

Vrednosti težkih kovin v krvi in specifičnih porfirinov v urinu pri otrocih z avtizmom

Heavy metals and specific porphyrine levels in children with autism

Macedoni-Lukšič Marta,^{1,3} Gosar David,¹ Oražem Jasna,¹ Kodrič Jana,¹ Lešnik-Musek Petra,¹ Zupančič Mirjana,¹ France-Štiglic Alenka,² Sešek-Briški Alenka,² Neubauer David,¹ Osredkar Joško²

¹ Univerzitetna
Pediatrična bolnica,
Bohoričeva 20, 1000
Ljubljana

² Univerzitetni inštitut
za klinično kemijo in
biokemijo, Univerzitetni
Klinični center Ljubljana,
Zaloška 2, 1000
Ljubljana

³ Inštitut za avtizem in
sorodne motnje, Goričane
84, 1215 Medvode

Korespondenca/ Correspondence:

doc. dr. Marta Macedoni-
Lukšič, dr. med.
Inštitut za avtizem in
sorodne motnje, Goričane
84, 1215 Medvode
e: mmacedoni@gmail.
com

Ključne besede:

avtizem; otroci; težke
kovine; cepljenje;
tiomersal

Key words:

autism; children; heavy
metals; vaccination;
thymersal

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 376–86

Prispelo: 14. jun. 2013,
Sprejeto: 15. jan. 2014

Raziskavo je finančno

Izvleček

Izhodišča: Namen naše študije je bil primerjati skupino otrok s spektroatvističnimi motnjami (SAM) in kontrolno skupino otrok z drugimi nevrološkimi motnjami/bolezni glede krvnih vrednosti težkih kovin (cink, baker, aluminij, živo srebro, svinec) in vrednosti specifičnih porfirinov v urinu.

Metode: V študijo smo vključili skupino otrok s SAM (n = 52, povprečna starost = 6,2 let) in kontrolno skupino otrok z drugimi nevrološkimi motnjami/bolezni (n = 22, povprečna starost = 6,6 let), ki sta bili med seboj primerljivi glede na razvojno starost oz. spoznavne sposobnosti (Mann-Whitney U = 565,0, p = .595). Meritve težkih kovin v krvi smo izvedli z atomsko absorpcijsko spektrometrijo, meritve porfirinov v urinu pa z metodo HPLC s fluorimetričnim detektorjem. Pri analizi rezultatov smo uporabili večsmerno analizo kovariance (MANCOVA) in generalizirane linearne modele.

Rezultati: Skupini se nista pomembno razlikovali glede vrednosti posameznih težkih kovin v krvi, signifikantna razlika med skupinama je bila le v razmerju Cu/Zn, ki je bilo pomembno višje v skupini otrok s SAM (Wald $\chi^2 = 6.6$, $df = 1$, $p = .010$). Tudi glede vrednosti uroporfirina I, heptakarboksiporfirina I, heksakarboksiporfirina I se skupini nista pomembno razlikovali, ob tem, ko sta bili vrednosti koproporfirina I in koproporfirina III v urinu nižji v skupini otrok s SAM.

Zaključki: Glede na zvišano razmerje Cu/Zn bi bilo smiselno določiti krvni vrednosti cinka in bakra pri vseh otrocih s SAM in v primeru potrebe dodati cink v prehrano.

Abstract

Background: The aim of our study was to determine the levels of heavy metals in blood (zinc, copper, aluminium, lead, mercury), as well as the specific porphyrin levels in the urine of patients with ASD compared with patients with other neurological disorders.

Methods: The study was performed in a group of children with ASD (N = 52, average age = 6.2y) and control group of children with other neurological disorders (N = 22, average age = 6.6y), matched in terms of intellectual abilities (Mann-Whitney U = 565.0, p = .595). Measurement of heavy metals in blood was performed by atomic absorption spectrometry, while the HPLC method by means of a fluorescence detector was used to test urinary porphyrin levels. Results were compared across groups using a multivariate analysis of covariance (MANCOVA). In addition, a generalized linear model was used to establish the impact of group membership on the blood Cu/Zn ratio.

Results: In terms of heavy metal blood levels, no significant difference between the groups was found. However, compared to the control group, ASD group had significantly elevated blood Cu/Zn ratio (Wald $\chi^2 = 6.6$, $df = 1$, $p = .010$). Additionally, no significant difference between the groups was found in terms of Uroporphyrin I, Heptacarboxyporphyrin I, Hexacarboxyporphyrin and Pentacarboxyporphyrin I. However, the levels of Coproporphyrin I and Coproporphyrin III were lower in the ASD group compared to the controls.

Conclusions: Due to the observed higher Cu/Zn ratio we'd suggest that blood levels of zinc and copper should be tested in all children with ASD and a Zn supplement should be given as needed.

podprla ARRS
Šifra projekta: J3-9470-0312-06
Naslov: Biokemični dejavniki pri nastanku avtizma
Vodja: Joško Osredkar
Pogodba: 1000-07-219470

Uvod

Avtizem je razvojnonevrološka motnja s kakovostno spremenjenim vedenjem na področju socialne interakcije, besedne in nebesedne komunikacije ter s prisotnostjo stereotipnega vedenja in/ali ozko usmerjenih interesov. Etiologija je kompleksna in heterogena s soudeležbo tako genetskih kot okoljskih dejavnikov. Biološkega označevalca ne poznamo, diagnozo postavimo glede na značilne klinične znake. Avtizem je nekoč veljal za redko motnjo, v zadnjih 10-20 letih pa se je njegova incidenca drastično povečala. Danes predstavljajo vse spektroatvistične motnje (SAM) skupaj najhitreje naraščajoče razvojne motnje. Pogostost je narasla od 1/2500 leta 1970 do skoraj 1/100 danes.¹ Na ta izjemen porast so vplivali tako sprememba koncepta, dimenzionalni pogled na to razvojno motnjo, zamenjava in »dodajanje« diagnostov kot tudi večja ozaveščenost, nove terapevtske možnosti in specifični pristopi v izobraževanju teh otrok.²⁻⁶

Etiopatogeneza ostaja v večini primerov nepojasnjena. Še vedno velja, da so genetski vplivi pri avtizmu najpomembnejši, a v zadnjih študijah raziskovalci ugotavljajo manjšo konkordanco za monozigotne (0,58) in dizigotne (0,21) dvojčke v primerjavi s starejšimi študijami, kar posredno kaže na večji pomen okoljskih dejavnikov.⁷ Z novimi strategijami na področju raziskovanja genetike (analiza genske povezanosti in asociacijske študije) se sicer odkriva čedalje več genov, ki se povezujejo s povečanim tveganjem za SAM, a kljub temu pri večini teh SAM v klinični praksi ne odkrijemo genetske motnje, ki bi pojasnjevala specifično klinično sliko.^{8,9} Ob tem novejša genomska presejalna metode, predvsem primerjalna genomska hibridizacija z uporabo mikromrež, prispevajo k natančnejši klinični genetski diagnostiki v primerjavi s klasično kariotipizacijo. Redke *de novo* ali prirojene strukturne variabilnosti genoma, zlasti spremembe v številu kopij – SGV (*angl.* Copy-number variations, CNVs) naj bi tako našli pri 5-10 % otrok z »idiopatskim« avtizmom, v naši študiji, v katero so bili zajeti večinoma otroci, ki so poleg avtizma imeli pridruženo duševno manjrazvitost, pa celo več – 16,6 %.^{10,11}

V zadnjih 10 letih so v izrazitem porastu študije o morebitnih okoljskih dejavnikih tveganja. Ena največjih tovrstnih ameriških populacijskih študij *CHARGE* (*angl.* An Epidemiologic Investigation of Genetic and Environmental Factors Contributing to Autism), ki povezuje tako okoljske kot genetske dejavnike, se je začela l. 2006, poudarek pa je na okoljskih dejavnikih, ki bi lahko delovali na razvoj avtizma med nosečnostjo in v prvem letu življenja.¹² Novejši večji populacijski študiji sta še *SEED* (*angl.* The Study to Explore Early Development) in predvsem *ABC* (*angl.* The Autism Birth Cohort), ki poleg interakcije med genetskimi in okoljskimi dejavniki vključujeta še časovno razsežnost.^{13,14}

Med prenatalnimi okužbami ostajajo rdečke na prvem mestu kot dejavnik tveganja. Tudi pretirano uživanje alkohola, uživanje določenih zdravil – valproat, talidomid, mizoprostol, višja starost staršev in metabolne motnje matere v nosečnosti povečajo tveganje za razvoj avtizma.¹⁵⁻¹⁷ V okviru študije *CHARGE* so poleg omenjenih identificirali kot možne dejavnike tveganja tudi onesnaženost zraka, vročinska stanja med nosečnostjo ter izpostavljenost pesticidom, medtem ko je uživanje folne kisline na začetku in v prvem trimesečju nosečnosti zmanjšalo tveganje za nastanek avtizma.¹⁸⁻²² Narašča tudi količina informacij v zvezi z imunskimi dejavniki v povezavi z avtizmom.²³⁻²⁵

Še vedno pa, predvsem med laično populacijo, ostaja največji interes za raziskovanje možnega vpliva težkih kovin, predvsem živega srebra (Hg), na razvoj avtizma. Živo srebro je za razvijajoče možgane med najbolj toksičnimi težkimi kovinami, ne vemo pa, kolikšna je še »varna« koncentracija.^{26,27} Lahko povzroča vrsto nevroloških abnormnosti, vključno z avtizmu podobno vedenjsko sliko.²⁸ V slovenskem prostoru je bilo odmevno razpravljanje o »možnih vplivih živega srebra na patogenezo avtizma«, v katerem avtor obširno razlaga mehanizme nevrotoksičnega delovanja metil- in etil-Hg. Glavni vir Hg, ki ga avtor v tem kontekstu omenja, je tiomersal – etilna oblika Hg, ki se je uporabljal oz. se ponekod še, kot konzervans v cepivih.²⁹

Porfirini, predvsem specifični, v urinu so lahko kazalnik zastrupitve s težkimi kovinami.^{30,31} Pri otrocih z avtizmom so našli določene derivate – koproporfirin in prekoprofirin – v pomembno večji količini kot pri kontrolnih skupinah otrok z ne-nevrološkimi obolenji in zdravih otrok.³² Ostali porfirini – uroporfirin, heptakarboksiporfirin in pentakarboksiporfirin kažejo manj konsistentne vzorce povezanosti s SAM.³³

Čezmerno izločanje porfirinov v urinu je posledica blokade ključnih encimov v presnovi porfirinov, npr. uroporfirinogen dekarboksilazne in koproporfirinogen oksidazne.³⁴⁻³⁶ V primeru inhibicije omenjenih dveh encimov se zviša koncentracija koproporfirina in pentakarboksiporfirina v urinu. Prekoproporfirin pa nastaja iz pentakarboksiporfirinogena pod vplivom težkih kovin, predvsem živega srebra. Tisti otroci z avtizmom, ki imajo izraženo t.i. pico (hranjenje z neužitnimi snovmi), imajo tveganje tudi za zastrupitev s svincem.³⁷

Med elementi v sledovih, ki so ključni za delovanje živih organizmov, ima cink prav posebno mesto.³⁸ V osrednjem živčevju je pomemben za delovanje več kot 200 encimov. Deluje v antagonističnem razmerju z bakrom. Porušeno ravnovesje teh dveh elementov – predvsem v smeri znižanega cinka in/ali zvišanega bakra (Cu/Zn) lahko vodi v mnoge zdravstvene težave.³⁸⁻⁴⁰ Najpomembnejši celični vir cinka je protein metalotionein (MT). Z vezavo na MT cink med drugim sodeluje tudi pri detoksifikaciji težkih kovin. Ta proces poteka kot cikel oksidoredukcij.⁴¹ Za njegov potek so poleg cinka in bakra pomembni še selen ter aminokislinski histidin in cistein. Na drugi strani je glavni celični vir bakra t.i. Cu/Zn superoksid dismutaza (Cu/Zn SOD₁), ki igra pomembno vlogo pri zmanjševanju oksidativnega stresa.³⁷ Raziskovalci poročajo o pomembno znižanih vrednostih serumskega cinka in/ali zvišanem razmerju baker/cink pri osebah z avtizmom.^{27,42,43}

Z namenom, da tudi v našem prostoru prispevamo k boljšemu razumevanju možnega vpliva težkih kovin, smo v letih 2007–2010 opravili raziskavo na skupini otrok s SAM in kontrolni skupini otrok z drugimi nevrološkimi motnjami, v kateri

smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Ali imajo otroci s SAM pomembno višjo koncentracijo svinca, živega srebra, aluminija, bakra in manjšo cinka v serumu v primerjavi s kontrolno skupino?
2. Ali imajo otroci s SAM pomembno višjo koncentracijo specifičnih porfirinov v urinu v primerjavi s kontrolno skupino?

Udeleženci in metode

V raziskavo smo naključno vključili otroke, ki smo jih obravnavali v obdobju 2006–2009 na Kliničnem oddelku za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo Pediatrične klinike v Ljubljani. Pred vključitvijo so bili starši in otroci seznanjeni z namenom raziskave ter zaproseni za pisni pristanek. Vključili smo skupino otrok s spektroatističnimi motnjami (SAM) (N = 52) in sicer na podlagi diagnostičnih meril DSM IV TR (2000) in rezultatov na lestvici CARS (*angl.* Childhood Autism Rating Scale) in kontrolno skupino otrok z drugimi nevrološkimi motnjami in boleznimi (N = 22).

Psihološko ocenjevanje

Spoznavne sposobnosti so bile glede na starost udeležencev ocenjene z Lestvico zgodnjega razvoja Nancy Bayley (BSID-II) – Mentalno lestvico, z Wechslerjevo lestvico inteligentnosti za otroke in mladostnike (WISC-III) in Ravenovimi barvnimi progresivnimi matricami (CPM). Lestvice zgodnjega razvoja Nancy Bayley (BSID-II) so v Sloveniji in po svetu eden najbolj pogosto uporabljenih psihodiagnostičnih instrumentov za ocenjevanje zgodnjega razvoja dojenčkov in malčkov od enega do 48 mesecev starosti. Omogočajo standardizirano primerjavo otrokovega razvoja z razvojem njegovih vrstnikov ter izračun dveh ločenih količnikov za mentalni in motorični razvoj s povprečjem 100 in standardnim odklonom 15. Slovenska priredba inštrumenta⁴⁴ je preverjena na reprezentativni skupini 303 slovenskih otrok in izkazuje dobro zanesljivost (Cronbach α za mentalno lestvico = 0.78–0.93).

Wechslerjeva lestvica inteligentnosti za otroke in mladosntnike (WISC-III)⁴⁵ je v slovenskem prostoru zadnja različica široko uporabljenih Wechslerjevih lestvic za ocenjevanje inteligentnosti. Pri otrocih med šestim in pol ter 16 letom starosti omogoča oceno splošnih spoznavnih sposobnosti s pomočjo izračuna količnika IQ s povprečjem 100 in standardnim odklonom 15. Slovenska priredba WISC-III kaže dobro zanesljivost (Cronbach α za skupno lestvico = 0.88–0.92), norme, ki omogočajo primerjavo posameznikovih dosežkov z vrstniki pa so v slovenski priredbi zasnovane na reprezentativni skupini 1100 otrok. Poleg WISC-III smo v naši raziskavi pri manjši skupini otrok s SAM (N = 5) za oceno splošnih spoznavnih sposobnosti uporabili tudi Ravenove barvne matrice (CPM)⁴⁶. Preskus je v tujini in Sloveniji zanesljiv (Cronbach α = 0.89) in široko uporabljen test splošnega (g) faktorja inteligentnosti. Pri preskusu se otrok sooči z zaporedjem likovnega gradiva in ugotavlja povezave med elementi, ki mu omogočajo nadaljevanje likovnega zaporedja. Testni dosežek na preskusu je izražen v obliki percentilnega ranga. Slovenske norme za test so na voljo od četrtega leta starosti dalje in so osnovane na skupini 1290 otrok. Da smo lahko rezultate na testu CPM primerjali z rezultati testov BSID-II in WISC-III, smo v naši raziskavi rezultate na testu CPM, izražene v percentilnih rangih, normalizirali in jim določili standardno vrednost na normalno porazdeljeni lestvici s povprečjem 100 in standardnim odklonom 15. Tako dobljene rezultate smo nato združili z normalno porazdeljenimi rezultati na lestvici splošnih spoznavnih sposobnosti WISC-III ter mentalni lestvici testa BSID-II ter jih razdelili v pet kategorij (< 50, 51–60, 61–70, 71–80, > 81). Čeprav rezultati na uporabljernih treh inštrumentih ne merijo popolnoma identičnih spoznavnih sposobnosti, je njihova konvergentna veljavnost precejšnja, še posebej pri otrocih, starejših od dveh let.⁴⁷ Raziskave namreč kažejo, da je napovedna veljavnost mentalne lestvice BSID-II za dosežke na testih splošnih spoznavnih sposobnosti, kot je WISC-III v otroštvu, visoka ($r = 0.73$ – 0.79),⁶⁰ prav tako pa zmerno do

visoko korelirajo rezultati na testih CPM in WISC-III (povprečni $r = 0.67$).⁴⁶

Analiza težkih kovin

Analiza težkih kovin v krvi je bila opravljena na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani in je potekala po naslednjih metodah:

1. analiza cinka in bakra s t.i. plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo,
2. analiza aluminija in svinca z metodo elektrotermične atomske absorpcijske spektrometrije,
3. analiza živega srebra z metodo atomske absorpcijske spektrometrije s hladnimi parametri.

Meritve *živega srebra* smo izvedli na atomskem absorpcijskem spektrometru Varian SpectrAA–250 plus (Varian Australia Pty Ltd Mulgrave, Victoria, Avstralija) z dodatno enoto VGA 77 za analizo s hladnimi parametri po kislinem razkroju v mikrovalovni pečici MARSXpress (CEM, ZDA). Razredčeni vzorec in raztopino SnCl₂ v HCl smo s pomočjo peristaltične uvedli v reakcijsko spiralo, kjer je potekla redukcija ionizirane oblike živega srebra s pomočjo kositrovih ionov do atomske oblike, ki je v obliki živosrebrove pare prehajalo v argon. Z dodatnim tokom argona smo atome živega srebra uvedli v merilno celico, skozi katero je potekala svetlobna pot. V devetih sekundah je spektrometer opravil 3 meritve približno eno minuto po začetku vleka vzorca, ko je bilo vzpostavljeno ravnotežno stanje. Meritve so bile zadovoljive, če je bila pri absorbancah, večjih od 0,010, relativna standardna deviacija manjša od 5 %.

Aluminij v serumu in svinec v krvi smo določali z metodo elektrotermične atomske absorpcijske spektrometrije po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Analizo kontrolnega materiala (Seronorm Trace elements - serum) smo izvajali pred začetkom dela, med delom na vsakih 10 vzorcih in po končanem delu. Za našo me-

todo določanja aluminija je meja zaznavanja 1,64 µg/L, nenatančnost v seriji pri koncentraciji 63,4 µg/L je 3,67 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 63,4 µg/L je 4,80 %. Netočnost pri koncentraciji 63 µg/L je 1,74 %. Za našo metodo določanja svinca je meja detekcije 0,015 µg/L, nenatančnost v seriji je pri koncentraciji 384 µg/L 4 %, pri koncentraciji 37 µg/L pa 8 %, nenatančnost med serijami je pri koncentraciji 386 µg/L 6,6 %, pri koncentraciji 36 µg/L pa 12 %. Netočnost pri koncentraciji 35,6 µg/L je 4,7 % in pri koncentraciji 385,5 µg/L je 0,7 %.

Baker in cink v serumu smo določali z metodo plamenske atomske absorpcijske spektrometrije po utečenih rutinskih postopkih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Kalibrirali smo po metodi standardnega dodatka z vodnimi standardi treh različnih koncentracij. Baker v vzorcih smo merili v seriji. Analizo kontrolnega materiala (Precinorm U, Precipath U) smo izvajali pred začetkom dela in po končanem delu. Za našo metodo določanja bakra je meja zaznavanja 1,2 µmol/L, nenatančnost v seriji pri koncentraciji 17,2 µmol/L je 2,4 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 17,5 µmol/L je 3,7 %. Netočnost pri koncentraciji 17,5 µmol/L je 1,7 %. Za našo metodo določanja cinka je meja zaznavanja 1,6 µmol/L,

nenatančnost v seriji pri koncentraciji 12,96 µmol/L je 3,7 %, nenatančnost med serijami pri koncentraciji 13,28 µmol/L je 5,3 %. Netočnost pri koncentraciji 13,28 µmol/L je 2,15 %.

Analiza porfirinov

Analiza specifičnih porfirinov v urinu je bila opravljena v podjetju KOBIS, d.o.o. Odvzeti urin smo takoj zavili v aluminjasto folijo in ga zamrznili do analize na -30 °C. Analize smo izvedli s tehniko HPLC s fluorimetričnim detektorjem. Postopek smo izvedli z reagenčnim kompletom ClinRep firme RECIPE in sicer: po centrifugiranju (3000 g, 5 min) smo 1 ml supernatanta zakisali s HCl, ponovno centrifugirali in 50 ml raztopine aplicirali na reverzno fazno kolono (C18, 5 mm). Porfirinske frakcije smo eluirali z mobilno fazo z gradientom, frakcije porfirinov v eluatu pa detektirali s fluorescenčnim detektorjem.

Analiza specifičnih porfirinov je bila opravljena ločeno za dve skupini frakcij: a) uroporfirin I, heptakarboksiporfirin I, heksakarboksiporfirin I in pentakarboksiporfirin I; b) koproporfirin I in koproporfirin III. V dve skupini smo jih razdelili glede na predhodne raziskave, kjer se je pokazalo, da

Tabela 1: Značilnosti skupine otrok s SAM ter kontrolne skupine otrok.

	SAM	Kontrolna skupina	p
N	52	22	
starost v letih (M ± SD)	6,2 ± 3,0	6,6 ± 3,7	.620
spol (% moških)	88,7	52,2	.002

Tabela 2: Primarne diagnoze otrok v kontrolni skupini.

Diagnoza	N	%
Razvojni zaostanek/duševna manjrazvitost	12	56,5
Epilepsija	2	8,7
Hiperkinetična motnja	2	8,7
Tourettov sindrom	1	4,3
Drugo ^a	5	21,7

Opomba: a – med udeleženci z drugimi diagnozami so bili po en bolnik z diskretnim hemisindromom, motnjo stereotipnega gibanja, tuberozno sklerozo ter poznimi posledicami po prebolelem bakterijskem meningitisu

sta koproporfirin I in III v primerjavi z drugimi porfirinskimi frakcijami (uroporfirin, heptakarboksipofirin, heksakarboksipofirin) najbolj zanesljivo povezana z zastrupitvijo z živim srebrom pri ljudeh in živalih.³³

Statistična analiza

Skupini smo glede na povprečno starost primerjali s pomočjo *t*-testa ter glede na spol in soobolevnost s pomočjo ustreznih neparametričnih testov (χ^2 test, Fisherjev natančni test, Mann-Whitney *U* test). Za statistično oceno razlik med skupinama glede na vrednosti težkih kovin v krvi in porfirinov v urinu smo naprej opravili večsmerno analizo kovariance (MANCOVA), potem pa še izračun petih generaliziranih linearnih modelov s pomočjo programskega paketa SPSS 19.0 (IBM SPSS Statistics, 2010). Za oceno povezanosti biokemičnih parametrov ter ravni splošnih spoznavnih sposobnosti smo uporabili Spearmanov neparametrični korelacijski koeficient. Raven sprejemljive napake α za vse opravljene statistične analize je bila .05.

Rezultati

Značilnosti udeležencev

Skupini otrok sta bili primerljivi glede na starost ter večino ključnih spremenljivk, razlikovali pa sta se glede spola, in sicer so bili otroci v kontrolni skupini pogosteje ženskega spola (Tabela 1). Starostni razpon otrok je

bil od 1–16 let starosti. Diagnoze v kontrolni skupini otrok so prikazane v Tabeli 2.

Spoznavne sposobnosti so bile ocenjene z Lestvico zgodnjega razvoja Nancy Bayley (BSID-II) – Mentalno lestvico pri 29 otrocih s SAM (54,7 %) in pri 13 otrocih v kontrolni skupini (54,7 %), z Wechslerjevo lestvico inteligentnosti za otroke (WISC-III) pri 19 otrocih s SAM (35,8 %) in 10 otrocih v kontrolni skupini (43,5 %) in z Ravenovimi barvnimi progresivnimi matricami (CPM) pri 5 otrocih s SAM (9,5 %). Raven splošnih spoznavnih sposobnosti je bila v obeh skupinah primerljiva (Mann-Whitney $U = 565,0$, $p = .595$) – Tabela 3.

Težke kovine v krvi

Večsmerna analiza kovariance (MANCOVA) ni potrdila, da bi bili pripadnosti skupini (Wilks' $L = .914$, $df_1 = 5$, $df_2 = 40$, $p = .591$, $\eta^2 = .086$), spol (Wilks' $\Lambda = .$, $df_1 = 5$, $df_2 = 40$, $p = .546$, $\eta^2 = .093$) ali starost (Wilks' $\Lambda = .$, $df_1 = 5$, $df_2 = 40$, $p = .296$, $\eta^2 = .137$) povezani s krvnimi vrednostmi težkih kovin. Glede na odsotnost statistično pomembnih učinkov dodatnih analiz nismo opravili s pomočjo generaliziranih linearnih modelov.

Z generaliziranimi linearnimi modeli pa smo opravili analizo razlik med skupinama glede na razmerje med bakrom in cinkom. Izračun regresijski koeficientov (*b*) (Tabela 4) je pokazal, da so starejši otroci ne glede na skupino imeli nižje razmerje med bakrom in cinkom in da so imeli otroci s SAM v primerjavi z otroki iz kontrolne skupine pomembno povišano razmerje med bakrom in cinkom (95-odstotni interval zaupanja za otroke s SAM = 1,86–2,26; 95-odstotni interval zaupanja za kontrolno skupino = 1,51–1,88).

Posthoc analiza ravni bakra ($M_{SAM} = 20.6$ mmol/L, $SD_{SAM} = 3.3$ mmol/L, $M_{primerjalna} = 19.9$ mmol/L, $SD_{primerjalna} = 4.1$ mmol/L) in cinka ($M_{SAM} = 10.7$ mmol/L, $SD_{SAM} = 1.8$ mmol/L, $M_{primerjalna} = 12.1$ mmol/L, $SD_{primerjalna} = 1.5$ mmol/L) je pokazala, da je bila razlika med skupinama v razmerju med bakrom in cinkov posledica razlik med skupinama v ravni cinka (Mann-Whitney $U = 267,5$, $p = .007$), ne pa tudi bakra (Mann-Whitney

Tabela 3: Splošne spoznavne sposobnosti otrok v skupini otrok s SAM in kontrolni skupini.

RQ / IQ raven	SAM	kontrolna skupina
< 50	49,1 %	30,4 %
51–60	11,3 %	26,1 %
61–70	3,8 %	13,0 %
71–80	7,5 %	13,0 %
>81	28,3 %	17,4 %

Opombe: RQ / IQ raven – porazdelitev razvojnih količnikov (RQ) ocenjenih na osnovi Lestvic zgodnjega razvoja Nancy Bayley (BSID-II) ter količnikov inteligentnosti (IQ) ocenjenih s pomočjo Wechslerjeve lestvice inteligentnosti za otroke in mladostnike (WISC-III) in Ravenovih barvni matric (CPM) (glej Udeleženci in metoda).

$U = 398.5$, $p = .327$). V skupini otrok s SAM je bilo višje razmerje med bakrom in cinkom povezano tudi z nižjimi splošnimi spoznavnimi sposobnostmi (Spearman $r = -.373$, $df = 47$, $p = .010$), medtem ko v kontrolni skupini tega nismo zasledili (Spearman $r = -.022$, $df = 20$, $p = .482$).

Porfirini v urinu

Analiza porfirinov v urinu je bila narejena pri 18 otrocih s SAM in pri 19 otrocih v kontrolni skupini. Statistična analiza prvega sklopa porfirinskih frakcij (uroporfirin I, heptakarboksiporfirin I, heksakarboksiporfirin I in pentakarboksiporfirin I) ni pokazala na statistično pomembno razliko glede na skupino. (Wilks' $\Lambda = .734$, $df_1 = 4$, $df_2 = 14$, $p = .328$, $\eta^2 = .266$), spol (Wilks' $\Lambda = .740$, $df_1 = 4$, $df_2 = 14$, $p = .343$, $\eta^2 = .260$) ali starost (Wilks' $L = .914$, $df_1 = 4$, $df_2 = 14$, $p = .942$, $\eta^2 = .050$). V nadaljevanju pa se je z večsmerno analizo kovariance pokazal trend statistične povezanosti med prisotnostjo SAM in koncentracijo koproporfirina I in III (Wilks' $\Lambda = .833$, $df_1 = 2$, $df_2 = 19$, $p = .176$, $\eta^2 = .167$). Dodatne analize, opravljene z generaliziranimi linearnimi modeli, so pokazale, da je koncentracija koproporfirina III (Wald $\chi^2 = 3.71$, $df = 1$, $p = .054$) mejno nižja v skupini otrok s SAM, koncentracija koproporfirina I (Wald $\chi^2 = 2.81$, $df = 1$, $p = .094$) pa se statistično ni razlikovala med obema skupinama - Slika 1.

Razpravljanje

Študija je prva raziskava biokemičnih kazalcev pri otrocih s SAM v Sloveniji. Pomembna obogatitev na tem področju je tudi v mednarodnem prostoru, kjer je bilo izvedenih sicer že vrsta podobnih raziskav, vendar večinoma brez primerjave z ustrežno kontrolno skupino. Pomemben rezultat študije je tudi uvedba novih diagnostičnih metod, in sicer določanje serumskih vrednosti živega srebra na Kliničnem oddelku za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem Kliničnem centru v Ljubljani.

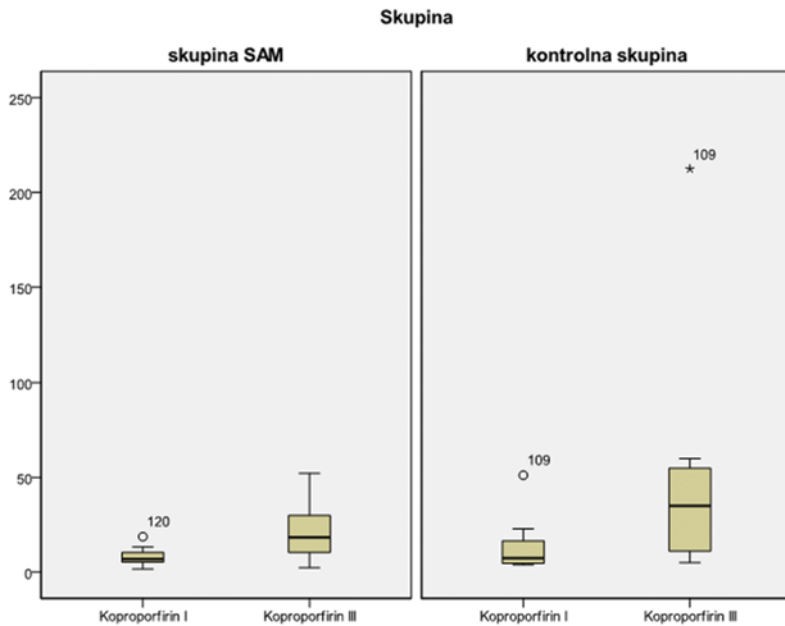
V študiji nismo ugotovili statistično pomembnih razlik v serumskih vrednostih posameznih težkih kovin med obema skupinama, ob tem pa je bilo signifikantno zvišano razmerje Cu/Zn, predvsem kot posledica razlik v vrednosti Zn. Zvišano razmerje Cu/Zn pri osebah z avtizmom omenjajo tudi drugi raziskovalci,^{42,43,48-50} a glede na literaturo ta sprememba ni specifična za avtizem. Omenja se v povezavi z vrsto zdravstvenih težav, na področju razvojnih in vedenjskih motenj pa najpogosteje s hiperkinetično motnjo.^{38-40,51} V naši študiji sta bila v kontrolni skupini udeležena le dva otroka s hiperkinetično motnjo, tako da primerjava ni bila možna. Študijo bi bilo zato smiselno nadgraditi z več udeleženci s hiperkinetično motnjo.

Razlogi za porušeno razmerje Cu/Zn so lahko prisotni na različnih ravneh metabolizma teh dveh elementov v sledovih, zato pa

Tabela 4: Rezultati generaliziranega linearnega modela za napovedovanje razmerja med bakrom in cinkom glede na prisotnost SAM, spola in starosti.

Parameter	b	SE	Wald χ^2	df	p
Presečišče	0.749	0.084	79.6	1	.001
Skupina otrok s SAM	0.197	0.077	6.6	1	.010
Kontrolna skupina (referenčna skupina)	-	-	-	-	-
Moški spol	-0.075	0.085	0.7	1	.381
Ženski spol (referenčna skupina)	-	-	-	-	-
Starost	-0.029	0.010	8.2	1	.004

Opomba: V tabeli so navedeni regresijski koeficienti (b), standardne napake (SE) ter Waldov χ^2 test s pripadajočimi stopnjami svobode (df) ter statistično pomembnostjo posameznih členov regresijske enačbe (p). Navedeni regresijski koeficienti kažejo na odnos med razmerjem med cinkom in bakrom ter neodvisnimi spremenljivkami (npr. $b_{starost} = -0.029$; za vsako leto starosti za 0.029 nižje razmerje med bakrom in cinkom).



Slika 1: Koncentracije koproporfirinov I in III ($\mu\text{g/L}$) v urinu pri otrocih s SAM ($N=18$) in otrocih v kontrolni skupini ($N=19$).

med drugim to lahko vodi v slabše delovanje detoksifikacijskega mehanizma z metalotioneinom in/ali Cu/Zn SOD1 ter na tak način do čezmerne oksidativnega stresa in poškodbe možganskih celic.^{38,41,52-54} Po drugi strani pa je znižana vrednost Zn lahko posledica povečanega oksidativnega stresa, zaradi česar se poveča delovanje metalotioneinskega sistema in vezava Zn in Cu nanj, zato pa zmanjša razpoložljivost teh dveh elementov za delovanje v okviru drugih encimskih poti.⁴⁹ Ne glede na mehanizem nastanka bi bilo glede na rezultate naše študije smiselno dodajati cink v prehrano vsem tistim otrokom s SAM, ki imajo znižano vrednost cinka ali zvišano razmerje Cu/Zn v krvi. Normalno razmerje med tema dvema elementoma je približno 1:1, spodnja meja normale pa 1,4.^{48,49} Russo in deVito navajata pozitiven učinek zdravljenja s cinkom pri določenih otrocih s SAM.⁵⁵

V naši študiji se skupini otrok s SAM in kontrolna skupina nista razlikovali glede na serumske vrednosti Hg, vrednost koproporfirina III v urinu pa je bila celo mejno nižja v skupini otrok s SAM. Raziskovalci, ki dokazujejo povezavo med razvojem avtizma in povečano koncentracijo te porfirinske frakcije v urinu kot označevalcem zastrupitve organizma s težkimi kovinami, predvsem Hg, v svojih študijah praviloma rezultatov ne kontrolirajo z udeleženci z drugimi razvojnimi/nevrološkimi motnjami, tako kot v

naši študiji, ampak z zdravimi.^{30,32} Glede na naše rezultate je torej malo verjetno, da bi bila za razvoj SAM pomembna povečana obremenitev s Hg v primerjavi z drugimi razvojno-nevrološkimi motnjami ali boleznimi.

Tudi v okviru študije CHARGE, kjer je bila narejena analiza krvne vrednosti živega srebra (Hg) pri 452 otrocih (249 z avtizmom, 143 z razvojnim zaostankom in 60 zdravih), ob upoštevanju prehranskih, medicinskih, farmacevtskih in dentalnih virov Hg, med skupinami ni bilo statistično značilne razlike. Glavni dejavnik, ki je vplival na vrednosti Hg, je bila količina uživanja rib, ki je bila v skupini otrok z avtizmom manjša, tako da je bila tudi krvna vrednost Hg v tej skupini najnižja.⁵⁶ Poleg uživanja rib je amalgam v zalivkah najpomembnejši vir živega srebra v telesu.⁵⁷

Živo srebro v obliki tiomersala se v dosedanjih študijah ni pokazal za pomembni dejavnik pri razvoju avtizma.⁵⁸⁻⁶¹ Tiomersal, ki je etilna oblika Hg, se je začel uporabljati kot konzervans v cepivih v 30. letih prejšnjega stoletja. Ob tem, ko je jasen nevrotoksični učinek metilne oblike Hg, za etilno obliko ta povezava nikoli ni bila tako jasna. Ne glede na to, sta zaradi povečane zaskrbljenosti javnosti Ameriška akademija za pediatrijo (AAP) in Ameriška javno-zdravstvena služba (*US Public Health Service*) l. 1999 priporočili, da se tiomersal preventivno odstrani iz otroških cepiv, ostal je le v nekaterih cepivih proti gripi. V nekaterih državah, npr. na Danskem, je bil tiomersal odstranjen iz otroških cepiv že l. 1992. Ravno danska študija je bila ena prvih in večjih epidemioloških študij, v kateri se je pokazalo, da incidenca avtizma tudi po odstranitvi tiomersala iz cepiv, narašča.⁶¹ Po nekaj letih konsistentno negativnih rezultatov študij o povezavi tiomersala in avtizma, je l. 2002 AAP umaknila omenjeno priporočilo, WHO pa l. 2008 podprla uporabo tiomersala v cepivih. V Sloveniji se je v preteklosti uporabljal tiomersal samo v cepivu proti tetanusu ter davici in tetanusu. Od 90. let dalje tega konzervansa v omenjenih cepivih ni več, l. 2010 pa je brez njega tudi cepivo proti hepatitisu B (osebna korespondenca z dr. Alenko Kraigher, 8.5.2013).

Na drugi strani so bile narejene študije o dodatnih dejavnikih, ki bi lahko skupaj z (normalno) izpostavljenostjo Hg, predstavljali potencialno škodljivi vpliv na razvijajoče se možgane, npr. določene imunske pomanjkljivosti, neustrezna in kakovostno pomanjkljiva prehrana, predvsem pomanjkanje dolgoveržnih nenasičenih maščobnih kislin, aminokislina metionina in mineralov v sledovih – cinka in selena, v povezavi z izraženostjo določenih genov in zmanjšano sposobnostjo organizma za učinkovito izločanje te težke kovine.^{52,62-64} V svoji študiji Thompson in Boekelheide navajata višjo starost, uživanje rib in povečano uživanje alkohola kot dejavnike, ki zvišujejo obremenitev organizma pri ženskah v rodnem obdobju z nekaterimi okoljskimi strupi, med drugimi tudi s Hg.⁶⁵ Glede na to, da se večinoma še vedno raziskuje potencialno škodljiv učinek na zdravje posameznih okoljskih strupov, nekateri raziskovalci poudarjajo potrebo po novih metodoloških pristopih, pri katerih bi se upoštevalo kumulativno tveganje več okoljskih strupov.⁶⁶

Zaključki

V naši študiji smo raziskovali morebitni vpliv težkih kovin, ki so že vrsto let predmet

nasprotujočih si razlag o možnih vzrokih za SAM. Med rezultati je izstopalo pomembno višje razmerje Cu/Zn pri otrocih s SAM v primerjavi s kontrolno skupino otrok z drugimi nevrološkimi motnjami. Glede na literaturo tak rezultat ni specifičen samo za osebe s SAM. Največkrat se omenja v povezavi s hiperkinetično motnjo. Ne glede na vzrok naš rezultat podpira potrebo po merjenju cinka in bakra v krvi pri vseh otrocih s SAM. V primeru odstopanja priporočamo dodatek cinka v prehrano. Povezava serumske vrednosti Hg in SAM se v naši študiji ni potrdila, ravno tako nismo zasledili povečane koncentracije koproporfirina v urinu otrok s SAM kot morebitnega subtilnejšega označevalca za povečano obremenitev s Hg.

Zahvala

Raziskava je bila financirana s strani ARRS (J3-9470-0312-06). Zahvaljujemo se otrokom, ki so bili udeleženi v raziskavi, in njihovim staršem. Ravno tako se zahvaljujemo osebju Kliničnega oddelka za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo za sodelovanje pri raziskavi ter podjetju Kobis za opravljeno analizo porfirinov v urinu.

Literatura

1. Prevalence of Autism Spectrum Disorders—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. Erratum in: *MMWR Surveill Summ.* 2009; 58(SS10): 1–20.
2. King M, Bearman P. Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *Int J Epidemiol* 2009; 38: 1224–34.
3. Sinzig J, Walter D, Doepfner M. Attention deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents with autism spectrum disorder: symptom or syndrome? *J Atten Disord* 2009; 13: 117–26.
4. Anholt GE, Cath DC, van Oppen P et al. Autism and ADHD symptoms in patients with OCD: are they associated with specific OC symptom dimensions or OV symptom severity? *J Autism Dev Disord* 2010; 40: 580–9.
5. Fombonne E. Commentary: on King and Bearman. *Int J Epidemiol* 2010; 38: 1241–2.
6. Macedoni-Lukšič M. Stopenjska obravnava otrok s spektroavtističnimi motnjami. In: Kržišnik C, Battelino T, eds. *Izbrana poglavja iz pediatrije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo; 2011. p. 311–17.
7. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 2011; 68: 1095–102.
8. Rutter M. Aetiology of autism: findings and questions. *J Intell Dis Res* 2005; 49: 231–8.
9. Casey JP, Magalhaes T, Conroy JM, Regan R, Shah N, Anney R et al. A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder. *Hum Genet* 2012; 131: 565–79.
10. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22: 229–37.
11. Macedoni-Lukšič M, Krgović D, Zagorac A, Zagradišnik B, Kokalj-Vokač N. Array-comparative genomic hybridization as a powerful tool for detection of small genetic abnormalities in children with autism spectrum disorders. *Med Razgl* 2012; 51: S5.
12. Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen R, Jones CR, van de Water J, Pessah IN. The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1119–25.
13. Schendel DE, Diguiseppi C, Croen LA, Fallin MD, Schieve LA, Wiggins LD. The study to explore

- re early development (SEED): a multisite epidemiologic study of autism by the centers for autism and developmental disabilities research and epidemiology (CADDRE) network. *J Autism Dev Disord* 2012; 42: 2121–40.
14. Stoltenberg C, Schjølberg S, Bresnahan M et al. The autism birth cohort (ABC): a paradigm for gene-environment-timin research. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 676–80.
 15. King MD, Fountain C, Dakhllallah D, Bearman PS. Estimated autism risk and older reproductive age. *Am J Public Health* 2009; 99: 1673–9.
 16. Shelton JF, Tancredi DJ, Hertz-Picciotto I. Independent and dependent contributions of advanced maternal and paternal ages to autism risk. *Autism Res* 2010; 3: 30–9.
 17. Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL et al. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 2012; 129: 1121–8.
 18. Volk HE, Hertz-Picciotto I, Delwiche L, Lurmann F, McConnell R. Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 873–7.
 19. Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry* 2013; 70: 71–7.
 20. Zerbo O, Iosif AM, Walker C, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delay? Results from the CHARGE study. *J Autism Dev Disord* 2013; 43: 25–33.
 21. Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah IN. Tipping the balance of autism risk: potential mechanisms linking pesticides and autism. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 944–51.
 22. Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I, Allayee H et al. Maternal periconceptual folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE case-control study. *Am J Clin Nutr* 2012; 96: 80–9.
 23. Braunschweig D, Duncanson P, Boyce R, Hansen R, Ashwood P, Pessah IN et al. Behavioral correlates of maternal antibody status among children with autism. *J Autism Dev Disord* 2012; 42: 1435–45.
 24. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, van de Walter J. Association of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011; 232: 196–9.
 25. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, van de Walter J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 840–9.
 26. Costa LG, Ashchner M, Vitalone A, et al. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 87–110.
 27. Geier DA, Audhya T, Kern JK, Geier MR. Blood mercury levels in autism spectrum disorders: Is there a threshold level? *Acta Neurobiol Exp* 2010; 70: 177–86.
 28. James SJ, Cutler P, Melnyk S, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1611–7.
 29. Kobal AB. Možni vpliv živega srebra na patogenezo avtizma. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 37–44.
 30. Geier DA, Geier MR. A prospective assessment of porphyrins in autistic disorders: a potential marker for heavy metal exposure. *Neurotox Res* 2006; 10: 57–64.
 31. Brester MA. Biomarkers of xenobiotic exposures. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 306–17.
 32. Nataf R, Skorupka C, Amet L, Lam A, Springbett A, Lathe R. Porphyrinuria in childhood autistic disorder: implications for environmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 214: 99–108.
 33. Wang L, Angley MT, Gerber JP, Sorich MJ. A review of candidate urinary biomarkers for autism spectrum disorder. *Biomarkers* 2011; 16: 537–552.
 34. Sarkany RP. Porphyrin. From Sir Walter Raleigh to molecular biology. *Adv Exp Med Biol* 1999; 455: 235–41.
 35. Gross U. Erythropoietic and hepatic porphyrias. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 641–661.
 36. Woods JS. The association between genetic polymorphisms of coproporphyrinogen oxidase and an atypical porphyrinogenic response to mercury exposure in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 113–20.
 37. Cohen DJ, Johnson WT, Caparulo BK. Pica and elevated blood lead level in autistic and atypical children. *Am J Dis Child* 1976; 130: 47–8.
 38. Osredkar J, Sustar N. Copper and zinc, Biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clinic Toxicol* 2011; doi/10.4172/2161-0494.S3-001
 39. DiGirolamo AM, Ramirez-Zea M. Role of zinc in maternal and child mental health. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 940S–5S.
 40. Plum LM, Rink L, Haase H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2010; 7: 1342–65.
 41. Kang YJ. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med* 2006; 231: 1459–67.
 42. Russo AJ, DeVito R. Analysis of copper and zinc plasma concentration and the efficacy of zinc therapy in individuals with Asperger's syndrome, pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) and autism. *Biomarker Insights* 2011; 6: 127–33.
 43. Yasuda H, Yashida K, Yasuda Y, Tsutsui T. Infantile zinc deficiency: Association with autism spectrum disorders. *Sci Rep* 2011; 1, 129; DOI: 10.1038/srep00129.
 44. Bayley N, Zupančič M, Kavčič T. *Lestvice zgodnje razvoja Nancy Bayley*. (2. izd.). Ljubljana: Center za psihodiagnostična sredstva, 2004.
 45. Wechsler D., Boben D, Bucik T. *Priročnik za Wechslerjevo lestvico inteligentnosti za otroke*. (3. izd.). Ljubljana: Center za psihodiagnostična sredstva, 2001.
 46. Boben D. *Slovenska standardizacija Ravenovih progresivnih matric: norme za CPM, SPM in APM*. Ljubljana: Center za psihodiagnostična sredstva, 2003.
 47. Strauss E, Shernan EM, Spreen O. *A Compendium of Neuropsychological Tests*. (3. izd.). New York: Oxford University Press, 2006.
 48. Faber S, Zinn GM, Kern II JC, Kingston HMS. The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in

- children with autism spectrum disorders. *Biomarkers*, 2009; 14: 171–80.
49. Bjørklund G. The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiol Exp*, 2013; 73: 225–36.
 50. Crăciun EC, Ursu M, Predescu E, Bjørklund G, Dronca M. The status of whole blood zinc and copper levels in autistic children. *Romanian Review of Laboratory Medicine*, 2009; 15: 132.
 51. Kiddie JY, Weiss MD, Kitts DD, Levy-Milne R, Wasdell MB. Nutritional status of children with attention deficit hyperactivity disorder: A pilot study. *Int J Pediatrics* 2010; doi: 10.1155/767318.
 52. Dufault R, Schnoll R, Lukiw WJ, et al. Mercury exposure, nutritional deficiencies and metabolic disruptions may affect learning in children. *Behav and Brain Functions* 2009; 5: 44–59.
 53. Woody RM. Oxidative stress in autism. *Alternative Therapies* 2004; 10: 22–36.
 54. Osredkar J. Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393–406.
 55. Russo AJ, deVito R. Analysis of copper and zinc plasma concentration and the efficacy of zinc therapy in individuals with Asperger's syndrome, pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) and autism. *Biomarker Insights* 2011; 6: 127–33.
 56. Hertz-Picciotto I, Green PG, Delwiche L, Hansen R, Walker C, Pessah IN. *Environ Health perspect* 2009; 118: 161–6.
 57. Mutter J. Is dental amalgam safe for humans? The opinion of the scientific committee of the European Commission. *J Occupat Med Toxicol* 2011; 6: 2.
 58. Stehr-Green P, Tull P, Stellfeld M, Mortenson PB, Simpson D. Autism and thimerosal-containing vaccines: lack of consistent evidence for an association. *Am J Prevent Med* 2003; 25: 101–6.
 59. Nelson KB, Bauman ML. Thimerosal and autism? *Pediatrics* 2003; 111: 674–8.
 60. Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: A critical review of published original data. *Pediatrics* 2004; 114: 793–803.
 61. Madsen KM, Lauritse MB, Pedersen CB, et al. Thimerosal and the occurrence of autism: negative ecological evidence from danish population-based data. *Pediatrics* 2003; 112: 604–6.
 62. Hornig M, Chian D, Lipkin WI. Neurotoxic effects of postnatal thimerosal are mouse strain dependent. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 833–845.
 63. Stamova B, Green PG, Tian Y, Hertz-Picciotto I, Pessah IN, Hansen R et al. Correlations between gene expression and mercury levels in blood of boys with and without autism. *Neurotox Res* 2011; 19: 31–48.
 64. Gerecht M, Austin DW. The plausibility of a role for mercury in the etiology of autism: a cellular perspective. *Toxicol Environ Chem* 2011; 93: 1251–73.
 65. Thompson MR, Boekelheide K. Multiple environmental chemical exposures to lead, mercury and polychlorinated biphenyls among childbearing-aged women (NHANES 1999–2004): Body burden and risk factors. *Environ Res* 2013; 121: 23–30.
 66. Sarigiannis DA, Hansen U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals – A challenge for policy makers. *Environ Health* 2012; 11(1 Suppl): S18–30.