

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE PREŠEREN

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE PREŠEREN

**RAZMERJE UROPORFIRINA I PROTI KOPROPORFIRINU III V
URINU AVTISTIČNIH OTROK OB SUMU NA ZASTRUPITEV S
TEŽKIMI KOVINAMI**

**UROPORPHYRIN I VERSUS COPROPORPHYRIN III RATIO IN
URINE OF AUTISTIC CHILDREN AT SUSPICION OF HEAVY
METAL POISONING**

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal v podjetju Kobis d.o.o., kjer so mi posredovali tudi vse kromatografske meritve in rezultate, ki sem jih uporabil v svoji diplomski nalogi.

Na tem mestu bi se rad zahvalil svojemu mentorju prof.dr. Jošku Osredkarju in somentorici spec. Alenki France Štiglic za vso pomoč, ki sta mi jo s svojim strokovnim znanjem nudila pri izdelavi te diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Kliničnemu inštitutu za klinično kemijo in biokemijo za posredovane meritve, ki so jih opravili in dr. Iztoku Grabnarju za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja in somentorstvom spec. Alenke France Štiglic.

Ljubljana, september 2010

Predsednik diplomske komisije: prof .dr. Marija Sollner Dolenc

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar

Somentor: spec. Alenka France Štiglic

Član diplomske komisije: asist. dr. Igor Locatelli

VSEBINA DIPLOMSKE NALOGE

| | |
|---|----|
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 SPEKTER AVTISTIČNIH MOTENJ..... | 1 |
| 1.1.1 Avtizem na splošno..... | 1 |
| 1.1.2 Zgodovina avtizma..... | 1 |
| 1.1.3 Avtizem..... | 3 |
| 1.1.4 Aspergerjev sindrom..... | 4 |
| 1.1.5 Rettov sindrom..... | 4 |
| 1.1.6 Pervazivne motnje razvoja, ki niso drugače opredeljene..... | 5 |
| 1.1.7 Spremljajoča stanja..... | 5 |
| 1.1.8 Prevalenca avtizma..... | 6 |
| 1.1.9 Etiologija avtizma..... | 6 |
| 1.1.10 Vplivi za nastanek avtizma..... | 7 |
| 1.1.10.1 Genetski vplivi..... | 7 |
| 1.1.10.2 Živo srebro..... | 8 |
| 1.1.10.3 Cepiva..... | 8 |
| 1.1.10.4 Vpliv prehrane..... | 9 |
| 1.1.11 Diagnoza..... | 10 |
| 1.1.11.1 DSM..... | 10 |
| 1.1.12 Ostale težke kovine..... | 11 |
| 1.1.12.1 Svinec..... | 11 |
| 1.1.12.2 Aluminij..... | 12 |
| 1.1.12.3 Cink..... | 13 |
| 1.1.12.4 Baker..... | 13 |
| 1.2 PORFIRINI..... | 14 |
| 1.2.1 Zgradba porfirinov..... | 14 |
| 1.2.2 Biosinteza porfirinov in hema..... | 16 |
| 1.3 HPLC..... | 19 |
| 1.3.1 Delovanje..... | 19 |
| 1.3.2 Način detekcije..... | 20 |
| 2 NAMEN DELA..... | 21 |
| 3 MATERIALI IN METODE..... | 22 |
| 3.1 MATERIALI..... | 22 |
| 3.1.1 Vzorci..... | 22 |
| 3.1.1.1 Predobdelava vzorca – Zbiranje in shranjevanje vzorcev urina..... | 23 |
| 3.1.2 Reagenti..... | 23 |
| 3.1.3 Instrumenti..... | 24 |
| 3.2 METODA..... | 24 |
| 3.2.1 Opis metode..... | 24 |
| 3.2.2 Diferencialno določanje porfirinov v urinu..... | 25 |
| 3.2.3 Podatki metode..... | 26 |
| 3.2.3.1 Linearnost..... | 26 |
| 3.2.3.2 Limita določanja..... | 26 |
| 3.2.3.3 Limita detekcije..... | 26 |
| 3.2.3.4 Retencijski časi..... | 26 |
| 4 EKSPERIMENTALNO DELO..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.1 Dodajanje IS/Stabilizacija..... | 27 |
| 4.2 Stabilnost predobdelanih vzorcev | 27 |
| 4.3 HPLC pogoji | 27 |
| 4.3.1 Mobilna faza | 27 |
| 4.3.2 Avtovzorčnik..... | 27 |
| 4.3.3 Črpalka | 28 |
| 4.3.4 Analitična kolona | 28 |
| 4.3.5 Varovalna kolona | 28 |
| 4.3.6 Detektor..... | 28 |
| 4.3.7 Testna analiza..... | 29 |
| 4.3.8 HPLC analiza | 29 |
| 4.3.9 Kalibracija | 29 |
| 4.3.10 Izračun..... | 29 |
| 4.3.10.1 Splošno | 29 |
| 4.3.10.2 Avtomatiziran izračun | 30 |
| 4.3.10.3 Ročni izračun..... | 30 |
| 4.3.10.3.1 Metoda internega standarda..... | 30 |
| 4.3.10.5 Pretvorba molarnosti | 31 |
| 4.3.11 Statistična obdelava..... | 31 |
| 5 REZULTATI | 32 |
| 5.1 KROMATOGRAMI..... | 35 |
| 6 RAZPRAVA..... | 37 |
| 7 SKLEP..... | 41 |
| 8 LITERATURA | 43 |

KAZALO TABEL

| | |
|--|----|
| Tabela I: Podatki o otrocih..... | 22 |
| Tabela II: Komponente..... | 23 |
| Tabela III: Ocenjeni retencijski časi za posamezne frakcije porfirinov..... | 26 |
| Tabela IV: Čas in odstotek mobilne faze..... | 28 |
| Tabela V: Faktorji za pretvorbo molarnosti..... | 31 |
| Tabela VI: Kontrolna skupina – porfirini..... | 32 |
| Tabela VII: Skupina avtizem – porfirini..... | 32 |
| Tabela VIII: Osnovni statistični podatki za porfirine v obeh skupinah in skupaj..... | 33 |
| Tabela IX: Interval zaupanja in p-vrednost za porfirine..... | 33 |
| Tabela X: Statistični podatki za težke kovine v obeh skupinah in skupaj..... | 34 |
| Tabela XI: Interval zaupanja in p-vrednost za težke kovine..... | 34 |
| Tabela XII: Retencijski časi posameznih frakcij v standardni raztopini..... | 35 |
| Tabela XIII: Retencijski časi posameznih frakcij v urinskem kalibratorju..... | 36 |
| Tabela XIV: Referentne vrednosti za porfirine v urinu..... | 38 |
| Tabela XV: Referentne vrednosti za težke kovine..... | 39 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Struktura porfina..... | 15 |
| Slika 2: Potek biosinteze hema..... | 18 |
| Slika 3: Slikovna predstavitev aparata HPLC..... | 19 |
| Slika 4: Kromatogram urina zdrave osebe..... | 25 |
| Slika 5: Kromatogram urina osebe z akutno intermitentno porfirijo..... | 25 |
| Slika 6: Kromatogram urina osebe z variegated porfirijo..... | 25 |
| Slika 7: Kromatogram urina osebe z kongenitalno eritropoetično porfirijo..... | 25 |
| Slika 8: Kromatogram standardne raztopine..... | 35 |
| Slika 9: Kromatogram urinskega kalibratorja..... | 36 |

POVZETEK

Avtizem je vseživljenjska razvojna motnja. Je del spektra, ki ga imenujemo spekter avtističnih motenj ali na kratko SAM. Beseda "spekter" se uporablja, ker imajo vse osebe z avtizmom težave na treh glavnih področjih. Ampak se le te pri vsakem posamezniku izražajo drugače in na posameznika vplivajo na drugačne načine. Avtizem ni bolezen ampak sindrom, ki ga povzroča več negenetskih in genetskih dejavnikov.

Da bi določili kako onesnaženo okolje vpliva na SAM, je bilo narejenih že več študij o obremenitvi telesa s težkimi kovinami. Porfirini, derivati pri sintezi hema, predstavljajo neodvisen indikator o povečani izpostavljenosti. Proizvodnja hema poteka 85% v celicah eritroidne vrste, ostalo pa v jetrih in ledvicah. Sinteza hema poteka v dveh korakih iz sukcinil koencima A in glicina do uroporfirinogena in v nadaljni seriji korakov preko pentakarboksiporfirinogena in koproporfirinogena v hem. Odvečni porfirinogeni metaboliti se izločijo v urin kot oksidirani porfirini.

V študiji je sodelovalo 32 otrok, od katerih smo zbrali vzorce urina in jih razdelili v dve skupini glede na diagnozo. Prva je kontrolna skupina, ki vključuje otroke z drugimi nevrološkimi motnjami, druga pa je skupina avtizem, v kateri so otroci z diagnozo avtizem ali Aspergerjev sindrom. Vključeni so otroci obeh spolov starosti od >1 do 15 let. Skupini smo med seboj statistično primerjali glede na vsebnosti porfirinov v urinu in težkih kovin v krvi ali serumu.

Rezultati meritev porfirinov v urinu kažejo pomemben delež odstopanj nad zgornjo in spodnjo mejo referentnih vrednosti v obeh skupinah. Razmerje uro I/kopro III je povišano pri 26 od 32 otrok (81,25%), od teh 8 (61,54%) iz kontrolne skupine in 18 (94,74%) iz skupine avtizem. To nakazuje da je to pomemben podatek pri otrocih z nevrološkimi motnjami, še posebno pri otrocih z SAM. Pri meritvah težkih kovin v serumu ali krvi pa smo zaznali le minimalna odstopanja iz katerih se ne da sklepati kakršnekoli povezave med porfirinskimi vrednostmi.

Statistična obdelava podatkov za porfirine in težke kovine ne kaže statistično pomembne razlike ($p > 0,05$) med skupinama.

ABSTRACT

Autism is a lifelong neurodevelopmental disorder. It is a part of the spectrum called autism spectrum disorder or ASD. Every person with autism has difficulties in three main areas but the symptoms and behaviour vary from each individual, that's why the word "spectrum" is used. Autism is not a disease but a syndrome that is caused by multiple genetic and nongenetic factors.

There have been many studies performed on heavy metal toxicity to determine how environmental pollutants contribute to ASD. Porphyrins are derivatives of heme synthesis and represent an independent indicator of heavy metal burden. Heme synthesis mainly occurs in erythroid cells and also in liver and kidneys. It is performed by two steps from succinyl coenzyme A and glycine to uroporphyrinogen and in further series of steps from pentacarboxyporphyrinogen and coproporphyrinogen into heme. Redundant porphyrinogenic metabolites are excreted into urine as oxidized porphyrins.

Our study includes 32 children. Their urine was collected and they were divided into two groups. One is the control group that includes children with other neurological disorders and second is the autism group that includes children with autism and Asperger's disorder. Children are male and female, aged from >1 to 15 years. We statistically compared the two groups for the values of porphyrins in urine and heavy metals in blood or serum.

Results of porphyrin levels in urine show significant deviation both above and below the reference values in both groups. URO I/COPRO III ratio is increased in 26 of 32 children (81,25%), of which 8 (61,54%) are in control group and 18 (94,74%) are in autism group. This shows to be an important data for children with neurodevelopmental disorders specially for children diagnosed with ASD. Determination of heavy metals in whole blood or serum showed only minimal deviation that do not suggest any relation to porphyrin levels.

Statistical data processing of porphyrin and heavy metal results shows no statistical significance ($p > 0,05$) between our groups.

SEZNAM OKRAJŠAV

- Al – aluminij
- ALA – aminolevulinska kislina
- AS – Aspergerjev sindrom
- ASA – Združenje ameriških psihiatrov
- ASD – autism spectrum disorder
- CDC – Center for Disease Control and Prevention
- Co-A – koencim A
- CPOX – koproporfirinogen oksidaza
- Cu – baker
- DMPS – dimerkapto-propansulfatna kislina
- DMSA – dimerkaptosukcinilna kislina
- DSM-IV – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
- EDTA – etilendiamin tetraacetna kislina
- EPA – Environmental Protection Agency
- Fe – železo
- HDL – high-density lipoprotein
- Hg – živo srebro
- HPLC – visokoločljivostna tekočinska kromatografija
- ICD-10 – mednarodna klasifikacija bolezni
- IOM – Institute of Medicine

IS – interni standard

MeCP2 – gen za metil-CpG-vezavni protein 2

MMR – measles, mumps and rubella

NHANES – National Health and Nutritional Examination Survey

Pb – svinec

PMR – pervazivne motnje razvoja

ppm – part per million

REC – izkoristek

SAM – spektroavtistične motnje

UROD – uroporfirinogen dekarboksilaza

USDA – U. S. Department of Agriculture

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija

Zn – cink

ZPP – cinkov protoporfirin

1 UVOD

1.1 SPEKTER AVTISTIČNIH MOTENJ

1.1.1 Avtizem na splošno

Avtizem je vseživljenjska razvojna motnja. Je del spektra, ki ga imenujemo spekter avtističnih motenj ali na kratko SAM. Beseda "spekter" se uporablja, ker imajo vse osebe z avtizmom težave na treh glavnih področjih. Ampak se le te pri vsakem posamezniku izražajo drugače in na posameznika vplivajo na drugačne načine. Medtem, ko so nekateri ljudje z avtizmom sposobni živeti relativno "vsakdanje" življenje, potrebujejo drugi strokovno pomoč celo življenje (1). Avtizem prizadane vse socialno-ekonomske sloje, etnične sloje in rase (2).

Pod SAM spadajo:

- avtizem
- Aspergerjev sindrom
- Rettov sindrom
- Pervazivne motnje razvoja, ki niso drugače opredeljene

1.1.2 Zgodovina avtizma

V zgodnjih 1940-ih letih sta Leo Kanner in Hans Asperger, takrat pionirja na področju avtizma, uporabila izraz "avtizem" in "avtističen" (neodvisno drug od drugega) in tako je bila ta oznaka rojena. Izraz prihaja iz grške besede: autos, ki pomeni samo-svoj. Kanner je

uporabil izraz, da bi opisal otroke s klasičnim avtizmom, medtem ko je Asperger opisoval bolj sposobne in inteligentne posameznike. Mnogo pozneje, je Dr. Lorna Wing iz Velike Britanije uporabila izraz Aspergerjev sindrom, da bi definirala bolj sposobne individualiste z avtizmom (3).

V 50-ih in 60-ih letih so v glavnem verjeli, da so otroci, ki imajo avtizem, shizofreniki. To pomanjkanje razumevanja je vodilo v to, da so mnogi starši verjeli, da so oni krivi za stanje svojih otrok. V večini primerov se je celo verjelo, da je izvor avtizma "hladna, neskrbna mati", ki vodi otroke v duševno izolacijo. Takšno razmišljanje se je sprejelo na osnovi mnenja dr. Bruna Bettelheima, enega prvih otroških razvojnih strokovnjakov, ki se je osredotočil na avtizem (4).

V letu 1964, je Bernard Rimland, psiholog in oče avtističnega otroka napisal knjigo: *Infantile autism: The syndrome and its Implications for a Neural Theory of Behavior*. V tej knjigi Rimland zatrjuje, da je avtizem biološka motnja in ne čustvena oziroma duševna prizadetost. Ta knjiga je spremenila način, na katerega so do takrat dojemali avtizem in je imela ogromen vpliv na prihodnje metode zdravljenja za ljudi z avtizmom in povezanimi motnjami (3).

Leta 1977 sta dr. Susan Folstein in dr. Michael Rutter objavila prvo študijo dvojčkov z avtizmom in s tem potrdila, da ima avtizem tudi gensko osnovo. Leta 1991 so dr. Catherine Lord, dr. Michael Rutter in dr. Ann LeCouteur objavili *Autism Diagnostic Interview*. Leta 1992 je Združenje ameriških psihiatrov (ASA) izdalo *Diagnostični in statistični priročnik (DSM-IV)*, v katerem so bili določeni kriteriji za diagnosticiranje avtistične motnje. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je podoben priročnik izdala leta 1993, ki ga poznamo kot *Mednarodna klasifikacija bolezni (ICD-10)* (4).

1.1.3 Avtizem

Otroci, ki se normalno razvijajo, so socialna bitja, ki opazujejo ljudi okoli sebe, oponašajo zvoke, se smeji. Prizadetost na socialnem področju se pri otrocih z avtizmom kaže z negledanjem v oči, neprepoznavanjem neverbalnih gest, kot je npr. kazanje s prstom. Mlajši avtistični otroci se igrajo na drugačen način kot tisti, ki se normalno razvijajo. Ponavadi se manj igrajo in pretvarjajo in kažejo manj interesa. Ko rastejo, otroci z avtizmom pogosto ne razvijejo normalnega odnosa s sovrstniki in se čustveno ne odzivajo na druge. Med odraščanjem ne pridobijo socialnega zavedanja in s tem lahko zgledajo kot izolirani od sveta. Zelo malo kažejo čustva in tudi ne kažejo zaznavanja ljudi okoli sebe. Včasih se obnašajo socialno neprimerno, npr. vprašajo debelo osebo, zakaj je debela. Prizadetost pri komunikaciji se pri avtistih kaže v tem, da pozno razvijejo govor ali pa ga sploh ne. Pri posameznikih, ki razvijejo govor, pa je ta zelo omejen, pogosto ponavljajo stvari in sprašujejo vedno isto vprašanje. Večina avtističnih otrok, ki delno razvijejo govor, težko povejo, kaj potrebujejo oz. želijo, in to jih lahko privede v frustracije, tesnobo ali celo napad jeze.

Prizadetost se kaže tudi v posebnih interesih, obnašanju in aktivnostih, ki jih imajo avtistični otroci. Lahko so zavzeti za določene stvari, ki so za druge postranskega pomena, pogosto tudi prikazujejo ponavljajoče igre, kot npr. razvrščanje igrač po določenem vrstnem redu. Mnogo avtističnih otrok ima ponavljajoče motorične posebnosti, kot so določeni gibi z rokami. Zelo so odvisni od rutine in ustaljenih vzorcev v vsakodnevem življenju, od katerih ne morejo odstopati in spremembe so za njih lahko zelo stresne situacije (3).

Avtizem se pri vsakem posamezniku kaže drugače, vendar pa imajo vsi ljudje z avtizmom težave na treh glavnih področjih, ki jih na kratko imenujemo "triada primanjkljajev".

Ta področja so:

- težave s socialno komunikacijo (verbalno in neverbalno)
- težave s socialno interakcijo
- težave na področju fleksibilnosti mišljenja (4).

Pomanjkanja, ki se kažejo pri avtizmu, vplivajo na vse vidike otrokovega življenja in na življenje njegove družine (3).

1.1.4 Aspergerjev sindrom

Otroci z Aspergerjevim sindromom (AS) imajo veliko skupnega z otroki z avtizmom, nimajo pa zaostanka pri razvoju govora. Čeprav po diagnosticiranju po DSM-IV nimajo govorne prizadetosti, je jasno, da ti otroci nimajo normalnega oz. tipičnega govora. Značilno je tudi, da imajo povprečne ali nadpovprečne intelektualne sposobnosti. Socialno otroci z AS niso odtujeni tako kot avtistični otroci, vendar reagirajo z drugimi na nenavaden ali ekscentričen način. Spoprijateljijo se s sovrstniki, ampak v prijateljstvu se še vedno kažejo težave zaradi njihovega nelagodja in nerazumljenosti s strani vrstnikov. Pri pogovoru so nagnjeni k temu, da govorijo le o stvareh, ki jih zanimajo. Ne naučijo se spoznati "pravil" interakcije, zaradi česar tudi ne razumejo šal in metafor med pogovorom, kar jih lahko privede do občutkov izolacije in sramote. Ti otroci imajo monoton in nečustven način govora, kažejo obsedenost z določenimi temami in pogosto ponavljajo vprašanja.

Za stvari, ki jih interesirajo, se intenzivno zanimajo in bi radi vedeli prav vse o tej določeni stvari. Npr. otrok bi rad zvedel absolutno vse o kolesih – od tega kako so zgrajeni, kdo je bil prvi, ki ga je izdelal, do sestave vsakega kolesa, ki obstaja.

Otroci z AS lahko kažejo ekscentrično obnašanje, imajo slabo motorično koordinacijo, starši pa jih pogosto opisujejo kot nerodne (3).

1.1.5 Rettov sindrom

Rettov sindrom spada med pervazivne motnje razvoja (PMR) in se včasih zamenja z avtizmom, še posebej v zgodnjih (predšolskih) letih otroka, čeprav je začetek in potek tega

stanja zelo značilen. Otroci z Rettovim sindromom se v samem začetku normalno razvijajo. Ponavadi se v prvih mesecih življenja upočasni rast glave in pojavi se pomanjkanje namenskih gibov z rokami. Tipično se začne kazati tudi močna mentalna retardacija, motnje v motoričnih sposobnostih in stereotipni gibi z rokami. Literatura v glavnem navaja pojav te motnje pri punčkah (5).

1.1.6 Pervazivne motnje razvoja, ki niso drugače opredeljene

Stanja, ki spadajo pod PMR (kamor spada tudi avtizem) in jih ne moremo drugače diagnosticirati spadajo pod SAM in jih včasih imenujemo tudi "atipični avtizem". Pervazivne motnje razvoja, ki niso drugače opredeljene, je diagnoza po DSM-IV, ki opredeljuje otroke, ki imajo težave v socialnih odnosih, komunikaciji in/ali stereotipne vzorce obnašanja in interese. Za diagnozo ni postavljenih točnih meril in je opredeljena zgolj implicitno. Ti otroci pa ne izpolnjujejo vseh pogojev za diagnozo avtizem. Za njih je značilno, da težje navežejo stik z vrstniki, so nenavadno občutljivi, nekatere socialne večine in intelektualne zmožnosti pa so prizadete v manjši meri in manj pogosto, kot pa pri klasičnih avtistih. Zaradi pomanjkanja informacij in znanja o njihovem stanju pridejo ti otroci relativno pozno do zdravstvene pomoči.

1.1.7 Spremljajoča stanja

Mnogo posameznikov z SAM ima tudi druge zdravstvene težave:

- Nevrološke motnje vključno z epilepsijo
- Prebavno-črevesne težave, včasih izredno hude
- Porušen imunski sistem
- Nerazvite fine in grobe motorične spretnosti
- Anksioznost in depresija... (6)

1.1.8 Prevalenca avtizma

Mnogo let je bilo prisotno mišljenje, da je avtizem redka motnja, ki je prisotna pri okoli 4 do 5 na 10.000 otrok. Poročila prevalence iz 80-ih in 90-ih pa nakazujejo, da je prisotnost veliko bolj pogosta, pri okoli 30 do 60 na 10.000 otrok. Od teh pa jih okoli četrtina (10 do 20 na 10.000) izpolnjuje kriterije za pravi avtizem. Ta porast je postala zaskrbljujoča za mnoge, ki so se začeli ukvarjati s tem, zakaj je otrok z SAM vedno več. Da bi ugotovili pravo prevalenco so na ameriškem centru za nadzor bolezni (Center for Disease Control and Prevention – CDC) izvedli študijo pri 8 letnih otrocih iz 14 držav v Ameriki. Rezultati raziskav so pokazali, da 1 od 150 otrok živi z SAM. Ta statistični podatek velja za pravo prevalenco pri večini strokovnjakov za avtizem v Ameriki.

Pri uporabi tega podatka CDC pravi, da lahko sklepamo, če se v ZDA vsako leto rodi 4 milijone otrok, jih bo 24.000 eventuelno diagnosticiranih z SAM. Če je ta podatek konstanten za zadnji dve desetletji potem računajo, da je okoli 500.000 oseb od rojstva do 21 leta starosti obolelih z SAM. Po teh podatkih je SAM na drugem mestu med razvojnimi motnjami, takoj za intelektualno prizadetostjo (7). Razmerje med prizadetimi fantki in pučkami je 3:1.

Nekateri viri govorijo celo o 556 % porasti prisotnosti avtizma od leta 1991 do 1997 (8).

Podatki z diagnosticiranjem po DSM-IV kažejo prisotnost Rettovega sindroma pri 3,8 na 10.000 deklic (5).

O pravi prevalenci in porastu SAM pa vsi strokovnjaki niso enotnega mnenja (7).

1.1.9 Etiologija avtizma

Avtizem ni bolezen ampak sindrom, ki ga povzroča več negenetskih in genetskih dejavnikov. Pri Rettovem sindromu je znana mutacija v genu za metil-CpG-vezavni protein 2 (MeCP2). Za druge motnje (avtizem, AS, PMR, ki niso drugače opredeljene) pa

ni odkritega genetskega ali negenetskega vzroka. Iz literature je možno razbrati, da na pojav SAM lahko vpliva več med seboj povezanih genetskih faktorjev. Epidemiološke študije nakazujejo tudi na vpliv okoljskih strupov (težke kovine), teratogenov, perinatalnih vplivov in prenatalnih okužb (citomegalovirusi). Nekateri pripisujejo del krivde tudi preventivnim cepljenjem (vakcinam).

Avtizem je pogost pri tuberozni sklerozi in sindromu fragilnega X kromosoma, vendar ta dva primera skupaj z še nekaterimi redkimi boleznimi nimajo velikega deleža pri celotni avtistični populaciji (manj kot 10 %) (8).

1.1.10 Vplivi za nastanek avtizma

1.1.10.1 Genetski vplivi

Zaradi razmerja 3:1 med prizadetimi fantki in punčkami so izključili možnost dedovanja z X kromosomom. Če je v družini avtistični otrok je možnost, da bodo nadaljnji otroci prizadeti okoli 2 do 8 %. To je veliko več kot prevalenca med celotno populacijo in zelo malo za bolezni, ki se dedujejo z enim genom. Raziskave pri dvojčkih poročajo o 60 % složnosti za klasičen avtizem pri monozigotnih dvojčkih in 0 pri dvozogotnih. Delež 60 % kaže, da je lahko genetski vpliv dominanten v teh primerih.

Obstajajo prepričljivi dokazi, da se "idiopatični" avtizem podeduje. Statistični podatki nakazujejo, da je vzrok za "idiopatični" avtizem interakcija med večimi geni, vendar epigenetični faktorji in izpostavljenost okoljskim vplivom prispevajo k variabilnem izražanju avtističnih značilnosti (8).

1.1.10.2 Živo srebro

Živo srebro je zelo razširjeno in neprestano prisotno v našem okolju. Izpostavljenost škodljivim koncentracijam Hg lahko povzroči stalne nevrološke in renalne prizadetosti. Del elementarnega Hg in anorganskega Hg (večinoma kot Hg^{2+} soli), ki se spusti v zrak ali vodo se s pomočjo mikroorganizmov metilira in akumulira v tkivih živali. Z dvigovanjem po prehranjevalni verigi se koncentracija Hg zvišuje. Iz tega vidika smo ljudje najbolj izpostavljeni Hg z uživanjem rib. Zastrupitev je najbolj zaskrbljujoča pri ženskah v rodni letih, ker je fetus zelo občutljiv na škodljive učinke Hg. Poleg Hg v okolju smo mu izpostavljeni tudi preko nekaterih zdravil, kjer je prisotno tako v organski kot v ionski Hg^{2+} obliki. V teh dveh oblikah je prisotno v zdravilih za oči, ušesa, nos, grlo in kožo; prav tako se pojavlja tudi v belilnih kremah; kot konzervans v kozmetiki, zobnih pastah, raztopinah za kontaktne leče, vakcinah, alergijskih testih, imunoterapevtskih raztopinah; v antiseptikih, dezinfekcijskih sredstvih, kontracepcijskih sredstvih; fungicidih, herbicidih; in zobnih zalivkih, termometrih in še nekaterih drugih proizvodih.

Leta 1999 je ameriški CDC izvedel raziskavo (NHANES), iz katere sklepajo, da ima okoli 10 % žensk v ZDA, ki so v rodni letih (16 – 49 let), vrednosti celotnega Hg v krvi nad varno mejo (5.8 $\mu\text{g/L}$), postavljeno s strani ameriške agencije za varovanje okolja (EPA). Prav tako naj bi imele povišane (nad 1 ppm) vrednosti Hg v vzorcih las.

Nekateri znanstveniki so ocenjevali obstojnost Hg^{2+} v možganih in poročajo o dokazih, da je razpolovna doba v centralnem živčnem sistemu zelo dolga (več let), medtem ko je razpolovna doba organskega Hg^{33} nekaj dni oz. tednov. Druga študija izvedena pri človeških obdukcijah poroča o okoli 20 let dolgi razpolovni dobi Hg^{2+} v možganih (9).

1.1.10.3 Cepiva

V Ameriki so pred kratkim veliko govorili o potencialni vlogi cepiv pri etiologiji avtizma. Pri tej povezavi obstajata dva vidika: prvi obravnava možne toksične učinke tiomersala, ki

vsebuje živo srebro in je bil v 90-ih prisoten v določenih cepivih; drugi govori o potencialno škodljivem vplivu kombiniranega cepiva za viruse mumpsa, ošpic in rdečk (MMR) (10).

Skrb o številu cepiv, ki jih prejmejo otroci in nastankom avtizma, je še vedno prisotna. Tu je največ pozornosti prejel tiomersal, ki vsebuje živo srebro, s predpostavko da povzroča nevrotoksičnost in s tem lahko tudi SAM. Odstranitev tiomersala iz trga in nadaljne raziskave niso pokazale povezave med cepljenjem in avtizmom, ampak starši avtističnih otrok zahtevajo nadaljne študije.

Obstajajo mnenja, da cepivo za MMR lahko povzroči avtizem pri otrocih z genetsko predispozicijo. Ta domneva je prinesla za seboj veliko pozornosti s strani staršev avtističnih otrok in zdravnikov. CDC in Inštitut za medicino (IOM) v Ameriki sta ovrgla povezavo med MMR cepivom in SAM, ampak to še vedno ostaja odprto vprašanje (7).

1.1.10.4 Vpliv prehrane

Veliko avtističnih otrok ima probleme pri razgrajevanju določenih proteinov, kot je gluten (najdemo ga v pšenici, ječmenu, ovsu, ržu) in kazein (najdemo ga v mleku in mlečnih izdelkih). Gluten in kazein vsebujeta določene kombinacije aminokislin, katere je zelo težko telesnemu prebavnemu sistemu prebaviti oz. razgraditi na posamezne aminokislino. Tako ostane hrana v obliki verige večih aminokislin. Ti peptidi se absorbirajo iz črevesja v kri, saj imajo avtistični otroci bolj prepustno črevesje kot zdravi otroci. Ko ti peptidi pridejo do možganov, povzročijo reakcijo, kot bi jo povzročila heroin ali morfij. Ti opiodi lahko vplivajo na obnašanje otroka, na njegove sposobnosti, čustva, bolečino in celo na občutljivost zvoka. Prav tako lahko reagirajo s področjem možganov, katero je povezano z govorom. Prav eden izmed faktorjev avtizma je ta, da so možgani avtističnih otrok upočasnjeni (zadrogirani, metabolično manj aktivni, kar se odraža tudi na govornem področju) (11).

V večih raziskavah so prikazali izboljšanje pri celo do 80 % pacientih s SAM, ki so se

striktno držali diete brez glutena in kazeina. Reichelt s sodelavci poroča o izboljšanju vedenjskih motenj pri 13 od 15 pacientov z SAM, po enem letu diete brez glutena in kazeina (12).

1.1.11 Diagnoza

Zgodnje prepoznavanje in diagnosticiranje SAM je izrednega pomena za nadaljnji razvoj otroka. Navadno lahko med prvimi opažanji staršev in dejansko diagnozo avtizma mine več (do 4) let. Pri AS pa je ta interval lahko še daljši. To se dogaja tudi, ker zdravniki nočejo postaviti napačne diagnoze in s tem "označiti" otroka ali ker se ne zavedajo pomembnosti zgodnje diagnoze. Kasnejša diagnoza pa prinese kasnejše ukrepanje za te otroke. Dolgo časa pa tudi ni bilo prisotnih diagnostičnih pripomočkov, po katerih bi se zdravniki lahko orientirali.

Danes je na voljo več diagnostičnih orodij, po katerih se prepoznava otroke z SAM. Nekateri od teh so:

- CHAT (The Checklist for Autism in Toddlers)
- PDDST (The Pervasive Developmental Disorder Screening Test-Stage 1) (13)
- CARS (Childhood Autism Rating Scale) (14)
- DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition)

1.1.11.1 DSM

To orodje je izdano s strani ameriškega psihiatričnega združenja (American Psychiatric Association) in opisuje diagnostične kriterije za duševne bolezni. Uporabljajo ga zdravniki, razne agencije, podjetja, organizacije v ZDA in drugod po svetu. DSM je bil deležen kritik in pohval, in od leta 1952, ko je bil prvič izdan, je bil popravljen že 5 krat. Trenutno se uporablja IV verzija, ki je bila izdana leta 1994.

DSM IV je kategorični klasifikacijski sistem. Kategorije so prototipi in za paciente z visokim približkom se smatra, da imajo motnjo. DSM IV pravi da "ne obstaja nobena predpostavka, da je vsaka kategorija duševne bolezni samostojna entiteta z absolutnimi mejniki...", ampak osamljenim, brez kriterijev in simptomom s slabo oceno se ne daje pomena. Za skoraj polovico motenj morajo simptomi povzročiti "klinično pomembno bolečino ali prizadetost na socialnem, poklicnem ali katerem drugem pomembnem področju" (15).

Kljub svojim omejitvam pa je priznan kot najboljše in najbolj uporabljeno orodje (14).

Ne poznamo pa nobenega biokemičnega markerja za SAM, zato je diagnosticiranje odvisno od zmožnosti izkušenih zdravstvenih delavcev, da tako subjektivno, kot objektivno prepoznajo omejevalne značilnosti s poznavanjem preteklosti, opazovanjem in uporabo diagnostičnih orodij (13).

1.1.12 Ostale težke kovine

1.1.12.1 Svinec

Svinec je še vedno prisoten v naši okolici v svinčenih barvah, starih vodovodih in onesnaženi zemlji. Lahko je prisoten tudi v vsakdanjih proizvodih, kot so plastična okenska senčila, svečne vrvice, otroški nahrbtniki, nakit. Izpostavljeni smo lahko tudi preko delavnega mesta ali hobija. Pri odraslih se v kri absorbira 20 – 70 % zaužitega svinca in skoraj 100 % vdihanega svinca. Najbolj ranljivi pa so otroci stari od 9 mesecev do 3 let, ker absorbirajo svinec bolj učinkovito kot odrasli in so tudi bolj izpostavljeni, ker veliko "raziskujejo" in veliko stvari dajo v usta. Druge rizične skupine so nosečnice oziroma njihov plod, izpostavljeni delavci in rokodelci in njihove družine.

Ne poznamo dokazov, ki bi določili prag pod katerim Pb nima škodljivega vpliva na

zdravje. Za koncentracije svınca v krvi, ki so se v preteklosti smatrale za varne, danes vemo, da lahko povzročijo rahle, kronične zdravstvene težave. Škodljivi učinki izpostavitve svincu se kažejo kot razvojna nevrotoksičnost, vpliv na razmnoževanje in toksičnost v ledvicah, krvi in endokrinem sistemu. Samo koncentracija v krvi je zanesljiv pokazatelj trenutne izpostavljenosti Pb. Poleti izpostavitve doseže svoj vrh in takrat je primeren čas za preverjanje koncentracij pri otrocih. Razpolovna doba svınca v krvi je 30 dni, tako je koncentracija v krvi pokazatelj izpostavitvi v zadnjih treh mesecih. Večinoma se izpostavljenosti da izogniti in diagnosticiranje zastrupitve s svincem je relativno lahko v primerjavi z drugimi okoljskimi strupi. Pri ocenjevanju zastrupitve se upoštevajo izvor Pb, rizične skupine in laboratorijski testi (16).

1.1.12.2 Aluminij

Aluminij je vseprisoten, ampak je v naravi njegova razpoložljivost omejena, ker se pojavlja v netopni obliki. Zaradi te netopnosti ga je zelo malo na površini in v podtalnici in biosistemi so zelo malo izpostavljeni topni obliki Al^{2+} . To je zelo pomembno pri ohranitvi majhne obremenjenosti biosistemov z Al. Ampak v patoloških pogojih se lahko pojavi povišana vrednost Al v bioloških sistemih. Al je široko uporabljen v našem vsakdanjem življenju. Nekateri od možnih največjih virov vnosa Al v telo so s hrano, pitno vodo, pijačami in zdravili, ki vsebujejo Al. Al-sulfat se znatno uporablja kot flokulacijsko sredstvo pri odstranjevanju organskih substanc.ocene kažejo, da je lahko dnevni vnos Al od 3 do 30 mg/dan. Al je normalno prisoten v čajnih listih. Nekateri poročajo o vrednosti 0.3 % Al v starejših listih in 0.01 % v mlajših listih. Normalni čajni nalivek vsebuje 50 krat več Al kot enaka količina kave. Koncentracija Al v skodelici čaja je običajno v razponu 2 – 6 mg/L. Drugi viri Al so aditivi v hrani, konzervansi, posoda za kuhanje, kuhinjski pripomočki in ovoji za hrano. Vnos Al s hrano je majhen v primerjavi z vnosom pri zauživanju antacidov, ki vsebujejo Al, ti lahko prinesejo odmerek od 50 do 1000 mg/dan (17).

1.1.12.3 Cink

Cink je esencialna kovina pri sesalcih in je potreben za delovanje večih metaloenzimov, DNA sintezo, celično rast in delitev, metabolizem membran, razvoj možganov. Priporočena vrednost zaužitega Zn je 10 – 20 mg na dan. Zn se široko uporablja pri različnih kovinskih zlitinah, gumah, barvah. V zadnjih letih so se pojavili kovinski praški z nano delci, ki so zelo uporabni zaradi njihove velike specifične površine, ultra visoko reaktivne površine in "quantum" efekta. Uporabljajo se v barvni industiji, medicinskem diagnosticiranju, sončnih kremah in kozmetiki. Do sedaj se nano Zn prašek uporablja kot visoko reaktiven katalizator pri vodikovih organskih reakcijah, pri okoljski zaščiti, barvah, pigmentih, metalurških aditivih... Z industrializacijo nanotehnologije bo izpostavljenost ljudi nanodelcem v prihodnosti narasla. Ampak zaenkrat še ni znano, kakšni so vplivi nanodelcev na zdravje, ki vstopijo v telo direktno med proizvodnjo ali indirektno iz okolja (npr. aerosoli z nanodelci) in preko prehranjevalne verige. Poročajo, da ameriško ministrstvo za kmetijstvo (USDA) izvaja raziskave za uporabo nanodelcev pri pakiranju hrane in tudi v sami hrani.

Akutno peroralno zaužitje visokih odmerkov cinka in njegovih spojin normalno povzroči gastrointestinalne težave, s simptomi, kot so slabost, bruhanje, abdominalni krči in diareja. Za take učinke je navadno potrebno zaužiti od 2 do 8 mg Zn/kg/dan. Večmesečno uživanje visokih vrednosti Zn lahko povzroči anemijo, neželene učinke na pankreasu in zmanjšane vrednosti HDL holesterola v krvi. Pomanjkanje Zn pa povzroči različne motnje, kot so lahko zaostalost v telesni rasti, rak, okužbe, kožne bolezni in počasno celjenje ran (18).

1.1.12.4 Baker

Cu je esencialen element v sledovih v vseh živih sistemih in je pomemben pri mnogih biokemičnih reakcijah v celici. Med drugim je Cu^{2+} potreben za aktivnost encimov, ki so povezani z metabolizmom Fe^{2+} , npr. za aktivnost ceruloplazmina, proteina, ki zmanjšuje dostopnost Fe^{2+} ionov, ki katalizirajo reakcije izkoriščanja kisikovih radikalov. Drugi so še

encimi, ki so povezani z integriteto centralnega živčnega sistema in encimi, ki sodelujejo pri nastanku elastina, kolagena in melanina. V povezavi z Zn^{2+} je Cu^{2+} kofaktor za encim superoksid dismutazo.

Vrednosti Cu v okolju so se v zadnjih letih povečale zaradi antropogenih aktivnosti, kot so npr. aplikacije Cu v fungicidih in algicidih, industrijske odplake in uporaba Cu v proizvodnji kuhinjskih pripomočkov, barv in vodovodov. Korozija Cu^{2+} iz vodovodnih cevi lahko znatno poveča vrednosti Cu^{2+} v vodi gospodinjstev. Skrbi za spremembo kvalitete vode za ljudi in živali na splošno so se v zadnjih letih povečale in nekateri se nagibajo k temu, da bi postavili varnostno mejo in s tem obvarovali ljudi in ekosisteme pred toksičnimi vplivi.

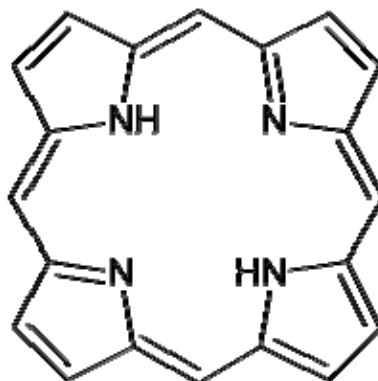
Čeprav je Cu esencialen pri fizioloških vrednostih v sledovih, je lahko potencialno zelo toksičen in sicer že pri vrednostih, ki so rahlo nad fiziološkimi. Nekateri študije pri sesalcih poročajo o kronični zastrupitvi s Cu^{2+} pri relativno nizki vrednosti Cu^{2+} v jetrih, kar se kaže kot degeneracija jetrnih in ledvičnih celic, hemoglobinurija, zlatenica in zgodnja smrt. Obstajajo tudi dokazi, da pri ljudeh različnih starosti, z različno dolgo izpostavljenostjo nizkim vrednostim Cu^{2+} pride do simptomov, kot so bruhanje, slabost, abdominalni krči, vrtenje in diareja. Ti simptomi se pojavijo že po relativno kratkem času po izpostavitvi (19).

1.2 PORFIRINI

1.2.1 Zgradba porfirinov

Porfirini so skupina kemijskih spojin katere so pogosto prisotne v naravi, npr. v zelenih listih ali rdečih krvnih celicah. So heterociklične oblike, sestavljeni iz štirih pirolnih

obročev, ki so med seboj povezani z štirimi metinskimi mostovi (=CH-). Porfirini so spojine z aromatičnimi obroči. Makroobroči so konjugirani sistemi in zaradi tega imajo zelo močno absorbcijo vidne svetlobe in so posledično močno obarvani. Beseda porfirin izhaja iz grškega izraza »porphyra«, ki pomeni škrlatno barvo. Porfirini so derivati osnovne molekule, ki se imenuje porfin (20).



Slika 1: Struktura porfina (20)

V derivatih porfina so β -vodikovi atomi popolnoma ali delno substituirani z različnimi stranskimi verigami, kot so: alkil, hidroksialkil, vinil, karbonil ali karboksilna skupina. Različni porfirini so razvrščeni glede na vrsto stranskih verig. V skladu s tem razlikujemo naslednje porfirine: protoporfirin, koproporfirin, etioporfirin, mezoporfirin in uroporfirin. Vsi naravni protoporfirini vsebujejo dve različni stranski verigi vsakega pirolovega obroča. Torej so pri dveh različnih verigah možne štiri izomere.

Protoporfirin se v naravi nahaja le kot izomer številka IX in ker je opredeljen kot derivat koproporfirina III, se lahko imenuje tudi protoporfirin III. Protoporfirin IX se pojavlja v hemu in hemoglobinu, mioglobinu in v večini citokromov (21).

Porfirini vežejo kovine in s tem tvorijo komplekse - metaloporfirine. Kovinski ion, ki ima ponavadi naboj 2^+ ali 3^+ je v sredini obroča povezan z dušikovimi atomi, pri tem pa se izgubita dva protona. V obroč se lahko vstavijo skoraj vse kovine.

Porfirinu, v katerega se ne veže nobena kovina, včasih rečemo prosta baza (free base). Nekateri porfirini, ki vsebujejo železo so znani pod imenom hem in proteine, ki vsebujejo

hem, imenujemo hemoproteini. Tu sta najbolj znana hemoglobin in mioglobin, ki imata funkcijo vezave kisika (20).

1.2.2 Biosinteza porfirinov in hema

Porfirini in hem se sintetizirajo v vseh celicah sesalcev. Aktivnost biosinteze je najbolj pomembna v kostnem mozgu in jetrih. Niz reakcij vodi do sinteze hema, ki se začne s sukcinil koecimom A in glicinom ter konča z vključitvijo Fe^{2+} iona v molekulo protoporfirina IX. Pri sintezi hema sodeluje osem encimov, štirje v mitohondrijih in štirje v citosolu.

V prvi reakciji biosinteze hema nastane aminolevulinska kislina (ALA). Sintetizira se v mitohondrijih z encimom sintazo aminolevulinske kisline (EC 2.3.1.36) iz glicina in sukcinil koencima A v prisotnosti pirodoksalfosfata. Aktivnost encima sintaze aminolevulinske kisline uravnava hitrost celotne sinteze hema, vendar je njena aktivnost manjša od aktivnosti ostalih encimov sistema.

Drugi encim v biosintezi hema je sintaza porfobilinogena (EC 4.2.1.24), ki katalizira nastanek porfobilinogena iz dveh molekul ALA. ALA nastaja v mitohondrijskem matriksu in se premika v citosol, kjer deluje. Zmanjšana aktivnost sintaze porfobilinogena je zelo redka motnja, eden od zunanjih dejavnikov pa je lahko tudi svinec (13).

V tretjem koraku biosinteze hema sodelujeta dva encima: porfobilinogen deaminaza/hidroksimetilbilan sintaza (EC 4.3.1.8) in uroporfirinogen III kosintaza (EC 4.2.1.75). Pri tej reakciji se štiri molekule porfobilinogena povežejo v skeletno zgradbo porfirinogena, kar je reducirana oblika porfirina. Pri tem z eliminacijo štirih NH_3 molekul nastane hidroksimetilbilan.

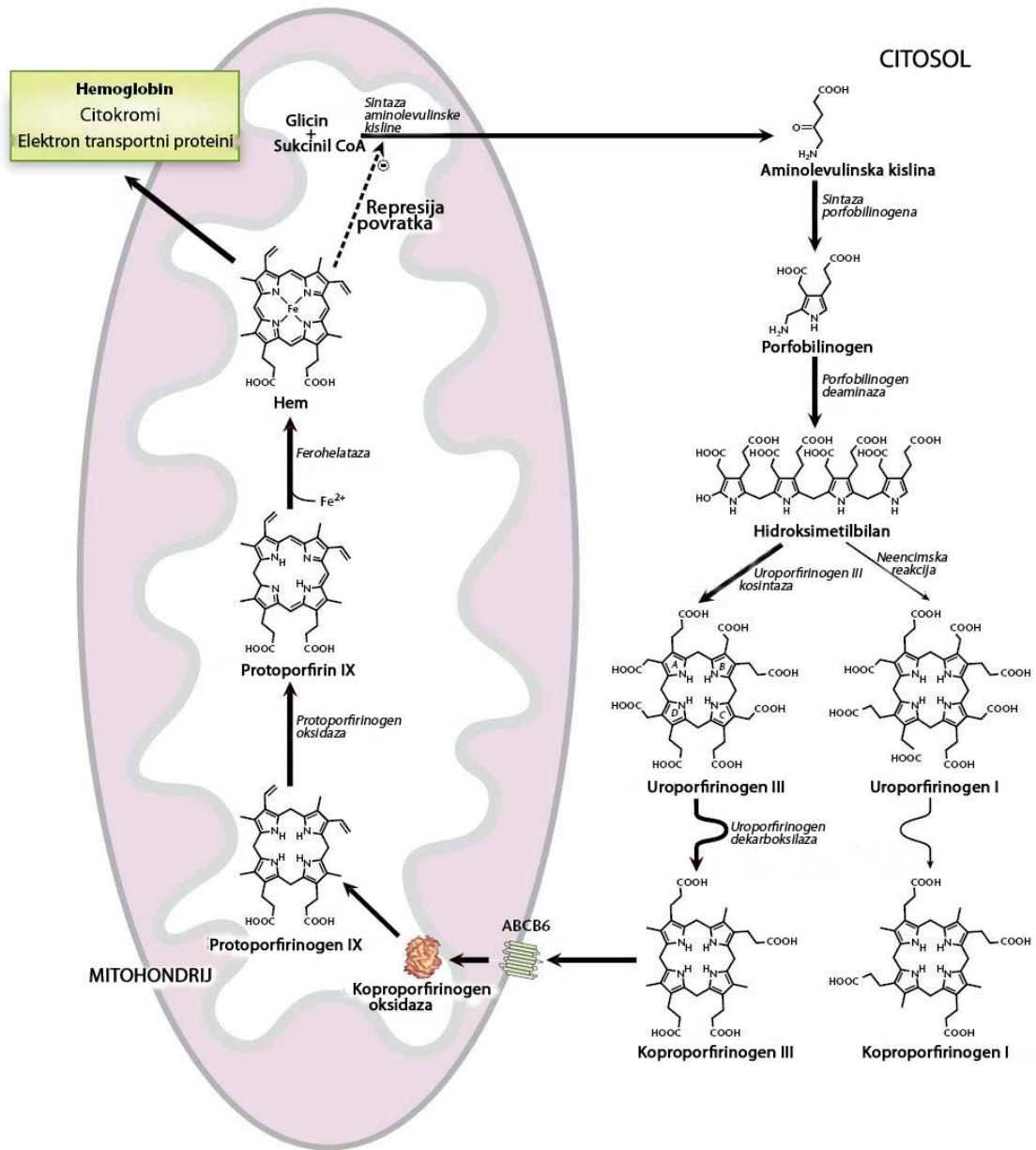
Po tvorbi tetrapirolovega skeleta poteče več reakcij dekarboksilacije in oksidacije pred nastankom protoporfirinogena IX. Še vedno v citosolu se najprej vsi acetilno kislinski substituenti dekarboksilirajo do metilnih skupin, ob prisotnosti uroporfirinogen dekarboksilaze (EC 4.1.1.37), pri tem pa nastane koproporfirinogen III. Potem poteče prenos koproporfirinogena III v notranjo membrano mitohondrija, kjer se

koproporfirinogen oksidaza (EC 1.3.3.3) šibko veže z notranjo mitohondrijsko membrano. Koproporfirinogen oksidaza sodeluje pri dekarboksilaciji in oksidaciji propionatnih preostankov na obročih A in B (14).

Naslednji encim v biosintezi hema je encim protoporfirinogen oksidaza (EC 1.3.3.4), deluje prav tako v membrani mitohondrijev. Ta oksidira protoporfirinogen v protoporfirin IX. Protoporfirin IX nastaja z encimsko oksidacijo kot edini porfirin v biosintezi hema. Ostali porfirini nastajajo z neencimsko oksidacijo in predstavljajo ireverzibilno pot v biosintezi hema.

Zadnja faza v biosintezi hema je vgrajevanje Fe^{2+} v protoporfirin IX. To reakcijo katalizira encim ferohelataza (EC 4.99.1.1) na notranji membrani mitohondrija. Tako nastane hem.

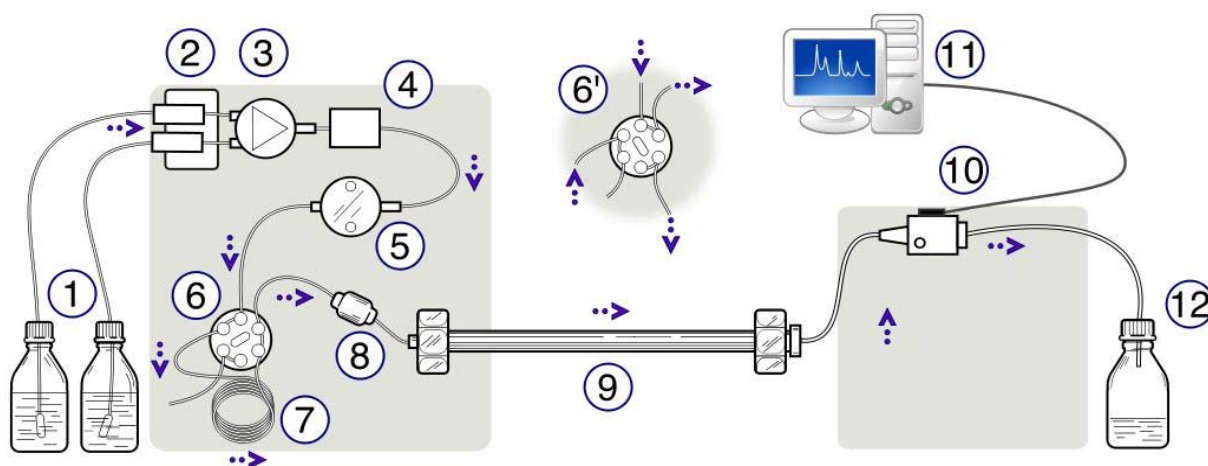
Ferohelataza je specifična za Fe^{2+} in preprečuje vezavo Fe^{3+} v molekulo porfirina. Za vezavo tekmujejo kovinski ioni z valenco 2+. Na primer: Zn^{2+} je v visokih koncentracijah prisoten ob nastajanju rdečih krvnih celic in neposredno tekmuje z Fe^{2+} za encimski vstop v protoporfirin IX. Nastali cinkov protoporfirin (ZPP) je posredni pokazatelj razpoložljivosti železa pri dozorevanju eritroblasta. Porast zvišanih koncentracij ZPP pri različnih pridobljenih motnjah je povezana z motnjami v metabolizmu železa, kar povzroča pomanjkanje železa in anemije pri kroničnih boleznih. Zvišane koncentracije aluminija pri dializnih bolnikih ali zastrupitev s svincem prav tako povzročijo zvišanje ZPP z motnjo v metabolizmu železa (21).



Slika 2: Potek biosinteze hema (22)

1.3 HPLC

Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (high-performance liquid chromatography - HPLC) se uporablja za ločevanje, kvalitativno in kvantitativno določevanje spojin. HPLC uporablja kolono (stacionarna faza), črpalko, ki črpa mobilno fazo skozi kolono, in detektor, ki prikazuje retencijske čase molekul. Retencijski čas je odvisen od interakcije med stacionarno fazo, analiziranimi molekulami in topilom (23).



Slika 3: Slikovna predstavitev aparata HPLC (24)

- (1) Topilo – mobilna faza, (2) Odstranjevalec plinov iz topila, (3) Gradientni ventil, (4) Gradientni mešalec, (5) Črpalka - visok pritisk, (6) Ventil za vzorec – odprt, (6') Ventil za vzorec – zaprt, (7) Injektor vzorca, (8) Predkolona, (9) Kolona – stacionarna faza, (10) Detektor, (11) Izpis podatkov, (12) Zbiralnik odpadnega materiala

1.3.1 Delovanje

Vzorec, ki ga analiziramo dodamo v majhni količini v tok mobilne faze. Potovanje analita skozi kolono se upočasni s specifičnimi kemičnimi ali fizikalnimi interakcijami s stacionarno fazo. Koliko časa se analit zadrži je odvisno od njegovih lastnosti, sestave stacionarne faze in mobilne faze. Čas, v katerem se specifičen analit eluira (izloči iz konca kolone) se imenuje retencijski čas. Ta čas pod določenimi pogoji predstavlja specifično identifikacijsko karakteristiko določenega analita. Z uporabo kolone z manjšimi delci

povečamo linearno hitrost, kar da komponentam manj časa da difundirajo znotraj kolone, to pa privede do boljše resolucije (podatek od ločbi) končnega kromatograma. Za topilo se uporabljajo različne mešanice organskih topil med seboj ali z vodo. Vodi so lahko dodani različni pufri ali soli, ki pomagajo pri ločevanju komponent analita.

Še ena izboljšava pri HPLC je, da spreminjamo sestavo mobilne faze med samo analizo. Temu pravimo gradientna elucija. Normalen gradient za reverzno fazno HPLC se lahko začne z 5% metanolom in se poveča linearno do 50% metanola v 25 minutah. Gradient, ki ga izberemo je odvisen od hidrofobnosti analita. Gradient loči mešanice analita kot funkcijo afinitete analita za določeno sestavo mobilne faze relativno od stacionarne faze. V primeru, ko uporabimo gradient voda/metanol, se bodo bolj hidrofobne komponente eluirale ko bo mobilna faze sestavljena večinoma iz metanola. Bolj hidrofilne komponente pa se bodo eluirale v pogojih ko bo v mobilni fazi prevladovala voda.

Izbira topila, dodatkov in gradienta je odvisna od lastnosti stacionarne faze in lastnosti analita. Pogosto se opravi serije testov analita in število poskusnih analiz, da lahko najdemo metodo HPLC, ki nam daje najboljše ločevanje posameznih komponent (23).

1.3.2 Način detekcije

Fluorescenčni detektor je občutljiv in široko uporaben kljub njegovi enostavni uporabi z relativno majhnimi stroški in nizko stopnjo vzdrževanja.

Pri tej metodi detekcije se pošlje svetloba željene ekscitacijske valovne dolžine (394 nm v našem primeru) skozi vzorec, katero nato delno absorbira analit. Del te energije substanca emitira kot svetlobo večje valovne dolžine (fluorescenca). To svetlobo ujamejo fotocelice pri izbrani emisijski valovni dolžini (624 nm v našem primeru) in računalnik kot rezultat izpiše kromatogramski vrh. Tako je površina pod kromatogramskim vrhom proporcionalna koncentraciji merjene substance.

2 NAMEN DELA

V naši raziskavi je bilo vključenih 32 otrok obeh spolov, starosti do 15 let. Vsi otroci imajo določene razvojne motnje ali druge težave, ni pa bilo vključenih zdravih otrok. Otroke smo glede na diagnozo razdelili v dve skupini. Prva je kontrolna skupina (N= 13), kjer imajo otroci diagnozo glavobol, razvojni zaostanek ali vrtoglavica, druga je skupina avtizem (N= 19), ti pa so diagnosticirani z avtizmom ali Aspergerjevim sindromom. Da bi ugotovili možno povezavo med vrednostmi porfirinov v urinu in SAM smo z metodo HPLC izmerili posamezne frakcije porfirinov v urinu teh otrok in kot najpomembnejši parameter izračunali razmerje uroporfirina I proti koproporfirinu III. Kot pokazatelj vpliva okolja na SAM in možno statistično pomemben podatek pri našem delu pa smo izmerili tudi koncentracijo težkih kovin v krvi ali serumu. Merjene so bile z atomsko absorpcijsko spektometrijo na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Vse dobljene rezultate smo statistično obdelali in skušali ugotoviti statistično pomembno razliko med skupinama za vrednosti posameznih porfirinov, razmerja Uro I/Kopro III in težkih kovin.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Tabela I: Podatki o otrocih

| Št. | Oznaka | Spol | Starost (leta) | Diagnoza | Skupina |
|-----|--------|------|----------------|---------------------|-------------------|
| 1 | AL | ž | 1 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 2 | BB | m | 6 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 3 | BD | ž | 14 | Glavobol | Kontrolna skupina |
| 4 | BS | ž | 12 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 5 | BŽ | m | / | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 6 | CD | ž | 4 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 7 | FJ | m | / | Aspergerjev sindrom | Skupina avtizem |
| 8 | GB | m | 5 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 9 | GZ | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 10 | HA | ž | >1 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 11 | HK | ž | 11 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 12 | HM | m | 3 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 13 | KA | ž | 5 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 14 | KMM | m | 7 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 15 | KS | ž | 15 | Vrtoglavica | Kontrolna skupina |
| 16 | LA | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 17 | LN | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 18 | MD | m | 8 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 19 | MN | ž | 8 | Glavobol | Kontrolna skupina |
| 20 | MP | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |

| | | | | | |
|----|----|---|----|--------------------|-------------------|
| 21 | PM | m | 3 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 22 | PT | ž | 11 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 23 | PT | m | 11 | Glavobol | Kontrolna skupina |
| 24 | RT | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 25 | SA | m | 4 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |
| 26 | SD | m | 9 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 27 | SJ | m | 3 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 28 | SL | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 29 | ŠA | m | 4 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 30 | ŠD | m | 3 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 31 | UM | m | 2 | Avtizem | Skupina avtizem |
| 32 | ŽH | ž | 5 | Razvojni zaostanek | Kontrolna skupina |

3.1.1.1 Predobdelava vzorca – Zbiranje in shranjevanje vzorcev urina

Zbrali smo enkratni urin otrok brez dodatkov in jih shranili v posebnih rjavih steklenicah na 4 °C v temnem prostoru. Če hranimo vzorec za dalj časa, mu izmerimo volumen in ga hranimo na -20 °C.

Kisle urine je potrebno nevtralizirati z natrijevim hidrogen karbonatom.

3.1.2 Reagenti

ClinRep® Complete Kit for Porphyrins in Urine (za 100 analiz)

Tabela II: Komponente

| | | |
|---------------------|-------------------------------|----------|
| Mobilna faza A | Mobile Phase A | 1000 ml |
| Mobilna faza B | Mobile Phase B | 800 ml |
| Standard | Standard Solution | 5 ml |
| IS interni standard | IS Internal Standard | 5 ml |
| kalibrator | Urine Calibrator, lyophil. | 5 x 5 ml |
| viale | Vials for Sample Pretreatment | 100 pcs. |

3.1.3 Instrumenti

Za diferencialno določanje porfirinov v urinu s HPLC smo uporabili naslednje komponente:

- gradientna črpalka
- injekcijski ventil ali avtovzorčnik (ClinLab[®] Autosampler, Model AS3000)
- fluorescenčni detektor (ekscitacija: 394 nm; emisija: 624 nm)
- računalnik s HPLC programsko opremo
- HPLC termostat (ClinLab[®] HPLC Thermostat, Model HT3000)
- odstranjevalec plinov (ClinLab[®] 4-Channel-Degasser, Model DG4000)
- dušilec impulzov (ClinLab[®] Pulsedamper, Model PD2000)

3.2 METODA

3.2.1 Opis metode

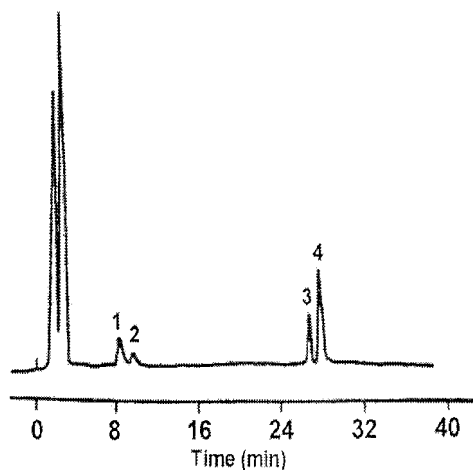
V tem testu porfirine zaznamo po njihovi naravni fluorescenci. Pred HPLC analizo mora biti vsak vzorec pripravljen s kratko predobdelavo. Pri tem mora biti vzorec zaščiten pred svetlobo.

Kromatografsko ločevanje analitov smo izvajali v reverzno fazni koloni z uporabo binarnega gradienta in pufrov, ki vsebujejo ion-paritvena sredstva. Analite smo določili enega za drugim s fluorescenčnim detektorjem.

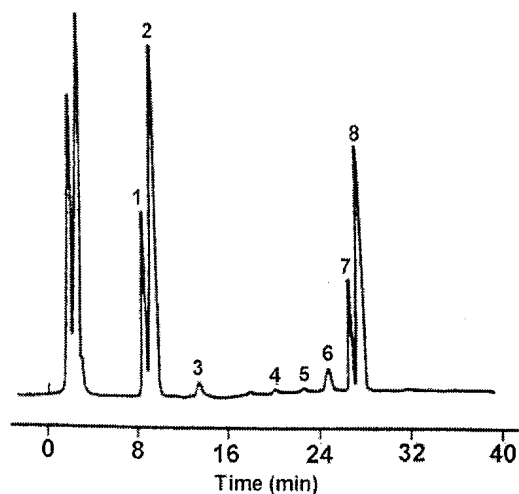
Izračun koncentracij smo opravili z uporabo metode z internim standardom s pomočjo površin pod kromatogramskimi vrhovi.

ClinRep[®] celoten kit za določanje porfirinov v urinu omogoča diferencialno kvantifikacijo porfirinov v približno 20 min na analizo.

3.2.2 Diferencialno določanje porfirinov v urinu

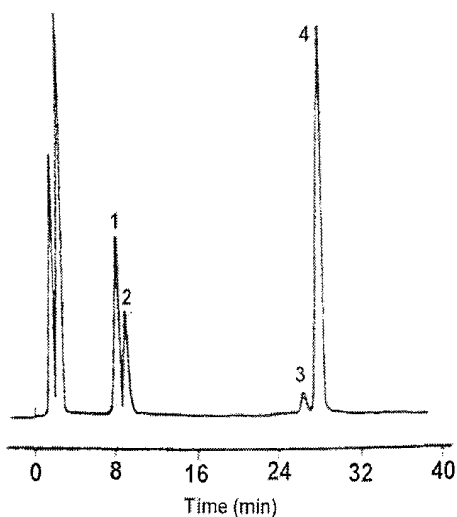


Slika 4: Kromatogram urina zdrave osebe
kromatogramski vrhovi: 1: Uroporfirin I, 2: Uroporfirin III, 3: Koproporfirin I, 4: Koproporfirin III



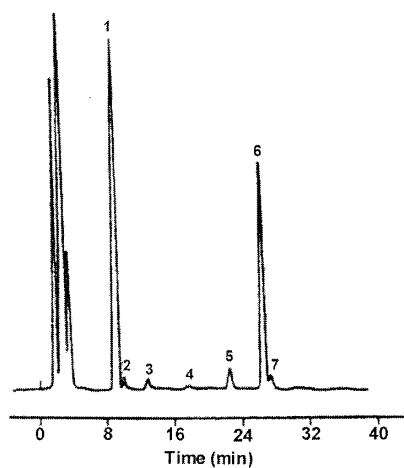
Slika 5: Kromatogram urina osebe z akutno intermitentno porfirijo

kromatogramski vrhovi: 1: Uroporfirin I, 2: Uroporfirin III, 3: Heptakarboksiporfirin III, 4: Heksakarboksiporfirin III, 5: Pentakarboksiporfirin I, 6: Pentakarboksiporfirin III, 7: Koproporfirin I, 8: Koproporfirin III



Slika 6: Kromatogram urina osebe z variegatno porfirijo

kromatogramski vrhovi: 1: Uroporfirin I, 2: Uroporfirin III, 3: Koproporfirin I, 4: Koproporfirin III



Slika 7: Kromatogram urina osebe z kongenitalno eritropoetično porfirijo

kromatogramski vrhovi: 1: Uroporfirin I, 2: Uroporfirin III, 3: Heptakarboksiporfirin I, 4: Heksakarboksiporfirin I, 5: Pentakarboksiporfirin I, 6: Koproporfirin I, 7: Koproporfirin III

3.2.3 Podatki metode

3.2.3.1 Linearnost

Diferencialno določanje porfirinov v urinu je linearno v območju od 1 do 5000 $\mu\text{g/L}$ na porfirin.

3.2.3.2 Limita določanja

Spodnja limita določanja je 1 $\mu\text{g porfirina/L}$.

3.2.3.3 Limita detekcije

Spodnja limita detekcije je 0.5 $\mu\text{g porfirina/L}$.

3.2.3.4 Retencijski časi

Tabela III: Ocenjeni retencijski časi za posamezne frakcije porfirinov

| | |
|--------------------------|--------------------|
| Uroporfirin I: | približno 5.5 min |
| Heptakarboksiporfirin I: | približno 6.7 min |
| Heksakarboksiporfirin I: | približno 8.1 min |
| Interni Standard IS: | približno 9.4 min |
| Pentakarboksiporfirin I: | približno 10.1 min |
| Koproporfirin I: | približno 11.8 min |
| Koproporfirin III: | približno 13.0 min |

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Dodajanje IS/Stabilizacija

Odpipetirali smo 500 μl urina in mu dodali 50 μl internega standarda IS nato hitro premešali (približno 5 sec) na vortex mešalu. Potem smo vzorec centrifugirali 5 min na 1000 x g. Za HPLC analizo smo uporabili alikvot supernatanta. Z dodatkom IS tudi odstranimo večino motečih snovi.

4.2 Stabilnost predobdelanih vzorcev

Po dodatku internega standarda IS in hrambi v temnem prostoru je vzorec stabilen najmanj 3 dni pri sobni temperaturi, 7 dni pri 4 °C in 3 mesece pri – 20 °C.

4.3 HPLC pogoji

4.3.1 Mobilna faza

Posoda je morala biti tesno zaprta, ker v nasprotnem primeru se lahko zgodi, da komponente mobilne faze izhlapijo, kar pa vpliva na retencijske čase.

4.3.2 Avtovzorčnik

Volumen injeciranja: 20 μ l

Interval injeciranja: 20 min

Raztopina za spiranje: mešanica metanol/voda (razmerje 1:1)

4.3.3 Črpalka

Gradienti so si sledili v zaporedju

Tabela IV: Čas in odstotek mobilne faze

| Čas (min) | % A | % B |
|-----------|-----|-----|
| 0 | 100 | 0 |
| 3 | 82 | 18 |
| 7 | 70 | 30 |
| 9 | 60 | 40 |
| 14 | 33 | 67 |
| 15 | 100 | 0 |
| 20 | 100 | 0 |

Hitrost pretoka: 0,7 ml/min

4.3.4 Analitična kolona

Analiza je potekala pri 30 °C z uporabo HPLC termostata. Tlak v koloni ni presegel 200 bar.

4.3.5 Varovalna kolona

Varovalna kolona nam pomaga preprečiti kontaminacije analitične kolone. Zaradi tega je bilo potrebno varovalno kolono redno menjati (najkasneje na vsakih 100 vzorcev).

4.3.6 Detektor

Fluorescenčni detektor smo nastavili na naslednje valovne dolžine: ekscitacija: 394 nm; emisija: 624 nm. Občutljivost in razpon morata biti primerna, odvisno od uporabljenega detektorja.

4.3.7 Testna analiza

Pred analiziranjem vzorcev smo izvedli testno analizo z uporabo standardne raztopine da smo preverili zmogljivost ločevanja našega sistema.

Večkrat smo injicirali 20 µl standardne raztopine, dokler nismo dobili dveh identičnih kromatogramov po retencijskih časih in resoluciji kromatogramskih vrhov.

Nato smo preverili parametre kot so: čas analize, identifikacija kromatogramskih vrhov, začetek in konec kromatogramskih vrhov. Popravili smo parametre če je bilo to potrebno in spet injicirali standardno raztopino da smo preverili stanje.

4.3.8 HPLC analiza

Injicirali smo 20 µl supernatanta v HPLC sistem.

4.3.9 Kalibracija

Kadar opravljamo večje število analiz je priporočljivo injicirati kalibrator na vsak peti vzorec in prav tako po koncu analize. To nam omogoča spremljanje HPLC pogojev.

4.3.10 Izračun

4.3.10.1 Splošno

Najprej zagotovimo, da vsak kromatogram ustreza pravemu vzorcu. Nato primerjamo vsak kromatogram z kromatogramom kalibratorja, da preverimo če se kromatogramski vrhovi analitov ujemajo po retencijskih časih. Priporočljivo je vključiti še neznan vrh, da se ne pojavi napačna identifikacija zaradi spremembe retencijskih časov, kar se lahko pojavi zaradi nihanja temperature. Če smo med vzorci analizirali kalibrator lahko popravimo napake brez ponavljanja analiz.

Izračun neznanega vzorca lahko izvedemo s pomočjo metode eksterne ali interne standarda z izračunom površin pod kromatogramskimi vrhovi. V našem primeru smo uporabili metodo interne standarda in avtomatiziran izračun.

Pri metodi interne standarda lahko pride do potencialnih napak zaradi nepravilnega injiciranja vzorca. Pri tem si lahko pomagamo z izračunom izkoristka. Z ekstrapolacijo do 100% izkoristka lahko dosežemo pravilen izračun koncentracije analitov v vzorcu.

4.3.10.2 Avtomatiziran izračun

Z uporabo metode interne standarda se koncentracija analitov izračuna avtomatično preko računalnika. S tem se pridobi prava koncentracija analita v $\mu\text{g/L}$ urina, brez dodatnega računanja.

4.3.10.3 Ročni izračun

4.3.10.3.1 Metoda interne standarda

Koncentracija analita v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$\text{konc. analit v vzorcu } [\mu\text{g/L}] = \frac{\text{površina analit v vzorcu} \times \text{konc. analit v kalibratorju } [\mu\text{g/L}]}{\text{površina analit v kalibratorju} \times \text{REC}}$$

Koncentracija analita v kalibratorju je podana vrednost.

Izkoristek (REC) internega standarda IS se izračuna po naslednji formuli:

$$\text{REC} = \frac{\text{površina IS v vzorcu}}{\text{površina IS v kalibratorju}}$$

4.3.10.5 Pretvorba molarnosti

Tabela V: Faktorji za pretvorbo molarnosti

| Substanca | Molekulska masa (g/mol) | Pretvorba |
|-----------------------|-------------------------|---|
| Uroporfirin | 830.8 | $\mu\text{g/L} \times 1.20 = \text{nmol/L}$ |
| Heptakarboksiporfirin | 786.7 | $\mu\text{g/L} \times 1.27 = \text{nmol/L}$ |
| Heksakarboksiporfirin | 742.7 | $\mu\text{g/L} \times 1.35 = \text{nmol/L}$ |
| Pentakarboksiporfirin | 698.7 | $\mu\text{g/L} \times 1.43 = \text{nmol/L}$ |
| Koproporfirin | 654.7 | $\mu\text{g/L} \times 1.53 = \text{nmol/L}$ |

4.3.11 Statistična obdelava

Kot osnovne statistične parametre smo za vsak analit pri vsaki skupini izračunali:

- povprečno vrednost: $\bar{X}_p = \sum x_i / N$
- standardni odklon: $SD = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x}_p)^2 / N - 1}$
- varianco: $VAR = SD^2$

(x_i – rezultat posameznega vzorca, N – število vzorcev)

Ti parametri so bili izračunani s programom Microsoft Office Excel.

Nadaljne smo izračunali interval zaupanja, kjer smo izbrali stopnjo tveganja $\alpha =$

0,05. S programom Microsoft Office Excel smo izračunali zaupanje (0,95) in ga odšteli oz. prišteli povprečni vrednosti.

Kot podatek za statistično pomembno razliko smo izračunali p-vrednost s programom SPSS. P-vrednost je verjetnost, da ob predpostavki, da je ničelna hipoteza pravilna, dobimo za testno statistiko vrednosti, ki so bolj 'ekstremne' (bolj v korist alternativne hipoteze) od izračunane vrednosti testne statistike. Ničelna hipoteza pravi, da se skupini statistično glede na vrednosti analitov med seboj ne razlikujeta oziroma, da med skupinama ni statistično pomembne razlike. Stopnjo tveganja smo zopet izbrali $\alpha = 0,05$.

5 REZULTATI

Tabela VI: Kontrolna skupina – porfirini

| | Oznaka | Starost (leta) | Spol | Celokupni porfirini ($\mu\text{g/L}$) | Uro I ($\mu\text{g/L}$) | 7-CO ($\mu\text{g/L}$) | 6-CO ($\mu\text{g/L}$) | 5-CO ($\mu\text{g/L}$) | Kopro I ($\mu\text{g/L}$) | Kopro III ($\mu\text{g/L}$) | Uro I /Kopro III |
|----|--------|----------------|------|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| 1 | BD | 14 | ž | 69,80 | 28,70 | 2,26 | 0,71 | 20,70 | 24,25 | 11,80 | 2,43 |
| 2 | BŽ | / | m | 66,46 | 7,80 | 1,22 | 1,81 | 0,82 | 12,42 | 42,39 | 0,18 |
| 3 | BB | 6 | m | 106,81 | 8,95 | 0,10 | 1,90 | 0,38 | 22,89 | 72,69 | 0,12 |
| 4 | CD | 4 | ž | 95,64 | 8,96 | 1,83 | 1,20 | 0,93 | 22,84 | 59,87 | 0,15 |
| 5 | HA | >1 | ž | 49,60 | 4,12 | 1,24 | 1,50 | 0,39 | 7,36 | 34,99 | 0,12 |
| 6 | HM | 3 | m | 20,20 | 4,04 | 1,35 | 1,43 | 0,53 | 4,09 | 8,76 | 0,46 |
| 7 | HK | 11 | ž | 14,11 | 2,55 | 1,74 | 0,53 | 0,40 | 3,72 | 5,18 | 0,49 |
| 8 | KA | 5 | ž | 50,85 | 11,49 | 1,46 | 2,25 | 1,24 | 10,02 | 24,39 | 0,47 |
| 9 | KS | 15 | ž | 12,10 | 4,39 | 0,66 | 1,22 | 0,10 | 2,14 | 3,68 | 1,19 |
| 10 | MN | 8 | ž | 17,24 | 3,60 | 0,97 | 0,79 | 0,10 | 2,66 | 9,22 | 0,39 |
| 11 | PT | 11 | m | 215,69 | 19,72 | 1,55 | 0,00 | 1,12 | 34,59 | 158,71 | 0,12 |
| 12 | SA | 4 | m | 280,50 | 12,34 | 0,97 | 2,65 | 1,04 | 51,09 | 212,41 | 0,06 |
| 13 | ŽH | 5 | ž | 39,59 | 3,82 | 0,72 | 0,00 | 0,51 | 7,58 | 26,96 | 0,14 |

Tabela VII: Skupina avtizem – porfirini

| | Oznaka | Starost (leta) | Spol | Celokupni porfirini ($\mu\text{g/L}$) | Uro I ($\mu\text{g/L}$) | 7-CO ($\mu\text{g/L}$) | 6-CO ($\mu\text{g/L}$) | 5-CO ($\mu\text{g/L}$) | Kopro I ($\mu\text{g/L}$) | Kopro III ($\mu\text{g/L}$) | Uro I /Kopro III |
|----|--------|----------------|------|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| 1 | AL | 1 | ž | 24,71 | 1,90 | 1,20 | 1,44 | 0,68 | 5,29 | 14,19 | 0,13 |
| 2 | BS | 12 | ž | 8,24 | 1,42 | 1,59 | 1,04 | 0,42 | 1,53 | 2,23 | 0,64 |
| 3 | FJ | 7 | m | 76,43 | 9,96 | 0,62 | 0,65 | 0,10 | 13,12 | 52,07 | 0,19 |
| 4 | GZ | 4 | m | 32,35 | 7,71 | 0,57 | 1,39 | 0,10 | 7,13 | 15,55 | 0,50 |
| 5 | GB | 5 | m | 8,44 | 2,37 | 0,87 | 0,00 | 0,78 | 1,34 | 3,09 | 0,77 |
| 6 | KMM | 7 | m | 18,30 | 5,35 | 1,00 | 1,02 | 1,10 | 4,31 | 5,53 | 0,97 |
| 7 | LN | 4 | m | 31,51 | 5,06 | 1,09 | 0,52 | 0,59 | 5,30 | 18,95 | 0,27 |
| 8 | LA | 4 | m | 75,46 | 9,43 | 1,34 | 1,87 | 0,89 | 11,30 | 50,62 | 0,19 |
| 9 | MP | 4 | m | 35,75 | 5,74 | 0,66 | 0,72 | 1,15 | 8,77 | 18,70 | 0,31 |
| 10 | MD | 8 | m | 15,70 | 1,80 | 1,48 | 1,46 | 0,65 | 3,64 | 6,66 | 0,27 |
| 11 | PT | 11 | ž | 20,69 | 3,50 | 1,00 | 0,00 | 1,20 | 5,61 | 10,37 | 0,34 |
| 12 | PM | 3 | m | 29,87 | 3,64 | 1,09 | 0,00 | 0,40 | 6,82 | 17,92 | 0,20 |
| 13 | RT | 4 | m | 33,06 | 7,31 | 0,94 | 0,56 | 0,95 | 6,91 | 16,38 | 0,45 |
| 14 | SD | 9 | m | 46,19 | 11,31 | 0,90 | 1,41 | 0,51 | 8,07 | 23,98 | 0,47 |
| 15 | SJ | 3 | m | 15,80 | 1,75 | 1,17 | 0,00 | 0,55 | 2,23 | 10,10 | 0,17 |
| 16 | SL | 4 | m | 19,11 | 5,08 | 1,34 | 1,51 | 0,10 | 3,38 | 7,79 | 0,65 |
| 17 | ŠA | 4 | m | 48,50 | 9,56 | 1,35 | 1,70 | 0,42 | 13,12 | 22,34 | 0,43 |
| 18 | ŠD | 3 | m | 54,27 | 10,35 | 0,69 | 1,49 | 1,09 | 10,32 | 30,33 | 0,34 |
| 19 | UM | 2 | m | 65,11 | 13,01 | 2,22 | 0,68 | 0,72 | 18,65 | 29,83 | 0,44 |

Tabela VIII: Osnovni statistični podatki za porfirine v obeh skupinah in skupaj

| Skupina | N | Podatek | Celokupni porfirini | Uro I | 7-CO | 6-CO | 5-CO | Kopro I | Kopro III | Uro I/Kopro III |
|---------|----|---|---------------------|-------|------|------|-------|---------|-----------|-----------------|
| KS | 13 | Povprečna vrednost ($\mu\text{g/L}$) | 79,89 | 9,27 | 1,24 | 1,23 | 2,17 | 15,82 | 51,62 | 0,49 |
| SA | 19 | | 34,71 | 6,12 | 1,11 | 0,92 | 0,65 | 7,20 | 18,77 | 0,41 |
| SK | 32 | | 53,07 | 7,40 | 1,16 | 1,05 | 1,27 | 10,70 | 32,12 | 0,44 |
| KS | 13 | Standardni odklon ($\mu\text{g/L}$) | 81,51 | 7,28 | 0,54 | 0,78 | 5,36 | 14,13 | 61,53 | 0,63 |
| SA | 19 | | 21,07 | 3,56 | 0,39 | 0,61 | 0,34 | 4,40 | 13,70 | 0,22 |
| SK | 32 | | 57,78 | 5,70 | 0,47 | 0,71 | 3,56 | 10,68 | 44,40 | 0,45 |
| KS | 13 | Variance ($\mu\text{g/L}$) ² | 6644,69 | 57,34 | 0,32 | 0,66 | 31,12 | 216,30 | 4101,69 | 0,43 |
| SA | 19 | | 443,99 | 13,41 | 0,16 | 0,39 | 0,12 | 20,43 | 198,04 | 0,05 |
| SK | 32 | | 3338,22 | 32,46 | 0,22 | 0,51 | 12,70 | 114,08 | 1971,42 | 0,20 |

KS – Kontrolna skupina, SA – Skupina avtizem, SK – vsi skupaj

Tabela IX: Interval zaupanja in p-vrednost za porfirine

| Porfirini | Interval zaupanja ($\mu\text{g/L}$) | | | p-vrednost |
|---------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------|------------|
| | Kontrolna skupina | Skupina avtizem | Vsi skupaj | |
| Celokupni porfirini | $79,89 \pm 44,31$ | $34,71 \pm 9,47$ | $53,07 \pm 20,02$ | 0,072 |
| Uro I | $9,27 \pm 4,12$ | $6,12 \pm 1,65$ | $7,40 \pm 1,97$ | 0,126 |
| 7-CO | $1,24 \pm 0,31$ | $1,11 \pm 0,18$ | $1,16 \pm 0,16$ | 0,469 |
| 6-CO | $1,23 \pm 0,44$ | $0,92 \pm 0,28$ | $1,05 \pm 0,25$ | 0,231 |
| 5-CO | $2,17 \pm 3,03$ | $0,65 \pm 0,16$ | $1,27 \pm 1,23$ | 0,345 |
| Kopro I | $15,82 \pm 7,99$ | $7,20 \pm 2,03$ | $10,70 \pm 3,70$ | 0,060 |
| Kopro III | $51,62 \pm 34,81$ | $18,77 \pm 6,33$ | $32,12 \pm 15,38$ | 0,092 |
| Uro I/Kopro III | $0,49 \pm 0,36$ | $0,41 \pm 0,10$ | $0,44 \pm 0,15$ | 0,629 |

Tabela X: Statistični podatki za težke kovine v obeh skupinah in skupaj

| Skupina | N | Podatek | Baker | Aluminij | Cink | Svinec | Živo srebro |
|---------|----|--------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| KS | 13 | Povprečna vrednost | $21,38 \mu\text{mol/L}$ | $6,87 \mu\text{g/L}$ | $12,02 \mu\text{mol/L}$ | $22,91 \mu\text{g/L}$ | $1,85 \mu\text{g/L}$ |
| SA | 19 | | $19,39 \mu\text{mol/L}$ | $7,83 \mu\text{g/L}$ | $11,64 \mu\text{mol/L}$ | $28,29 \mu\text{g/L}$ | $2,15 \mu\text{g/L}$ |
| SK | 32 | | $20,17 \mu\text{mol/L}$ | $7,47 \mu\text{g/L}$ | $11,79 \mu\text{mol/L}$ | $26,18 \mu\text{g/L}$ | $2,04 \mu\text{g/L}$ |
| KS | 13 | Standardni odklon | $3,80 \mu\text{mol/L}$ | $5,90 \mu\text{g/L}$ | $1,59 \mu\text{mol/L}$ | $11,98 \mu\text{g/L}$ | $1,06 \mu\text{g/L}$ |
| SA | 19 | | $4,20 \mu\text{mol/L}$ | $5,90 \mu\text{g/L}$ | $2,51 \mu\text{mol/L}$ | $17,05 \mu\text{g/L}$ | $1,95 \mu\text{g/L}$ |
| SK | 32 | | $4,10 \mu\text{mol/L}$ | $5,82 \mu\text{g/L}$ | $2,18 \mu\text{mol/L}$ | $15,25 \mu\text{g/L}$ | $1,66 \mu\text{g/L}$ |
| KS | 13 | Variance | $14,46 (\mu\text{mol/L})^2$ | $34,81 (\mu\text{g/L})^2$ | $2,54 (\mu\text{mol/L})^2$ | $143,49 (\mu\text{g/L})^2$ | $1,13 (\mu\text{g/L})^2$ |
| SA | 19 | | $17,64 (\mu\text{mol/L})^2$ | $34,85 (\mu\text{g/L})^2$ | $6,3 (\mu\text{mol/L})^2$ | $290,72 (\mu\text{g/L})^2$ | $3,79 (\mu\text{g/L})^2$ |
| SK | 32 | | $16,79 (\mu\text{mol/L})^2$ | $33,82 (\mu\text{g/L})^2$ | $4,76 (\mu\text{mol/L})^2$ | $232,60 (\mu\text{g/L})^2$ | $2,74 (\mu\text{g/L})^2$ |

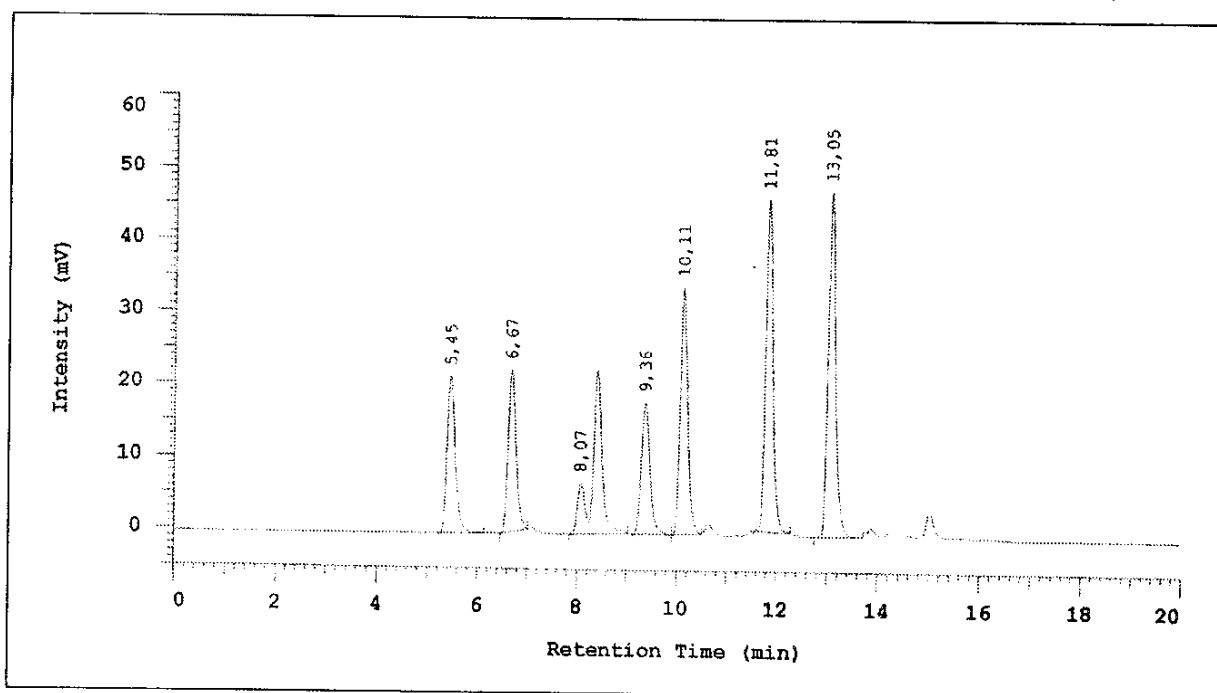
KS – Kontrolna skupina, SA – Skupina avtizem, SK – vsi skupaj

Tabela XI: Interval zaupanja in p-vrednost za težke kovine

| Težke kovine | Interval zaupanja | | | p-vrednost |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|
| | Kontrolna skupina | Skupina avtizem | Vsi skupaj | |
| Baker | $21,38 \pm 2,07 (\mu\text{mol/L})$ | $19,39 \pm 1,89 (\mu\text{mol/L})$ | $20,17 \pm 1,42 (\mu\text{mol/L})$ | 0,215 |
| Aluminij | $6,87 \pm 3,21 (\mu\text{g/L})$ | $7,83 \pm 2,65 (\mu\text{g/L})$ | $7,47 \pm 2,01 (\mu\text{g/L})$ | 0,674 |

| | | | | |
|-------------|--|--|--|-------|
| Cink | $12,02 \pm 0,87$ ($\mu\text{mol/L}$) | $11,64 \pm 1,13$ ($\mu\text{mol/L}$) | $11,79 \pm 0,76$ ($\mu\text{mol/L}$) | 0,663 |
| Svinec | $22,91 \pm 6,51$ ($\mu\text{g/L}$) | $28,29 \pm 7,67$ ($\mu\text{g/L}$) | $26,18 \pm 5,28$ ($\mu\text{g/L}$) | 0,371 |
| Živo srebro | $1,85 \pm 0,58$ ($\mu\text{g/L}$) | $2,15 \pm 0,88$ ($\mu\text{g/L}$) | $2,04 \pm 0,57$ ($\mu\text{g/L}$) | 0,664 |

5.1 KROMATOGRAMI

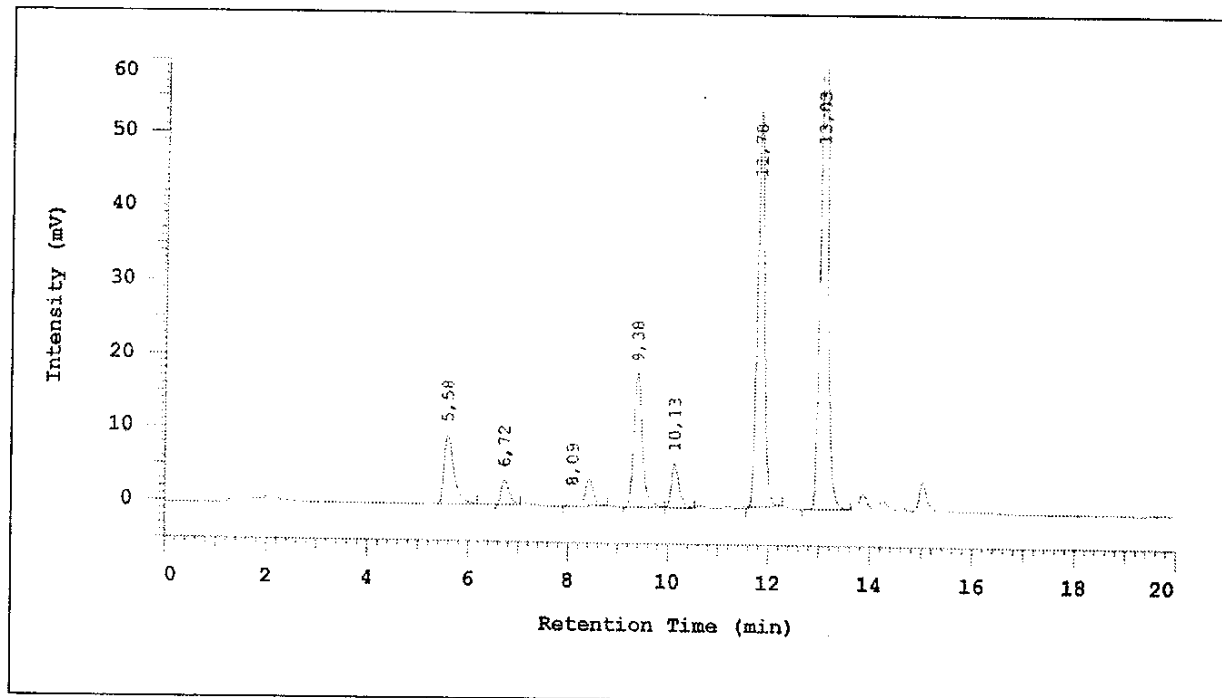


Slika 8: Kromatogram standardne raztopine

Tabela XII: Retencijski časi posameznih frakcij v standardni raztopini

| | |
|-----------------------|-----------|
| Uroporfirin I | 5.45 min |
| Heptakarboksiporfirin | 6.67 min |
| Heksakarboksiporfirin | 8.07 min |
| Interni standard IS | 9.36 min |
| Pentakarboksiporfirin | 10.11 min |
| Koproporfirin I | 11.81 min |
| Koproporfirin III | 13.05 min |

Standardna raztopina ni namenjena za kalibracijo ampak služi za kvalitativno kontrolo HPLC sistema (integracijski parametri, retencijski časi, ločba in oblika kromatogramskih vrhov). To nas privede do osnove za zanesljivo kromatografijo in omogoča efektiven potek dela.



Slika 9: Kromatogram urinskega kalibratorja

Tabela XIII: Retencijski časi posameznih frakcij v urinskem kalibratorju

| | |
|-----------------------|-----------|
| Uroporfirin I | 5.58 min |
| Heptakarboksiporfirin | 6.72 min |
| Heksakarboksiporfirin | 8.09 min |
| Interni standard IS | 9.38 min |
| Pentakarboksiporfirin | 10.13 min |
| Koproporfirin I | 11.78 min |
| Koproporfirin III | 13.03 min |

6 RAZPRAVA

Da bi določili, kako onesnaženo okolje vpliva na SAM, je bilo narejenih že več študij o obremenitvi telesa s težkimi kovinami. Krvne analize so slab pokazatelj tega, ker se ostanki kovin zadržujejo v tkivih. S kelatnimi sredstvi lahko sprostimo vezane kovine in s tem dobimo bolj zanesljiv indikator o izpostavljenosti. Ampak je sprostitelj težkih kovin s kelati lahko toksična in kelatna terapija je neprimerna za rutinsko določanje obremenitve s težkimi kovinami. Vzorci las predstavljajo alternativo, ampak nekateri otroci, ki kasneje postanejo avtistični ne izločajo kovin v lase, kar dodatno otežuje analize.

Porfirini, derivati pri sintezi hema, predstavljajo neodvisen indikator o povečani izpostavljenosti. Proizvodnja hema poteka 85% v celicah eritroidne vrste, ostalo pa v jetrih in ledvicah. Sinteza hema poteka v dveh korakih iz sukcinil Co-A in glicina do uroporfirinogena in v nadaljni seriji korakov preko pentakarboksiporfirinogena in koproporfirinogena v hem. Odvečni porfirinogeni metaboliti se izločijo v urin kot oksidirani porfirini, predvsem uroporfirin in koproporfirin. Porfirini, ki nastopajo v sredini

sintezne poti (uroporfirin in koproporfirin) so najbolj topni v vodi, medtem ko se hidrofobni protoporfirin največ izloča v žolč in feces.

Povečano izločanje porfirinov v urin ali porfirinurija je posledica blokade ključnih encimskih korakov pri stanjih kot so genetsko pomanjkanje encimov pri sintezi hema, hepatični, renalni in eritroidni bolezni in tudi pri toksični inhibiciji encimov sinteze hema. Pri poskusnih živalih in ljudeh, ki so bili izpostavljeni težkim kovinam se porfirini povečano izločajo v urin. Največji tarči za inhibicijo s težkimi kovinami sta uroporfirinogen dekarboksilaza (UROD) in koproporfirinogen oksidaza (CPOX). Inhibicija teh reakcij privede do specifičnega povečanja koproporfirina in pentakarboksiporfirina v urinu. S kelatno terapijo (DMPS in EDTA) se da znižati vrednosti porfirinov v urinu proti kontrolnim vrednostim. Lahko pa tudi nekovinske spojine motijo sintezo hema in povečajo vrednosti porfirinov v urinu. Prekoproporfirin (znan tudi kot keto-isokoproporfirin) nastaja z in vivo konverzijo pentakarboksiporfirinogena pod pritiskom interference težkih kovin in je zaradi tega specifičen porfirinski marker za zastrupitev s težkimi kovinami, posebno s Hg (25).

Tabela XIV: Referentne vrednosti za porfirine v urinu

| Porfirini | Referentne vrednosti |
|-----------------------|-----------------------------|
| Uroporfirin | 5,83 – 11,67 µg/L |
| Heptakarboksiporfirin | 1,18 – 2,76 µg/L |
| Heksakarboksiporfirin | 0,30 – 0,60 µg/L |
| Pentakarboksiporfirin | 0,70 – 2,03 µg/L |
| Koproporfirin | 32,68 – 52,29 µg/L |
| Celokupni porfirini | 40,69 – 69,35 µg/L |
| Uro/Kopro | 0,14 – 0,1 |

V kontrolni skupini imamo 8 deklet in 5 fantov od katerih ima 5 otrok povišane celokupne porfirine, od tega sta 2 dekleti in 3 fantje. Štiri dekleta in en fant pa imajo znižane celokupne porfirine. Uroporfirin I imata povišan 2 fanta in 1 dekle, znižan pa 1 fant in 5

deklet. Tri dekleta in 2 fanta imajo znižan heptakarboksiporfirin, zvišan heksakarboksiporfirin ima kar 6 deklet in 4 fantje, znižan pa en fant in eno dekle. Pentakarboksiporfirin je močno zvišan pri enem dekletu, znižan pa pri kar treh dekletih in dveh fantih. Pri noben od otrok ni povišan koproporfirin I, znižan pa je pri 3 fantih in kar 8 dekletih. Za razliko pa imajo trije fantje in eno dekle povišan koproporfirin III, znižan pa je tudi pri šestih dekletih in enem fantu. Razmerje uroporfirina I proti koproporfirinu III odstopa pri 9 otrocih, od tega je višji pri kar 6 dekletih in 2 fantih, znižan pa samo pri enem fantu.

Skupina avtizem zajema skupaj 19 otrok, od teh je 16 fantov in 3 dekleta. Celokupni porfirini so povišani pri dveh fantih in znižani pri treh dekletih in kar desetih fantih. Samo en deček ima povišan uroporfirin I, znižanega pa imata dve deklici in spet kar 9 fantov. Zvišan heptakarboksiporfirin ni pri nobenem od otrok, znižan pa pri eni deklici in 11 fantih, medtem ko je heksakarboksiporfirin povišan pri 2 dekletih in 11 fantih, pri treh fantih in enem dekletu pa sploh nismo zaznali heksakarboksiporfirina. Pentakarboksiporfirin pa je samo znižan pri 2 dekletih in 9 fantih. Za koproporfirin I in III nima nobeden od otrok povišanih vrednosti. Frakcijo koproporfirin I imajo znižano vsi, koproporfirin III pa prav tako vsi razen dveh dečkov. Razmerje uro I/kopro III je povišano tudi pri vseh razen pri eni deklici.

Podatek p-vrednosti ($p > 0,05$) nam pove, da obdržimo ničelno hipotezo, ki pravi, da se skupini statistično glede na vrednosti porfirinov med seboj ne razlikujeta oziroma, da med skupinama ni statistično pomembne razlike. V nasprotju z našim primerom pa so Nataf s sodelavci ugotovili pomembne razlike med avtistično in kontrolno skupino, v katero so bili vključeni otroci z drugimi nevrološkimi motnjami. Nepričakovano pa pri Aspergerjevem sindromu niso ugotovili razlike s kontrolno skupino. Poročajo, da je povišan koproporfirin pri avtistih (2,6 krat) primerljiv s povprečno povišanimi vrednostmi pri skupini ameriških zobozdravnikov (3,2 krat), ki so bili izpostavljeni živemu srebru ali pa pri kronični izpostavitvi arzenu (1,9 krat) pri kitajskih vaščanih. Ugotovili so tudi, da sta prekoprofirin in pentakarboksiporfirin, markerja zastrupitve s težkimi kovinami, povišana pri avtističnih otrocih. Ampak ni bilo pri vseh teh otrocih zaznati porfirinurije. Presežek porfirinov pri avtizmu se razločno in signifikantno zniža s kelatno (DMSA)

terapijo, nadaljne poročajo. Kelatna sredstva se uporabljajo za izločanje težkih kovin, kar namiguje na povezavo med povišanimi vrednostmi porfirinov in vsebnostjo težkih kovin.

Tabela XV: Referentne vrednosti za težke kovine

| Baker | Aluminij | Cink | Svinec | Živo srebro |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| serum | serum | serum | kri | kri |
| 11 – 26,7 $\mu\text{mol/L}$ | do 10 $\mu\text{g/L}$ | 10 – 19,7 $\mu\text{mol/L}$ | otroci do 100 $\mu\text{g/L}$ | do 8 $\mu\text{g/L}$ |

V kontrolni skupini je samo eno odstopanje rezultatov od referentnih vrednosti, in sicer ena deklica ima rahlo povišano koncentracijo bakra v serumu.

Pri skupini avtizem je malo več odstopanj, vse vrednosti, ki niso v intervalu referentnih vrednosti kažejo le manjše odstopanje. En fant ima povišan baker v serumu in štirje fantje imajo povišan aluminij v serumu. Ena deklica ima znižan cink v serumu in en fant ima povišano živo srebro v krvi.

Pri težkih kovinah je prišlo le do manjših odstopanj in iz teh rezultatov se ne da opredeliti kakšnih pomembnih sklepanj.

Živo srebro lahko interferira pri reakciji od pentakarboksiporfirinogena III do koproporfirinogena III in med nadaljno reakcijo do protoporfirinogena IX. Pri zastrupitvi s Hg so v urinu tipično povečani pentakarboksiporfirin, koproporfirin III in razmerje prekopro/uro I in III, prav tako pa je dominantno v urinu povečana koncentracija prekoproporfirina. Če je prekoproporfirin zelo povišan, potem se vedno sumi na efekt živega srebra, manj povišane vrednosti pa so pri tem lahko nepomembne. Povečan prekoproporfirin z znižanim uroporfirinom I in III, bo zvišal razmerje prekopro/uro I in III, kar je lahko specifično za zastrupitev s Hg. Na drugi strani pa povečan uroporfirin I in III ob normalnem razmerju prekopro/uro I in III ne pomeni vpliva živega srebra ampak verjetno stimulacijo biosinteze (26).

Na akumuliranje pentakarboksiporfirina pri zastrupitvi s Hg lahko deluje koproporfirinogen oksidaza, kar privede do abnormalnega produkta

ketoisokoproporfirinogena, ki naj bi pri kromatogramu predstavljal vrh, ki ga označujemo kot prekoprofirin (22).

Kronična porfirinurija povzročena zaradi živega srebra je lahko faktor pri nastanku avtizma (26).

Toksični učinki svınca lahko vplivajo na reakcije od ALA do uroporfirinogena in reakcijo od koproporfirinogena III do protoporfirinogena IX. Pri zastrupitvi s svincem sta tipično v urinu povišana kopropofirin I in III. Lahko sta povišana tudi aminolevulinska kislina in cink protopofirin pri zastrupitvi s svincem ali pa ob pomanjkanju železa. Pri zastrupitvi s svincem se kažejo podobni simptomi kot pri akutni intermitentni porfiriji, ki so bolečine v trebuhu, zaprtje in bruhanje. Anemija, ki se pojavi pri zastrupitvi s svincem, je pri manjši izpostavljenosti, ki povzroča porfirijo, lahko odsotna. To namiguje, da celoten tok skozi porfirinsko pot ni močno zmanjšan ob pristnosti svınca, čeprav se veliko intermediatov izloči zaradi toksičnih učinkov (26).

Aluminij inhibira nekatere encime pri sintezi hema in je povezan z tipično porfirinurijo pri kroničnih hemodializnih pacientih, ki so pogosto preobremenjeni z aluminijem. Povzroča tudi specifično povišane vrednosti kopropofirina III v urinu (26).

7 SKLEP

Spektroavtistične motnje so resne razvojne motnje z še naznanim vzrokom in so v zadnjem času verjetno celo v porastu. Nekateri znanstveniki domnevajo, da gre najverjetneje za kombinacijo genetskih in okoljskih dejavnikov. Zagotovo pa stroka še ni enotnega mnenja glede nastaka in niti glede diagnosticiranja in zdravljenja otrok s SAM. Zato bo tukaj potrebno narediti še veliko raziskav, da se tem otrokom nudi čimboljše zdravljenje in kvaliteta življenja. Ključ do tega bi znal biti v individualnem pristopu do vsakega posameznika, saj se pri vsakem motnje kažejo na drugačen način.

Naša raziskava je ena redkih, ki poleg otrok s SAM za kontrolno skupino vključuje otroke z drugimi nevrološkimi motnjami in ne zdravih otrok. Je pa tudi prva v Slovenji, ki zajema otroke s SAM.

Metoda HPLC se je izkazala kot primerna za merjenje porfirinov v urinu.

Rezultati meritev porfirinov v urinu kažejo pomemben delež odstopanj nad zgornjo in spodnjo mejo referentnih vrednosti v obeh skupinah. Razmerje uro I/kopro III je povišano pri 26 od 32 otrok (81,25%), od teh 8 (61,54%) iz kontrolne skupine in 18 (94,74%) iz skupine avtizem. To nakazuje da je to pomemben podatek pri otrocih z nevrološkimi motnjami, še posebno pri otrocih z SAM. To bi lahko bil pomemben parameter pri nadaljnjih raziskavah za diagnosticiranje avtističnih otrok.

Pri meritvah težkih kovin v serumu ali krvi pa smo zaznali le minimalna odstopanja iz katerih se ne da sklepati kakršnekoli povezave med porfirinskimi vrednostmi. Prav tako ne moremo sklepati, da težke kovine vplivajo na katerekoli nevrološke motnje v naši celotni populaciji. To izključuje povezanosti abnormalnih vrednosti porfirinov pri zastrupitvi s težkimi kovinami v našem primeru.

Statistična obdelava podatkov za porfirine in težke kovine ne kaže statistično pomembne razlike ($p > 0,05$) med skupinama.

Za izboljšanje raziskave bi bilo smiselno povečati število otrok, morda bi lahko otroke znotraj skupin razdelili na podskupine na posamezno nevrološko motnjo in s tem povečali specifičnost statistične obdelave. Prav tako bi namesto naključnega vzorca urina lahko uvedli odvzem prvega jutranjega ali 24-urnega urina, za boljšo primerljivost rezultatov.

8 LITERATURA

1 http://avtizem.org/kaj_je_avtizem.html 17.11.2009

2 Scahill L, Bearss K: The Rise in Autism and the Mercury Myth. Journal Of Child And Adolescent Psychiatric Nursing 2009; 22 (1): 51-53.

3 http://avtizem.com/zgodovina_avtizma.php 17.11.2009

4 http://avtizem.org/zgodovina_avtizma.html 17.11.2009

5 <http://info.med.yale.edu/chldstdy/autism/retts.html> 17.11.2009

6 http://avtizem.org/glavne_zna_ilnosti_avtizma.html 17.11.2009

- 7 Inglese MD, Elder JH: Caring for Children With Autism Spectrum Disorder, Part I: Prevalence, Etiology, and Core Features. *Journal of Pediatric Nursing* 2009; 24 (1): 41-48.
- 8 Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I: The Genetics of Autism. *Pediatrics* 2004; 113(5): 472-486.
- 9 Geier DA, King PG, Sykes LK, Geier MR: A comprehensive review of mercury provoked autism. *The Indian Journal Of Medical Research* 2008; 128 (4): 383-411.
- 10 Scahill L, Bearss K: The Rise in Autism and the Mercury Myth. *Journal Of Child And Adolescent Psychiatric Nursing* 2009; 22 (1): 51-53.
- 11 http://avtizem.com/diete_dodatki.php 02.12.2009
- 12 Hsu CL, Lin CY, Chen CL, Wang CM, Wong MK: The Effects of A Gluten and Casein-free Diet in Children with Autism: A Case report. *Chang Gung Medical Journal* 2009; 32 (4): 459-65.
- 13 Manning-Courtney P, Brown J, Molloy CA, Reinhold J, Murray D, Sorensen-Burnworth R, Messerschmidt T, Kent B: Diagnosis and Treatment of Autism Spectrum Disorders. *Current Problems In Pediatric And Adolescent Health Care* 2003; 33 (9): 283-304.
- 14 Dodd Inglese M: Caring for Children With Autism Spectrum Disorder, Part II: Screening, Diagnosis, and Management. *Journal of Pediatric Nursing* 2009; 24 (1): 49-59.
- 15 http://en.wikipedia.org/wiki/Diagnostic_and_Statistical_Manual_of_Mental_Disorders 05.12.2009
- 16 Sanborn MD, Abelson A, Campbell M, Weir E: Identifying and managing adverse environmental health effects: 3. Lead exposure. *Canadian Medical Association Journal* 2002; 166 (10): 1287-92.
- 17 Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS: Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *The Indian Journal Of Medical Research* 2008; 128 (4): 545-56.
- 18 Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF:

Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicology Letters* 2006; 161 (2): 115-23.

19 Herkovits J, Helguero LA: Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibian embryos. *The Science Of The Total Environment* 1998; 221 (1): 1-10.

20 <http://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin> 05.12.2009

21 Krnjak L, Skitek M: Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki. *Farmacevtski vestnik* 2005; 56: 125-130.

22 Lord RS, Bralley JA: *Laboratory Evaluations for Integrative and Functional Medicine*, 2nd edition, Metametrix Institute, Duluth, 2008: 481 - 490

23 http://en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography 06.12.2009

24 http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg 06.12.2009

25 Nataf r, Skorupka C, Amet L, Lam A, Springbett A, Lathe, R: Porphyrinuria in childhood autistic disorder: Implications for environmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 214 (2): 99-108.

26 <http://www.mexametrix.com/files/test-menu/interpretive-guides/Porphyrins-IG.pdf>
14.06.2010