as the control group.



## **Seznam okrajšav**

NICHD: National Institute of Child Health and Human Development

PDD-NOS: pervasive developmental disorder not otherwise specified

NIMH: National Institute of Mental Health

SAM: spekter avtističnih motenj (autism spectrum disorder)

ASD: autism spectrum disorder

GIT: gastrointestinalni trakt

FDA: Food and Drug Administration

IOM: Institute of Medicine

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

AAS: atomska absorpcijska spektrometrija

## 1. Uvod

Avtizem je kompleksna bolezen, ki se fenotipsko izraža na zelo različne načine, prav tako predpostavljajo, da so zelo različni tudi vzroki nastanka bolezni, ki ostajajo večinoma neznani. Je nevrolška razvojna motnja. Čeprav je avtizem nevrobiološka motnja, trenutno še nimamo biološkega testa ali specifičnega označevalca s katerim bi jo odkrivali (1, 2). Diagnosticiramo jo na osnovi številnih kriterijev, ki izhajajo iz vedenjskih vzorcev. Glavni cilji raziskav, ki potekajo na področju avtizma, so najti vzroke, morebitne biokemične označevalce in razviti nova zdravljenja, ki bi ublažila simptome avtizma. Raziskave potekajo na področju genetike, okoljskih dejavnikov, prenatalnih poškodb, funkcije možganov, nevrokemičnih in imunoloških dejavnikov (2, 3, 4, 5, 6, 7).

### **1.1. Avtizem in spekter avtističnih motenj (SAM)**

Avtizem je razvojna motnja, ki se pojavi v zgodnjem otroštvu. Je pervazivna nevrolško-biološka motnja, za katero so značilne motnje v socialnih stikih, težave z verbalno in neverbalno komunikacijo ter nenavadne, ponavljajoče in zelo omejene spretnosti in zanimanja. Čeprav se fenotip spreminja glede na duševno starost otroka, te tri komponente ostajajo enake. Avtizem je pervazivna motnja, ker motnje na teh treh področjih vplivajo na celoten razvoj otroka, in je razvojna motnja, ker se vedenje spreminja z odraščanjem (8). Klinični znaki se najpogosteje izrazijo do tretjega leta starosti (9). Medtem ko imajo vsi otroci z avtizmom hude motnje na področju socialnih stikov, se resnost in oblika kognitivnih motenj zelo razlikujejo. Intelktualna sposobnost otrok z avtizmom variira od visoke inteligence pa vse do duševne manj razvitosti, ki je izražena pri kar 70 % (2, 7). Pri avtizmu pogosto srečamo preobčutljivost ali zmanjšano občutljivost za čutne dražljaje (4). Zaradi zelo širokega spektra kliničnih značilnosti avtizma so strokovnjaki uvedli terminologijo »spekter avtističnih motenj« ali SAM (10). V skupino spektra avtističnih motenj uvrščamo avtizem (najtežja oblika), Aspergerjev sindrom (blažja oblika) in skupino pervazivnih razvojnih motenj, ki niso drugače opredeljene (pervasive developmental disorder not otherwise specified: PDD-NOS). V revidirani četrti izdaji Diagnostičnega in statističnega priročnika za mentalne bolezni (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition,

---

Text Revision ali DSM-IV-TR) spada spekter avtističnih motenj v skupino pervazivnih razvojnih motenj. Ostali dve redki, a zelo hudi motnji, ki spadata v skupino pervazivnih razvojnih motenj, pa sta Rettov sindrom in otroška dezintegrativna motnja (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10).

### **1.1.1. Zgodovina**

Avtistično motnjo je prvi opisal psihiater Leo Kanner leta 1943, leto kasneje pa je pediater Hans Asperger opisal lažjo obliko bolezni, ki je postala znana kot Aspergerjev sindrom. Kljub njunim poglobljenim in natančnim opisom motnje je avtizem dolgo veljal za obliko otroške psihotične, celo shizofrenične motnje. Po tem obdobju, ko je postalo jasno, da avtizem in shizofrenija nimata istih bioloških in genetičnih dejavnikov, je v petdesetih in šestdesetih letih prejšnjega stoletja nastopilo obdobje, ko so vzroke za razvoj avtistične motnje iskali predvsem v neustreznih razvojnih in družinskih pogojih. Šele leta 1964 je Rimland dokazal, da je avtizem biološka motnja, in s tem ovrgel teorijo Bettelheima, da je avtizem duševna bolezen. Leta 1977 sta Susan Folstein in Michael Rutter objavila prvo študijo, ki je obravnavala dvojčke z avtizmom in v kateri sta dokazala vlogo dednih dejavnikov pri nastanku avtizma. V devetdesetih letih prejšnjega stoletja so odkrili povezavo med avtizmom in spremembami na kromosomih 15 in 9, kasneje pa so odkrili še nekatere gene, ki bi lahko bili povezani z avtizmom (4). Danes prevladuje mnenje, da so v razvoj SAM vpleteni tudi dejavniki okolja (11, 12). Kljub vsem raziskavam in hipotezam pa vzrokov za nastanek avtizma še do danes niso odkrili. Leta 1992 je Združenje ameriških psihiatrov (ASA) izdalo Diagnostični in statistični priročnik DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), v katerem so bili določeni kriteriji za diagnosticiranje avtistične motnje, Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) pa je leta 1993 izdala priročnik Mednarodne klasifikacije bolezni ICD-10 (International Classification of Diseases), v katerem je opredelila pojem spektra avtističnih motenj (4).

### **1.1.2. Prevalenca**

Motnje avtističnega spektra so v pediatrični populaciji enako pogoste ali celo pogostejše kot nekatera dobro poznana obolenja (na primer sladkorna bolezen, spina bifida ali Downov sindrom) (4).

Podatki o prevalenci so precej različni. V petdesetih letih prejšnjega stoletja je bila prevalenca SAM približno 3-4 na 10.000 otrok, v zgodnjih devetdesetih letih pa je močno narasla. Tako je bila po podatkih NICHD (National Institute of Child Health and Human Development) leta 2003 prevalenca SAM v ZDA 2 do 6 na 1000 otrok (4, 13). Ni jasno, ali je povečana prevalenca posledica postavitve natančnejših diagnostičnih kriterijev in spremembe v diagnostičnih metodah ali gre za dejansko povečanje prevalence SAM. Leta 2006 so Baird in sodelavci v svoji študiji ugotovili, da je prevalenca SAM v Veliki Britaniji 11,6 na 1000 otrok (14). Podobne rezultate je dobila skupina ameriških raziskovalcev. V retrospektivni študiji so ugotovili, da je v bila prevalenca SAM ameriški populaciji 9 na 1000 (15). Ne glede na prevalenco in leto raziskave vseh študijah zasledimo, da se SAM pojavlja pogosteje pri dečkih kot pri deklicah. Razmerje med dečki in deklicami se giblje med 2:1 in 6,5:1 in je še večje pri Aspergerjevem sindromu (10, 13, 15).

Pogosteje se pojavlja tudi pri otrocih (pri 2 - 8 %), ki že imajo brata ali sestro s SAM, in pri ljudeh z določenimi drugimi razvojnimi motnjami (sindrom krhkega kromosoma X, mentalna retardacija, tuberozna skleroza) (10, 16).

### **1.1.3. Znaki avtizma, postavljanje diagnoze in zdravljenje**

Za klinično sliko avtizma je značilna prisotnost motenj oziroma primanjkljaj na področju socialnih stikov in komunikacije z ostalimi ter prisotnost ponavljajočih, stereotipnih gibov in postopkov. Spekter avtističnih motenj pokriva široko paleto simptomov, ki se med posamezniki lahko zelo razlikujejo in variirajo od blagih pa do zelo težkih oblik v odvisnosti od starosti in stopnje opravlne sposobnosti posameznika. Otroci s SAM se na različnih področjih razvijajo različno hitro in lahko pri govoru in socialnih stikih zelo zaostajajo, medtem ko so motorično enako razviti kot vrstniki (4, 10).

Pri približno 25 % do 30 % avtističnih otrok zaznamo očiten zastoj in včasih tudi jasno regresijo v razvoju v starosti med 15. in 21. mesecem. Opazimo izgubo uporabe besed, socialni umik, izgubo očesne komunikacije in včasih spremembo v spalnih in prehranjevalnih navadah in pojav nenavadnega vedenja (1, 10).

Diagnostične kriterije pri otroku težko potrdimo, saj se vedenje med otroki zelo razlikuje in je tudi odvisno od starosti. Retrospektivne študije kažejo, da večina staršev opazi težave in odstopanja okrog otrokovega 18. meseca in da lahko

zanesljivo postavimo diagnozo avtizma med 2. in 3. letom, čeprav je postavitve diagnoze širšega spektra avtističnih motenj v tem obdobju manj zanesljiva kot pri starejših otrocih (4, 17).

Čeprav je avtizem nevrobiološka motnja, trenutno še nimamo biološkega testa ali specifičnega označevalca s pomočjo katerega bi lažje postavili diagnozo (1, 2). Sum na SAM postavi zdravnik na osnovi vedenjskih značilnosti. Postavitve diagnoze poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja vključuje razvojno presejanje med sistematskimi pregledi. Takrat je avtistična motnja samo hipoteza (na primer na osnovi socialne odmaknjenosti), ki jo je potrebno sistematično preveriti. V drugi stopnji se v diagnostiko vključi multidisciplinarni tim, ki vključuje pediatra, psihologa, razvojnega nevrologa, specialnega pedagoga, psihiatra, logopeda in druge strokovnjake. Potreben je poglobljen zdravniški pregled z zbiranjem natančnih anamnestičnih podatkov o razvoju otroka in opazovanjem otroka v različnih razmerah. Sledi psihološko testiranje ter strnitev ugotovitev in dobljenih podatkov (4, 9, 17). Za ocenjevanje otrokovega socialnega razvoja in razvoja komunikacije poznamo številna diagnostična orodja (4).

Kriteriji za diagnosticiranje avtizma so opisani v ICD-10 (International Classification of Diseases, 10. izdaja) in v DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Izdaja, text revision) iz leta 2000 (1).

Zgodnje diagnosticiranje spektra avtističnih motenj je pomembno, saj zgodnje vključevanje otroka s SAM v primeren vzgojni program izboljša rezultate terapij (1, 4, 10). Diagnoza je pomembna tudi za genetsko svetovanje staršem otroka z avtizmom glede naslednjih nosečnosti, saj je tveganje, da bo tudi naslednji otrok imel SAM, večje (10).

Zdravila, ki bi izboljšalo oziroma zmanjšalo simptome SAM, zaenkrat še ni na voljo. Številna zdravila, ki se uporabljajo, samo izboljšujejo pridružene simptome, kot so zmanjšana pozornost in koncentracija, obsesije, stereotipni postopki, prevelika zaskrbljenost in strah, depresivno razpoloženje, težave s spanjem in avtoagresivnost. Med zdravili uporabljamo selektivne inhibitorje ponovnega privzema serotonina, zdravila, ki inhibirajo prenos impulzov v dopaminergičnih nevronih, in zdravila, ki delujejo na adrenalinske in noradrenalinske sisteme, ter antikonvulzive (4, 9, 18, 19). Čeprav zdravila lahko omilijo simptome in so lahko v pomoč pri nekaterih pacientih, je prav strukturirano učenje veščin, ki vključuje

ukrepanje na vedenjskem in razvojnem področju ter na področju senzorično motoričnih in socialnih področjih, trenutno najbolj učinkovito zdravljenje. Cilj zdravljenja je pridobivanje spretnosti na področjih, kjer se kažejo primanjkljaji, s tem dosežemo boljše delovanje posameznika in zmanjšan učinek pridruženih bolezni (4, 9, 18, 19, 20).

Med možnimi alternativnimi terapijami se omenjajo terapije, ki vplivajo na imunski sistem kot so prehrana brez glutena in/ali kazeina, uporaba imunoglobulinov ali protivirusnih zdravil, prav tako uporaba detoksikacijskih terapij (npr. kelacija) in terapij, ki delujejo na gastrointestinalni trakt (uporaba prebavnih encimov, antimikotikov, probiotikov, antibiotikov, prehrana brez glutena in kazeina). Uporabljajo se tudi prehranska dopolnila (različni vitamini, določene aminokisliline in minerali), ki naj bi modulirala nevrološki prenos, imunski odgovor ali delovala preko epigenetskih mehanizmov. Za večino od teh alternativnih terapij za zdaj še ni dovolj znanstvenih dokazov o njihovih pozitivnih ali negativnih učinkih pri SAM (4, 9, 18, 21).

#### **1.1.4. Soobolevnost in spremljajoče težave**

Motnje avtističnega spektra se zelo pogosto pojavljajo skupaj s številnimi drugimi nevro-razvojnimi in psihiatričnimi motnjami. Tako je kar 75 % otrok z avtizmom duševno manj razvitih in prav toliko otrok z avtizmom ima učne težave. Učne težave so dejavnik tveganja za razvoj vedenjskih motenj. Otroci z motnjami avtističnega spektra imajo težave s pozornostjo, hitrostjo mentalne in motorične odzivnosti, z delovnim spominom. Številni otroci s SAM imajo senzorične motnje in so lahko zelo občutljivi na določene glasove, oblike, okuse in vonje. Pri 17 do 30 % otrok z avtizmom se v zgodnjem otroštvu ali adolescenci razvije epilepsija. Prav tako imajo otroci z avtizmom dvakrat več raznih psihiatričnih motenj kot ostali. Več je depresivnosti, anksioznosti, motenj v spanju, hranjenju in odvajanju, motenj v aktivnosti in pozornosti, avtoagresivnega in agresivnega vedenja. Avtizem je prisoten tudi pri nekaterih znanih genetskih motnjah in kromosomskih nepravilnostih. Tako pri 2 do 5% ljudi s SAM najdemo tudi sindrom krhkega kromosoma X, pri 1 do 4 % najdemo tuberozno sklerozo (4), pa tudi fenilketonurijo, Angelmanov sindrom, vendar pri kar 90 % primerov avtizma ne najdemo nobenega od teh sindromov (22).

### 1.1.5. Etiologija SAM

SAM je multifaktorska bolezen, pri kateri kombinacija številnih dejavnikov tveganja pripelje do nastanka fenotipa. Ti učinki bi lahko bili posledica toksičnih okoljskih dejavnikov ali epigenetskih dejavnikov, ki spremenijo funkcijo genov in s tem posledično tudi funkcijo živčevja. Epigenetski dejavniki so lahko posledica fizičnega okolja (npr. biokemično aktivne snovi) ali psiholoških dejavnikov (npr. stres), ki lahko spremenijo biokemično delovanje možganov, povzročijo aktivacijo ali deaktivacijo gena v določenem obdobju razvoja ali uravnavajo izražanje gena na drugačen način (9).

Vse več študij kaže, da naj bi bila v patogenezo SAM vpletena oksidativni stres in presnovne motnje aminokislin. Tako so pri otrocih s SAM ugotovili motnje v presnovi (predvsem v procesu transmetilacije in transsulfuracije) aminokislin, ki vsebujejo žveplo, kar je pomembno predvsem v imunskih celicah in nevronih pri sintezi reducirane glutaciona. Ugotovili so tudi spremenjeno aktivnost antioksidantnih encimov in znižane vrednosti glutaciona, znižane vrednosti antioksidantnih metaloproteinov (ceruloplazmin, transferin), in zvišano razmerje med oksidirano ter reducirano obliko glutaciona (2, 23).

Tudi številne študije na področju imunološke funkcije pri otrocih s SAM so pokazale zelo široko zbirko možnih nepravilnosti od zmanjšane celičnega odgovora, znižanih koncentracij komponent komplemента, povečane humoralne imunosti in prisotnosti avtoprotiteles (2, 3).

Ena izmed predpostavk je tudi, da je v etiologijo nastanka SAM vpletena spremenjena prepustnost črevesne stene, ki lahko nastane zaradi zmanjšane delovanja sulfotransferaznega sistema, fizične poškodbe, infekcije oziroma prekomernega razrasta bakterij in glivic (2, 24), lahko pa je tudi posledica vnetne reakcije na antigene iz hrane ali nastane po cepljenju s cepivom proti ošpicam, mumpsu in rdečkam (25). Zaradi spremenjene propustnosti naj bi se v večji meri absorbirali eksogeni opioidni peptidi, ki vplivajo na prenos impulzov v osrednjem živčnem sistemu ali na njegovo dozorevanje v prenatalnem in poporodnem obdobju (24, 25), lahko pa je zmanjšana sposobnost absorpcije vitamina B<sub>12</sub> iz hrane, kar lahko bi lahko vplivalo na nastajanje mielina (25).

V zadnjih letih se je povečalo število študij, ki osvetljujejo nevrobiološko osnovo SAM. Vse več študij namiguje, da naj bi se nevropatološke spremembe pri tistih s

povečanim tveganjem za SAM zgodile že v zgodnjem prenatalnem obdobju ob sočasni izpostavljenosti teratogenim snovem (valproat, talidomid) (10). Pri ljudeh s SAM se že v prenatalnem obdobju pojavijo razlike v rasti in organizaciji možganov, vidimo tudi spremenjeno število celic, velikost nevronov ter število receptorjev (9, 10, 26). Začetne študije strukturnega in funkcionalnega slikanja centralnega živčnega sistema so kazale na številne anomalije na različnih nivojih: možgansko deblo, mali možgani, limbični sistem. Ti predeli možganov pa so povezani z razvojem socialnih, komunikacijskih in motoričnih sposobnosti, ki so pri SAM okrnjeni (9).

Čeprav vemo, da so pri nastanku avtizma pomembni tako genetski dejavniki kot tudi dejavniki okolja, ostajajo strukturni in biokemični dogodki, ki privedejo do bolezni in njihovo zaporedje, še vedno nejasni (6).

#### **1.1.5.1 Genetski dejavniki**

Od leta 1977, ko so sta Folsteinova in Rutter prvič objavila rezultate študije na dvojčkih, ki je pokazala, da je pojavnost avtizma pri obeh enojajčnih dvojčkih večja kot pri dvojajčnih, vemo, da so v razvoj avtizma vpleteni genetski dejavniki. Novejši podatki kažejo, da naj bi se SAM pojavljal pri do 92 % obeh enojajčnih in pri do 10 % obeh dvojajčnih dvojčkih, pri sorojcih se SAM pojavlja pri 2-8 % (10, 16, 27). Ugotovili so, da ima precejšen delež sorodnikov avtističnih otrok težave pri izvršitvenih funkcijah, lahko se pojavljajo tudi težave s komunikacijo in druge motnje, kar lahko hipotetično kaže na genetsko nagnjenje za avtizem. Te ugotovitve kažejo, da je v nastanek bolezni verjetno vpletenih več genov in da je izražanje značilnosti, ki jih povezujemo z avtizmom, različno (8, 9, 16, 28). Novejše študije podpirajo hipoteze, da se pri družinah, ki imajo samo enega člana s SAM, pojavljajo mutacije na novo, pri družinah, ki imajo več članov s SAM, pa se mutacije dedujejo (29, 30). Približno 10 % pacientov s SAM ima genetske sindrome in kromosomske nepravilnosti. Med temi so najpogostejši sindrom krhkega kromosoma X, tuberozna skleroza in po materi podedovane podvojitve določenih regij na kromosomu 15 (15q11-13) kar vodi do Angelmanovega sindroma (9, 10, 16, 31). Prav tako se pogosteje pojavlja pri nezdravljeni fenilketonuriji in fetalnem alkoholnem sindromu. 3-4 % pacientov s SAM ima pridružen sindrom krhkega kromosoma X in pri kar 30-50 % vseh pacientov s



sindromom krhkega kromosoma X najdemo nekaj značilnosti SAM, zato predvidevajo, da je dedovanje genetske nagnjenosti za avtizem vsaj delno vezano na kromosom X. Z genetskimi boleznimi, vezanimi na kromosom X, in genomskim vtisom (imprintingom) bi lahko vsaj delno pojasnili, zakaj se SAM pogosteje pojavlja pri dečkih kot deklicah, čeprav razlogi še niso popolnoma jasni (9, 10, 16). Objavljenih je veliko študij z opisanimi številnimi geni, ki ne povzročajo SAM, ampak povečujejo dovzetnost za SAM. Vsegenomske študije so odkrile regije na kromosomih 2, 3, 6, 7, 11, 15, 16, 17, 20, 22 in X, ki bi lahko vsebovale enega ali več genov, povezanih z avtizmom, čeprav samih genov še niso identificirali (10, 16, 31, 32, 33, 34, 35). Genetske študije potekajo na skupini genov za receptor GABA-A na kromosomu 15, na genu za serotoninski prenašalec 5-HTT (3, 16, 36), genu za dopaminsko  $\beta$ -hidroksilazo (16) ter genetskih sprememb *ras* proteina (37, 38).

#### 1.1.5.2 Dejavniki okolja

Podatki študij, ki so bile objavljene v zadnjih petdesetih letih, prepričljivo kažejo, da so za razvoj SAM odločilni genetski dejavniki (6, 10), saj se pojavlja klasični avtizem pri 60 %, SAM pa pri 92 % enojajčnih dvojčkov. Prav zato ker pri enojajčnih dvojčkih ni popolnega ujemanja, predvidevamo, da so v razvoj SAM vpleteni tudi dejavniki okolja (11, 12), ki lahko vplivajo na obstoječe genetske dejavnike odgovorne za pojav simptomov SAM pri posameznem otroku (10).

V zvezi z avtizmom se pojavljajo in proučujejo številni dejavniki okolja, ki bi lahko vplivali na njegov nastanek tako v prenatalnem obdobju, med porodom kot tudi v poporodnem obdobju. V prenatalnem obdobju se kot možni sprožilni dejavniki za nastanek SAM proučujejo virusne infekcije osrednjega živčnega sistema v maternici (citomegalovirus, rdečke, herpes) ali infekcije kmalu po porodu (10, 12, 39), spolni hormoni med nosečnostjo (2, 10), prisotnost materinih protiteles usmerjenih proti proteinom človeških možganov, ki v času nosečnosti prehajajo placento (40), in prisotnost številnih kemičnih spojin (poliklorirani bifenili, organofosfatni pesticidi) (12, 41). Za jemanje nekaterih zdravil v določenem gestacijskem obdobju vemo, da povzročajo simptome avtizma (talidomid, valprojska kislina), vplive drugih pa še proučujejo (alkohol ter velike količine vitamina A ali retinoidov) (2, 10, 12). Povečano tveganje za avtizem bi lahko

pomenili hipoksični zapleti med porodom in hipoksija ploda (42, 43), huda hiperbilirubinemija, ki povzroči nevrološke poškodbe (43), ter nizka porodna teža in ekstremna nedonošenost (39). Preiskovali so tudi uporabo kombiniranega cepiva proti ošpicam, mumpsu in rdečkam kot možnemu dejavniku tveganja za SAM, vendar zadnja poročila epidemioloških študij kažejo, da vzročne povezave med SAM in tem cepivom ne moremo dokazati (10, 44, 45, 46, 47). Povečano tveganje za SAM imajo prvorojenci in otroci, ki se rodijo materam, starejšim od 35 let (11, 43, 48) in očetom po 40. letu (42, 48, 49).

Težke kovine, kot sta svinec in živo srebro, lahko poškodujejo živčni sistem v fazi razvoja (41). Številne raziskave so iskale možne vzročne povezave med izpostavljenostjo otrok v prenatalnem obdobju in zgodnjem otroštvu okoljskemu živemu srebru in razvojem možganov pri SAM (10). Največ pozornosti je bilo namenjene uporabi in vnosu etilnega živega srebra (tiomersala) v organizem, ki se uporablja kot konzervans v cepivih. Rezultati študij so zelo različni. Nekatere kažejo jasno povezavo med tiomersalom in SAM (50, 51, 52, 53, 54) in na pomanjkanje podatkov o varni uporabi pri nosečnicah ter nedonošenih dojenčkih z zelo nizko porodno težo (55), druge kažejo, da se prevalenca zaradi uporabe cepiva s tiomersalom ni povečevala (45, 47, 56, 57, 58, 59, 60); še več, kanadska in danska študija sta pokazali, da se je incidenca po uporabi cepiva brez tiomersala celo povečevala (45, 56). Čeprav je veliko število študij ovrglo povezavo med tiomersalom in nevrološkimi motnjami in je zaključek Ameriškega inštituta za medicino (Institute of Medicine - IOM), da ni vzročne povezave med cepivi s tiomersalom in avtizmom (61), Ameriška agencija za zdravila (Food and Drug Administration – FDA) priporoča, da se, če je le mogoče, za otroke do 6. leta starosti uporablja cepiva brez tiomersala. Po podatkih FDA zdaj večina cepiv ne vsebuje živega srebra ali vsebuje le njegove sledi v etilni obliki (62).

## **1.2. Težke kovine**

### **1.2.1. Živo srebro**

Živo srebro je neesencialen toksičen element, ki je zelo razširjen v našem okolju. Glavni vir živega srebra v okolju je naravno izhlapevanje iz zemeljske skorje (približno 80 %), preostanek pa je antropogenega izvora. Obstaja v različnih

fizikalno-kemičnih oblikah, ki imajo specifične kemične in toksikološke značilnosti (63, 64). Med anorganske oblike sodijo elementarno živo srebro ( $\text{Hg}^0$ ) in anorganske spojine  $\text{Hg}^{2+}$  in  $\text{Hg}^+$ , med organske spojine pa sodijo alkil- (metilno živo srebro, etilno živo srebro), alkoksi- in aril- (fenilno živo srebro) živosrebrove spojine. Glavni vir živega srebra v populaciji je prehrana (predvsem ribe), s katero vnašamo metilno živo srebro v organizem (64).

### **1.2.1.1 Toksikokinetika živega srebra**

Toksičnost živosrebrovih spojin je zelo odvisna od kemične oblike, vstopne poti v organizem, odmerka in časa izpostavljenosti.

Glavni delež obremenitve organizma z živim srebrom predstavlja metilno živo srebro, ki se absorbira v tankem črevesu iz hrane. Najvišje koncentracije živega srebra v krvi so dosežene 4 do 14 ur po zaužitju s hrano. Alkilno živo srebro je v krvi in tkivih vezano na proteine (hemoglobin) in glutation ter druge molekule z nizko molekulsko maso in zelo hitro prehaja krvno-možgansko pregrado in placento, prehaja pa tudi v materino mleko (65). Koncentracije živega srebra v krvi novorojencev so 1,5- do 1,9-krat višje kot pri materi (64, 66). Do 10 % vsega metilnega in etilnega živega srebra se kopiči v možganih. Med 90 % in 95 % vsega metilnega živega srebra v krvi je v eritrocitih (64, 67). Približno 90 % metilnega živega srebra se izloči preko žolča v feces (64, 66). Izločanje z urinom je majhno, vendar s časom narašča. 100 dni po izpostavljenosti se po tej poti izloči približno 20 % vse dnevne izločene količine (67). Biološka razpolovna doba metilnega živega srebra v polni krvi je dolga in traja približno 50 dni (64, 66), pri doječih materah 42 dni (67), v celotnem telesu traja približno 70 dni (64, 66), še veliko daljši je razpolovni čas v možganih, ki je od 240 dni do 1 leta (64).

### **1.2.1.2 Klinična slika izpostavljenosti živemu srebru**

Pri izpostavljenosti živemu srebru je prizadetost organov in s tem tudi klinični znaki odvisna od spojine, količine, poti absorpcije, časa izpostavljenosti in stopnje razvoja organizma. Najpogosteje so prizadeta pljuča, ledvice, gastrointestinalni trakt, koža in osrednji živčni sistem (64, 65), pri posameznikih se lahko pojavi tudi preobčutljivost na živo srebro (akrodinija) (65, 68).

Živčni sistem je organ, ki je najbolj občutljiv za toksične vplive alkilnih oblik živega srebra (65, 69). Ob izpostavljenosti organskim oblikam živega srebra se pojavijo

Številni nevrološki simptomi, kot so razdražljivost, plahost, živčnost, tremor, motnje vida, okusa in voja, izguba sluha, motnje gibanja, razdražljivost, depresija, motnje spanja in težave s spominom, sčasoma nastopita paraliza dihalnih mišic in smrt. Pri izpostavljenosti metilnemu živemu srebru iz okolja traja latentna faza do razvoja kliničnih znakov nevrotoksičnosti približno 10 let (64, 65). Nevrotoksični učinki naj bi bili posledica vpliva živega srebra na prenašanje živčnih signalov in kopičenja živega srebra v osrednjem živčnem sistemu v anorganski obliki, ki sicer zelo slabo prehaja krvno-možgansko pregrado, kar kaže na možnost biotransformacije metilnega živega srebra v anorgansko po prehodu pregrade, ki tako ostane ujeto v osrednjem živčnem sistemu (66). Zaradi nizke sposobnosti regeneracije tkiva osrednjega živčnega sistema in počasnega nalaganja živega srebra v osrednjem živčnem sistemu se nevrotoksični učinki živega srebra izražajo še dolgo po izpostavljenosti (65). Zapoznelo izražanje kliničnih znakov je lahko tudi posledica sub-kliničnih lezij, ki se kasneje izrazijo zaradi vpliva staranja (66).

Med učinke živega srebra na otroke štejemo čas od zanositve pa vse do zrelosti (18 let), ko so vsi biološki sistemi polno razviti. Pri otrocih mater, ki so bile v nosečnosti izpostavljene organskim oblikam živega srebra, zaznamo predvsem nevrološke simptome, ki variirajo od zaostanka na motoričnem in verbalnem področju, pa do resnih poškodb možganov (65, 69). Izkazalo se je, da je resnost nevroloških simptomov pri potomcu odvisna od količine metilnega živega srebra, ki ga zaužije mati med nosečnostjo, da so bolj prizadeti otroci, ki so bili izpostavljeni metilnemu živemu srebru v drugem trimesečju nosečnosti, ter da so nevrološki simptomi bolj izraženi pri moških potomcih kot pri deklicah (65). Pri kronični izpostavljenosti so opazni zmanjšana pozornost, slabša fino-motorična funkcija, primanjkljaj na govornem področju, zmanjšane vizualno-prostorske sposobnosti (65, 69), zmanjšana sposobnost učenja in pomnjenja in zmanjšan inteligenčni kvocient (41, 70). Dolgotrajno zvišane koncentracije živega srebra v možganih povzročajo spremembe v nevrološkem razvoju možganov, spremenjena je migracija in delitev živčnih celic (71). Izpostavljenost zelo visokim odmerkom metilnega živega srebra v maternici povzroči tudi duševno manj razvitost (41). Pri izpostavljenosti v času razvoja se učinki toksičnosti lahko izrazijo šele kasneje (65) in se tudi po prenehanju izpostavljenosti z leti še poglobljajo (65, 68).

Za ugotavljanje izpostavljenosti živemu srebru najpogosteje določamo koncentracijo živega srebra v krvi in urinu. Pri nedavni izpostavljenosti živemu srebru določamo živo srebro v urinu in krvi, čeprav je pri nizki izpostavljenosti korelacija slaba. Na trenutne koncentracije živega srebra v krvi vpliva tudi metilno živo srebro, ki ga vnašamo s hrano (67). Določanje živega srebra v urinu je enostavno in daje možnost za hitro identifikacijo izpostavljenih posameznikov. Urin je bolj primeren za določanje pri izpostavljenosti anorganskemu živemu srebru, ker organsko predstavlja le majhen delež živega srebra v urinu. Ali je razmerje med urinom in krvjo pri različnih odmerkih izpostavljenosti konstantno, pa še ni povsem jasno (65). Določanje v laseh je priporočljivo samo pri izpostavljenosti metilnemu živemu srebru (67) in je uporabno za določanje dolgotrajne izpostavljenosti, čeprav je koncentracija živega srebra v laseh lahko višja zaradi zunanje kontaminacije (65).

Pri obremenjenosti z živim srebrom lahko zaradi njegove nefrotoksičnosti določamo tudi biološke označevalce za zmanjšano ledvično funkcijo. Določamo lahko proteine v urinu, koncentracijo serumskega kreatinina in aktivnost *N*-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaze (NAG) v urinu (65). Porfirini v urinu in njihov specifični profil s povišanimi vrednostmi koproporfirina, pentakarboksiporfirina in prekoproporfirina so biološki označevalec pri zvišanih vrednostih metilnega živega srebra (72, 73, 74, 75, 76, 77).

### **1.2.1.3 Mehanizmi toksičnega delovanja**

Glavni mehanizem za biološko delovanje živega srebra je visoka vezalna afiniteta do sulfhidrilnih skupin proteinov zunajceličnih in znotrajceličnih membran in organelov. Najverjetneje povzroči deaktivacijo številnih encimov, strukturnih proteinov, vpliva na transportne procese in spremeni prepustnost celične membrane. Z nekoliko manjšo afiniteto se veže tudi na aminske in karboksilne skupine. Raziskave sprememb, ki jih povzroča živo srebro, potekajo v smeri povečanega oksidativnega stresa, prepustnosti krvno-možganske pregrade, motenj sinteze proteinov, podvojevanja DNA, aktivnosti DNA-polimeraze, sinaptičnega prenosa signalov, imunskega sistema ter na mnogo drugih področjih. Živo srebro s spremembami znotrajceličnega statusa sulfhidrilnih spojin povzroči oksidativni stres, peroksidacijo lipidov, motnje v delovanju mitohondrijev, spremembe v presnovi hema in zmanjšano celično obrambo proti oksidativnemu

stresu (64, 65, 78). Oksidativna poškodba ledvic lahko privede do številnih biokemičnih sprememb, med drugim tudi do povečanega izločanja porfirinov v ledvicah (64, 65). V ledvičnih celicah naj bi vezava živega srebra z glutationom in metalotioninom sprožila sintezo številnih encimov, ki za svoje delovanje potrebujejo glutation (glutation transferaza, glutation peroksidaza) (65, 78), metalotionina in številnih stresnih proteinov.

Podobni mehanizmi potekajo tudi v nevronih, za katere pa predvidevajo, da so močno občutljivi na delovanje živega srebra zaradi nizke koncentracije endogenega glutationa ali pa so neučinkoviti pri obrambi proti oksidativnemu stresu. Zaradi svoje dobre topnosti v lipidih naj bi se organske oblike živega srebra prerazporedile v mielin in inhibirale vzdražnost nevronov, obenem pa bi z vezavo na transportne proteine vplivale na njihovo funkcijo. Eksperimentalni podatki kažejo, da so učinki metilnega živega srebra na transport aminokislin in mikrotubule živčnih celic v razvijajočem se živčnem sistemu opazni, še preden se pokažejo znaki zastrupitve in preden se zmanjša aktivnost encimov. Toksični učinki na mikrotubule v razvijajočem se živčnem sistemu imajo vpliv na delitev in migracijo živčnih celic, kar je verjetno vzrok za nevrotoksično delovanje v času pred rojstvom in v tednih po njem.

Z vezavo na proteine živo srebro spremeni njihovo terciarno strukturo in tudi kemično strukturo, s tem ti izgubijo svojo biološko aktivnost, obenem pa postanejo tudi imunogeni in povzročijo imunski odgovor organizma do lastnih sestavin (63, 65).

### **1.2.2. Svinec**

Svinec je neesencialni toksični element, ki se kopiči v organizmu. Glavni vir svinca pri nekadilcih sta voda in hrana (81).

#### **1.2.2.1 Toksikokinetika svinca**

Svinec v anorganski obliki vstopa v telo predvsem preko gastrointestinalnega trakta, nekaj pa tudi preko pljuč, medtem ko svinec v organski (alkilirani) obliki lahko prehaja tudi preko nepoškodovane kože. Organska oblika svinca se presnavlja do anorganske oblike, ki se konjugira z molekulami kot je glutation (79). Večina s hrano vnesenega svinca se izloči z blatom, do 10 % pa se ga absorbira v

kri, pri otrocih celo do 50 %. V krvi ga je manj kot 2 % celotne količine v telesu (80), od tega ga je od 95 % do 99 % vezanega v eritrocitih, preostali svinec v krvi je vezan na plazemske proteine ali je v ionizirani obliki. Po absorpciji v kri se porazdeli med parenhimskimi organi, prehaja v materino mleko, preko placente in krvno-možganske pregrade, čeprav so njegove koncentracije v možganih nizke (80, 81). Svinec v organski obliki najlažje prodira v tkiva, bogata z lipidi, kot je osrednji živčni sistem (63). Med porazdeljevanjem se svinec kopiči v kosteh, kjer predstavlja več kot 90 % vsega svinca v telesu. V tej obliki je inerten, vendar se v določenih okoliščinah (infekcija, operacija, sprememba kislinsko-baznega ravnovesja, osteoporoza, pomanjkanje kalcija) mobilizira iz kosti, kar lahko povzroči visoke koncentracije v krvi in toksične učinke (79, 80). Absorbirani svinec se iz telesa izloča predvsem preko urina (75 % do 80 %) (63, 80) ter preko žolča in gastrointestinalnega trakta z blatom (približno 15 %) (80). Razpolovna doba svinca v celem telesu je 5 let (80), v krvi je približno 36 dni, v mehkih tkivih 40 dni in v kosteh okrog 27 let (81).

#### **1.2.2.2 Klinična slika pri izpostavljenosti organizma svincu**

Toksični učinki svinca lahko zajamejo številne organe in organske sisteme od živčnega sistema, ledvic, reproduktivnih organov, jeter, endokrinih žlez in gastrointestinalnega trakta. Pri dolgotrajni izpostavljenosti majhnim količinam so najbolj kritični učinki na sintezo hema in eritropoezo, osrednji živčni sistem, na ledvice, krvni tlak in kardiovaskularni sistem (82).

Najresnejši zaplet pri zastrupitvi s svincem je vsekakor encefalopatija. Akutna encefalopatija se pojavi s časovnim zamikom ob akutni izpostavljenosti velikemu odmerku svinca, kronična encefalopatija pa nastopi pri dolgotrajni izpostavljenosti svincu. Klinično se izrazita kot razdražljivost, motnje govora, utrujenost, motnje spanja, težave s pozornostjo, izguba spomina, glavobol, mišični tremor, motena usklajenost mišičnih gibov, halucinacije, zaspanost, oslabelost, paraliza, krči, koma in smrt (79, 81). Pri nižjih koncentracijah so nevrološko vedenjske motnje (motnje v odzivnih časih, vizualno motoričnih spretnostih, motnje finomotoričnih spretnosti, zmanjšan inteligenčni kvocient in kognitivne funkcije, zaskrbljenost, spremembe razpoloženja) manj izražene (79, 83). Pri otrocih je najbolj kritično obdobje izpostavljenosti svincu v času fetalnega in poporodnega razvoja.

Najpomembnejši učinek izpostavljenosti nižjim koncentracijam svınca v razvojni dobi je učinek na nevrolški vedenjski razvoj (79, 80, 81). Študije so pokazale, da imajo otroci, izpostavljeni svincu, nižji inteligenčni kvocient in zaznavne vedenjske spremembe (79, 80), v hujših primerih pa lahko pride do disfunkcije perifernega živčevja ali celo do encefalopatije in smrti (83).

Pri povečani izpostavljenosti organizma svincu lahko določimo v polni krvi zvišano koncentracijo svınca, znižano katalitično aktivnost encima dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kisline ( $\delta$ -ALAD) v polni krvi, zvišano koncentracijo protoporfirinov v eritrocitih (63) in zvišano koncentracijo  $\delta$ -aminolevulinske kisline ter kopropofirina III v urinu (81). Koncentracije porfobilinogena in uroporfirinogenov v urinu so praktično nespremenjene. Lahko vidimo tudi zvišane koncentracije železa v serumu in urinu, bazofilne punktacije v eritrocitih in povečano število retikulocitov (80).

### 1.2.2.3 Mehanizmi toksičnega delovanja svınca

Svinec inhibira delovanje številnih encimov v človeškem organizmu, kar pripelje do številnih sprememb v organizmu. Zelo dobro se veže na sulfhidrilne skupine cisteina v proteinih vseh tkiv. Komplekse tvori tudi s fosfatnimi, karboksilnimi ter amino skupinami (80). Z vezavo svinec spremeni terciarno strukturo proteinov in s tem njihovo delovanje. Te spremembe so še posebej pomembne v osrednjem živčnem sistemu, kostnem mozgu in ledvicah (63, 80). Pomemben je učinek na sintezo hema v eritrocitih in eritropoetskih celicah v kostnem mozgu (80). Svinec inhibira delovanje encimov dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kisline ( $\delta$ -ALAD) in ferokelataze. S tem pride do kopičenja  $\delta$ -aminolevulinske kisline (ALA), protoporfirina IX in kopropofirina III. Namesto železa se zaradi inhibicije ferokelataze v protoporfirin IX vgrajuje cink (80, 81). Te spremembe kažejo na izpostavljenost svincu še pred pojavom kliničnih znakov. Pri zastrupitvi s svincem so prisotne morfološke spremembe v živčnem sistemu (razpadle mielinske ovojnice, proliferacija glia celic ...) (80).

S spremembo terciarne strukture lahko postanejo proteini tudi antigeni, kar je še najbolj izraženo v ledvicah, ker so tam med izločanjem svınca iz telesa relativno velike koncentracije svınca (63). Svinec se tudi zelo močno veže na mitohondrije (80).



### 1.2.3. Aluminij

Aluminij je najpogostejša kovina v zemeljski skorji. Uporablja se tudi kot antacid, v obliki dodatkov hrani, v kozmetiki in pri hemodializi kot vezalec fosfatov (84). Aluminij pri tistih, ki niso poklicno izpostavljeni, vstopa v telo predvsem s hrano in v manjši meri (do 3 %) tudi z vodo (85).

#### 1.2.3.1 Toksikokinetika aluminija

Aluminij in njegove spojine se slabo absorbirajo. V gastrointestinalnem traktu je absorpcija pod 0,5 % dnevnega vnosa, preostanek se izloči s fecesom. Njegova absorpcija je odvisna od kemične oblike, pH, ionske moči in prisotnosti kelatorjev (citrat, askorbinska kislina) (84, 85). Na absorpcijo naj bi vplivala tudi starost ter prisotnost kalcija in železa (85). 1 % aluminija v krvi je v eritrocitih, preostalih 99 % aluminija je v plazmi, od tega ga je večina vezana na proteine kot transferin in albumin (63, 85). Aluminij se porazdeli po vseh tkivih, vendar ga je največ v kosteh (50 %), četrtnina ga je v pljučih (84), kopiči pa se tudi v možganih (63). Živalski modeli kažejo, da aluminij prehaja placento in se kopiči v plodu. Nekaj ga prehaja tudi v materino mleko (84). Absorbirani aluminij se izloča predvsem z urinom (83 %) in le majhen delež v fecesu (manj kot 2 %). Razpolovna doba pri kronično izpostavljenih je 6 mesecev ali več, pri ostalih pa 8 ur (85).

#### 1.2.3.2 Klinična slika pri izpostavljenosti organizma aluminiju

V populaciji, ki ni poklicno izpostavljena, ni znanih akutnih primerov zastrupitve z aluminijem z oralnim vnosom (85). Količina aluminija v telesu se lahko poveča v primeru zmanjšane ledvične funkcije in/ali ob velikem vnosu aluminija. Takrat lahko pride do toksičnih učinkov, ki so najbolj izraženi v osrednjem živčnem sistemu in na kosteh. Pri kroničnem vnosu se izrazi osteomalacija (84), lahko se izrazita tudi encefalopatija (spremembe v govoru, krči) in mikrocitna anemija (85). Aluminij se pri Alzheimerjevi bolezni kopiči v možganih (63), prav zato poteka kar nekaj kar študij v povezavi z aluminijem v pitni vodi kot možnim dejavnikom tveganja za Alzheimerjevo bolezen in zmanjšano kognitivno funkcijo pri starostnikih (85).

O toksičnih učinkih aluminija pri otrocih obstaja zelo malo podatkov. Pri tistih s prizadeto ledvično funkcijo opazimo nevrološke spremembe in osteomalacijo. Ob

dolgotrajnem jemanju oralnih antacidov se zaradi zmanjšane absorpcije fosfatov pri dojenčkih razvije hipotnija, mišična oslabelost, kraniosinostoza in upočasnjena rast. Pri nedonošencih se ob iatrogeni izpostavljenosti aluminiju lahko aluminij pospešeno nalaga v tkivih, posebej v kosteh, ob sočasni odpovedi ledvic se lahko razvije encefalopatija (85). Aluminij se prenaša preko placente. Po obremenitvi podgan z aluminijem so koncentracije aluminija v možganih pri plodu višje kot pri odraslih podganah (84). Preobčutljivost na aluminij je redka. Znani pa so primeri, ko je po cepljenju v otroštvu s cepivi, ki vsebujejo aluminij, prišlo do pozne preobčutljivosti na aluminij (85).

Pri sumu na izpostavljenost aluminiju določamo koncentracijo aluminija v serumu (63). Za merjenje toksičnih učinkov ob izpostavljenosti aluminiju nimamo enostavne in neinvazivne metode. Metoda izplavljanja aluminija iz kosti z uporabo deferoksamina pri posameznikih, za katere sumimo, da imajo obolenje kosti zaradi aluminija, je sicer možen izbor, vendar na rezultate lahko vplivajo dodatki železa (84).

### **1.2.3.3 Mehanizmi toksičnega delovanja aluminija**

Natančen mehanizem toksičnega delovanja aluminija ni znan. Vemo, da v bioloških sistemih (ne glede na oksidacijsko stanje) tekmuje s kationi, predvsem magnezijem. Vplival naj bi tudi na sistem sekundarnega sporočanja in na razpoložljivost kalcija. Čeprav imamo za razumevanje mehanizmov premalo podatkov, vemo, da aluminij povzroča spremembe citoskeletnih proteinov možganskih nevronov in s tem tudi spremenjeno delovanje nevronov. Ireverzibilno naj bi se vezal na sestavine celičnega jedra in inhibiral nastajanje mikrotubulov v nevronih. Na živalih so se nevtoksični učinki aluminija kazali na različne načine od nevrološko vedenjskih in nevrološko razvojnih sprememb pa vse do neurodegenerativnih sprememb v možganih. Študije na živalih so pokazale, da aluminij lahko vpliva na prepustnost krvno-možganske pregrade, na holinergično aktivnost, prevajanje signalov, peroksidacijo lipidov ter kompetitivno vpliva na presnovo esencialnih elementov v sledovih (84).

### **1.2.4. Baker**

Baker je esencialni element, ki igra pomembno vlogo kot kofaktor številnih metaloproteinov, kot so ceruloplazmin, citokrom oksidaza, superoksid dismutaza, dopamin- $\beta$ -hidroksilaza, askorbat oksidaza in tirozinaza. Pomemben je pri absorpciji železa in sintezi hemoglobina (86, 87). Sodeluje v oksidacijsko-redukcijskih reakcijah, kjer je kot kofaktor metaloproteinov nenadomestljiv (86, 88), ter inducira sintezo metalotionina (89). Igra pomembno vlogo tudi pri aktivaciji in represiji transkripcije genov (88). Baker ima dvojno vlogo: je esencialni element, hkrati pa je v visokih koncentracijah lahko tudi toksičen (86).

#### **1.2.4.1 Presnova bakra**

Glavni vir bakra pri tistih, ki niso poklicno izpostavljeni, je hrana, v manjši meri pa tudi voda. Na absorpcijo, ki poteka predvsem preko gastrointestinalnega trakta, vplivajo spol, količina in kemična oblika bakra ter snovi v hrani (elementi v sledovih, sulfat, aminokislina, vlaknine). Ob oralnem vnosu se v duodenumu absorbira od 50 do 80 % zaužitega bakra (86). Po prehodu bazolateralne membrane s pomočjo citosolnega metalotionina se, vezan na albumin, s krvjo prenese v jetra. V jetrih se shrani v obliki kuproproteinov. Iz jeter se sprošča vezan na ceruloplazmin. V plazmi potuje vezan na ceruloplazmin (98 %) in albumine do perifernih tarčnih tkiv. V največjih koncentracijah ga najdemo v jetrih, srcu, možganih, ledvicah in mišicah. Lahko prehaja placento (87). Izloča se predvsem preko žolča in gastrointestinalnih izločkov v blato, v majhnih količinah se izloča z urinom in potom (86, 88).

#### **1.2.4.2 Klinična slika pri pomanjkanju in obremenitvi organizma z bakrom**

Pri pomanjkanju bakra lahko pride do zmanjšane pigmentacije zaradi zmanjšane sinteze melanina, motnje v prečnih povezavah med kolagenom in elastinom, motene usklajenosti mišičnih gibov in motenj v presnovi dopamina. Zaradi resnega pomanjkanja bakra je zmanjšana absorpcija železa (86).

Pomanjkanje bakra se klinično izrazi kot hipokromna anemija, nevtropenija, zmanjšana pigmentacija ter pri otrocih še okvare kosti in sklepov, kasneje pa tudi kot nevrološke motnje (hipotonija, apneja, upočasnen psihomotorični razvoj). Ekstremno pomanjkanje bakra je izraženo pri Menkejevi bolezni, pri kateri sta

genetsko okvarjena njegov transport in shranjevanje. Klinično se izrazi med drugim tudi s cerebralno degeneracijo, ki je posledica močno zmanjšane aktivnosti encima citokrom c oksidaze v živčnem tkivu (86). Pomanjkanje bakra srečamo tudi pri nedonošenih in novorojencih z nizko porodno težo ter pri malabsorpcijskih sindromih (88).

V splošni populaciji le redko srečamo zastrupitev z bakrom. Klinično se izrazi kot kovinski okus, epigastrična bolečina, glavobol, slabost, omotičnost, bruhanje, diareja, tahikardija, hematurija, jetrna in ledvična odpoved ter smrt (88). Zvišane vrednosti bakra srečamo pri Wilsonovi bolezni, kjer je zaradi genetske motnje transporta zmanjšano izločanje bakra preko žolča, zato pride do njegovega kopičenja v organih (jetrih, možganih, ledvicah in roženici). Klinični znaki so nevrološke motnje zaradi degeneracije bazalnih ganglijev ter ciroza jeter (86, 87, 88). Zvišane vrednosti se lahko pojavijo tudi pri pacientih na hemodializi in pri tistih s kroničnimi boleznimi jeter (88).

Pri kronično znižanih koncentracijah bakra se pojavijo hipokromna anemija, nevtropenija, v plazmi pa določimo znižane koncentracije bakra in ceruloplazmina (86). Pri zvišanih vrednostih bakra v telesu lahko poleg zvišanih vrednosti bakra v plazmi, serumu in urinu določimo tudi zvišane vrednosti jetrnih encimov in bilirubina zaradi toksičnih učinkov na jetra (90).

#### **1.2.4.3 Mehanizmi toksičnega delovanja in pomanjkanja bakra**

Biokemični mehanizmi toksičnega delovanja bakra so predvsem posledica njegovih neposrednih učinkov na strukturo in funkcijo bioloških molekul, kot so DNA, celične membrane in proteine ali posrednih učinkov preko kisikovih radikalov (87). Esencialnost in potencialna toksičnost bakra v bioloških sistemih je v njegovi visoki reaktivnosti in sposobnosti, da se veže na različne skupine bioloških spojin. Toksični učinki visokih koncentracij se kažejo z izpodrivanjem drugih esencialnih elementov, kar lahko spremeni strukturo receptorjev ali prenašalnih proteinov in povzroči spremembe v depolarizaciji membrane. Z vezavo na makromolekule povzroči neposredno poškodbo proteinov (encimov) ali oksidativne spremembe DNA, z nastankom prostih radikalov povzroči oksidativni stres in posledično tudi poškodbo celic. Toksičnost naj bi se izrazila šele, ko so zasedena vsa vezavna

mesta za baker na metalotioninu, ki je tudi sicer znotrajcelični antioksidant in z vezavo reaktivnih kisikovih spojin varuje celico pred poškodbo.

Baker verjetno igra pomembno vlogo pri normalnem razvoju živčnega sistema v prenatalnem obdobju, saj je v možganih v velikih koncentracijah. To lahko pojasni hudo mentalno zaostalost in degenerativne spremembe pri Menkejevi bolezni, medtem ko pri pomanjkanju bakra zaradi premajhnega vnosa s hrano v obdobju po rojstvu nevroloških sprememb ni (88).

### **1.2.5. Cink**

Cink je esencialni element v sledovih, ki je nujno potreben za človekovo rast, reprodukcijo in razvoj, vendar pa pri prevelikem vnosu lahko postane tudi toksičen (91). Potreben je za delovanje številnih metaloenzimov (alkoholne dehidrogenaza, karboanhidraza, alkalne fosfataze, levcinamino peptidaze, superoksid dismutaze, RNA in DNA polimeraze) (86, 91), sodeluje pri izražanju genov, stabilizira strukturo proteinov in nukleinskih kislin ter sodeluje pri transportnih procesih (86). V organizem ga vnašamo predvsem s hrano in zelo malo z vodo. Pri splošni populaciji so vnosi preko nepoškodovane kože in pljuč minimalni (91).

#### **1.2.5.1 Presnova cinka**

Približno 20 do 30 % cinka, vnesenega s hrano, se absorbira. Absorpcija poteka preko aktivnega transporta. Dobro se absorbira iz hrane z visoko vsebnostjo proteinov, absorpcijo pa ovirajo celuloza in visoke koncentracije kalcija, fosforja, železa in bakra (86, 91). Po absorpciji gre najprej v jetra, od tam se razporedi po celem telesu. V največjih koncentracijah pa ga najdemo v jetrih, ledvicah, trebušni slinavki, prostati in očeh. V krvi se porazdeli med plazmo, levkocite in eritrocite (91). V eritrocitih ga je desetkrat več kot v plazmi zaradi visoke vsebnosti karboanhidraze in drugih od cinka odvisnih encimov. V plazmi se prenaša vezan predvsem na albumin, v manjši meri je vezan na  $\alpha_2$ -makroglobulin in transferin. Cink se izloča predvsem preko žolča, pankreatičnega soka in celic črevesne sluznice v črevesno svetlino, od kjer se ga približno 70 % reabsorbira, preostanek pa se izloči z blatom (86, 91). Le majhen delež se ga izloča preko urina in potu. Biološka razpolovna doba je približno 300 dni (91).

### **1.2.5.2 Klinična slika pri pomanjkanju in obremenitvi organizma s cinkom**

Pomanjkanje cinka povzroči nastanek dermatitisa, zastoj v rasti, slabo celjenje ran, hipogonadizem s prizadeto reproduktivno sposobnostjo, zaostanek spolnega dozorevanja, zmanjšano duševno funkcijo in oslavljen imunski odgovor (86, 91, 92), v primerih hujšega pomanjkanja pa povzroči alopecijo, izgubo telesne teže in anoreksijo, motnje voha, motnje usklajenosti mišičnih gibov, tremor, izgubo spomina, diarejo, prizadeti so višji intelektualni procesi, pride do pojava paranoje, senzorične izgube govora, ponavljajočih se infekcij in celo smrti (86, 91). Pri daljšem času trajajočem zmanjšanem vnosu cinka so opazni znaki zmanjšane nevro-motorične in kognitivne funkcije s precejšnjim zmanjšanjem senzoričnih sposobnosti, pozornosti, optičnega spomina ter prostorskih sposobnosti in sposobnosti zaznavanja (91). Dokazano je, da pomanjkanje cinka v nosečnosti (v prvem trimesečju) povzroči kongenitalne deformacije srca pri plodu (91, 92) in da nosečnice z nizkimi vrednostmi cinka v drugem trimesečju rojevajo otroke z nižjo porodno težo (91).

Pri izpostavljenosti cinku in njegovim spojinam z vdihavanjem preko pljuč se pojavijo toksični učinki, ki so odvisni od kemične oblike cinka. Simptomi obsegajo bolečino v prsnem košu, kašelj, dispnejo, slabost, slabo počutje ter levkocitozo (91, 92). Pri oralnem vnosu prekomernih količin cinka se pojavijo slabost, bruhanje, trebušni krči, diareja, anemija ter znižano število levkocitov (92). Pri zelo visokih količinah zaužitega cinka se pojavi zaspanost, letargija, nestabilna hoja, zvišane vrednosti amilaze in lipaze (91).

Za oceno prisotnosti cinka v telesu najpogosteje uporabljamo določanje cinka v serumu ali plazmi, lahko pa ocenjujemo njegovo razpoložljivost preko določanja aktivnosti encimov, ki so odvisni od cinka (alkalna fosfataza, karboanhidraza) (86).

### **1.2.5.3 Mehanizmi toksičnega delovanja in pomanjkanja cinka**

Presnovne spremembe, ki nastanejo zaradi pomanjkanja cinka, niso povsem znane. Vemo, da ima cink bistveno vlogo pri strukturi in funkciji številnih proteinov vključno z metaloencimi, transkripcijskimi dejavniki in hormonskimi receptorji. Obstajajo dokazi, da naj bi cink vplival na prenašalne sisteme v osrednjem živčnem sistemu, še posebej na inhibitorni prenašalec GABA (gama-aminomaslena kislina). Na gojenih mišjih nevronih je bilo dokazano, da je cink

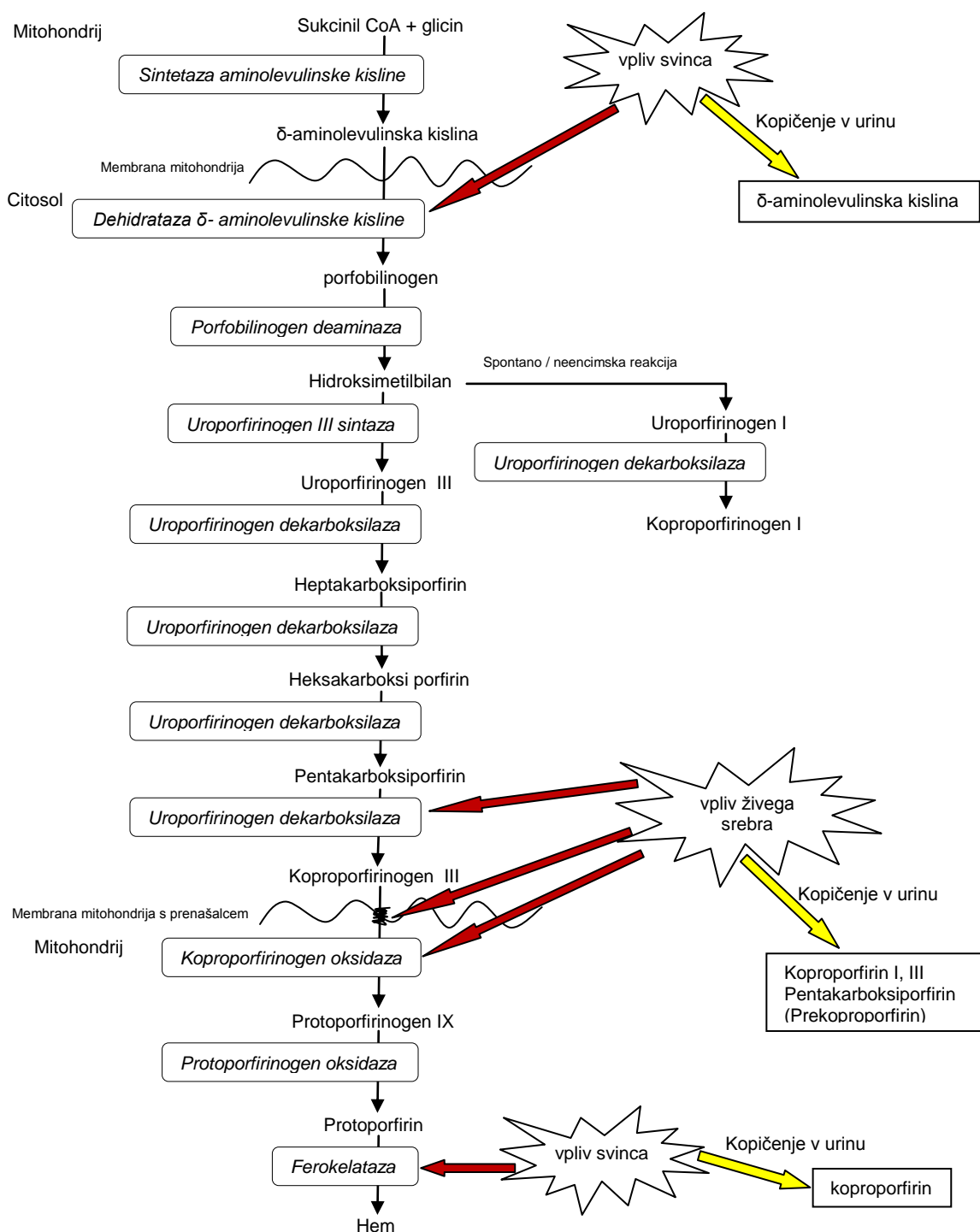
močan antagonist živčnih prenašalcev NMDA (N-metil-d-aspartata) in GABA. Visoke koncentracije cinka lahko motijo homeostazo drugih esencialnih elementov (na primer bakra) in delujejo citotoksično (91).

### **1.3. Porfirini**

Porfirini, ciklični tetrapiroli, ki imajo v svoji strukturi 4 pirolne obročje, povezane z metilenskimi skupinami, so vmesni presnovni produkti v biosintezi hema. Hem je prostetična skupina, ki jo za svoje delovanje potrebujejo številni sistemi. Najdemo ga v aktivnem mestu hemoglobina, mioglobina, citokromov in mitohondrijskih prenašalcev elektronov. Hemoproteini igrajo pomembno vlogo pri transportu elektronov in kisika, aktivaciji kisika in razgradnji vodikovega peroksida (73, 93).

#### **1.3.1. Sinteza in izločanje porfirinov**

Sinteza hema poteka preko sinteze porfirinov v skoraj vseh celicah, večinoma pa v eritropoetskih (80 %) in jetrnih parenhimskih (20 %) celicah. Pri tem sodeluje osem encimov, od tega so štiri v citosolu in štiri v mitohondrijih (93, 94). Sinteza hema (Slika 1) poteka iz sukcinil-CoA in glicina s pomočjo sintetaze aminolevulinske kisline do  $\delta$ -aminolevulinske kisline (ALA). Iz dveh molekul ALA ob prisotnosti encima dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kisline nastane porfobilinogen. Porfobilinogen deaminaza katalizira kondenzacijo štirih molekul porfobilinogena v hidroksimetilbilan, ki ga uroporfirinogen III sintaza hitro spremeni v uroporfirinogen III. Lahko pa ciklizacija hidroksimetilbilana poteče spontano v uroporfirinogen I, ki se po delni dekarboksilaciji z uroporfirinogen dekarboksilazo spremeni v koproporfirinogen I. Ta se izloči preko žolča in urina. Uroporfirinogen dekarboksilaza dekarboksilira štiri stranske verige uroporfirinogena III do metilnih skupin. Preko treh intermediatov (heptakarboksiporfirinogen, heksakarboksiporfirinogen, pentakarboksiporfirinogen) nastane koproporfirinogen III. Samo koproporfirinogen III vstopa v nadaljnjo reakcijo, ki jo katalizira encim koproporfirinogen oksidaza. Nastane protoporfirinogen IX, ki ga encim protoporfirinogen oksidaza oksidira do protoporfirina IX. Zadnji korak v sintezi hema je vgradnja železovega iona ( $\text{Fe}^{2+}$ ) v protoporfirin s pomočjo encima ferokelataza. Na to mesto se lahko vgradijo tudi drugi ioni, ki imajo valenčno število 2+ (73, 93, 94).



**Slika 1: Sintezna pot in možni vpliv težkih kovin na posamezne encime sintezne poti porfirinov (povzeto po 53, 73, 94). Na sliki vidimo na katere encime vplivata živo srebro in svinec (rdeča puščica) in kateri presnovki se posledično kopičijo v urinu (rumena puščica).**

Porfirini in njihovi prekurzorji se izločajo v urinu in z žolčem. V urinu se izločata  $\delta$ -aminolevulininska kislina in porfobilinogen. Normalno prevladuje v urinu



koproporfirin, ki se ga preko urina izloči 30 % do 35 %, preostanek pa preko žolča v blatu. V urinu prevladuje izomera koproporfirin III, ki predstavlja kar 70 % celotnega koproporfirina v urinu, preostanek pa je izomera koproporfirin I. V žolču je razmerje ravno obratno. Ostali porfirini v urinu so uroporfirin in sledi heptakarboksiporfirina, heksakarboksiporfirina, pentakarboksiporfirina. V blatu se izločajo velike količine porfirinov. Po tej poti se izločata predvsem protoporfirin in koproporfirin (93).

Vsi ciklični intermediati sintezne poti (razen protoporfirina IX) so porfirinogeni, ki se ob prisotnosti kisika hitro oksidirajo do porfirinov (93). Oksidacijo povzročijo tudi prisotne težke kovine (73). Porfirini močno absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini okrog 400 nm in oddajajo svetlobo pri valovni dolžini med 550 in 650 nm (94).

### **1.3.2. Motnje v presnovni poti porfirinov**

Motnje v presnovni poti hema povzročijo kopičenje in povečano izločanje porfirinov ali njihovih prekurzorjev. Porfirije so lahko primarne ali sekundarne.

Med primarne prištevamo vrojene motnje pomanjkanja aktivnosti specifičnih encimov v sintezi hema. Primarne porfirije se glede na klinične znake ločijo na oblike s kožnimi znaki fotoobčutljivosti ter na nevrološko-psihiatrične oblike, ki so povezane s kopičenjem porfirinskih prekurzorjev  $\delta$ -aminolevulinske kisline in porfobilinogena (94).  $\delta$ -aminolevulinska kislina v možganih deluje na benzodiazepinske receptorje in jo povezujemo z nastankom nevroloških motenj, epilepsije in avtizma (53).

Sekundarne ali pridobljene porfirije nastanejo zaradi inhibicije encima s toksično snovjo, kar povzroči kopičenje porfirinov v urinu, ki lahko služijo kot biološki označevalec učinka toksične snovi. Med toksine, ki vplivajo na presnovno pot hema, uvrščamo kemične snovi, kot so heksaklorbenzen, vinil klorid, dioksin in številne težke kovine (73, 94, 95). Sprožilni dejavniki akutnega napada porfirije so tudi stradanje in hipoglikemija, uživanje alkohola, stres, fizični napor, okužba, nekatera zdravila in poživila (96). Glede na mesto delovanja toksina dobimo različne količine in razmerja porfirinov, ki jih določamo v urinu.

Težke kovine, kot sta svinec in živo srebro, inhibirajo delovanje encimov v presnovni poti hema, kar povzroči kopičenje določenih vmesnih produktov na tej poti (Slika 1). Zato toksične učinke težkih kovin lahko ugotavljamo tudi z

določanjem porfirinov in porfirinskih frakcij v urinu (73, 94, 95). Glede na mesto delovanja toksina dobimo različne količine in razmerja porfirinov, ki jih določamo v urinu. Svinec je znan inhibitor sintezne poti hema. Inhibira delovanje encimov dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kisline ( $\delta$ -ALAD) in ferokelataze, zato se v urinu kopičita  $\delta$ -aminolevulinska kislina in koproporfin (80). Živo srebro naj bi imelo neposredni inhibitorski učinek na uroporfirinogen dekarboksilazo in koproporfirinogen oksidazo (75). Leta 1991 so bili objavljeni rezultati študije (72), ki je ob dolgotrajni izpostavljenosti pri podganah proučevala porfirinski profil v urinu zaradi kopičenja živega srebra v ledvicah. Ugotovili so zvišane vrednosti koproporfirina, pentakarboksiporfirina in pojav netipičnega prekroporfirina v urinu, ki naj bi bile posledica prav neposrednega inhibitorskega učinka živega srebra na uroporfirinogen dekarboksilazo in koproporfirinogen oksidazo. Koncentracije porfirinov v urinu so se večale glede na odmerke in čas izpostavljenosti in se vrnile na normalo po prenehanju izpostavljenosti živemu srebru. Po opravljenem izplavljanju živega srebra s kelatorjem so se vrednosti teh porfirinov v urinu znižale (75). Podobne rezultate so kasneje dobili tudi pri ljudeh, ki so bili izpostavljeni nizkim odmerkom živega srebra. Primerjali so urinske profile porfirinov zobozdravnikov, ki so bili izpostavljeni živosrebrovim param zaradi izdelave amalgamskih zalivk, s profili zobozdravnikov, ki niso bili izpostavljeni (74, 76). Izkazalo se je, da je izpostavljenost nizkim odmerkom živega srebra pri zobozdravnikih imela vpliv na nevrološko-vedenjskem področju in tudi na porfirinski profil v urinu (97). Vsa ta dejstva kažejo na to, da bi porfirini v urinu lahko bili dober biološki označevalec za izpostavljenost nizkim koncentracijam živega srebra, vendar je zaradi vpliva različnih težkih kovin na to sintezno pot za interpretacijo vpliva živega srebra potrebno sočasno določanje tudi koncentracije živega srebra v urinu (65). Težke kovine naj bi tudi inhibirale delovanje prenašalcev koproporfirina III v mitohondrij, posledično naj bi se povečale koncentracije koproporfirina III in predhodnikov, kar bi povzročilo, skupaj z inhibicijo uroporfirinogen dekarboksilaze, tudi povečano nastajanje koproporfirina I. Tako bi visoko razmerje med koproporfinom III in koproporfinom I kazalo na vpliv težkih kovin, predvsem arzena (77).

#### **1.4. Težke kovine, elementi v sledovih in porfirini v povezavi s SAM**

Zastrupitev s svincem ima pri otrocih vpliv na razvoj številnih področji možganov in vključuje vpliv na kognitivne, komunikacijske in socialne funkcije, ki se v številnih primerih izražajo kot simptomi pri avtizmu (98). Izpostavljenost svincu znižuje inteligenčni kvocient in vpliva na kognitivni razvoj, v otroštvu prispeva k hiperaktivnosti in kratkotrajni pozornosti, motoričnemu nemiru, kar vpliva tako na učenje, vedenje in socializacijo (41, 70, 98).

Živo srebro lahko povzroči spremembe v imunskem sistemu, senzorične, nevrološke, motorične in vedenjske motnje, ki so podobne značilnostim SAM. Izpostavljenost živemu srebru se kaže kot zmanjšana sposobnost učenja in pomnjenja, motnje pozornosti in zmanjšan inteligenčni kvocient (41, 70). Pri avtizmu zasledimo zmanjšano sposobnost izločanja živega srebra v žolč (100) in v laseh (101). James in sodelavci so pri skupini z avtizmom ugotovili značilno znižane vrednosti celokupnega glutationa, kar kaže na povečano občutljivost za oksidativni stres in večjo občutljivost skupine z avtizmom na toksične učinke težkih kovin. Prav to pa bi lahko prispevalo k razvoju kliničnih znakov avtizma (102). Tako kot živo srebro tudi aluminij vpliva na celične in presnovne procese v živčnem sistemu (103). Primerjalne študije med skupinami s SAM in kontrolnimi skupinami kažejo, da so pri skupinah s SAM zvišane vrednosti živega srebra v možganih, v krvi, laseh, urinu in mlečnih zobeh (71, 100, 104).

Pri SAM se pogosto izražata pomanjkanje cinka, zvišane koncentracije bakra in nizko razmerje med cinkom in bakrom, kar lahko kaže na odstopanje v delovanju metalotioninskega sistema. To razmerje bi lahko bilo biološki označevalec za toksične učinke težkih kovin (še posebej živega srebra) pri SAM (89).

V povezavi s SAM in toksičnimi učinki težkih kovin na porfirine v urinu je Nataf s sodelavci ugotovil, da so vrednosti koproporfirina v urinu v skupini otrok z avtizmom v povprečju 2,6-krat višje kot v kontrolni skupini, vrednosti v skupini z Aspergerjevim sindromom pa se niso razlikovale od vrednosti v kontrolni skupini. Na koncentracijo koproporfirina v urinu naj bi najbolj vplivale težke kovine, koncentracija uroporfirina pa naj bi bila precej neodvisna od njihovih toksičnih učinkov. Pri obremenitvi s težkimi kovinami so zaznali tudi pojav atipičnega

porfirina prekoproporfirina. Pri razmerju koncentracije koproporfirina in uroporfirina med skupino z avtizmom in kontrolno skupino so ugotovili statistično pomembno razliko med razmerji in zvišane koncentracije prekoproporfirina v skupini z avtizmom glede na kontrolno skupino ali skupino z Aspergerjevim sindromom. Pri avtizmu so bile višje tudi vrednosti pentakarboksiporfirina in heksakarboksiporfirina, vrednosti za heptakarboksiporfirina pa se niso razlikovale glede na kontrolno skupino. V skupini z Aspergerjevim sindromom se vrednosti ne razlikujejo glede na kontrolno skupino. Po uporabi kelatorja mezo-2,3-dimerkaptosukcinilne kisline (DMSA) pri 11 otrocih z avtizmom so se vrednosti koproporfirina, prekoproporfirina in njunega razmerja v urinu značilno znižale. 53 % otrok z avtizmom je izločalo visoke količine porfirinov v urinu (53). Tudi Geier in Geier sta pri vrednostih koproporfirina v urinu ugotovila, da sta povprečna vrednost in mediana pri skupini z avtizmom značilno višji glede na kontrolno skupino (sorojenci brez nevroloških odklonov), ni pa bilo razlik pri skupini z Aspergerjevim sindromom. Razlik tudi ni bilo pri drugih porfirinskih frakcijah: uroporfirinu, heptakarboksiporfirinu, heksakarboksiporfirinu in pentakarboksiporfirinu (105).

## **1.5. Analizne metode**

### **1.5.1. Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)**

AAS je metoda za analitiko elementov v bioloških vzorcih, pri kateri v prvem koraku dosežemo, da določani element disociira iz kemijskih vezi. Ob tem nastane oblak prostih atomov v osnovnem stanju, skozi katerega usmerimo svetlobo valovne dolžine in frekvence, značilne za ta element. Elektromagnetno valovanje vzbudi elektrone preiskovanega elementa iz osnovnega stanja na višji energijski nivo. Zaradi absorpcije se zmanjša intenziteta vpadnega žarka elektromagnetnega valovanja. Absorpcija je sorazmerna s koncentracijo atomov (Beer-Lambertov zakon).

Atomski absorpcijski spektrometer je sestavljen iz:

- vira svetlobe, ki je žarnica z votlo katodo. Na katodi je element, ki ga merimo v biološkem vzorcu in seva svetlobo valovne dolžine, potrebno za vzbuditev analiziranega atoma,

- optičnega sistema, ki usmerja svetlobo skozi prostor za atomizacijo in preko monokromatorja do detektorja,
- prostor za atomizacijo preiskovanega elementa,
- monokromator, ki prepušča le svetlobo določene valovne dolžine,
- detektor, ki pretvori svetlobno energijo v električni tok in ga okrepi,
- računalnika.

Atomizacijo pri plamenski AAS izvajamo s plamenom visokih temperatur (npr. zrak-acetilen), v katerega neposredno aspiriramo vzorec. Ob tem topilo izpari in spojine disociirajo na elemente v osnovnem stanju.

Atomizacijo pri elektrotermični AAS izvajamo v grafitni kivetu. Vzorec avtomatsko pipetiramo v grafitno kiveto, ki je pod visokim tokom in nizko napetostjo. Ob tem se grafitna kiveta zaradi visokega upora segreva in tako omogoča atomizacijo vzorca. Kiveta je votla, saj skozi poteka optična pot. Preprihavamo jo z inertnim plinom. Za korekcijo absorpcije ozadja uporabljamo Zeemanovo korekcijo z močnim magnetnim poljem (106).

Pri AAS s hladnimi parami izvajamo atomizacijo s kemično reakcijo. Primer je redukcija živosrebrih ionov s kositrovim kloridom.  $\text{Hg}^0$  potem s pomočjo inertnega plina uvedemo v absorpcijsko komoro (107).

### **1.5.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti nam omogoča hitro in dobro kvantitativno in kvalitativno ločitev komponent v tekoči fazi. Temelji na porazdelitvi analita med tekočo mobilno in stacionarno fazo na osnovi fizikalnih in kemijskih reakcij (adsorpcija, ionska izmenjava in ločitev na osnovi velikosti molekul). Porazdelitev komponent se ponavlja vzdolž kolone do konca, kjer se komponente ločeno eluirajo iz kolone in jih zaznamo z detektorji. Signali so podani kot kromatografski vrhovi in nam dajejo kvalitativno informacijo, površina pod kromatografskim vrhom pa je proporcionalna koncentraciji in nam omogoča kvantitativno ovrednotenje posameznega analita. Čas, ki je potreben, da se nek analit pri določenih pogojih eluira iz kolone, imenujemo retencijski čas in je odvisen od lastnosti same spojine, dimenzije kolone, vrste stacionarne faze in velikosti delcev v koloni, vrste mobilne faze in hitrosti pretoka ter temperature. S

spreminjanjem teh pogojev lahko vplivamo na retencijski čas in ločljivost posameznih komponent, in tako optimiziramo kromatografski proces.

Pri reverzno fazni kromatografiji uporabljamo, obratno kot pri klasični, nepolarno stacionarno fazo in polarno mobilno fazo, zato je tudi vrstni red elucije posameznih komponent ravno obraten (najprej se eluirajo bolj polarne komponente), ločitev je bolj specifična, vzpostavitev ravnotežnih pogojev je hitrejša in tudi čas elucije je večinoma krajši. Za reverzno stacionarno fazo uporabimo modificiran silikagel. Pri ločevanju komponent s HPLC je bistvenega pomena sestava mobilne faze, ki mora biti zelo čista, ne sme kemijsko reagirati s stacionarno fazo in mora ustrezati vrsti detektorja, ki ga uporabljamo. S spreminjanjem polarnosti mobilne faze med procesom ločevanja (gradientna elucija) dosežemo krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni in posledično bistveno skrajšamo trajanje ločevanja, obenem dosežemo tudi popolno ločljivost komponent v mešanici, izboljšamo obliko vrhov in občutljivost. Pri uporabi mobilne faze pri reverzno fazni HPLC, ki ima večji delež vode, dosežemo zakasnelo elucijo, če pa želimo povečati hitrost elucije, uporabljamo večji delež organskih topil, ki se z vodo ne mešajo.

Instrument je sestavljen iz črpalke, ki črpa mobilno fazo preko kolone, injektorja, ki injicira vzorec v kolono, kromatografske kolone, kjer se ločujejo analiti, detektorja, ki zaznava ločene analite, termostata, ki vzdržuje konstantno temperaturo, in računalnika oziroma sistema za vrednotenje rezultatov. Visokotlačna črpalka črpa tekočo mobilno fazo vzdolž fino porazdeljene stacionarne faze v koloni in mora zagotavljati enakomeren pretok skozi kolono, saj je od stabilnosti pretoka odvisna natančnost analize. Tlak, ki je potreben, je odvisen od lastnosti kolone, skozi katero potiskamo topilo (velikost delcev, dolžina, premer), od mobilne faze in od pretoka. Kolona je bistveni del HPLC sistema na kateri, se vrši ločitev zmesi na posamezne komponente. Kolone se razlikujejo po dolžini, notranjem premeru, vrsti polnila in premeru delcev stacionarne faze. Pri kolonah večjih dolžin je potreben večji tlak v HPLC sistemu, pri krajših pa je ločitev slabša. Da zmanjšamo kontaminacijo kolone in s tem tudi padec učinkovitosti kolone, pogosto uporabljamo predkolone. Detektor je tisti del HPLC sistema, ki naredi substance, ki smo jih ločili na koloni, vidne. Merimo spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Na izbiro detektorja vplivajo komponente, ki jih želimo zaznavati, obenem pa je zelo

pomembno, da z njim lahko določimo koncentracijo (kvantitativna določitev) ločene substance. Fluorescenčni detektor je zelo občutljiv in izkorišča lastnost nekaterih snovi, da absorbirajo svetlobo (ekscitacijska svetloba) pri eni valovni dolžini in emitirajo svetlobo pri daljši valovni dolžini (emisijaska svetloba), ki potuje preko monokromatorja do fotocelice. Emisijo merimo pod kotom  $90^\circ$  (108, 109).

## 2. Namen dela

Namen našega dela bo ovrednotiti vpliv težkih kovin kot dejavnikov okolja na razvoj spektra avtističnih motenj, saj izsledki dosedanjih podobnih raziskav niso enotni. Namen našega dela je tudi ugotoviti ali so porfirini v urinu primeren označevalec za toksične učinke težkih kovin.

V našem delu bomo:

- določili koncentracije svineca in živega srebra v polni krvi, aluminija v serumu, bakra in cinka v serumu ter živega srebra v urinu skupine otrok s spektrom avtističnih motenj in pri otrocih kontrolne skupine z uporabo AAS,
- ugotavljali, ali so koncentracije živega srebra, svineca, aluminija in bakra v skupini s spektrom avtističnih motenj značilno višje in koncentracije cinka značilno nižje kot v kontrolni skupini oziroma glede na populacijo otrok starih od 1-15 let,
- ugotavljali, ali je razmerje med cinkom in bakrom v skupini otrok s spektrom avtističnih motenj značilno nižje kot pri kontrolni skupini,
- ugotavljali, ali obstajajo povezave med koncentracijo živega srebra v polni krvi in živega srebra v urinu, izraženim na koncentracijo kreatinina v urinu,
- ugotavljali, ali obstajajo povezave med koncentracijo živega srebra in porfirinskim profilom ter koncentracijami porfirinov v urinu,
- kot biološke označevalce za toksične učinke težkih kovin v urinu določili celokupne porfirine in porfirinske frakcije v urinu otrok s spektrom avtističnih motenj in urinu otrok kontrolne skupine z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti,
- ugotoviti, ali se koncentracije celokupnih porfirinov in porfirinskih frakcij v urinu otrok iz skupine spektra avtističnih motenj pomembno razlikujejo od koncentracij v urinu otrok kontrolne skupine oziroma povprečnih vrednosti, izmerjenih pri nevrološko normalno razvitih otrocih in objavljenih v literaturi,
- ugotavljali, ali se pri spektru avtističnih motenj pojavlja značilen profil porfirinskih frakcij (zvišano razmerje med prekoproporfirinom in uroporfirinom, zvišane vrednosti pentakarboksiporfirina in heksakarboksiporfirina ter pojav atipičnega prekoproporfirina).



### 3. Eksperimentalno delo

#### 3.1. Preiskovanci

V našo raziskavo je bilo vključenih 107 otrok. V skupini s spektrom avtističnih motenj je bilo 86 otrok s povprečno starostjo 6,8 leta ( $SD=3,2$ ). V kontrolni skupini, ki so jo sestavljali otroci z drugimi nevrološkimi obolenji, je bilo 21 otrok s povprečno starostjo 7,5 leta ( $SD=4,0$ ). V skupini SAM je bilo 74 dečkov in 12 deklic, v kontrolni skupini pa 12 dečkov in 9 deklic. V skupini SAM je imelo diagnozo avtizem 78 in diagnozo Aspergerjev sindrom 8 otrok. Med otroki z diagnozo avtizem je bilo 66 dečkov in 12 deklic, pri otrocih z diagnozo Aspergerjev sindrom je bilo 8 dečkov in nič deklic. Prisotnost znakov SAM smo ocenjevali v skladu z diagnostičnim sistemom DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2007) in otroke na tej osnovi razvrstili v skupino otrok s SAM ali kontrolno skupino. V kontrolni skupini otrok je bil pri desetih otrocih prisoten razvojni zaostanek, pri petih duševna manj razvitost, trije so imeli diagnosticiran glavobol in po eden vrtoglavico, motnjo v govornem razvoju in motnjo aktivnosti in pozornosti.

Za raziskovalni projekt je bilo izdano dovoljenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka: 98/05/06).

#### 3.2. Vzorci

Pri protokolu za zbiranje vzorcev in pripravo za analizo elementov v sledovih je potrebno upoštevati možnosti kontaminacije vzorca in jih preprečevati. Ker se elementi v sledovih lahko sproščajo iz epruvet in lončkov, smo za odvzem elementov v sledovih uporabljali posebne kemijsko čiste epruvete za elemente v sledovih za analize iz polne krvi z dodatkom natrijevega heparinata, za določitve v serumu pa brez dodatkov. Kri je odvzemalo osebje, seznanjeno s protokolom. Zaprte epruvete so po odvzemu dostavili v laboratorij. Serumske epruvete smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih na minuto in odpipetirali serum za določitve bakra, cinka in aluminija. Baker in cink smo določili takoj, aluminij pa smo določali v serijah, zato smo serum prenesli v kemijsko čisto epruveto in zamrznili do določitve na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Epruvete za določitve živega srebra in svinca v polni krvi smo dobro premešali, polno kri razdelili na dva dela v kemijsko čiste epruvete in zamrznili do analize na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Za analizo porfirinov, živega srebra in kreatinina v urinu je bil odvzet naključni vzorec urina. Odvzeti urin smo takoj razdelili na dva dela. Vzorec, ki je bil namenjen za določitev porfirinov, smo takoj zavili v aluminijasto folijo in zamrznili do analize na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vzorec za določitev živega srebra smo zamrznili do analize na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3. Delovno okolje, instrumenti in laboratorijski pribor**

Za elemente v sledovih smo sestavili protokol nadzora nad kontaminacijo pri odvzemu, ravnanju z vzorcem, laboratorijskim priborom in v samem analitskem delu po priporočilih CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (116). Delo in analiza sta potekala v sobi s filtriranim čistim zrakom, kjer so postavljeni tudi analizatorji. Tako smo preprečili možnost kontaminacije iz zraka.

Meritve svinca in aluminija smo izvedli na elektrotermičnem atomskem absorpcijskem spektrometru Varian SpectrAA-800 (Varian Australia Pty Ltd Mulgrave, Victoria, Avstralija) z magnetno enoto, ki omogoča Zeemanovo korekcijo ozadja in z avtomatskim pipetorjem. S pretokom čistega argona (99,9 %) smo zagotavljali inertno okolje v kiveti. Računalnik s svojim programom omogoča avtomatski izračun rezultatov iz krivulje glede na višino vrha signala ali površine pod krivuljo.

Meritve cinka in bakra smo izvedli na plamenskem atomskem absorpcijskem spektrometru Varian SpectrAA - 250 Plus (Varian Australia Pty Ltd Mulgrave, Victoria, Avstralija), ki odčita tri absorbance iz istega vzorca, izračuna njihovo srednjo vrednost ter iz kalibracijske krivulje izračuna koncentracijo posameznega vzorca. Izvor svetlobe je votla katoda (Zn ali Cu), korekcijo ozadja izvedemo z devterijsko žarnico.

Porfirinske frakcije v urinu smo ločevali in določali na HPLC sistemu, ki je bil sestavljen iz gradientne črpalke, avtomatskega vzorčevalnika, kolone (C18,  $5\ \mu\text{m}$ ), fluorescenčnega detektorja, dušilca impulzov in računalnika s programsko opremo za HPLC proizvajalca Thermo Scientific. HPLC sistem je bil termostatiran. Računalnik s svojim programom nam je omogočal neposredni izračun koncentracij posameznih frakcij iz kromatograma. Za delo smo uporabljali certificirane pipete s plastičnimi nastavki za enkratno uporabo.

### **3.4. Reagenti, standardi in kontrolni material**

Za določanje elementov v sledovih smo uporabljali reagente visoke stopnje čistosti (suprapur quality).

Za določanje svinca smo uporabljali:

- Triton X-100 (suprapur quality, Merck, Nemčija)
- Antifoam (suprapur quality, Merck, Nemčija)
- HNO<sub>3</sub> (65 %-suprapur quality, Merck, Nemčija)
- Vodo Aqua B. Brown (Meisungen, Nemčija) (deionizirana voda tipa I (reverzna osmoza) z upornostjo >10 MΩ pri 25°C)
- Modifikator: 0,2 % triton-X-100, 0,2 % antifoam v vodi
- Standard: Tritisol Lead Standard 197760 500 (Merck, Nemčija)
- Kontrole: Seronorm Trace elements - Whole Blood (Sero, Norveška)

Za določanje aluminija smo uporabljali:

- HNO<sub>3</sub> (65 %-suprapure quality, Merck, Nemčija)
- Triton X-100 (suprapure quality, Merck, Nemčija)
- Antifoam (suprapure quality, Merck, Nemčija)
- Vodo Aqua B. Brown (Meisungen, Nemčija)
- Standard: Tritisol Aluminum Standard (Merck, Nemčija)
- Modifikator: 0,2% triton-X-100, 0,2 % antifoam v vodi
- Kontrole: Seronorm Trace elements - serum (Sero, Norveška)

Za določanje bakra smo uporabljali:

- Diluent: raztopina KCl in NaCl (0,37 g KCl in 8,18 g NaCl na 1L H<sub>2</sub>O )
- Standard: Tritisol Copper standard (Merck, Nemčija)
- Kontrole: Precinorm U, Precipath U (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija)
- Vodo Aqua B. Brown (Meisungen, Nemčija)

Za določanje cinka smo uporabljali:

- Diluent: raztopina 0,1 mol/L HNO<sub>3</sub>
- Standard: Tritisol Zinc standard (Merck, Nemčija)
- Kontrole: Seronorm Trace Elements Serum I (SERO AS Asker-Norveška)
- Vodo Aqua B. Brown (Meisungen, Nemčija)

Za določanje porfirinov v urinu smo uporabljali:

- reagente ClinRep<sup>®</sup> (mobilna faza A in B, interni standard) (Recipe Chemicals + Instruments GmbH, Nemčija)
- kalibrator ClinCal<sup>®</sup> - Calibrator (Recipe Chemicals + Instruments GmbH, Nemčija)
- standardna raztopina ClinTest<sup>®</sup> - Standard (Recipe Chemicals + Instruments GmbH, Nemčija)
- kontroli v dveh nivojih ClinChek<sup>®</sup> - Control (Recipe Chemicals + Instruments GmbH, Nemčija)
- vodo in metanol za HPLC

### **3.5. Merjenje analitov**

#### **3.5.1. Živo srebro v polni krvi in urinu**

##### **3.5.1.1 Instrumenti, oprema in delovno okolje**

Meritve živega srebra smo izvedli na atomskem absorpcijskem spektrometru Varian SpectrAA - 250 plus (Varian Australia Pty Ltd Mulgrave, Victoria, Avstralija) z dodatno enoto VGA 77 za analizo s hladnimi parami po kislinskem razkroju v mikrovalovni pečici MARSXpress (CEM, ZDA). Izvor svetlobe je votla katoda, korekcija ozadja pa z devterijsko žarnico. Pri razklopu smo uporabljali posodice iz teflona (politetrafluoroetilena, PTFE) za uporabo pri povišanih tlakih.

Za delo smo uporabljali certificirane pipete s plastičnimi nastavki za enkratno uporabo, teflonske posodice za razklop in polipropilenske epruvete za vzorce in certificirane merilne bučke. Ves pribor za večkratno uporabo smo pred vsako uporabo namakali 24 ur v 4 %-raztopini HNO<sub>3</sub> (ultrapure) in ga 3-krat dobro sprali z vodo tipa I in posušili.

Morebitno kontaminacijo laboratorijskega pribora (merilne bučke, polipropilenske epruvete in nastavke za pipete) smo preverili tako, da smo pribor 24 ur namakali v 4 %-raztopini HNO<sub>3</sub> in določili živo srebro v tej raztopini, da bi zaznali vsako povečanje živega srebra. Pri ugotavljanju morebitne kontaminacije teflonskih posodic za razklop smo odpipetirali enake volumne 4 %-raztopine HNO<sub>3</sub> kot pri razklopu vzorca in izvedli program razklopa v mikrovalovni pečici. Tako pridobljene raztopine smo analizirali po enakem postopku kot vzorce. Vsebnost živega srebra je morala biti pod mejo detekcije naše metode.

Delo in analiza sta potekala v čisti sobi s filtriranim zrakom.

### 3.5.1.2 Reagenti, standardi in kontrolni material

Pri določanju živega srebra smo uporabljali deionizirano vodo tipa I.

Uporabili smo reagente s certifikatom o odsotnosti oziroma vsebnosti živega srebra. Pred njihovo uporabo smo preverili vsebnost živega srebra po enakem postopku kot smo ga razvili za vzorce. Vsi reagenti so bili visoke stopnje čistosti:

- $\text{HNO}_3$  (65 %-suprapur quality, Merck, Nemčija)
- $\text{SnCl}_2$  dihidrat (Merck, Nemčija)
- $\text{HCl}$  (30 % Merck, Nemčija)
- Reducent: 25% kositrov klorid ( $\text{SnCl}_2$ ) v 20 %  $\text{HCl}$  – poraba 50 ml za 15 vzorcev

Uporabili smo certificirane standarde Seronorm Trace Elements-Whole Blood, Sero AS (Norveška) level 1,2,3 in Lypocheck Urine Control For Trace Elements (Bio-Rad, Hercules).

Kontrolni material smo analizirali pred pričetkom dela, med serijo in po končanem delu. Rezultate kontrolnih vzorcev smo vnašali na Levey-Jenningsovo kontrolno karto. Za ukrepanje smo uporabljali Westgardova pravila in pri morebitnem odstopanju iskali vzrok ter ukrepali. Za kontrolo točnosti meritev smo uporabili certificiran kontrolni material Seronorm Trace Elements-Whole Blood, Sero AS (Norveška) level 1,2,3 za meritve v krvi in Lypocheck Urine Control For Trace Elements (Bio-Rad, Hercules) za meritve v urinu. Vključeni smo tudi v redno mednarodno kontrolo INSTAND (Nemčija).

### 3.5.1.3 Postopek predpriprave vzorcev in meritve živega srebra

Vzorci krvi in urina smo pred merjenjem živega srebra odtalili in jih homogeno premešali, potem pa razgradili s pomočjo 65 %  $\text{HNO}_3$  v mikrovalovni pečici. S tem smo dosegli razpad eritrocitov (hemolizo) in pretvorbo živega srebra v dvovalentno obliko.

V posodice za razklop v mikrovalovni pečici MARSXpress (CEM, USA) smo odpipetirali 1 mL polne krvi, in 2 mL 65% dušikove (V) kisline, jih pokrili s pokrovčkom in počakali, da se je začela začetna razgradnja. Po eni uri smo posodice dobro zaprli z zamaškom, jih postavili v mikrovalovno pečico in razklopili vzorce po posebnem programu. Razklop je potekal 5 minut pri temperaturi  $210^\circ \text{C}$ ,

pri električni moči 1600 W. Za dvig temperature do 210° C potrebujemo 15 minut. Po končanem razklopu smo posodice ohladili in jih previdno odprli v digestoriju. V ohlajeno raztopino smo odpipetirali še 6 mL redestilirane vode in dobro premešali (končna redčitev vzorca je 1:9, končna koncentracija kisline HNO<sub>3</sub> 14,4 %). Tako pripravljene vzorce smo uporabili za določanje koncentracije živega srebra z atomsko absorpcijsko spektroskopijo s hladnimi parami.

S pomočjo peristaltične črpalke (hitrost pretoka 6-8 mL/min) sta se raztopina SnCl<sub>2</sub> v HCl in vzorec zmešala in potovala do reakcijske spirale. Pred reakcijsko spiralo smo uvedli inertni plin (argon) v obliki majhnih mehurčkov. V reakcijski spirali je potekla redukcija ionizirane oblike živega srebra s pomočjo kositrovih ionov do atomske oblike, ki je v obliki živosrebrove pare prehajalo v argon. V ločevalniku se je plin ločil od tekočine in s pomočjo dodatnega toka argona smo atome živega srebra uvedli v merilno celico, skozi katero je potekala svetlobna pot. V devetih sekundah je spektrometer opravil 3 meritve približno eno minuto po začetku vleka vzorca, ko je bilo vzpostavljeno ravnotežno stanje. Meritve so bile zadovoljive, če je bila pri absorbancah, večjih od 0,010, relativna standardna deviacija manjša od 5 %.

Za pravilno merjenje je potreben konstantni pretok inertnega plina argona.

Pred meritvami vzorcev smo kalibrirali s standardnim materialom treh različnih koncentracij (Seronorm - polna kri 1, 2, 3), ki smo ga pred analizo razklopili v mikrovalovni pečici na isti način kot vzorce. Kontrolo celotnega sistema smo izvajali s kontrolnim materialom, ki je bil razklopljen na enak način kot vzorci (biološki material) in kalibracijski material. Na ta način smo kontrolirali izvedbo celotnega postopka od predpriprave vzorca (razklopa) pa do same meritve vzorca. V seriji smo po enakem postopku razklopili tudi vodo in tak vzorec uporabili kot slepi vzorec.

### **3.5.2. Svinec v polni krvi**

Svinec v polni krvi smo določali z elektrotermično AAS po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Analizo kontrolnega materiala (Seronorm Trace elements-Whole Blood) smo

izvajali pred začetkom dela, med delom na vsakih 10 vzorcev in po končanem delu.

Za našo metodo je meja detekcije 0,015  $\mu\text{g/L}$ , nenatančnost v seriji je pri koncentraciji 384  $\mu\text{g/L}$  4 %, pri koncentraciji 37  $\mu\text{g/L}$  pa 8 %, nenatančnost med serijami je pri koncentraciji 386  $\mu\text{g/L}$  6,6 %, pri koncentraciji 36  $\mu\text{g/L}$  pa 12%. Netočnost pri koncentraciji 35,6  $\mu\text{g/L}$  je 4,7 % in pri koncentraciji 385,5  $\mu\text{g/L}$  je 0,7 %.

### **3.5.3. Aluminij v serumu**

Aluminij v serumu smo določali z elektrotermično AAS po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Analizo kontrolnega materiala (Seronorm Trace elements - serum) smo izvajali pred začetkom dela, med delom na vsakih 10 vzorcev in po končanem delu.

Za našo metodo je meja zaznavanja 1,64  $\mu\text{g/L}$ , nenatančnost v seriji pri koncentraciji 63,4  $\mu\text{g/L}$  je 3,67 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 63,4  $\mu\text{g/L}$  je 4,80 %. Netočnost pri koncentraciji 63  $\mu\text{g/L}$  je 1,74 %.

### **3.5.4. Baker v serumu**

Baker v serumu smo določali s plamensko AAS po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kot vir svetlobe smo uporabili bakrovo votlo katodo, atomizacija pa je potekala v plamenu acetilen-zrak. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Baker v vzorcih smo merili v seriji. Analizo kontrolnega materiala (Precinorm U, Precipath U) smo izvajali pred začetkom dela in po končanem delu. Preiskovane vzorce, standarde in kontrole smo pripravili z diluentom v razmerju 1 + 1.

Za našo metodo je meja zaznavanja 1,2  $\mu\text{mol/L}$ , nenatančnost v seriji pri koncentraciji 17,2  $\mu\text{mol/L}$  je 2,4 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 17,5  $\mu\text{mol/L}$  je 3,7 %. Netočnost pri koncentraciji 17,5  $\mu\text{mol/L}$  je 1,7 %.

### **3.5.5. Cink v serumu**

Cink v serumu smo določali s plamensko AAS po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kot vir svetlobe smo uporabili

cinkovo votlo katodo, atomizacija pa je potekala v plamenu acetilen-zrak. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Cink v vzorcih smo merili v seriji. Analizo kontrolnega materiala (Precinorm U, Precipath U) smo izvajali pred začetkom dela in po končanem delu. Preiskovane vzorce, standarde in kontrole smo pripravili z diluentom v razmerju 0,5 + 2.

Za našo metodo je meja zaznavanja 1,6  $\mu\text{mol/L}$ , nenatančnost v seriji pri koncentraciji 12,96  $\mu\text{mol/L}$  je 3,7 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 13,28  $\mu\text{mol/L}$  je 5,3 %. Netočnost pri koncentraciji 13,28  $\mu\text{mol/L}$  je 2,15 %.

### 3.5.6. Porfirini v urinu

V fazi predpriprave vzorca smo urin odtalili in dobro premešali. Urinskemu alikvotu (500  $\mu\text{L}$ ) smo dodali interni standard (50  $\mu\text{L}$ ), na hitro premešali in centrifugirali (5 min na 1000 x g). Alikvot supernatanta smo uporabili za HPLC analizo. Z dodatkom internega standarda odstranimo vpliv motečih snovi, stabiliziramo vzorec in nadzorujemo ločbo komponent (čas elucije in velikost odziva). Pred izvedbo analize vzorcev smo na kolono večkrat injicirali standardno raztopino (20  $\mu\text{L}$ ), da smo preverili učinkovitost ločbe (retencijski časi, ločljivost vrhov in oblika...), dokler nista dva zaporedna kromatograma imela identičnih retencijskih časov in ločljivosti (resolucija). Po tem smo v sistem HPLC injicirali 20  $\mu\text{L}$  urinskega kalibratorja, ki smo ga predpripravili kot vzorec. S pomočjo kalibratorja smo iz površin posameznih vrhov znanih koncentracij posameznih analitov lahko izračunali njihove koncentracije v vzorcih. Kalibrator smo injicirali vsakih 10 vzorcev. Za analizo porfirinov v urinu smo v HPLC sistem injicirali 20  $\mu\text{L}$  supernatanta. Kromatograme posameznih vzorcev smo primerjali s kromatogramom urinskega kalibratorja, če se retencijski časi ujemajo (Preglednica I). S pomočjo internega standarda oziroma s primerjavo površine pod krivuljo v kalibratorju in vzorcu smo ugotavljali potencialne izgube vzorca zaradi nenatančnega injiciranja vzorca in izračunali izkoristek (Enačba 2). Vse površine pod krivuljo vzorcev smo potem preračunali na 100 % izkoristek glede na interni standard in koncentracije posameznih analitov v kalibratorju po Enačba 1.



**Preglednica I: Približni retencijski časi za posamezne porfirinske frakcije.**

Porfirinska frakcija	Okvirni retencijski časi (min)
Uroporfirin I	5,5
Heptakarboksiporfirin I	6,7
Heksakarboksiporfirini	8,1
Interni standard	9,4
Pentakarboksiporfirin I	10,1
Koproporfirin I	11,8
Koproporfirin III	13,0

**Enačba 1: Izračun koncentracij posameznih analitov pri HPLC s pomočjo internega standarda.**

$$\text{koncentracija}_{\text{analit v vzorcu}} [\mu\text{g/L}] = \frac{\text{površina}_{\text{analit v vzorcu}} * \text{koncentracija}_{\text{analit v kalibratorju}} [\mu\text{g/L}]}{\text{površina}_{\text{analit v kalibratorju}} * \text{izkoristek}}$$

**Enačba 2: Izračun izkoristka s pomočjo internega standarda.**

$$\text{izkoristek} = \frac{\text{površina}_{\text{interni standard v vzorcu}}}{\text{površina}_{\text{interni standard v kalibratorju}}}$$

Kromatografsko ločevanje analitov smo izvajali v reverzno fazni koloni (C18, 5  $\mu\text{m}$ ) z gradientno elucijo z uporabo dveh mobilnih faz, ki smo jima med potekom ločevanja spreminjali deleže s pomočjo gradientne črpalke, in ob prisotnosti pufov. Ločevanje je potekalo pri konstantni temperaturi 30°C in ob hitrosti pretoka mobilne faze 0,7 mL/min. Injiciranje supernatantov vzorcev je potekalo avtomatsko vsakih 20 minut. Eluirane ločene porfirinske frakcije smo določali s fluorescenčnim detektorjem. Valovna dolžina ekscitacijske svetlobe je bila 394 nm, saj porfirini svetlobo te valovne dolžine absorbirajo, valovna dolžina emisijske svetlobe, ki jo oddajajo posamezni porfirini in smo jo z detektorjem tudi merili, pa je bila 624 nm. Koncentracije posameznih porfirinskih frakcij v vzorcih nam je računalnik izračunal avtomatsko na osnovi internega standarda.

Linearno območje naše metode je 1 - 5000  $\mu\text{g/L}$  za posamezno porfirinsko frakcijo in spodnja meja zaznavanja je 0,5  $\mu\text{g/L}$  za posamezno porfirinsko frakcijo. Nenatančnost znotraj serije in med serijami za posamezne porfirinske frakcije pri različnih koncentracijah so zbrane v Preglednica II.

Natančnejši opis postopkov izvedbe metode, meritev in kromatogramov je opisan v diplomskem delu (117).

Vse koncentracije porfirinov smo preračunali na koncentracijo kreatinina v urinu, ki smo jo določili v posameznem vzorcu urina.

**Preglednica II: Nenatančnost znotraj serije in med serijami za posamezne porfirinske frakcije pri različnih koncentracijah.**

Porfirinska frakcija	Koncentracija ( $\mu\text{g/L}$ )	Koeficient variacije znotraj serije (%)	Koeficient variacije med serijami (%)
Uroporfirin I	13,0	4,91	4,37
	81,0	1,50	2,72
	189	1,74	3,10
Heptakarboksiporfirin I	4,20	5,28	2,92
	21,8	1,37	1,99
	41,3	1,57	2,02
Heksakarboksiporfirini	4,48	5,70	6,67
	21,9	2,16	2,31
	46,2	1,93	2,37
Pentakarboksiporfirin	4,46	3,07	3,72
	22,2	1,33	1,55
	48,9	1,21	1,38
Koproporfirin I	22,8	2,18	2,67
	132	1,60	1,80
	282	1,36	1,07
Koproporfirin III	56,7	1,87	2,45
	187	1,58	1,99
	379	1,43	1,15

### 3.5.7. Kreatinin v urinu

Kreatinin v urinu smo določali z encimsko metodo z encimom kreatinin amidohidrolazo po utečenem rutinskem postopku. Za našo metodo je meja zaznavanja  $4 \mu\text{mol/L}$ , nenatančnost med serijami je pri koncentraciji  $6 \text{ mmol/L}$  2,7 %.

## 3.6. Statistična analiza

Rezultate smo analizirali s pomočjo opisne statistike in preverili normalnost njihove porazdelitve s pomočjo testa Kolmogorov-Smirnov. Razlike med skupinami (skupino SAM, kontrolno skupino, podskupino avtizem, populacijo otrok, starih med 1 in 14 let) smo analizirali s pomočjo Studentovega t-testa za neodvisne vzorce. Razliko med skupino SAM in kontrolno skupino za živo srebro v urinu smo analizirali s pomočjo Mann-Whitneyevega U-testa. Povezave med koncentracijo živega srebra v krvi in razmerjem cink/baker smo analizirali s pomočjo t-testa za odvisne spremenljivke. Povezave med koncentracijo živega srebra v urinu izraženim na kreatinin in razmerjem cink/baker smo analizirali s pomočjo

Wilcoxonovega testa. Povezave med posameznimi spremenljivkami smo ocenili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Homogenost skupin po spolu smo preverili s testom hi-kvadrat. Pri preizkušanju domnev smo kot statistično pomembno upoštevali vrednost  $p$ , ki je manjša od 0,05.

Statistično analizo smo opravili s pomočjo računalniških programov (Microsoft Excel xp, ZDA, in Statistica SPSS for Windows, Stat. Soft., Microsoft corp., ZDA).

## 4. Rezultati

### 4.1. *Optimiziranje delovnega postopka in ocena analizne metode za živo srebro*

Pri optimiziranju delovnega postopka smo hkrati optimizirali razklop in merjenje živega srebra. Ob tem smo morali upoštevati, da je biološki material polna kri otrok, da je najboljša občutljivost aparata za merjenje koncentracije živega srebra, ko je koncentracija  $\text{HNO}_3$  v merjenem vzorcu približno 5 % in je koncentracija živega srebra v polni krvi nizka (pod 10  $\mu\text{g/L}$ ). Zato smo iskali najmanjši možen volumen krvi, ki ga potrebuje aparat (vsaj 8 mL končne raztopine), da še lahko določimo živo srebro. Uporabljali smo najmanjše možne količine polne krvi in iskali optimalno razmerje med polno krvjo in 65 % kislino  $\text{HNO}_3$ , pri katerem še poteče popoln razkroj polne krvi. Po končanem razkroju smo mešanico polne krvi in kisline redčili z vodo. Pri tem smo iskali najmanjše možno redčenje, da ne pademo pod mejo detekcije aparata. Upoštevati smo morali tudi vpliv koncentracije kisline v končni raztopini na občutljivost meritev. S spreminjanjem časa razklopa smo ugotavljali najkrajši čas razklopa, pri katerem še poteče popolni razklop vzorca. Želeli smo ugotoviti, pri kateri koncentraciji kisline so meritve najbolj zanesljive. Vpliv koncentracije kisline smo ugotavljali z razklopom kontrolnega materiala Seronorma 1 s koncentracijo živega srebra 3  $\mu\text{g/L}$  in Seronorm 3 s koncentracijo živega srebra 14  $\mu\text{g/L}$ . Primerjali smo absorbanco vzorca pri različnih koncentracijah kisline. Ugotovili smo, da je za popolno razgradnjo najbolj optimalno razmerje med polno krvjo in kislino 1:2. Večji delež kisline v fazi razkroja vzorca z mikrovalovno pečico nima vpliva, ga ima pa v fazi meritev, saj je pri visoki koncentraciji kisline v merjeni raztopini občutljivost meritev manjša. Obenem smo morali upoštevati tudi napako, ki nastane zaradi redčenja polne krvi s kislino in po razkroju še z vodo. Ugotovili smo, da dobimo najboljše rezultate, ko je v času razklopa razmerje med polno krvjo in 65 % kislino  $\text{HNO}_3$  1:2, za meritev pa končni faktor redčenja 9 in končna koncentracija kisline  $\text{HNO}_3$  14,4 %.

S spreminjanjem časa razklopa smo iskali najkrajši čas, ki je potreben za popolni razklop polne krvi. Kontrolni material (Seronorm 1 in Seronorm 3) smo v razmerju 1:2 s 65 % kislino  $\text{HNO}_3$  razklope pri 210°C izvajali različno dolgo. Vse razklopljene vzorce smo razredčili na enak način in izmerili njihovo koncentracijo.

Izmerjene koncentracije smo primerjali s podanimi vrednostmi za živo srebro. Ugotovili smo, da je 5-minutno vzdrževanje temperature na 210°C dovolj, da zagotovimo popolni razklop polne krvi.

Iskali smo tudi optimalno temperaturo za razklop polne krvi. Ugotovili smo, da je optimalna temperatura, s katero dosežemo popolni razklop krvnega vzorca, 210°C. V končnem temperaturnem programu razklopa se temperatura dvigne do 210°C v 15 minutah in se potem vzdržuje pri tej temperaturi še 5 minut.

Točnost celotnega postopka (razklop in meritev) smo preverjali z več določitvami kontrolnega vzorca v seriji. Razklop je potekal za vse vzorce hkrati. Za oceno točnosti smo uporabili t-test. Povprečno vrednost naših meritev smo primerjali s podano vrednostjo (8,7 µg/L). Ker je bila izračunana ( $t_{\text{izrač}} = 0,32$ ) vrednost t manjša od tabelarične ( $t_{\text{teoret}} = 1,833$ ,  $p = 0,05$ ,  $n-1 = 9$ ), je metoda točna.

Natančnost meritev v seriji smo določali z meritvijo koncentracije živega srebra v istem kontrolnem materialu, ki smo ga razdelili na 10 alikvotov. Vseh 10 alikvotov smo hkrati razklopili in koncentracije živega srebra določili v istem dnevu. Nenatančnost smo izrazili kot koeficient variacije, ki je znašal 10,42 % za podano koncentracijo 8,7 µg/L in 1,87 % za podano koncentracijo 17,9 µg/L.

Natančnost meritev med serijami (dan/dan) smo določali s ponovitvami istega vzorca v osmih zaporednih dneh. Vzorec smo razdelili na alikvote in jih shranili na -20°C. Nenatančnost meritev smo izrazili kot koeficient variacije. Povprečna vrednost vseh določitev živega srebra je bila 2,06 µg/L s standardnim odklonom 0,315. Koeficient variacije je bil 14,1 %. Nenatančnost je bila večja kot v seriji, saj so rezultati izračunani iz različnih kalibracijskih krivulj.

Za našo metodo je meja detekcije 0,05 µg/L.

Natančnejši opis postopkov izvedbe razklopa, meritev in validacije metode je opisan v diplomskem delu (110).

## **4.2. Preiskovanci**

Po končani raziskavi smo želeli preveriti homogenost skupin glede na spol in starost.

Skupina SAM in kontrolna skupina sta se glede na spol razlikovali ( $\chi^2 = 7,2$ ,  $p = 0,0073$ ).

**Preglednica III: Statistični izračun za homogenost skupin po spolu.**

Skupina Spol	SAM	kontrolna sk.	skupaj	$\chi^2$ - test	
moški	74	12	86	$\chi^2$	7,2
ženske	12	9	21	n-1	1
skupaj	86	21	107	p	0,0073

Skupina SAM in kontrolna skupina se glede na starost nista pomembno razlikovali ( $t(105) = -0,847$ ,  $p = 0,399$ ). Razpon starosti otrok ob pregledu in odvzemu vzorcev v skupini SAM je bil od 1,2 do 14,7 leta s povprečno starostjo 6,8 leta ( $SD=3,2$ ). V kontrolni skupini je bil razpon starosti od 0,8 do 15,4 leta in povprečna starost 7,5 leta ( $SD=4,0$ ).

**Preglednica IV: Statistični izračun za homogenost skupin po starosti.**

Skupina	N	$\bar{x}$	sd	Min-max	25-75 percentil	t-test		
						N-1	t	p
SAM	86	6,78	3,23	1,2 – 14,7	4,3 – 9,7	105	-0,847	0,399
Kontrolna	21	7,48	4,04	0,8 – 15,4	4,7 – 9,7			

Povprečna starost otrok z diagnozo avtizem je bila 6,5 leta ( $SD=3,2$ ) z razponom od 1,2 do 14,7 leta, povprečna starost otrok z diagnozo Aspergerjev sindrom je bila 9,8 leta ( $SD=2,2$ ) v razponu od 7,2 do 12,8 leta.

Za primerjavo težkih kovin smo uporabljali tudi vrednosti populacije otrok, starih od enega do petnajst let. Izračune za populacijo smo naredili na osnovi vseh določitev v serumih otrok, ki so bili analizirani v letih od 2008 do 2010 v našem laboratoriju in so bili v času odvzema stari od 1 do 15 let. Za izračune so upoštevane meritve, ki so znotraj 95 % intervala zaupanja.

### 4.3. Težke kovine

Koncentracije živega srebra v polni krvi smo določili pri 77 otrocih iz skupine SAM ( $\bar{x} = 2,0$ ,  $SD = 1,56$ ) in 19 otrocih iz kontrolne skupine ( $\bar{x} = 1,6$ ,  $SD = 0,91$ ). Koncentracije so presegale priporočeno zgornjo mejo našega laboratorija 3  $\mu\text{g/L}$  pri 9 otrocih iz skupine SAM, kar pomeni 11,7 % vseh otrok iz skupine SAM, in pri 2 otrocih iz kontrolne skupine, kar pomeni 10,5 % vseh otrok iz kontrolne skupine. Koncentracije živega srebra v krvi skupine SAM niso bile značilno višje glede na kontrolno skupino ( $t(94) = 1,064$ ,  $p = 0,145$ ). Primerjali smo tudi povprečne

vrednosti živega srebra v krvi dečkov v skupini SAM ( $N = 68$ ,  $\bar{x} = 2,024$ ,  $SD = 1,64$ ) in dečkov v kontrolni skupini ( $N = 10$ ,  $\bar{x} = 1,371$ ,  $SD = 0,85$ ), vendar nismo našli statističnih razlik med njima ( $t(76) = 1,23$ ,  $p = 0,222$ ). Vrednosti živega srebra v krvi deklic v skupini SAM z vrednostmi živega srebra v krvi deklic kontrolne skupine nismo primerjali, ker je bilo določitev v obeh skupinah premalo. Koncentracije naše kontrolne skupine na 95. percentilu ( $3,48 \mu\text{g/L}$ ) močno presegajo koncentracije v polni krvi, ki so bile določene na populaciji nemških otrok, starih med 3 in 15 let ( $P_{95} = 1,00 \mu\text{g/L}$ ) (118). V primerjavi z vrednostmi, ki smo jih dobili na naši populaciji otrok, starih od 1 do 15 let ( $\bar{x} = 1,61$ ,  $SD = 0,7$ ), pa so bile vrednosti živega srebra v krvi otrok iz skupine SAM statistično višje ( $t(136) = 1,83$ ,  $p = 0,0345$ ). Podobne koncentracije v polni krvi ( $\bar{x} = 1,51$ ,  $SD = 1,56$ ) na slovenski populaciji odraslih so dobili tudi v študiji monitoringa kemikalij v organizmih (111).

Koncentracije aluminija v serumu smo določili pri 81 otrocih iz skupine SAM ( $\bar{x} = 7,23$ ,  $SD = 6,81$ ) in 19 otrocih iz kontrolne skupine ( $\bar{x} = 6,20$ ,  $SD = 4,68$ ). Koncentracije so presegale priporočeno zgornjo mejo našega laboratorija  $10 \mu\text{g/L}$  pri 18 otrocih iz skupine SAM, kar pomeni 22,2 % vseh otrok iz skupine SAM, in pri 1 otroku iz kontrolne skupine, kar pomeni 5 % vseh otrok iz kontrolne skupine. Vrednosti aluminija v skupini SAM niso bile značilno višje glede na koncentracijo aluminija v serumu kontrolne skupine ( $t(98) = 0,624$ ,  $p = 0,267$ ), so pa bile značilno višje glede na populacijo naših otrok, starih od 1 do 15 let ( $t(195) = 2,74$ ,  $p = 0,0034$ ).

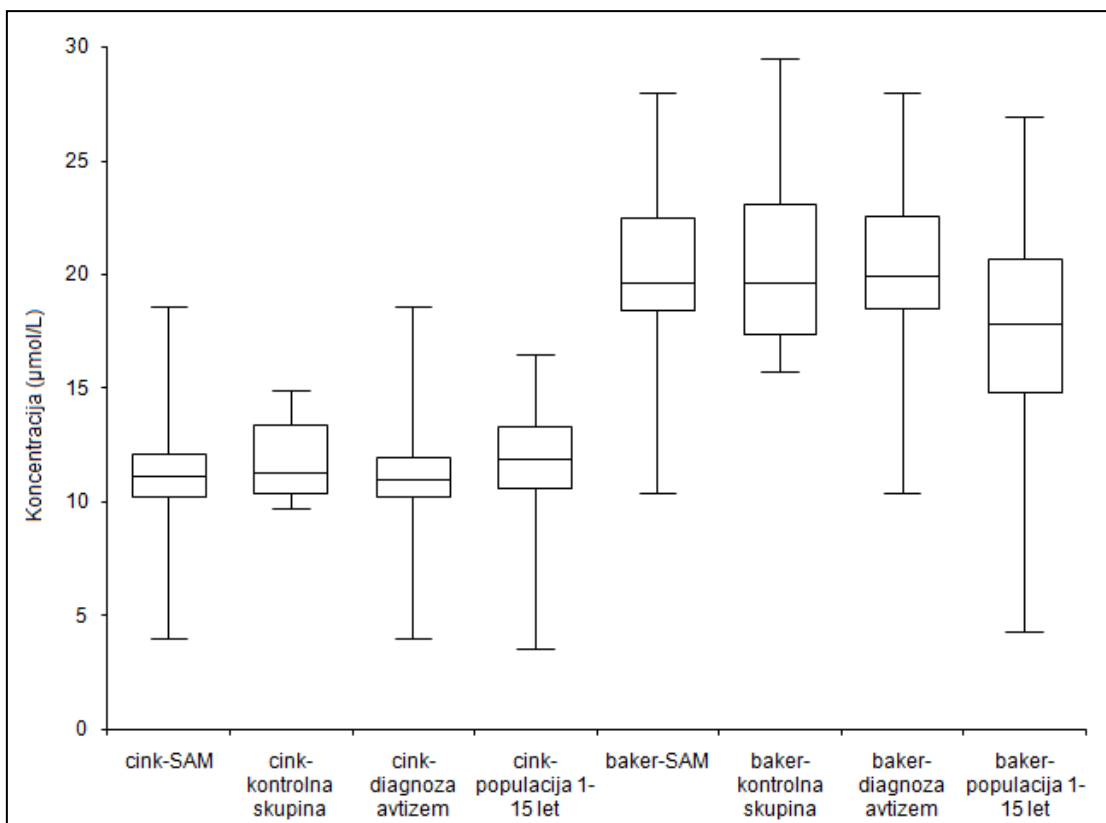
Koncentracije svinca v polni krvi smo določili pri 82 otrocih iz skupine SAM ( $\bar{x} = 30,4$ ,  $SD = 28,7$ ) in 21 otrocih iz kontrolne skupine ( $\bar{x} = 25,7$ ,  $SD = 16,7$ ). V skupini SAM smo določili eno izrazito visoko vrednost svinca ( $242 \mu\text{g/L}$ ). Koncentracije so presegale priporočeno zgornjo mejo našega laboratorija za otroke  $50 \mu\text{g/L}$  pri 10 otrocih iz skupine SAM, kar pomeni 12,2 % vseh otrok iz skupine SAM, in pri 2 otrocih iz kontrolne skupine, kar pomeni 9,5 % vseh otrok iz kontrolne skupine. Skupina SAM ni imela pomembno višjih koncentracij svinca v krvi glede na kontrolno skupino ( $t(101) = 0,705$ ,  $p = 0,241$ ), pa tudi glede na našo populacijo otrok, starih od 1 do 15 let ( $\bar{x} = 30,5$ ,  $SD = 18,7$ ), koncentracije niso bile statistično višje ( $t(304) = -0,05$ ,  $p = 0,5195$ ). Koncentracije naše kontrolne skupine na 95.

percentilu (62 µg/L) in tudi skupine SAM (63 µg/L) močno presegajo koncentracije, ki so bile določene na populaciji nemških otrok, starih med 3 in 15 let (P 95 = 33,8 µg/L) (118), in tudi tiste, ki so bile določene na populaciji odraslih v Sloveniji (P95 = 39,5 µg/L) (111).

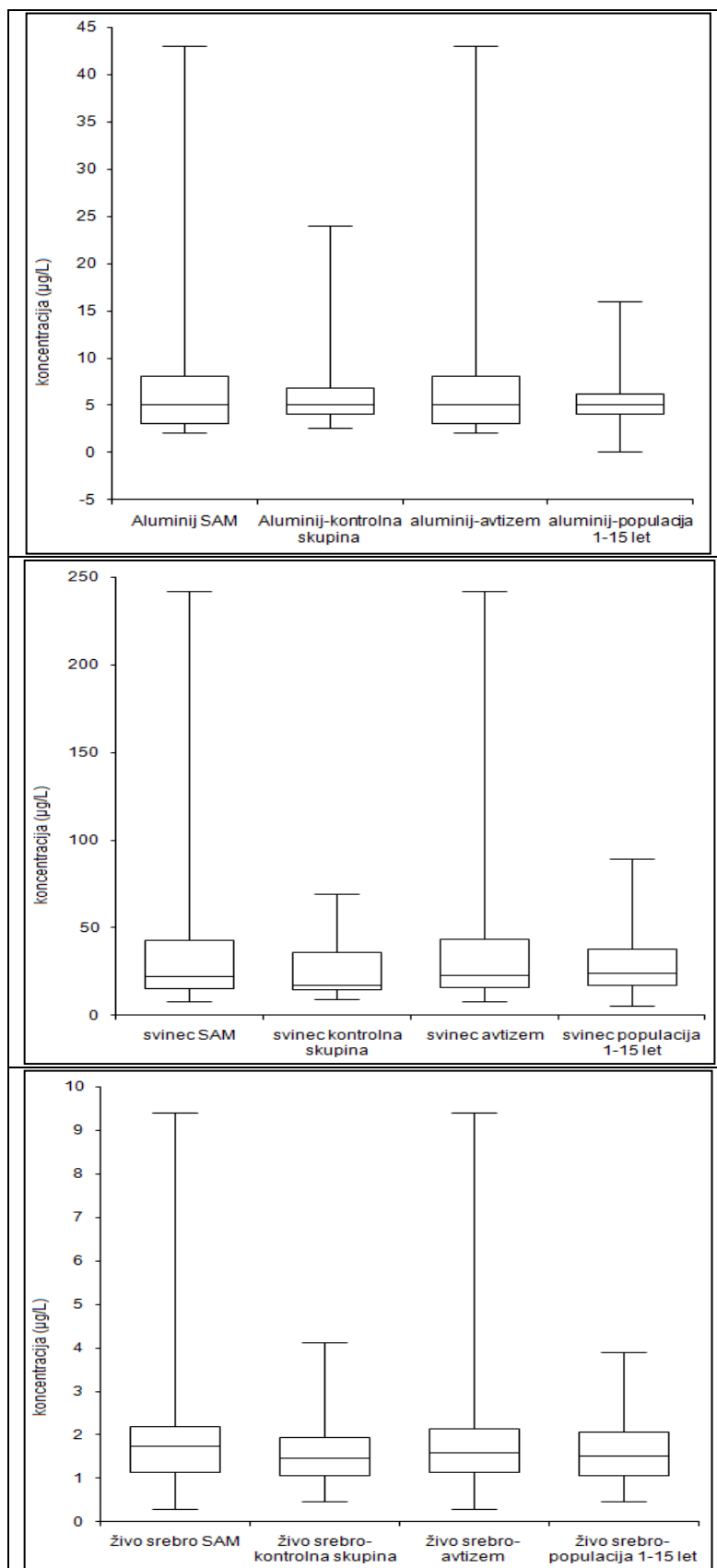
Koncentracije bakra v serumu smo določili pri 78 otrocih iz skupine SAM ( $\bar{x}$  = 20,1, SD = 3,32) in 19 otrocih iz kontrolne skupine ( $\bar{x}$  = 20,3, SD = 3,67). V skupini SAM sta imela 2 otroka koncentracije nad zgornjo mejo orientacijskega referenčnega intervala našega laboratorija (11,0 – 26,7 µmol/L) in eden pod njo, v kontrolni skupini pa je imel en otrok vrednosti bakra nad zgornjo mejo orientacijskega referenčnega intervala. Koncentracije bakra v serumu v skupini SAM niso bile značilno višje kot v kontrolni skupini ( $t(95) = -0,227$ ,  $p = 0,540$ ) oziroma so bile, v nasprotju s pričakovanim, celo nižje. So pa bile koncentracije bakra v serumu otrok iz skupine SAM značilno višje glede na populacijo naših otrok, starih od 1 do 15 let ( $t(191) = 4,35$ ,  $p = <0,0001$ ).

Koncentracije cinka v serumu smo določili pri 82 otrocih iz skupine SAM ( $\bar{x}$  = 11,2, SD = 4,3) in 19 otrocih iz kontrolne skupine ( $\bar{x}$  = 11,8, SD = 1,67). V skupini SAM je imelo 15 oziroma 18,3 % otrok koncentracije pod spodnjo mejo orientacijskega referenčnega intervala našega laboratorija (10,0 – 19,7 µmol/L), v kontrolni skupini pa en otrok (5,3 %). Skupina SAM glede na kontrolno skupino ni imela značilno nižje koncentracije cinka v serumu ( $t(99) = -1,027$ ,  $p = 0,154$ ), so pa bile koncentracije v skupini SAM značilno nižje glede na populacijo naših otrok, starih od 1 do 15 let ( $t(625) = -3,38$ ,  $p = <0,0001$ ).





**Slika 2: Primerjave koncentracij cinka in bakra v serumu med skupinami. V grafikonu so označene vrednosti za mediano, najnižje in najvišje vrednosti ter vrednosti za 25. in 75. percentil.**



Slika 3: Primerjave koncentracij aluminija v serumu ter svinca in živega srebra v polni krvi med skupinami. V grafikonu so označene vrednosti za mediano, najnižje in najvišje vrednosti ter vrednosti za 25. in 75. percentil.

**Preglednica V: Statistični izračuni za elemente v sledovih za skupino SAM, kontrolno skupino in podskupino avtizem.**

	Živo srebro ( $\mu\text{g/L}$ )	Aluminij ( $\mu\text{g/L}$ )	Svinec ( $\mu\text{g/L}$ )	Baker ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cink ( $\mu\text{mol/L}$ )	Razmerje cink/baker
<i>Skupina SAM</i>						
N	77	81	82	78	82	76
$\bar{x}$	2,00	7,23	30,4	20,1	11,2	0,562
SD	1,56	6,82	29,0	3,32	4,3	0,0015
mediana	1,73	5,0	22,0	19,7	11,1	0,555
Min	0,28	2,0	8,0	10,4	4,0	0,205
Max	9,4	43,0	242,0	28,0	18,6	1,178
25-75 percentil	1,13-2,18	3,0-8,0	15,0-43,0	18,4-22,5	10,2-12,1	0,483-0,652
<i>Kontrolna skupina</i>						
N	19	19	21	19	19	18
$\bar{x}$	1,60	6,20	25,7	20,3	11,8	0,587
SD	0,91	4,68	16,7	3,67	1,67	0,109
mediana	1,47	5,0	17,0	19,6	11,3	0,600
Min	0,46	2,6	9,0	15,7	9,7	0,432
Max	4,12	24,0	69,0	29,5	14,9	0,798
25-75 percentil	1,05-1,94	4,0-7,7	14,8-35,8	17,4-23,0	10,4-13,4	0,498-0,642
<i>Podskupina avtizem</i>						
N	69	73	74	71	74	68
$\bar{x}$	1,985	7,35	31,2	20,4	11,2	0,559
SD	1,623	6,82	29,9	3,33	2,13	0,166
mediana	1,58	5,0	23,0	19,9	11,0	0,535
Min	0,28	2,0	8,0	10,4	4,0	0,205
Max	9,4	43,0	242	28,0	18,6	1,178
25-75 percentil	1,12-2,13	3,0-8,0	15,9-43,1	18,5-22,6	10,2-11,9	0,477-0,630
<i>Populacija od 1 do 15 let</i>						
N	61	116	224	115	545	
$\bar{x}$	1,61	5,3	30,5	17,5	12,0	
SD	0,7	3,1	18,7	4,6	1,9	
mediana	1,52	5,0	24,0	17,8	11,9	
Min	0,47	0	5	4,3	3,5	
Max	3,89	16	89	26,9	16,5	
25-75 percentil	1,05-2,05	4-6,2	17-18	14,8-20,7	10,6-13,3	

**Preglednica VI: Vrednosti neparnega t-testa za elemente v sledovih za skupino SAM in kontrolno skupino ter podskupino avtizem in kontrolno skupino.**

	Živo srebro ( $\mu\text{g/L}$ )	Aluminij ( $\mu\text{g/L}$ )	Svinec ( $\mu\text{g/L}$ )	Baker ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cink ( $\mu\text{mol/L}$ )	Razmerje cink/baker
<i>Skupina SAM – kontrolna skupina</i>						
<b>t</b>	1,064	0,624	0,705	-0,227	-1,027	-0,440
<b>df</b>	94	98	101	95	99	91
<b>p*</b>	0,145	0,267	0,241	0,540	0,154	0,330
<i>Podskupina avtizem – kontrolna skupina</i>						
<b>t</b>	0,98	0,69	0,80	0,03	-1,12	-0,70
<b>df</b>	86,0	90,0	93,0	88,0	91,0	84,0
<b>p*</b>	0,165	0,245	0,212	0,437	0,133	0,244
<i>Skupina SAM – populacija od 1 do 15 let</i>						
<b>t</b>	1,83	2,74	-0,05	4,35	-3,38	
<b>df</b>	136	195	304	191	625	
<b>p*</b>	<b>0,0345</b>	<b>0,0034</b>	0,5195	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0004</b>	

\*Enosmerni t-test.

Pri koncentraciji bakra v serumu smo zaznali statistično pomembno ( $p = 0,014$ ) rahlo negativno povezanost ( $r = -0,249$ ) s starostjo. Pri koncentraciji cinka v serumu ( $r = 0,259$ ,  $p = 0,09$ ) in razmerju cinka in bakra ( $r = 0,238$ ,  $p = 0,022$ ) smo ugotovili statistično pomembno pozitivno povezanost s starostjo.

Pri preizkušanju povezanosti razmerja med cinkom in bakrom v serumu s težkimi kovinami nismo dobili statistično pomembnih povezav (Preglednica VII).

**Preglednica VII: Analiza povezanosti razmerja med cinkom in bakrom s težkimi kovinami.**

	Živo srebro v krvi ( $\mu\text{g/L}$ )	Aluminij ( $\mu\text{g/L}$ )	Svinec ( $\mu\text{g/L}$ )	Živo srebro v urinu / kreatinin ( $\mu\text{g/mol}$ )
<b>r*</b>	0,024	0,081	-0,036	-0,015
<b>N</b>	84	91	91	18
<b>p</b>	0,828	0,446	0,738	0,954

\*Pearsonov korelacijski koeficient

Živo srebro v urinu smo določali pri tistih otrocih, ki smo jim določali tudi porfirinske frakcije v urinu. Določili smo ga pri 13 otrocih skupine SAM in 7 otrocih iz kontrolne skupine. Vse vrednosti živega srebra v urinu smo preračunali na koncentracijo kreatinina, ki smo ga sočasno določili v teh urinskih vzorcih. Vrednosti smo izrazili

v mikrogramih živega srebra na mol kreatinina ( $\mu\text{g/mol}$ ). Z uporabo neparametričnega Mann-Whitneyevega U-testa smo ugotovili, da med skupinama ni statistično pomembnih razlik (Preglednica VIII).

**Preglednica VIII: Statistični izračuni za primerjavo živega srebra v urinu izraženem na kreatinin ( $\mu\text{g/mol}$ ) med skupino SAM in kontrolno skupino.**

skupina	N	mediana	Min-max	25-75 percentil	Mann-Whitneyev U-test		
					U	z	p
SAM	13	0,038	0 – 0,425	0,009 – 0,144	58,5	1,03	0,311
kontrolna	7	0,047	0 – 0,110	0,044 – 0,088			

#### 4.4. Porfirini

Porfirinske frakcije smo določili pri 20 otrocih skupine SAM (od tega je en imel diagnozo Aspergerjev sindrom, ostali pa diagnozo avtizem) in 12 otrocih iz kontrolne skupine. V vseh urinskih vzorcih smo določili tudi kreatinin, ki smo ga uporabili za normalizacijo koncentracij porfirinskih frakcij. Določili smo uroporfirin, heptakarboksiporfirin, heksakarboksiporfirin, pentakarboksiporfirin, koproporfirin I, koproporfirin III in celokupne porfirine. Vse porfirinske frakcije smo izrazili v mikromolih na mol kreatinina ( $\mu\text{mol/mol}$ ). Iz posameznih določitev porfirinov smo izračunali tudi razmerji med koproporfirinom in uroporfirinom ter med koproporfirinom I in koproporfirinom III. Vrednosti za porfirinske frakcije v skupini SAM in kontrolni skupini smo najprej ovrednotili glede na normalne referenčne vrednosti, ki smo jih povzeli po literaturi (112, 113) in so bile vrednotene glede na starost otroka ob odvzemu. V skupini SAM so vrednosti uroporfirina presegale zgornjo orientacijsko referenčno vrednost pri 13 (65 %) otrocih, heptakarboksiporfirin pri 9 (45 %), heksakarboksiporfirin pri 14 (70 %), pentakarboksiporfirin pri 7 (35 %) in koproporfirin pri 3 (15 %) otrocih. Dvanajst otrok je imelo hkrati zvišane tri ali več porfirinskih frakcij, trije pa nobene. V kontrolni skupini so vrednosti uroporfirina presegale zgornjo orientacijsko referenčno vrednost pri 5 (42 %) otrocih, heptakarboksiporfirin pri 1 (8 %), heksakarboksiporfirin pri 8 (67 %), pentakarboksiporfirin pri 1 (8 %) in koproporfirin pri 4 (30 %) otrocih. Trije otroci so imeli hkrati zvišane tri ali več porfirinskih frakcij, trije pa nobene.

Koncentracije vseh porfirinskih frakcij padajo s starostjo. Statistično pomembna negativna povezava med koncentracijo, izraženo na kreatinin, in starostjo pa je

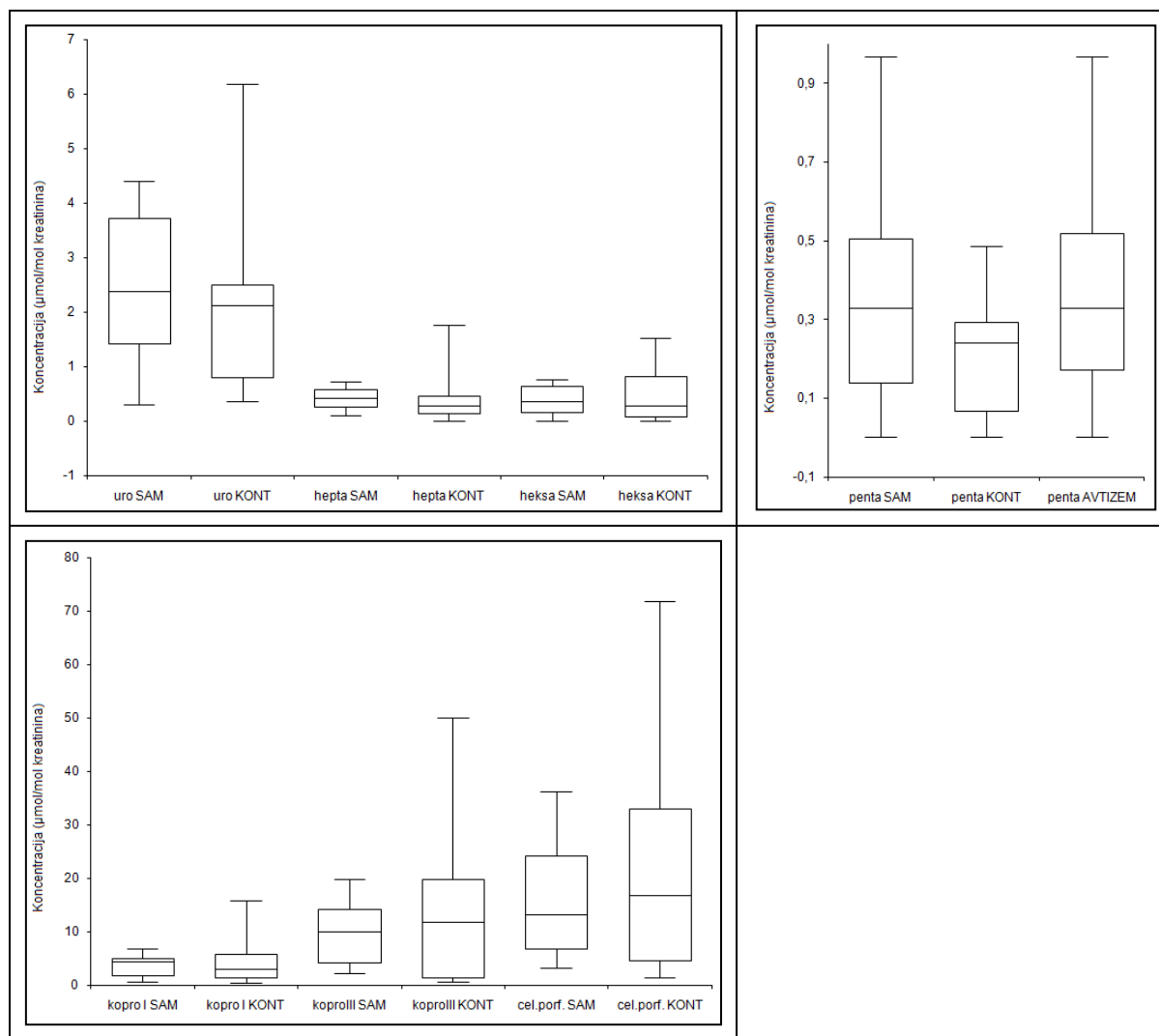
izražena pri pentakarboksiporfirinu ( $r = -0,309$ ,  $p = 0,043$ ), koproporfirinu I ( $r = -0,295$ ,  $p = 0,050$ ) in celokupnih porfirinih ( $r = -0,297$ ,  $p = 0,050$ ).

Primerjave porfirinskih frakcij med obema skupinama so pokazale, da med skupinama ni statistično značilnih razlik (Preglednica IX) z izjemo pentakarboksiporfirina, ki je v skupini SAM značilno višji ( $p = 0,016$ ). Prav tako tudi primerjava skupine otrok z diagnozo avtizem s kontrolno skupino ni pokazala statistično pomembnih razlik pri porfirinskih frakcijah, razen pri pentakarboksiporfirinu ( $p = 0,017$ ) (Slika 4).

Primerjave povezanosti posameznih porfirinskih frakcij so pokazale, da sta koncentraciji uroporfirina in heksakarboksiporfirina značilno povezani s koncentracijama koproporfirina I in koproporfirina III, koncentracija pentakarboksiporfirina je značilno povezana s koncentracijama heptakarboksiporfirina in heksakarboksiporfirina. Značilno sta povezani tudi koncentraciji koproporfirina I in koproporfirina III (Preglednica XII).

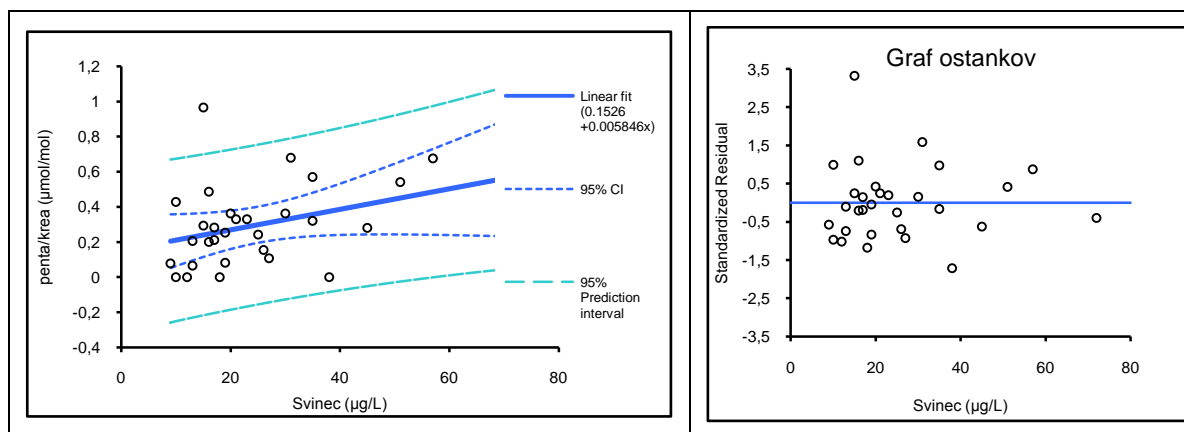
Vrednosti pentakarboksiporfirina ( $\bar{x} = 0,352$ ,  $SD = 0,26$ ) so pri skupini SAM v povprečju 2,05-krat višje kot pri kontrolni skupini ( $\bar{x} = 0,172$ ,  $SD = 0,12$ ) in 1,6-krat višje kot povprečne vrednosti izmerjene pri nevrolško normalno razvitih otrocih ( $\bar{x} = 0,224$ ,  $SD = 0,08$ ), ki jih je objavil Woods s sodelavci leta 2010 (112). Pri proučevanju vpliva težkih kovin na koncentracijo pentakarboksiporfirina smo ugotovili pozitivno povezanost s svincem (Preglednica XIII).

Povprečne koncentracije koproporfirina v skupini SAM ( $\bar{x} = 14,8$ ,  $SD = 13,4$ ) so bile nižje kot v naši kontrolni skupini ( $\bar{x} = 18,4$ ,  $SD = 18,6$ ). Razmerje povprečne koncentracije koproporfirina v skupini SAM glede na povprečne koncentracije v naši kontrolni skupini je bilo 0,69. V primerjavi z normalnimi vrednostmi ( $\bar{x} = 10,42$ ,  $SD = 4,3$ ), ki jih je dobil Woods (112), pa je razmerje 1,21, kar je primerljivo z njihovim razmerjem med njihovo skupino SAM in njihovo kontrolno skupino, ki je znašalo 1,33. Analizirali smo tudi povezanost koncentracije koproporfirina ter koproporfirina I in koproporfirina III s koncentracijami težkih kovin, vendar statistično pomembnih povezav s svincem nismo našli. So pa tako vrednosti koproporfirina ( $r = 0,26$ ), koproporfirina I ( $r = 0,19$ ) in koproporfirina III ( $r = 0,28$ ), izražene na kreatininu, pozitivno povezane s koncentracijo živega srebra v urinu,



**Slika 4: Primerjava koncentracij porfirinskih frakcij med skupino SAM in kontrolno skupino. V grafikonu so označene vrednosti za mediano, najnižje in najvišje vrednosti ter vrednosti za 25. in 75. percentil.**

**Okrajšave: URO: uroporfirin, HEPTA: heptakarboksiporfirin, HEKSA: heksakarboksiporfirin, PENTA: pentakarboksiporfirin, KOPRO I: koproporfirin I, KOPRO III: koproporfirin III, CEL. PORF.: celokupni porfirini, KONT: kontrolna skupina**



**Slika 5: Razsevni graf in graf ostankov pri analizi povezanosti svinca in pentakarboksiporfirina izraženega na mol kreatinina določenega v urinu.**

izraženega na kreatinin. Statistično pomembno so koncentracije koproporfirina I negativno povezane s cinkom (Preglednica XIII).

Vrednosti uroporfirina v urinu so v skupini SAM v povprečju ( $\bar{x} = 2,427$ ,  $SD = 1,54$ ) za 9 % višje kot v naši kontrolni skupini, vendar pa se znatno razlikujejo od normalnih vrednosti Woodsa in sodelavcev ( $\bar{x} = 1,13$ ,  $SD = 0,35$ ), saj je naša povprečna koncentracija kar 2,15-krat višja kot normalne vrednosti, ki jih je objavil Woods s sodelavci (112). Ugotovili smo tudi pozitivno povezanost uroporfirina z živim srebrom v urinu izraženim na kreatinin (Preglednica XIII).

Tudi koncentracije heptakarboksiporfirina so v skupini SAM višje glede na kontrolno skupino v povprečju za 22 %, koncentracije heksakarboksiporfirina pa v povprečju za 12 %. Primerjava koncentracij skupine SAM z normalnimi vrednostmi Woodsa pa kažejo, da so v povprečju koncentracije heptakarboksiporfirina 1,68-krat, koncentracije heksakarboksiporfirina pa v povprečju kar 4,38-krat višje kot normalne vrednosti, ki jih je določil Woods.

Primerjava razmerja med koproporfirinom in uroporfirinom med skupino SAM in našo kontrolno skupino je pokazala, da med njima ni statistično pomembnih razlik ( $t(30) = -1,512$ ,  $p = 0,141$ ). Analizirali smo tudi povezanost med razmerjem in težkimi kovinami. Ugotovili smo, da med razmerjem in svincem ni statistično pomembne povezave ( $p = 0,511$ ), statistično pomembne povezave tudi ni z živim srebrom v krvi ( $p = 0,594$ ) in živim srebrom v urinu, izraženim na kreatinin (0,978). Pri kontrolni skupini ( $\bar{x} = 2,81$ ,  $SD = 1,27$ ) je bilo razmerje koproporfirina III in koproporfirina I v povprečju višje kot pri skupini SAM ( $\bar{x} = 2,49$ ,  $SD = 1,00$ ), vendar med njima nismo našli statistično značilnih razlik ( $t(30) = -0,79$ ,  $p = 0,433$ ). Analizirali smo tudi povezanost razmerja s težkimi kovinami. Ugotovili smo, da je razmerje koproporfirin III / koproporfirin I statistično pomembno povezano z živim srebrom v urinu, izraženim na kreatinin ( $r = 0,38$ ,  $p = 0,048$ ). Z ostalimi težkimi kovinami povezave nismo odkrili.

Primerjava celokupnih porfirinov med skupino SAM in kontrolno skupino je pokazala, da med skupinama ni statistično značilnih razlik ( $t(30) = -0,970$ ,  $p = 0,340$ ).



**Preglednica IX: Statistični izračuni za porfirine v urinu za skupino SAM in kontrolno skupino.**

	URO*	HEP	HEKS	PENT	KOP I	KOP III	PORF
<i>Skupina SAM</i>							
N	20	20	20	20	20	20	20
$\bar{x}$	2,427	0,494	0,513	0,352	3,542	9,069	16,4
SD	1,54	0,343	0,475	0,260	2,12	6,92	10,4
Min	0,292	0,0	0,0	0,0	0,473	1,847	2,336
Max	6,783	1,509	1,931	0,966	8,03	21,538	36,251
<i>Kontrolna skupina</i>							
N	12	12	12	12	12	12	12
$\bar{x}$	2,222	0,404	0,456	0,172	4,364	14,05	21,66
SD	1,75	0,48	0,51	0,12	4,24	14,5	20,4
Min	0,355	0,0	0,0	0,0	0,28	0,484	1,43
Max	6,177	1,756	1,513	0,321	15,7	49,9	71,9

\*Vse porfirinske frakcije in celokupni porfirini so izraženi v koncentraciji  $\mu\text{mol}$  na mol kreatinina v urinu.  
Okrajšave: URO: uroporfirin, HEP: heptakarboksiporfirin, HEKS: heksakarboksiporfirin, PENT: pentakarboksiporfirin, KOP I: koproporfirin I, KOP III: koproporfirin III, PORF: celokupni porfirini

**Preglednica X: Statistični izračuni za razmerja porfirinov v urinu za skupino SAM in kontrolno skupino.**

	KOPRO/URO*	KOPRO III/KOPRO I	KOPRO/URO	KOPRO III/KOPRO I
	<i>Skupina SAM</i>		<i>Kontrolna skupina</i>	
N	20	20	12	12
$\bar{x}$	5,58	2,49	7,57	2,81
SD	2,79	1,00	4,69	1,27
Min	2,34	1,07	1,59	0,49
Max	12,98	4,52	13,55	4,76

\*Okrajšave: KOPRO/URO: razmerje med koproporfirinom in uroporfirinom, KOPRO III/KOPRO I: razmerje med koproporfirinom III in koproporfirinom I

**Preglednica XI: Vrednosti neparnega t-testa za porfirinske frakcije za skupino SAM in kontrolno skupino.**

	URO*	HEP	HEKS	PENT	KOP I	KOP III	PORF	KOPRO/ URO	KOPRO III/ KOPRO I
<b>t</b>	0,346	0,622	0,322	2,256	-0,733	-1,316	-0,970	-1,512	-0,79
<b>df</b>	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>p</b>	0,732	0,539	0,750	<b>0,031</b>	0,469	0,198	0,340	0,141	0,433

\* Vse porfirinske frakcije in celokupni porfirini so izraženi v koncentraciji  $\mu\text{mol}$  na mol kreatinina v urinu. Okrajšave: URO: uroporfirin, HEP: heptakarboksiporfirin, HEKS: heksakarboksiporfirin, PENT: pentakarboksiporfirin, KOP I: koproporfirin I, KOP III: koproporfirin III, PORF: celokupni porfirini, KOPRO/URO: razmerje med koproporfirinom in uroporfirinom, KOPRO III/KOPRO I: razmerje med koproporfirinom III in koproporfirinom I

**Preglednica XII: Rezultati povezav (korelacije) med posameznimi porfirinskimi frakcijami.**

	URO* - KOPRO I	URO - KOPRO III	HEKS - KOPRO I	HEKS - KOPRO III	PENT - HEP	PENT- HEKS	KOPRO I - KOPRO III
<b>r</b>	0,682	0,620	0,568	0,516	0,346	0,346	0,928
<b>df</b>	30	30	30	30	30	30	30
<b>p</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,053</b>	<b>0,053</b>	<b>&lt;0,0001</b>

\* Okrajšave: URO: uroporfirin, HEP: heptakarboksiporfirin, HEKS: heksakarboksiporfirin, PENT: pentakarboksiporfirin, KOP I: koproporfirin I, KOP III: koproporfirin III

**Preglednica XIII: Rezultati povezav (korelacije) med elementi v sledovih in porfirinskimi frakcijami.**

	URO**	PENTA	KOPRO I	PORF	KOPRO III / KOPRO I
<i>Cink</i>					
<b>r*</b>	-0,205	0,25	-0,319	-0,299	-0,083
<b>N</b>	31	31	31	31	31
<b>p</b>	0,134	0,448	<b>0,040</b>	<b>0,05</b>	0,328
<i>Svinec</i>					
<b>r*</b>	0,188	0,379	0,076	0,054	-0,077
<b>N</b>	30	30	30	30	30
<b>p</b>	0,160	<b>0,020</b>	0,344	0,389	0,344
<i>Živo srebro v urinu / kreatinin</i>					
<b>r*</b>	0,438	-0,173	0,192	0,275	0,383
<b>N</b>	20	20	20	20	20
<b>p</b>	<b>0,027</b>	0,233	0,209	0,120	<b>0,048</b>

\*Pearsonov korelacijski koeficient

\*\* Vse porfirinske frakcije in celokupni porfirini so izraženi v koncentraciji  $\mu\text{mol}$  na mol kreatinina v urinu. Okrajšave: URO: uroporfirin, PENT: pentakarboksiporfirin, KOP I: koproporfirin I, PORF: celokupni porfirini, KOPRO III/KOPRO I: razmerje med koproporfirinom III in koproporfirinom I

\*\*\*Za statistično primerjavo smo vzeli vse določitve živega srebra v urinu, izraženega na koncentracijo kreatinina v urinu.

## 5. Razprava

Študija predstavlja prvo raziskavo biokemičnih dejavnikov pri osebah z spektrom avtističnih motenj v Sloveniji in je pomembna obogatitev na tem področju tudi v mednarodnem prostoru, kjer je bila izvedena sicer že vrsta podobnih raziskav, vendar večinoma brez primerjave z ustrezno kontrolno skupino, ki je bila sestavljena iz otrok z različnimi nevrološkimi motnjami.

Glede na trenutno razpoložljivo literaturo o vlogi težkih kovin kot dejavnikov okolja pri nastanku spektra avtističnih motenj smo pričakovali, da se bodo koncentracije težkih kovin med skupino s spektrom avtističnih motenj in kontrolno skupino statistično pomembno razlikovale. Pričakovali smo, da bodo v skupini SAM višje vrednosti živega srebra in svınca v polni krvi, aluminija in bakra v serumu ter nižje vrednosti cinka v serumu in tudi nižje razmerje med cinkom in bakrom glede na kontrolno skupino.

Naši rezultati kažejo, da so povprečne vrednosti živega srebra v krvi, aluminija v serumu in svınca v krvi skupine SAM nekoliko višje kot pri kontrolni skupini, vendar statistično značilnih razlik nismo našli. Povprečne vrednosti bakra, cinka in razmerja med bakrom in cinkom v serumu so v skupini SAM nižje kot pri kontrolni skupini, vendar tudi pri teh analitih nismo našli statistično značilnih razlik. Zanimalo nas je tudi, ali se koncentracije posameznih elementov v sledovih razlikujejo glede na diagnozo oziroma na obliko SAM, zato smo skupino SAM razdelili na otroke z diagnozo avtizem in diagnozo Aspergerjev sindrom. Vrednosti otrok z diagnozo avtizem smo primerjali z vrednostmi kontrolne skupine. Rezultati so pokazali, da so povprečne vrednosti živega srebra in svınca v polni krvi, aluminija ter bakra v serumu pri otrocih z diagnozo avtizem višje od tistih iz kontrolne skupine. Povprečne koncentracije cinka in povprečna vrednost razmerja med cinkom in bakrom v serumu so bile pri otrocih z diagnozo avtizem nižje kot pri kontrolni skupini. Vendar tudi med skupinama otrok z avtizmom in kontrolno skupino pri elementih v sledovih nismo našli statistično značilnih razlik. Tudi primerjava vseh treh skupin diagnoza avtizem, diagnoza Aspergerjev sindrom in kontrolna skupina z enofaktorsko analizo variance ni pokazala značilnih razlik med skupinami. Tako lahko glede na naše rezultate sklepamo, da se skupine znotraj SAM glede na

diagnozo ne razlikujejo v koncentracijah elementov v sledovih in da trenutne koncentracije nimajo vpliva na stopnjo izražanja kliničnih značilnosti SAM.

Na prvi pogled kaže, kot da so naše ugotovitve v nasprotju z nekaterimi do sedaj objavljenimi rezultati študij (10, 41, 70, 71, 84, 85, 87, 88, 91, 92, 98, 100, 101, 104), kjer so bile vrednosti težkih kovin značilno zvišane in značilno znižane vrednosti za cink v serumu, vendar so te študije primerjale vrednosti skupine SAM z vrednostmi normalne populacije. Zato smo se odločili, da bomo za primerjavo tudi mi uvedli vrednosti normalne populacije otrok določenih v našem laboratoriju v starostnem razponu od 1 do 15 let. Primerjava je pokazala, da so vrednosti v skupini SAM za živo srebro v polni krvi ter aluminij in baker v serumu statistično značilno višje, za cink v serumu pa značilno nižje glede na populacijske vrednosti, kar je skladno s prej omenjenimi študijami. Iz tega lahko povzamemo, da je tudi naša kontrolna skupina glede na težke kovine bolj obremenjena kot normalna populacija, seveda pa zaradi majhnosti vzorca kontrolne skupine ne moremo sklepati, da so zvišane vrednosti določenih toksičnih elementov in znižane vrednosti cinka v vzročni povezavi z nevrološkimi motnjami.

Tudi srednje vrednosti razmerja med cinkom in bakrom v serumu se med skupino SAM in kontrolno skupino niso statistično značilno razlikovale. Primerjava med skupinami z diagnozo avtizem, diagnozo Aspergerjev sindrom in kontrolno skupino tudi ni pokazala statistično pomembnih razlik. Retrospektivna študija (89) je pokazala, da je imela skupina otrok s SAM povprečne vrednosti za cink v serumu 11,81  $\mu\text{mol/L}$ , za baker v serumu 20,71  $\mu\text{mol/L}$  razmerje med cinkom in bakrom v serumu 0,57, razmerje pri zdravih otrocih je bilo 0,68. Rezultati, ki smo jih dobili v naši skupini SAM, so bili primerljivi, saj so bile povprečne koncentracije za cink v serumu 11,2  $\mu\text{mol/L}$ , za baker v serumu 20,1  $\mu\text{mol/L}$  in razmerje cink/baker v serumu 0,562, kar kaže na neravnovesje med cinkom in bakrom. Baker je esencialen element, ki v visokih koncentracijah postane toksičen, povzroči peroksidacijo lipidov, zmanjša rezerve reducirane glutationa, s tem pa postane organizem bolj občutljiv za oksidativni stres. Cink je kofaktor številnih encimov, med drugim tudi superoksid dismutaze, ki odstranjuje superoksidne anione, in tako zmanjšuje oksidativni stres. Cink tudi inducira sintezo metalotionina, ki sodeluje pri odstranjevanju superoksidnih radikalov. Metalotionin je pomemben pri homeostazi cinka in veže tudi številne težke kovine, ki izpodrivajo cink iz vezavnih mest. Prav

neravnovesje med cinkom in bakrom bi lahko bilo odraz motenj v delovanju metalotioninskega sistema. Vsi mehanizmi, ki so posledica zvišane koncentracije bakra in znižane koncentracije cinka, posledično vodijo do prekomernega oksidativnega stresa in poškodb možganskih celic (23, 114). Ti mehanizmi pa bi lahko bili vpleteni v mehanizme nastanka SAM. Pri vrednotenju koncentracij težkih kovin se moramo tudi zavedati, da koncentracije, ki smo jih določili, odražajo trenutno stanje in ne kažejo koncentracij iz preteklosti. Zavedati se moramo tudi toksikokinetičnih lastnosti posamezne težke kovine. Tako na primer pri živem srebru najvišje vrednosti v krvi določimo med in kmalu po izpostavljenosti, ki pa začnejo zelo hitro padati, saj je na začetku razpolovna doba živega srebra 2 do 4 dni. Vrednosti živega srebra v urinu dosežejo najvišjo vrednost približno 2 do 3 tedne po izpostavljenosti. Tudi razpolovni čas je daljši kot v krvi, in sicer 40 do 60 dni pri kratkotrajnih in 90 dni pri dalje trajajoči izpostavljenosti. Ker se v urinu izloča zelo malo metilnega živega srebra, je vpliv metilne oblike, ki jo vnesemo s hrano, zelo majhen, vpliv na koncentracije v krvi pa velik. Živo srebro se tudi kopiči v osrednjem živčnem sistemu v anorganski obliki, ki sicer zelo slabo prehaja krvno-možgansko pregrado in tako ostane ujeto v osrednjem živčnem sistemu (66), nevrotoksični učinki živega srebra pa se izražajo še dolgo po izpostavljenosti (65). Prav zaradi težkega prehoda preko krvno-možganske pregrade ne moremo iz koncentracij v krvi sklepati na koncentracijo živega srebra v možganih. Prav tako še niso pojasnjeni učinki nizkih koncentracij težkih kovin v zarodni dobi in zgodnjem otroštvu. Ni jasno tudi, kolikšne koncentracije v tem obdobju povzročijo poškodbe živčnega sistema.

Zanimalo nas je tudi, ali bi razmerje cink/baker v serumu lahko bilo biološki označevalec za toksične učinke težkih kovin. Povezave med razmerjem in živim srebrom in svincem v polni krvi, aluminijem ter živim srebrom v urinu, izraženim na koncentracijo kreatinina določenega v urinu, so zelo šibke in neznačilne, kar nakazuje, da razmerje cink/baker v serumu ni primeren označevalec toksičnih učinkov težkih kovin. Verjetno bi bila za te namene bolj primerna vpeljava merjenja aktivnosti antioksidantnih encimov (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), merjenje vsebnosti oksidirane in reducirane oblike glutationa, produktov peroksidacije lipidov v krvi in urinu (npr. malondialdehid) in podobno.

Koncentraciji živega srebra v krvi in živega srebra v urinu nista bili pomembno povezani ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,581$ ), kar lahko pojasnimo s tem, da smo živo srebro določali v polni krvi in tako zajeli vse oblike živega srebra tudi metilno, ki zelo niha v odvisnosti od vnosa s hrano. V urinu pa se izloča predvsem anorganska oblika živega srebra in je bolj ali manj neodvisno od vnosa metilnega živega srebra s hrano.

Pri porfirinskih frakcijah v urinu smo pričakovali odstopanja v skupini SAM predvsem v smislu zvišanih vrednosti celokupnih porfirinov, koproporfirina, zvišanega razmerja med koproporfirinom in uroporfirinom, zvišanih vrednosti pentakarboksiporfirina in heksakarboksiporfirina ter pojav atipičnega prekroporfirina, ki naj bi bil specifičen za obremenitev s težkimi kovinami.

Povprečne vrednosti celokupnih porfirinov v skupini SAM so v nasprotju z našim pričakovanjem nekoliko nižje kot v kontrolni skupini. To pripisujemo dejstvu, da je kontrolna skupina relativno majhna (12 otrok) in da že ena izjemno visoka določitev ( $71,9 \mu\text{mol/mol}$  kreatinina) zelo vpliva na povprečno koncentracijo v celotni skupini.

Koncentracije vseh porfirinskih frakcij padajo s starostjo, zato smo za oceno števila porfirinskih frakcij, ki padejo izven območja orientacijskega referenčnega intervala, uporabljali koncentracije, povzete po literaturi (112, 113), ki so bile določene na nevrološko tipičnih otrocih. Naše vrednosti smo razdelili v starostne intervale kot v literaturi in jih primerjali s srednjimi vrednostmi za ustrezen starostni razred iz literature. Pri vrednotenju odstopanja povprečnih koncentracij pa smo se odločili za primerjavo srednjih vrednosti celotne skupine ne glede na starost, ker so tako naše skupine kot tudi skupine iz literature številčno premajhne (od 2 do 16 otrok na starostno skupino), da bi lahko rezultate ustrezno vrednotili.

Ugotovili smo, da so v skupini SAM povprečne vrednosti glede na našo kontrolno skupino za uroporfirin (9 %), heptakarboksiporfirin (22 %), heksakarboksiporfirin (12 %) in pentakarboksiporfirin (105 %) zvišane ter znižane za koproporfirin I (19 %), koproporfirin III (35 %) in celokupne koproporfirine (31 %). V primerjavi z v literaturi objavljenimi povprečnimi vrednostmi za tipično nevrološko razvite otroke so vrednosti naše skupine SAM za uroporfirin, heptakarboksiporfirin in heptakarboksiporfirin, pentakarboksiporfirin višje. Za 1,2-krat višje so bile tudi vrednosti za koproporfirin. S primerjavami rezultatov za posamezne porfirinske

frakcije pri dečkih iz skupine SAM z referenčnimi vrednostmi, ki jih je podal Woods za dečke, smo izničili vpliv spola na koncentracije posameznih porfirinskih frakcij. Dobili smo podobne rezultate kot za celotno skupino SAM. Povprečne vrednosti za uroporfirin so bile v skupini SAM 2,3-krat višje, heptakarboksiporfirin 1,5-krat, heksakarboksiporfirin 3,4-krat, pentakarboksiporfirin 1,4-krat in koproporfirin 1,2-krat višje. Woods in sodelavci pa so v povprečju za heptakarboksiporfirin imeli 1,2-krat, za heksakarboksiporfirin 1,5-krat, pentakarboksiporfirin 1,7-krat in koproporfirin 1,3-krat višje koncentracije v skupini SAM glede na normalno referenčno skupino. Naše zvišane vrednosti lahko pojasnimo z zvišanimi vrednostmi težkih kovin v skupini SAM glede na naše populacijske vrednosti za otroke, saj se z zmanjšanjem aktivnosti encimov uroporfirinogen dekarboksilaze in koproporfirinogen oksidaze zaradi vpliva težkih kovin posledično kopičijo vsi vmesni produkti sinteze hema. To nam potrjujejo tudi statistično značilne pozitivne povezave med posameznimi porfirinskimi frakcijami (Preglednica XII).

Pozitivna povezanost koproporfirina I in koproporfirina III z živim srebrom v urinu, izraženim na kreatinin, kaže na vpliv živega srebra na encime, ki sodelujejo v sintezni poti hema. Negativna statistično pomembna povezava (Preglednica XIII) med serumskim cinkom in koproporfirinom I ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,040$ ) ter celokupnimi porfirini ( $r = -0,299$ ,  $p = 0,050$ ) pa bi lahko nakazovala vlogo cinka v zaščitnih mehanizmih pred toksičnimi vplivi težkih kovin na encime v sintezni poti hema.

Statistično pomembno pozitivno povezavo ( $r = 0,383$ ,  $p = 0,048$ ) smo ugotovili med živim srebrom v urinu izraženim na kreatinin in razmerjem koproporfirin III/koproporfirin I. Pozitivna povezava je bila nakazana tudi med živim srebrom v urinu in koproporfirinom III ter živim srebrom v urinu in koproporfirinom I. To nakazuje, da se z večanjem koncentracije živega srebra večajo tudi koncentracije koproporfirina III in koproporfirina I ter, da je vpliv živega srebra na kopičenje večji pri koproporfirinu III.

Prekoproporfirina, ki naj bi se po podatkih Natafa in sodelavcev zaradi vpliva težkih kovin (predvsem živega srebra) pretvarjal iz pentakarboksiporfirinogena in so ga zasledili v kromatogramu med pentakarboksiporfirinom in koproporfirinom, na naši populaciji nismo zasledili. Prekoproporfirina v naših vzorcih nismo zasledili ne glede na skupino (SAM, avtizem, kontrola skupina) in tudi ne glede na koncentracijo težkih kovin.

Odstopanja smo dobili tudi pri povprečni koncentraciji uroporfirina. Naša povprečna vrednost v skupini SAM je od naše kontrolne skupine višja le za 9 %, je pa za kar 2,15-krat višja kot povprečne vrednosti tipično nevrolško razvitih otrok, ki jih je objavil Woods s sodelavci (112). Ugotovili smo tudi statistično pomembno pozitivno povezanost ( $r = 0,438$ ,  $p = 0,027$ ) uroporfirina z živim srebrom v urinu izraženim na kreatinin (Preglednica XIII). Naši izsledki so v nasprotju z nekaterimi objavami (53, 105), ki predpostavljajo, da so koncentracije uroporfirina precej neodvisne od učinkov živega srebra. Seveda lahko te razlike do neke mere pripišemo številčno majhnim skupinam, ki smo jih uporabili tako mi kot tudi ostali avtorji, vendar se pri vplivu živega srebra zmanjša aktivnosti encimov uroporfirinogen dekarboksilaze in koproporfirinogen oksidaze. Posledično lahko pričakujemo, da se bodo v urinu kopičili vmesni oziroma predhodni produkti sinteze hema, kot se v urinu kopiči uroporfirin pri okvari encima uroporfirinogen dekarboksilaze v primeru kronične jetrne porfirije (porfirija cutanea tarda). Zato je kopičenje uroporfirina tudi pri vplivu živega srebra na encim uroporfirinogen dekarboksilaze pričakovano.

Med razmerjem koproporfirin/uroporfirin in težkimi kovinami smo ugotovili negativno povezanost. V nasprotju z objavami (53) se razmerje niža z večanjem koncentracij težkih kovin. To lahko pojasnimo s kopičenjem obeh frakcij. Glede na naše vrednosti pa se uroporfirin kopiči v večji meri kot koproporfirin, zato se razmerje niža z višanjem koncentracije živega srebra.

Geier in sodelavci (115) so objavili tudi primerjavo porfirinskih frakcij v urinu med težkimi in blagimi oblikami SAM. Iz primerjave je razvidno, da se koncentracije pentakraboksi porfirina in razmerje med koproporfirinom in uroporfirinom med obema skupinama statistično značilno razlikujeta. Mi vrednotenja rezultatov glede na obliko v znotraj skupine SAM (avtizem, Aspergerjev sindrom) nismo izvedli, saj je bil v določitve porfirinov v urinu vključen le en primer Aspergerjevega sindroma.

Prav razlika v koncentracijah porfirinov med skupino SAM in kontrolno skupino bi lahko nakazovala na večjo občutljivost otrok v skupini SAM za toksične učinke težkih kovin. Ta bi lahko nastala zaradi slabšega delovanja mehanizmov, ki zmanjšujejo toksične učinke težkih kovin.

Zavedamo se, da statistično veljavnost rezultatov analize porfirinov v urinu našega dela zmanjšuje relativno majhno število otrok v obeh skupinah (SAM in kontrolni



skupini). Tudi primerjave glede na orientacijske vrednosti nevrološko tipičnih otrok bi bile bolj ustrezne, če bi namesto vrednosti Woodsa (112, 113) uporabljali vrednosti, določene na lastni populaciji, in z lastno metodo. Za nadaljnje poglobljene analize bi potrebovali večje število vključenih otrok v kontrolni skupini, skupino SAM, ki bi vsebovala večje število otrok z diagnozo avtizem in diagnozo Aspergerjev sindrom, ter skupino nevrološko normalnih otrok za postavitve lastnih referenčnih vrednosti. Za pravilno vrednotenje porfirinov in porfirinskih frakcij moramo vedno vzporedno določati in upoštevati tudi koncentracije težkih kovin.

## 6. Sklepi

V našem delu smo določali živo srebro v krvi in urinu, svinec v krvi ter aluminij, cink in baker v serumu skupine s spektrom avtističnih motenj. Koncentracije smo primerjali s koncentracijami kontrolne skupine, ki je bila sestavljena iz otrok z drugimi nevrološki motnjami ter s populacijsko skupino otrok, starih od 1 do 15 let. S pomočjo statističnih izračunov smo ugotovili:

- da so povprečne vrednosti živega srebra v polni krvi, aluminija v serumu in svineca v polni krvi skupine SAM nekoliko višje in so povprečne vrednosti bakra, cinka in razmerja med bakrom in cinkom v serumu v skupini SAM nižje kot pri kontrolni skupini. Vendar razlike niso bile statistično značilne.
- da so vrednosti v skupini SAM za živo srebro v polni krvi, aluminij in baker v serumu statistično značilno višje, za cink v serumu pa značilno nižje glede na populacijske vrednosti otrok starih med 1 in 15 leti.
- da je v naši skupini SAM povprečna vrednost razmerja cink/baker v serumu 0,562 in je nižja kot pri otrocih s tipičnim nevrološkim razvojem, kar kaže na neravnovesje med cinkom in bakrom. Statistično pomembne razlike med skupino SAM in našo kontrolno skupino nismo zasledili.
- da koncentraciji živega srebra v polni krvi in živega srebra v urinu nista bili pomembno povezani.

Kot biološke označevalce za toksične učinke težkih kovin smo v urinu določili tudi celokupne porfirine in porfirinske frakcije. Primerjali smo jih s kontrolno skupino in vrednostmi iz literature, določenimi na otrocih s tipičnim nevrološkim razvojem.

Ugotovili smo:

- da so v skupini SAM povprečne vrednosti v primerjavi z našo kontrolno skupino za uroporfirin, heptakarboksiporfirin, heksakarboksiporfirin in pentakarboksiporfirin zvišane ter znižane za koproporfirin I in koproporfirin III. Vendar med skupinama ni statistično značilnih razlik, z izjemo pentakarboksiporfirina, ki je v skupini SAM značilno višji.
- da so v primerjavi z povprečnimi vrednostmi za tipično nevrološko razvite otroke vrednosti naše skupine SAM za uroporfirin, heptakarboksiporfirin, heksakarboksiporfirin, pentakarboksiporfirin in tudi koproporfirin višje.

- da v naši populaciji nismo našli prekoprofirina, frakcije, ki naj bi bila značilno povezana s težkimi kovinami.
- negativno statistično pomembno povezavo med serumskim cinkom in koproporfinom I ter celokupnimi porfirini, ki bi lahko nakazovala vlogo cinka v zaščitnih mehanizmih pred toksičnimi vplivi težkih kovin na encime v sintezni poti hema.
- statistično pomembno pozitivno povezavo med živim srebrom v urinu, izraženim na koncentracijo kreatinina v urinu, in razmerjem koproporfirin III/koproporfirin I.
- statistično pomembno pozitivno povezavo med svincem v polni krvi in pentakarboksiporfirinom.

Naša študija predstavlja prvo proučevanje možnih biokemičnih dejavnikov, ki bi lahko bili vpleteni v nastanek spektra avtističnih motenj v Sloveniji. Potrdili smo, da imajo otroci s SAM značilno višje vrednosti težkih kovin kot populacija njihovih vrstnikov. Za bolj prepričljive povezave med težkimi kovinami, cinkom, bakrom ter porfirinskimi frakcijami v urinu bi vsekakor potrebovali večje skupine, tako kontrolne, skupine SAM s podskupinami in postavitev orientacijskih vrednosti za porfirinske frakcije na lastni populaciji z lastno metodo. Vprašanja o toksičnih učinkih zvišanih vrednostih težkih kovin in učinkih znižane vrednosti cinka ter koncentracijah, ki bi hipotetično lahko privedle do razvoja SAM, pa ostajajo odprta in so še vedno snov številnih raziskav. Za ugotavljanje toksičnih učinkov bi bilo verjetno smiselno vpeljati tudi merjenje aktivnosti antioksidantnih encimov (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), merjenje vsebnosti oksidirane in reducirane oblike glutationa, produktov peroksidacije lipidov v krvi in urinu (npr. malondialdehid) in podobno.

## 7. Literatura

1. Baird G, Cass H, Slonims V. Diagnosis of autism. *British Medical Journal*. 2003;327:488-493.
2. Medical Research Council Review of Autism Research: Epidemiology and Causes 2001; <http://www.mrc.ac.uk/pdf-autism-report.pdf>; 9.5.2006
3. Trottier G, Srivastava L, Walker CD. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *J Psychiatry Neurosci*. 1999;24:103-15.
4. Strock, M. Autism Spectrum Disorders (Pervasive Developmental Disorders). NIH Publication No. NIH-08-5511, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services 2010, <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/autism/nimhautismspectrum.pdf>; 12.10.2010.
5. Rutter M. Incidence of autism spectrum disorders: Changes over time and their meaning. *Acta Paediatr*. 2005;94:2-15.
6. Szatmari P. The causes of autism spectrum disorders. *British Medical Journal*. 2003;326:173-4.
7. Caronna EB, Milunsky JM, Tager-Flusberg H. Autism spectrum disorders: clinical and research frontiers. *Arch Dis Child*. 2008;93:518-523.
8. Szatmari P. Heterogeneity and the genetics of autism. *J Psychiatry Neurosci*. 1999;24:159-65.
9. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009;374:1627-38.
10. Plauche Johnson C, Myers M and the Council on Children With Disabilities. Identification and Evaluation of Children With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. 2007;120:1183-1215.
11. Bilder D, Pinborough-Zimmerman J, Miller J, McMahon W. Prenatal, perinatal, and neonatal factors associated with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2009;123:1293-300.
12. London EA. The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. *Environ Health Perspect*. 2000;108:401-4.
13. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2002 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of Autism Spectrum Disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2002. *MMWR Surveill Summ*. 2007; 56:12-28.
14. Baird G, Simonoff E, Pickles A et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet*. 2006; 368:210-5.
15. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*. 2009;58:1-20.

16. Muhle R, Trentacoste SV and Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics*. 2004;113:472–486.
17. Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT et al. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 1999;29:439-84.
18. Myers SM, Johnson CP; American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007;120:1162-82.
19. Rogers SJ, Vismara LA. Evidence-based comprehensive treatments for early autism. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2008;37:8-38.
20. Ospina MB, Krebs Seida J, Clark B et al. Behavioural and developmental interventions for autism spectrum disorder: a clinical systematic review. *PLoS One*. 2008;3:e3755.
21. Division of Epidemiology, Statistic and Prevention Research. Report to the NACHHD Council. January 2010; [http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/upload/DESPR\\_Council\\_Report\\_Jan\\_2010\\_FINAL.pdf](http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/upload/DESPR_Council_Report_Jan_2010_FINAL.pdf), 9.11.2010
22. Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen R et al. The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1119-25.
23. Kobal AB. Možni vpliv živega srebra na patogenezo avtizma. *Zdrav Vestn*. 2009;78:37–44.
24. Shattock P, Savery D. Urinary Profiles of People with Autism: possible implications and relevance to other research (Paper presented at the Durham Conference April 1996). <http://osiris.sunderland.ac.uk/autism/pshdur96.htm>; 14.3.2006
25. White JF. Intestinal Pathophysiology in Autism. Minireview. *Exp Biol Med*. 2003;228:639-649.
26. Pickett J, London E. The neuropathology of autism: a review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64:925-35.
27. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*. 1995;25:63-77.
28. Hollander E, King A, Delaney K et al. Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. *Psychiatry Res*. 2003 Jan 25;117:11-6.
29. O'Roak BJ, State MW. Autism genetics: strategies, challenges, and opportunities. *Autism Res*. 2008;1:4-17.
30. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007;316:445-9.
31. Weiss LA, Shen Y, Korn JM et al. Autism Consortium: Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008;358:667-75.

32. Risch N, Spiker D, Lotspeich L et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet.* 1999;65:493-507.
33. Weiss LA, Arking DE; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A: A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature.* 2009;461:802-8.
34. Glessner JT, Wang K, Cai G et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* 2009;459:569-73.
35. Shen Y, Dies KA, Holm IA et al. Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2010;125:e727-35.
36. Buxbaum JD. The Genetics of Autism Spectrum Disorders. *Medscape Psychiatry Mental Health.* 2005; <http://www.medscape.com/viewarticle/520013>; 4.10.2010
37. Stornetta RL, Zhu JJ. Ras and Rap Signaling in Synaptic Plasticity and Mental Disorders. *Neuroscientist.* 2010 Apr 29. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20431046.
38. Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D et al. Synapse to Disease Group. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med.* 2009;360:599-605.
39. Limperopoulos C, Bassan H, Sullivan NR et al. Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors. *Pediatrics.* 2008;121:758-65.
40. Braunschweig D, Ashwood P, Krakowiak P et al. Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. *Neurotoxicology.* 2008;29:226-31.
41. Woodruff TJ, Axelrad DA, Kyle AD et al. Trends in environmentally related childhood illnesses. *Pediatrics.* 2004;113:1133-40.
42. Kolevzon A, Gross R, Reichenberg A. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161:326-33.
43. Juul-Dam N, Townsend J, Courchesne E. Prenatal, perinatal, and neonatal factors in autism, pervasive developmental disorder-not otherwise specified, and the general population. *Pediatrics.* 2001;107:63-68.
44. Baird G, Pickles A, Simonoff E et al. Measles vaccination and antibody response in autism spectrum disorders. *Arch Dis Child.* 2008;93:832-7.
45. Fombonne E, Zakarian R, Bennett A et al. Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations. *Pediatrics.* 2006;118:e139-50.
46. Taylor B, Miller E, Lingam R et al. Measles, mumps, and rubella vaccination and bowel problems or developmental regression in children with autism: population study. *BMJ.* 2002;324:393-6.
47. Gerber JS, Offit PA. Vaccines and autism: a tale of shifting hypotheses. *Clin Infect Dis.* 2009;48:456-61.

- 
48. Croen LA, Najjar DV, Fireman B, Grether JK. Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161:334-40.
49. Reichenberg A, Gross R, Weiser M et al. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63:1026-32.
50. Geier DA, Geier MR. A comparative evaluation of the effects of MMR immunization and mercury doses from thimerosal-containing childhood vaccines on the population prevalence of autism. *Med Sci Monit.* 2004;10:PI33-9.
51. Geier D, Geier MR. Neurodevelopmental disorders following thimerosal-containing childhood immunizations: a follow-up analysis. *Int J Toxicol.* 2004;23:369-76.
52. Geier DA, Geier MR. An assessment of the impact of thimerosal on childhood neurodevelopmental disorders. *Pediatr Rehabil.* 2003;6:97-102.
53. Nataf R, Skorupka C, Amet L et al. Porphyrinuria in childhood autistic disorder: implications for environmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;214:99-108.
54. Young HA, Geier DA, Geier MR. Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: an assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink. *J Neurol Sci.* 2008;271:110-8.
55. Clements CJ. The evidence for the safety of thiomersal in newborn and infant vaccines. *Vaccine.* 2004;22:1854-61.
56. Madsen KM, Lauritsen MB, Pedersen CB et al. Thimerosal and the occurrence of autism: negative ecological evidence from Danish population-based data. *Pediatrics.* 2003;112:604-6.
57. Stehr-Green P, Tull P, Stellfeld M et al. Autism and thimerosal-containing vaccines: lack of consistent evidence for an association. *Am J Prev Med.* 2003;25:101-6.
58. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. *JAMA.* 2003;290:1763-6.
59. Heron J, Golding J; ALSPAC Study Team. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United Kingdom does not support a causal association. *Pediatrics.* 2004;114:577-83.
60. Price CS, Thompson WW, Goodson B et al. Prenatal and infant exposure to thimerosal from vaccines and immunoglobulins and risk of autism. *Pediatrics.* 2010;126:656-64.
61. Immunization Safety Review Committee, Board on Health Promotion and Disease Prevention. Institute of Medicine. Immunization Safety Review: Vaccines and Autism. Consensus Report 2004. <http://www.nap.edu/catalog/10997.html>; 22.11.2010
62. U.S. Food and Drug Administration. Thimerosal in Vaccines. Last revised 03/31/2010. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/UCM096228>; 22.11.2010
-

63. Moyer TP. Toxic Metals. In: Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998:982-998.
64. Tsalev D.L. et al. Mercury. In: Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice Vol 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983:158-169.
65. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Mercury. 1999. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>; 18.3.2009
66. WHO 1990. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 101: Methylmercury. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>; 22.11.2010
67. U.S. Environmental Protection Agency. Mercury Study Report to Congress: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. <http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume5.pdf>; 14.11.2006
68. WHO 1976. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 1: Mercury. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc001.htm>; 14.11.2006
69. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health. Organic Mercury. TEACH Chemical Summary. Last revised 10/27/2007. [http://www.epa.gov/teach/chem\\_summ/mercury\\_org\\_summary.pdf](http://www.epa.gov/teach/chem_summ/mercury_org_summary.pdf); 22.11.2010
70. Collaborative on Health and the Environment's Learning and Developmental Disabilities Initiative (2008) LDDI Scientific consensus statement on environmental agents associated with neurodevelopmental disorders. <http://www.iceh.org/pdfs/LDDI/LDDIStatement.pdf>; 20.11.2010
71. Geier DA, Kern JK, Geier MR. The biological basis of autism spectrum disorders: Understanding causation and treatment by clinical geneticists. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2010;70:209-26.
72. Woods JS, Bowers MA, Davis HA. Urinary porphyrin profiles as biomarkers of trace-metal exposure and toxicity: Studies on urinary porphyrin excretion patterns in rats during prolonged exposure to methyl mercury. Toxicol Appl Pharmacol. 1991;110:464-476.
73. Lord RS and Bralley JA. Toxicants and Detoxification. In: Lord RS and Bralley JA: Laboratory Evaluations for Integrative and Functional Medicine, Second Edition, Metamatrix Institute, Duluth, GA, 2008:467-512.
74. Woods JS, Martin MD, Naleway CA, Echeverria D. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. J Toxicol Environ Health. 1993;40:235-46.
75. Pingree SD, Simmonds PL, Rummel KT, Woods JS. Quantitative evaluation of urinary porphyrins as a measure of kidney mercury content and mercury body burden during prolonged methylmercury exposure in rats. Toxicol Sci. 2001;61:234-40.



76. Woods JS. Altered porphyrin metabolism as a biomarker of mercury exposure and toxicity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:210-5.
77. Hernández-Zavala A, Del Razo LM, García-Vargas GG et al. Altered activity of heme biosynthesis pathway enzymes in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Arch Toxicol.* 1999;73:90-5.
78. dos Santos AP, Mateus ML, Carvalho CM, Batoréu MC. Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. *Toxicol Lett.* 2007;169:121-8.
79. WHO 2000. International Programme on Chemical Safety: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants.  
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm>, 20.11.2010
80. Tsalev D.L. et al. Lead. In: *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice Vol 1*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983:137-150.
81. WHO 1995. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>, 18.11.2006
82. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. Lead In: *Air Quality Guidelines, Second Edition*, 2001.  
[http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0020/123077/AQG2ndEd\\_6\\_7Lead.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0020/123077/AQG2ndEd_6_7Lead.pdf); 16.9.2010
83. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Lead. 2007. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp13.pdf>; 11.9.2010
84. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Aluminum. 2008. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>; 20.9.2010
85. WHO 1997. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 194: Aluminium.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm>, 20.9.2010
86. Milne DB. Trace Elements. In: Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds.: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition*, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998:1037-1044.
87. UKPID Monograph: Copper (II) Chloride.  
<http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid53.htm>; 21.9.2010
88. WHO 1998. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 220: Zinc. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>; 21.9.2010
89. Faber S, Zinn GM, Kern JC 2nd, Kingston HM. The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers.* 2009;14:171-80.

- 
90. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Zinc. 2004. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>; 21.9.2010
91. WHO 2001. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 221: Zinc. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc221.htm>; 21.9.2010
92. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Zinc. 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp60.pdf>; 21.9.2010
93. Puy H, Deybach JC. Haem biosynthesis and excretion of porphyrins. In: Rodés J, Benhamou JP, Rizzetto M: Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice, Wiley-Blackwell, 2007:207-214.
94. Nuttall KL. Porphyrins and disorders of porphyrin metabolism. In: Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998:1711-1735.
95. Alves AN, Sumita NM, Burattini MN, Della Rosa HV. Spot urine porphyrins/creatinine ratio profile of healthy Brazilian individuals adjusted for personal habits. Braz J Med Biol Res. 2009;42:700-6.
96. Lainščak M, Kocijančič B. Akutna jetrna porfirija pri sladkornem bolniku. Med Razgl 2003;42:413-417.
97. Echeverria D, Heyer NJ, Martin MD et al. Behavioral effects of low-level exposure to elemental Hg among dentists. Neurotoxicol Teratol. 1995;17:161-8.
98. Lidsky TI, Schneider JS. Autism and Autistic Symptoms Associated with Childhood Lead Poisoning. The Journal of Applied Research. 2005;5:80-87.
99. Lidsky TI, Schneider JS: Autism and autistic symptoms associated with lead poisoning. J. Appl. Res. 2005;5:80-87.
100. Adams JB, Romdalvik J, Ramanujam VM, Legator MS. Mercury, lead, and zinc in baby teeth of children with autism versus controls. J Toxicol Environ Health A. 2007;70:1046-51.
101. Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. Int J Toxicol. 2003;22:277-85.
102. James SJ, Cutler P, Melnyk S et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. Am J Clin Nutr. 2004;80:1611-7.
103. Ewing GW. What is regressive autism and why does it occur? Is it the consequence of multi-systemic dysfunction affecting the elimination of heavy metals and the ability to regulate neural temperature? North American Journal of Medical Sciences. 2009;1:28-47.
104. Desoto MC, Hitlan RT. Blood levels of mercury are related to diagnosis of autism: a reanalysis of an important data set. J Child Neurol. 2007;22:1308-11.
105. Geier DA, Geier MR. A prospective assessment of porphyrins in autistic disorders: a potential marker for heavy metal exposure. Neurotox Res. 2006;10:57-64.

- 
106. Evenson MA. Spectrophotometric techniques. In: Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998:75-93.
107. Tsalev D.L. et al. Mercury. In: Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice Vol 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983:158-169.
108. Ullman MD et al. High-Performance Liquid Chromatography. In: Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998:184-192.
109. Rouessac F, Rouessac A. Chemical analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Chichester, England, 2007:3-30; 63-92.
110. Šuštar MT. Uporaba mikrovalovne pečice pri razklopu polne krvi za analizo živega srebra. Diplomsko delo. Ljubljana, 2007.
111. Horvat M, Mazej D, Snoj Tratnik J et al. Monitoring kemikalij v organizmih 2007-2009. Zaključno poročilo. Delovno poročilo IJS DP – 10523. Institut Jožef Stefan, 2010.
112. Woods JS, Armel SE, Fulton DI et al. Urinary porphyrin excretion in neurotypical and autistic children. Environ Health Perspect. 2010;118:1450-7.
113. Woods JS, Martin MD, Leroux BG, DeRouen TA, Bernardo MF, Luis HS, Leitão JG, Simmonds PL, Rue TC. Urinary porphyrin excretion in normal children and adolescents. Clin Chim Acta. 2009;405:104-9.
114. Russo AJ. Decreased Serum Cu/Zn SOD Associated with High Copper in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Journal of Central Nervous System Disease. 2010;2: 9-14.
115. Geier DA, Kern JK, Garver CR et al. Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. J Neurol Sci. 2009;280:101-8.
116. NCCLS Control of Preanalytical Variation in Trace Element Determinations; Approved Guideline (C38-A), 1997;17:1-30.
117. Prešeren J. Razmerje uroporfirina I proti koproporfirinu III v urinu avtističnih otrok ob sumu na zastrupitev s težkimi kovinami. Diplomsko delo. Ljubljana, 2010.
118. Schulz C, Angerer J, Ewers U et al. Human Biomonitoring Commission of the German Federal Environment Agency. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German environmental survey on children 2003-2006 (GerES IV). Int J Hyg Environ Health. 2009;212:637-47.