

Preiskave porfirinov in encima NAG pri otrocih z avtizmom in drugimi nevrološki motnjami, njihovih starših in sorojencih

Uvod:

Vzroke avtizma se intenzivno preiskuje, saj etiologija še vedno ni ustrezno pojasnjena. Kljub obsežnim raziskavam na genetskem področju pa pri 90% obolelih še vedno niso pojasnjene genetske spremembe, ki bi lahko vplivale na patogenezo avtizma.⁽¹⁾ Vse več je raziskav, ki kažejo na škodljive vplive nekaterih okoljskih dejavnikov^(2,3,4,5) in tudi hitro naraščanje incidence^(6,7) spektroavtističnih motenj (SAM) je znak, da je potrebno bolj preveriti tiste substance, ki so jim otroci v sodobnem svetu bolj izpostavljeni že pred oziroma po rojstvu. Nekateri snovi so že evidentirane, da povzročajo različne nevrološke motnje pri otrocih in v naši raziskavi smo se osredotočili na težke kovine. Woods s sod. (2010) je potrdil, da so frakcije porfirinov neke vrste marker pri avtizmu⁽⁸⁾, saj zelo pogosto pokažejo specifično sliko povišanih nekaterih frakcij (predvsem so to 5 karboksi porfirin, prekopro porfirin in koproporfirin) in podobne rezultate so že opazili pri odraslih, ki so bili poklicno izpostavljeni živemu srebru. V krvi otrok z avtizmom Woods sicer ni našel višjih vrednosti živega srebra kot pri otrocih z normalnim razvojem, kar pa ne preseneča, saj ima živo srebro v krvi razmeroma kratko razpolovno dobo⁽⁹⁾. Na podlagi podatkov o toksikokinetiki živega srebra^(10,11) pa je znano, da je edini pravi test obremenjenosti organizma z živim srebrom le provokacijski test z enim izmed kelatorjev (DMSA, DMPS...). Woods v svoji raziskavi ni izvajal provokacijskega testa, to pa je storil Nataf s sod. (2006), ki je prav tako ugotovil povišane frakcije specifičnih porfirinov pri otrocih z avtizmom⁽³⁾. S provokacijskim testom je Nataf potrdil tudi povišano izločanje živega srebra pri avtističnih otrocih, po opravljenem testu pa znižanje vrednosti posameznih frakcij porfirinov, ki so bile pred tem povišane. Tudi Adams s sod. (2009) je potrdil učinkovitost in varnost DMSA pri otrocih z avtizmom^(12,13) in ugotovil, da terapija z DMSA zelo vpliva na količine glutationa. Praviloma imajo avtistični otroci manjše količine glutationa, samo 3 dnevna terapija z DMSA pa normalizira vrednosti glutationa vsaj za 1 do 2 meseca, ob tem pa se tudi zmanjša jakost nekaterih avtističnih simptomov (govor, socializacija...)

Metode dela:

V maju in juniju 2010 smo zbrali 50 vzorcev urina z namenom, da ocenimo vpliv težkih kovin na nevrološke motnje otrok. V vzorcih urina smo določili frakcije porfirinov, kreatinin in N-acetil-glukozaminidazo (NAG). Celotna skupina je zajemala 50 preiskovancev, od katerega je bilo 12 primerov z avtizmom, 2 primera avtizma v kombinaciji z epilepsijo, 1 primer Downovega sindroma, 1 primer Downovega sindroma v kombinaciji z avtizmom, 1 primer cerebralne paralize, 1 primer cerebralne paralize z epilepsijo, 1 primer težje telesne in duševne motnje, 1 primer težje telesne in duševne motnje z epilepsijo, 1 primer celiakije in 1 primer hiperaktivnosti s poškodbo glave in epilepsijo, ostalo (28) pa so bili njihovi starši, bratje in sestre.

Z določitvijo porfirinov smo želeli ugotoviti eventuelen vpliv težkih kovin iz okolja (predvsem svinec in živo srebro), z določitvijo NAG pa eventuelno stopnjo zmanjšane delovanja ledvic. Z raziskavo pa nismo poskušali pri posameznikih evidentirati virov težkih kovin - amalgamske plombe, kraj bivanja, poklicna izpostavljenost, prehrana, cepiva...

Porfirine smo določili s HPLC metodo, in sicer naslednje frakcije: Uroporfirin, 5 CO porfirin I, 6 CO porfirin I, 7 CO porfirin I, Koproporfirin I in Koproporfirin III.

Povišane vrednosti uroporfirina, koproporfirina I in povišanega razmerja koproI/III so lahko posledica izpostavljenosti arzenu;

Prisotnost 5 CO frakcije, prekroporfirina in koproporfirina (I + III) kaže na verjetnost, da je bil organizem izpostavljen višjim koncentracijam živega srebra (Hg);

Povišane vrednosti aminolevulinske kisline, koproporfirina III, včasih koproporfirina I in Zn protoporfirina kažejo na verjetnost, da je bil organizem izpostavljen svincu (Pb).

V tabeli 1 ni rezultatov za 6 CO porfirin I in 7 CO porfirin I, ker pri nobenem izmed preiskovancev vrednosti niso presegle meje zaznavanja.

Rezultate analiz porfirinov in NAG smo preračunali na kreatinin in zaradi napake pri analizi kreatinina smo izločili iz nadaljnje obdelave podatkov en vzorec, en vzorec pa smo izločili zaradi nepravilno odvzetega vzorca – otrok je pred odvzemom popil preveč tekočine in rezultat ni bil realen. V bodoče bi bilo zaradi tega potrebno bolj natančno predpisati vzorčenje urina (na primer prvi jutranji urin), saj lahko dobimo pri zelo nizkih vrednostih kreatinina v urinu po korekciji rezultatov analiz na kreatinin nerealne vrednosti tako frakcij porfirinov kot tudi NAG.

Ugotovitve:

- prav vsi štirje otroci, ki imajo v urinu prisotno tudi frakcijo 5 karboksi porfirina I, imajo avtizem, dva med njimi tudi epilepsijo
- od petih primerov epilepsije samo ena deklica ni imela povišanih porfirinov
- vsi otroci, ki imajo povišane vrednosti encima NAG, imajo tudi povišane porfirine
- od vseh odraslih imajo samo trije starejši od 40 let povišane vrednosti encima NAG, vendar brez povišanih porfirinov
- nihče od otrok z normalnim razvojem ni imel povišanih vrednosti NAG
- med moškimi s povišanimi porfirini (razvrstitev glede na Koproporfirin III) so na prvih osmih mestih samo fantki z avtizmom (7) in hiperaktivnostjo (1) in med njimi so vsi trije, ki imajo tudi epilepsijo
- med ženskami s povišanimi porfirini (razvrstitev glede na Koproporfirin III) so zanimive prve štiri na lestvici: prva je mama otroka z avtizmom in Downovim sindromom, ki je odraščala v Mežici, druga je deklica s težjo duševno in telesno motnjo in epilepsijo, tretja je njena mama, četrta je deklica s celijakijo
- deklica z Downovim sindromom je imela od vseh najbolj povišan uroporfirin 1, vendar pa drugih frakcij ni imela povišanih, zato nekako izstopa
- eden od avtističnih otrok je na predlog DAN zdravnika že opravil detoksifikacijo, v naši tabeli je med tistimi, ki imajo najnižje vrednosti porfirinov, njegov vzorec pa je bil istočasno poslan tudi na analizo porfirinov v Francijo, od koder je prišel izvid, ki tudi ugotavlja normalne vrednosti porfirinov

Tabela 1: Rezultati analiz

Zap. št.	Spol	Letnik	Kreatinin	NAG	Uroporfirin	5CO porfirin I	Koproporfirin I	Koproporfirin III
1.	m	2000	17,8	7,25	2,0317	0,2940	5,7450	23,5484
38.	m	2002	1,91	8,07	0,0000		3,0398	19,6139
37.	m	2002	5,02	1,97	0,0000		2,0096	9,0440
2.	m	1997	17,6	3,95	2,3084	0,1205	2,6620	8,7465
12.	m	1998	11	9,48	1,8708		2,8689	7,2512
4.	m	2000	6,89	7,21	1,1048	0,1238	1,9525	6,9210
3.	m	2002	7,29	4,09	1,3875	0,1955	1,5854	6,3266
9.	m	1996	10,6	3,78	2,2176		1,5181	5,7139
21.	m	1959	6,71	1,47	1,5679		2,4148	5,6849
24.	m	1969	5,22	1,90	1,8932		2,1764	5,2587
14.	m	1993	10,3	2,89	1,4605		1,5094	4,7482
19.	m	1998	11,4	2,61	1,0888		1,4243	3,3589
13.	m	1964	14,5	2,20	1,3858		1,5792	2,9314
28.	m	1983	9,17	4,38	0,9137		1,8104	2,7272
8.	m	1989	19,6	3,55	1,2705		1,2933	2,6671
17.	m	1996	5,85	15,31	2,1558		2,9114	2,5854
6.	m	1991	32,6	2,91	0,9341		1,3833	2,3826
7.	m	1976	18,8	4,71	1,4141		0,8241	2,3760
42.	m	2005	7,54	3,20	0,0000		0,3293	1,3797
43.	m	1999	8,05	4,99	0,0000		0,4473	1,1695
27.	m	1970	5,64	5,29	1,6314		0,7508	1,1512
41.	m	1967	12	4,70	0,0000		0,4492	1,0078
29.	m	1973	9,15	5,43	0,9101		0,3626	0,9772
31.	m	1947	14,6	2,76	0,5324		0,2949	0,8212
10.	m	2004	15,1	3,30	1,4670		0,1778	0,5660
33.	m	2006	17	4,27	0,3060		0,0866	0,5135
30.	m	1940	10,2	10,76	0,7915		0,1645	0,3405
45.	m	1965	18,8	3,00	0,0000		0,1052	0,3279
48.	m	2001	12,7	4,42	0,0000		0,0000	0,3086
49.	m	1969	16,7	3,38	0,0000		0,1232	0,2299
16.	m	1978	18,8	4,77	0,6735		0,0581	0,1738
5.	ž	1978	23,6	5,17	1,8808		2,3989	8,2505
25.	ž	1994	5,73	15,63	1,7142		2,3600	7,4639
40.	ž	1965	2,78	10,72	0,0000		2,6171	5,8194
23.	ž	1990	7,35	1,35	1,3796		1,6069	4,8111
36.	ž	1995	2,85	3,86	0,2011		1,2747	4,3961
11.	ž	1996	16,7	4,16	1,3157		1,3881	4,3945
47.	ž	1974	1,33	7,45	0,0000		0,9940	4,1099
39.	ž	1974	9,36	4,29	0,0000		2,1065	3,4892
32.	ž	1953	6,80	5,92	0,8686		1,3899	2,1614
22.	ž	1993	4,18	5,77	2,4592		1,5396	1,9375
26.	ž	1963	7,15	4,17	1,3110		0,8385	1,5393
20.	ž	1968	12,9	15,61	0,8748		0,6668	1,0729
34.	ž	1973	10,6	4,67	0,3295		0,6807	1,0498
44.	ž	1964	14,3	1,69	0,0000		0,2278	0,5904
18.	ž	2000	19	6,12	0,6611		0,1614	0,4909
46.	ž	1997	13,7	5,29	0,0000		0,5982	0,4393
50.	ž	1969	17,9	3,15	0,0000		0,0359	0,1416

Glede na rezultate opravljenih analiz bi bilo smiselno opraviti še nekatere dodatne preiskave: ⁽¹⁰⁾

- pri otrocih s povišanim celokupnim NAG v urinu dodatno poleg celokupnega NAG opraviti še analizo deleža NAG-B, alfa -1 mikroglobulin in albumin ter šele na osnovi teh rezultatov opraviti krvne preiskave krvi za oceno funkcije ledvic (sečnina, kreatinin, MDRD, CRP)

- pri otrocih s povišanimi frakcijami porfirinov v urinu še analizo živega srebra v urinu in laseh ter analizo svinca in kadmija v krvi

- pri celotni skupini oseb z SAM analizo reduciranega in oksidiranega glutationa (in njuno razmerje) v eritrocitih in levkocitih, antioksidativnih encimov v eritrocitih (katalaze, Gpx, SOD) ter določitev vsebnost metionina, SAM, SAH, homocisteina in cisteina v plazmi.

Zaključek:

Podobno kot že nekateri prej^(3,8,12,14,15,16,17), smo tudi v tej raziskavi ugotovili povišane vrednosti nekaterih frakcij porfirinov pri otrocih z avtizmom, kar naj bi pomenilo večjo obremenjenost z nekaterimi težkimi kovinami – predvsem živim srebrom in svincem. Poleg tega pa so imeli otroci z nevrološkimi težavami pogosto povišane tudi vrednosti tubulnega encima NAG, ki je običajno povezan z motnjo delovanja tubulne funkcije ledvic zaradi vpliva zlasti živega srebra in kadmija.

Glede na majhno število preiskovancev bi bilo potrebno za potrditev rezultatov opraviti obširnejšo raziskavo na večji skupini preiskovancev in z obširnejšim naborom preiskav.

Raziskavo je financiralo Združenje bodi ZDRAV.

Reference:

1. Pinto D s sod.: Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010 Jul 15;466(7304):368-72.
2. 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.
3. Nataf R s sod.: Porphyrinuria in childhood autistic disorder: Implication for environmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 214: 99–108.
4. Kern JK s sod.: Sulfhydryl-reactive metals in autism. *J Toxicol Environ Health* 70:715-721.
5. Windham GC s sod.: Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the San Francisco Bay Area. *Environ Health Perspect* 114:1438-1444.
6. Kogan MD s sod.: Prevalence of Parent-5. Reported Diagnosis of Autism Spectrum Disorder Among Children in the US, 2007. *Pediatrics* Vol. 124 No. 5 November 2009, pp. 1395-1403
7. Hertz-Picciotto I, Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology*. 2009 Jan;20(1):84-90.
8. Woods JS s sod.: Urinary Porphyrin Excretion in Neurotypical and Autistic Children. *Environ Health Perspect*. 2010 Oct;118(10):1450-7
9. Pichichero ME s sod.: Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. *J Pediatr*. 2009 Oct;155(4):495-9.
10. Kopal AB: Možni vpliv živega srebra na patogenezo avtizma. *Zdrav Vestn* 2009; 78.

11. Burbacher TM s sod.: Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. *Environ Health Perspect* 113:1015-1021.
12. Adams JB s sod.: Safety and efficacy of oral DMSA therapy for children with autism spectrum disorders: Part A - medical results. *BMC Clin Pharmacol*. 2009 Oct 23;9:16.
13. Adams JB s sod.: Safety and efficacy of oral DMSA therapy for children with autism spectrum disorders: Part B - behavioral results. *BMC Clin Pharmacol*. 2009 Oct 23;9:17.
14. Austin DW, Shandley K.:An investigation of porphyrinuria in Australian children with autism. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(20):1349-51.
15. Geier DA s sod.: A prospective blinded evaluation of urinary porphyrins verses the clinical severity of autism spectrum disorders. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(24):1585-91.
16. Youn SI s sod.: Porphyrinuria in Korean children with autism: correlation with oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A*. 2010 Jan;73(10):701-10.
17. Kern JK s sod.: Toxicity Biomarkers in Autism Spectrum Disorder: A Blinded Study of Urinary Porphyrins. *Pediatr Int*. 2010 Jul 4.