

Pregledni prispevek/Review article

MOŽNI VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA PATOGENEZO AVTIZMA

POSSIBLE INFLUENCE OF MERCURY ON PATHOGENESIS OF AUTISM

Alfred Bogomir Kobal

Jurija Vege 19, 5280 Idrija

Izvleček

Izhodišča *Spektroavtistična motnja (SAM) je del širšega spektra razvojnih motenj, znanih kot pervazivne razvojne motnje, ki se pojavijo v zgodnjem otroštvu. Danes etiologija še ni poznana, znano pa je, da so za razvoj avtizma pomembni genetski, imunski in okoljski dejavniki. Med okoljske dejavnike sodi tudi živo srebro (Hg), vendar so mnenja o tem deljena. Nekateri rezultati iz zadnjega obdobja zanikajo, drugi pa podpirajo hipotezo o vplivu etil-Hg v timerosalu v otroških cepivih na razvoj SAM. Na kratko bom predstavil nekatere raziskave, ki pri otrocih s SAM opozarjajo na presnovne motnje določenih aminokislin, oksidativni stres in imunske motnje. Obenem pa bom osvetlil tudi nekatera osnovna spoznanja o privzemu, toksikokinetiki in bioloških mehanizmih delovanja Hg, ki bi lahko vplivali na razvoj SAM.*

Zaključki *Predstavljene raziskave podpirajo domnevo, da pri otrocih z določenimi presnovnimi motnjami aminokislin, ki povzročajo znižanje vsebnosti glutationa v celicah, in z imunskimi motnjami, lahko etil-Hg v timerosalu še dodatno povečuje oksidativno prizadetost astrocitov in nevronov, vpliva na imunsko odzivnost ter moti glutaminergično, serotonergično, holinergično in centralno dopaminergično aktivnost. Pri otrocih s povečano občutljivostjo na učinke Hg je timerosal v cepivih lahko pomemben dejavnik v patogenezi SAM.*

Ključne besede *razvojne motnje; timerosal; oksidativni stres; glutation; imunske motnje*

Abstract

Background *Autism Spectrum Disorder (ASD) is part of a broader spectrum of developmental disorders appearing in early childhood, known as pervasive developmental disorders. Although its etiology is not yet known today, genetic, immunological and environmental factors are considered relevant for the development of autism. Among the latter, there is also a mercury poisoning though opinions regarding its influence are divided. Some results obtained in recent times reject, while other support the hypothesis that ethyl-Hg in thimerosal, which is used in children's vaccines, influences the development of ASD. Some studies that point to metabolic disorders caused by certain amino acids, oxidative stress and immunological disorders in children with ASD are presented. In addition, some basic findings on the retention, toxicokinetics and biological mechanisms of Hg activity that could influence the development of ASD.*

Conclusions *The presented studies support the assumption that in children with specific metabolic disorders caused by amino acids that reduce glutathione content in cells, and immunological disorders, ethyl-Hg in thimerosal may enhance oxidative impairment in astrocytes and neurons, affect immunological response, and disturb the glutaminergic, serotonergic, holinergic and the central dopaminergic activity. In children with increased susceptibility to Hg, thimerosal in vaccines may be a significant factor in the pathogenesis of ASD.*

Key words *developmental disorders; thimerosal; oxidative stress; glutathione; immunological disorders*

Uvod

Avtizem je razvojna motnja z moteno socialno interakcijo, zoženjem interesov, stereotipno ponavljajočim se vedenjem, kar lahko spremlja mentalna retardacija in epilepsija, s prizadetostjo prebavil in autoimunskimi motnjami. Heterogenost simptomov in kliničnih znakov je pri avtizmu dokaj izrazita. Danes namesto izraza avtizem uporabljamo izraz spektroatvistična motnja (SAM), ki vključuje tudi lažje oblike in predstavlja del širšega spektra razvojnih motenj (t. i. pervazivne razvojne motnje). Običajno se bolezen razvije že pred 3. letom, prizadene okrog 9 na 1000 oseb in je bolj pogosta pri otrocih moškega spola (3–4:1). Pri 20–30 % obolenih otrok nastopi v starosti 18–24 mesecev izrazito obdobje avtistične regresije, v katerem otroci izgubijo že pridobljeno govorno znanje.¹ Po mnenju nekaterih raziskovalcev² incidenca SAM v zadnjih 10 letih narašča, vendar ni povsem jasno, ali je incidenca resnično povečana ali pa je to posledica širjenja definicije in boljšega zdravstvenega nadzora otrok. Pogostnost pojavljanja SAM in nekatera spoznanja s področja nevrobiologije, genetike, psihologije in obravnave SAM je strokovni javnosti v Sloveniji leta 2006 predstavila Marta Macedoni-Lukšič.³ Etiologija SAM ni znana, ocenjujejo pa, da je v ospredju primarno genetska okvara.⁴ Poleg proučevanja genetskih motenj v zadnjem obdobju precej raziskav opozarja na presnovne motnje aminokislin, ki vsebujejo žveplo, poglobljeno osvetljuje oksidativni stres in imunske motnje ter opozarja na nekatere okoljske dejavnike, ki lahko vplivajo na razvoj SAM pri otrocih.^{5–8} Glede na dosedanje raziskave je najverjetneje, da kombinacija genetskih, določenih presnovnih, imunskih in okoljskih dejavnikov vpliva na razvoj SAM.⁹ Okoljski dejavniki, ki lahko vplivajo na patogenezo avtizma, so predvsem prenatalna izpostavljenost talidomidu, antikonvulzantom, nekaterim virusnim infekcijam ter izpostavljenost pesticidom, PCB in nekaterim težkim kovinam,¹⁰ med katere sodi, po mnenju nekaterih, tudi živo srebro (Hg).^{11–13} Klinična diagnoza SAM sloni na sprejetih merilih in izkušnjah strokovnjaka s tega področja, saj trenutno ni na razpolago določenih diagnostičnih testov.¹⁴ Osnovni namen prispevka je predstaviti možni vpliv Hg na patogenezo SAM. V ta namen bodo na kratko predstavljeni rezultati posameznih raziskav, ki osvetljujejo določene značilnosti SAM, ki doslej pri nas niso bile pogosto obravnavane. Med slednje sodijo zlasti presnovne motnje aminokislin, ki vsebujejo žveplo, oksidativni stres in imunske motnje. Predstavljena bodo tudi nekatera osnovna spoznanja o delovanju Hg v osrednjem živčevju (OŽ), s katerimi se zdravnik pri svojem delu ne srečuje prav pogosto.

Rezultati dosedanjih raziskav

Genetske motnje

Kljub obsežnim raziskavam in nekaterim novim spoznanjem na genetskem področju^{4, 15, 16} danes še pri 90 % obolenih niso pojasnjene genetske spremembe, povezane s SAM, prav tako niso jasno opredeljene pre-

snovne motnje in motnje imunske odzivnosti, ki bi bile značilne za posamezne kategorije otrok s SAM. Močna genska povezanost s SAM je ugotovljena le pri nekaterih genskih okvarah, kot so sindrom drobljivega kromosoma X, nevrofibromatoza, Bourneville-Pringlova bolezen fenilketonurija in nekatere druge kromosomske nepravilnosti;¹⁷ okrog 15 genskih prizadetosti pa nakazuje šibko povezanost s SAM.¹⁸ Pomembne so tudi novejšje raziskave,¹⁶ ki v družinah otrok s SAM odkrivajo nove genske motnje, ki pa zajemajo le okrog 1 % primerov.

Presnovne motnje aminokislin

Aminokislina, ki vsebujejo žveplo, so bistvene za vzdrževanje redoks potenciala v celicah in imunskega sistema, saj je znano, da so pomembne za sintezo reducirane glutationa (GSH), ki je glavni znotrajcelični antioksidant zlasti v imunskih celicah, astrocitih in nevronih.^{19, 20} Raziskave Suha in sodelavcev, objavljene v letu 2008,⁵ so pri otrocih s SAM pokazale, da gre za motnje v metabolizmu teh aminokislin, zlasti za transmetilacijo in transulfuracijo. Pri tem je motena konverzija metionina v S-adenosilmetionin in tvorba cisteina, kar povzroča znižanje vsebnosti GSH v celicah. To znižanje lahko vpliva na zmanjšanje antioksidativne aktivnosti in vpliva na imunske odzivnosti, saj se domneva, da je znižanje GSH v levkocitih lahko povezano z aktivnostjo celic T. Motnje metilacije, znižanje cisteina in znižana sinteza GSH pri SAM je bila ugotovljena tudi v nekaterih drugih raziskavah.^{6, 21, 22} Znižana vsebnost GSH v astrocitih lahko pomembno zavira sintezo GSH v nevronih, ki so metabolno odvisni od astrocitov, kajti od njih prejemajo cistein za sintezo GSH.²⁰ Domnevajo, da so omenjene presnovne motnje aminokislin pri otrocih s SAM povezane z genetskimi motnjami in nekaterimi okoljskimi dejavniki.⁵

Oksidativni stres

V literaturi je čedalje več raziskav, ki poudarjajo vlogo oksidativnega stresa v patogenezi avtizma. Pregled teh spoznanj je predstavila Sajdel-Sulkowska s sod. v raziskavi, objavljeni leta 2008.⁷ V posameznih raziskavah so bile pri otrocih s SAM opravljene različne preiskave, ki so pri posameznih skupinah otrok pokazale: a) spremenjeno aktivnost antioksidantnih encimov z zvišano vsebnostjo oksidirane glutationa in NO; b) povišano vsebnost homocisteina v plazmi; c) povišano vsebnost produktov peroksidacije lipidov v krvi in urinu; č) nenormalno vsebnost bakra in cinka v krvi, ki kaže na motnje v delovanju metalotioneinov, beljakovin nizke molekularne teže z visoko vsebnostjo cisteina (30 %), ki vzdržujejo homeostazo kovin v celici in zunaj celice ter delujejo kot antioksidant; d) znižano vrednost selena (Se) in Se-encima glutation peroksidaze v krvi. Pri tem se seveda postavlja vprašanje, ali prehrana otrok s SAM vpliva na vsebnost Se v telesu in na sintezo Se proteinov, ali pa je to povezano z moteno tvorbo selenocisteina, ki lahko vpliva tudi na izločanje Se.²³ V avtoptičnih vzorcih možganskega tkiva otrok s SAM je Sajdel-Sulkowska s sod. (2008)⁷ ugotovila povečano koncentracijo 3-nitrotirozina v cerebelarnem tkivu, ki predstavlja relativno spe-

cifičen kazalec oksidativne okvare tirozina (ostankov) v proteinih. 3-nitrotirozin se tvori zaradi povišane tvorbe NO in njegovih presnovkov. Iz omenjenih raziskav je razvidno, da je pri otrocih s SAM znižana antioksidativna zmogljivost, ki povečuje tveganje za oksidativni stres, ki pa ga lahko pomembno povečujejo tudi nekateri dejavniki v okolju, med katerimi je tudi živo srebro in njegove spojine.

Imunska odzivnost in motnje v delovanju živčnih prenašalcev

Postavili so več različnih hipotez o možnem vplivu imunskih sprememb pri SAM. Poudarjajo se zlasti imunske motnje v zgodnjem obdobju nosečnosti, povečana incidenca avtoimunskih motenj v družinah in vpliv otroškega cepljenja. Slednje je bilo deloma predstavljeno leta 2008 na Derčevih dnevih v poglavju Problematika cepljenj.²⁴ Raziskave, ki jih je predstavil Ashwood s sod. leta 2006,⁹ podpirajo domnevo, da predin perinatalne imunske motnje lahko vplivajo na vsebnost citokinov, živčnih prenašalcev, neuropeptidov in hormonov. Imunske spremembe pri SAM najpogosteje prizadenejo naslednje komponente imunskega sistema: celice T, monocite/makrofage, celice NK, citokine, imunoglobuline, avtoimunske aktivnosti in nekatere avtoimunske genske spremembe.

Raziskave avtoptičnih vzorcev⁸ so pokazale kronično aktivacijo mikroglije in astrocitov s povišano vsebnostjo citokinov, kar nakazuje avtoimunske procese v osrednjem živčevju pri doslej še nedefiniranem številu otrok s SAM. Preiskave likvorja²⁵ odkrivajo znižanje neopterina in quinolonske kisline, hkrati pa povišane vrednosti biopterina, kar prav tako nakazuje moteno uravnavanje imunske aktivnosti in funkcijsko nezrelost osrednjega živčevja pri otrocih s SAM. Slednje podpira tudi znižana vsebnost serotonina, ki je sicer pomemben nevrotrofični dejavnik v razvojnem obdobju osrednjega živčevja.²⁶

Kljub temu, da rezultati različnih raziskav niso povsem identični, pa je pri otrocih s SAM zaznati moteno ravnotežje med podvrstama limfocitnih celic T pomagalk TH1 in TH2, kar spremlja izločanje različnih vrst citokinov.⁹ Nekateri raziskave so pokazale, da vrsta citokinov lahko vpliva tudi na vsebnost serotonina v OŽ, zlasti ker vplivajo na aktivnost gena za prenos serotonina in lahko delujejo zaviralno na encim, ki je pomemben za tvorbo serotonina iz triptofana.^{9, 27} Funkcionalna slikovna preiskava možganov – pozitronska emisijska tomografija (PET) je pokazala znižano vrednost serotonina levo kortikalno, kar nakazuje večjo prevalenco z resnejšimi motnjami govora.^{28, 29} Avtoptične študije pri otrocih s SAM so pokazale povečano aktivnost glutaminergičnega sistema (motena pretvorba glutamata v GABA zaradi znižane aktivnosti glutaminične decarboksilaze), kar lahko povzroča ekscitotoksične učinke.³⁰

Pri otrocih s SAM so bile ugotovljene avtoimunske spremembe, vezane na tvorbo protiteles na različna tkiva v OŽ, kot npr. mielin bazični protein, aksonski proteini, živčni rastni faktor in drugo. V likvorju je bila pri teh otrocih ugotovljena tudi povišana vsebnost glijalnih fibrilarnih proteinov, v serumu pa povišana vseb-

nost imunoglobulinov.^{9, 31} Postavljena je bila tudi hipoteza, da primarna imunska aktivacija v prebavilih lahko sproži sistemsko imunske aktivnosti, ki povzroča motnje v osrednjem živčevju. Imunska motnja, ki sproža povečano izločanje limfocitnih citokinov, prizadene črevesno pregrado, to pa lahko poveča prehod opijatov iz prehrane (zlasti beta-casemorfin-7) v krvni obtok in lahko vpliva na razvoj OŽ in vedenjske motnje, ki se pojavijo pri otrocih s SAM. Domnevajo, da imata bakterijska okužba in mlečni antigen pomembno vlogo pri modulaciji avtoimunskega sistema pri otrocih s SAM.⁹ Po drugi strani pa nekateri raziskovalci menijo, da prebavne motnje pri otrocih s SAM niso nič bolj pogoste kot pri ostalih otrocih.³²

Živo srebro kot pomemben okoljski dejavnik

Znano je, da izpostavljenost metil-Hg, zlasti prenatalno, v razvojnem obdobju otrokovega OŽ, deluje izredno nevrotoksično. Visoka izpostavljenost otrok med nosečnostjo je v Minamati na Japonskem povzročila izredno težko nevrološko prizadetost otrok. Pri nižji izpostavljenosti otrok med nosečnostjo pa se v kasnejšem razvojnem obdobju pojavljajo določene nevro-psihološke motnje, ki prizadenejo predvsem pozornost, spomin in govor otroka.^{33, 34} Tudi pretekle opažovanja so potrdila, da lahko zgodnja poporodna izpostavljenost nizkim koncentracijam Hg, pri manjšem številu otrok, povzroči težje zdravstvene okvare.³⁵

V zadnjih desetletjih se poudarja zlasti pomembnost etil-Hg v timerosalu, ki se je kot bakterioantik in fungistatik dodajal vsem cepivom, tudi tistim, ki so bila namenjena otrokom v prvem letu starosti. Povečana prevalenca avtizma je bila opazna po letu 1990, kmalu po uvedbi timerosala v dve otroški cepivi.¹¹ Rezultati raziskav o vplivu timerosala na SAM iz zadnjega desetletja, so izrazito nasprotujoči; vrsta predvsem epidemioloških raziskav ne potrjuje vpliva timerosala v cepivih na SAM,^{1, 36, 37} medtem ko raziskave, ki slone na biokemičnih in nevrobioloških spremembah in mehanizmih delovanja Hg, podpirajo hipotezo o vplivu Hg na patogenezo SAM.^{11, 12, 38-40} Raziskava Tompsona s sodelavci, objavljena leta 2007,⁴¹ je pokazala, da zgodnja post-natalna izpostavljenost otrok timerosalu v cepivih in imunoglobulinih ni povzročila nevro-psiholoških motenj pri opazovanih otrocih. Število opazovanih otrok (n = 1047), glede na prevalenco SAM ne podpira povsem veljavnosti in zanesljivosti rezultatov omenjene raziskave. Raziskava Youngove in sod. objavljena leta 2008,⁴² ki je zajela zelo veliko skupino otrok (n = 278.625), pa je pokazala pomembno povišano stopnjo pojavljanja razvojnih motenj v povezavi s timerosalom, ki so ga otroci prejeli s cepljenjem.

Privzem in toksikokinetika etil-Hg

Ker je prednatalna izpostavljenost otrok Hg večji del posledica globalne obremenjenosti okolja, je bila ta problematika že večkrat širše obravnavana,^{33, 43} deloma pa je bila predstavljena tudi naši strokovni javnosti v reviji JAMA leta 2003.^{44, 45} V zgodnjem otroštvu je lahko otrok izpostavljen etil-Hg v timerosalu, ki ga prej-

me v otroških cepivih in v drugih pripravkih, v določenih primerih pa tudi metil-Hg in anorganskim spojinam Hg s prehrano ter Hg⁰ (hlapi elementarnega Hg) z vdihavanjem, če živi v onesnaženem industrijskem okolju.^{33, 43}

Po nekaterih ocenah, lahko otroci v prvih 14 mesecih življenja prejmejo s cepivi, ki vsebujejo timerosal, 185 μg ,⁴⁶ po drugih ocenah⁴⁷ pa do 200 μg etil-Hg že v prvih 6 mesecih življenja. To so vrednosti, ki dosegajo t. i. referenčne vrednosti 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže/dnevno za vnos metil-Hg med nosečnostjo s prehrano, ki ne povečajo tveganja za pojavljanje škodljivih učinkov pri otrocih.⁴⁸ Pri otrocih starih od 2 do 6 mesecev so ugotovili, da je razpolovna doba izločanja etil-Hg iz krvi 7 dni. Po cepljenju je bila koncentracija Hg v urinu nizka, v blatu pa visoka.⁴⁹ Etil-Hg se podobno kot metil-Hg kopiči tudi v laseh, zato je primeren kazalec polpretekle izpostavljenosti, vendar le, če ga določamo v časovno ustreznem vzorcu las.⁵⁰ Raziskave Burbacherja in sodelavcev, objavljene leta 2005,⁵¹ ki so bile opravljene na primatih, so pokazale, da je razpolovna doba izločanja etil-Hg iz krvi v istem območju kot pri otrocih, vendar pa krajša v primerjavi z metil-Hg. Po izpostavljenosti etil-Hg pa se v osrednjem živčevju zadrži več anor-Hg kot po izpostavljenosti metil-Hg, podobno razmerje je tudi v ledvicah. Razmerje med povprečjem celokupne vsebnosti Hg v možganih in v krvi je nekoliko višje pri izpostavljanju etil-Hg kot pri metil-Hg. Večina anor-Hg se je v opazovanem obdobju izločala z blatom. Sicer pa je že dalj časa znano, da je izločanje anor-Hg iz osrednjega živčevja počasen proces.^{47, 61} Avtorji menijo, da zaradi ugotovljenih razlik v toksikokinetiki metil-Hg v biološkem materialu ni povsem primeren referenčni kazalec za oceno tveganja pri izpostavljenosti etil-Hg, ki ga prejmejo otroci s timerosalom.

Biološki mehanizmi delovanja živega srebra v osrednjem živčevju

Hg⁰, metil-Hg ali etil-Hg v timerosalu, se kopiči v osrednjem živčevju in je izrazito nevrotoksično, Hg⁰ in etil-Hg pa se zadržujeta tudi v ledvicah, kjer delujeta nefrotoksično. Nevrotoksični mehanizmi delovanja metil in etil-Hg so dokaj podobni.^{54, 55} Po prehodu žilno-možganske pregrade se etil in metil-Hg v osrednjem živčevju biološko razgradita, Hg⁰ pa oksidira v dvovalentno anorgansko obliko (anor-Hg). V nasprotju z metil-Hg pa etil-Hg prehaja prek žilno-možganske pregrade neposredno kot aminokislina. Večji del Hg se zadržuje v astrocitih, kjer se veže na SH skupine beljakovin, peptidov in aminokislin. Pri nižji izpostavljenosti Hg ne povzroča strukturnih sprememb v osrednjem živčevju, temveč le funkcionalne motnje.

Vezava Hg na SH-skupine GSH in cisteina znižuje vsebnost GSH v astrocitih in zmanjša prenos cisteina v nevrone, ki brez privzema cisteina iz astrocitov ne morejo sintetizirati GSH, to pa poveča občutljivost nevronov za delovanje Hg in oksidativni stres.²⁰ V razvojnem obdobju OŽ Hg zaradi vezave na SH-skupine zavira sintezo beljakovin, polimerizacijo tubulina, poglavitne beljakovine v mikrotubulih, ki je pomembna za rast živčnih vlaken in dendritov, ter povzroča spre-

membe v mitohondrijih. Hg sicer poveča tvorbo vodikovega peroksida, kisikovih in drugih radikalov ter sproža oksidativni stres, ki povzroča peroksidacijo lipidov, baz DNK, motnje v prepustnosti celične membrane in homeostaze kalcija v celici, prizadetost in celo apoptozo monocitov, celic T, celic glije in nevronov, moti delovanje živčnih prenašalcev ter povzroča imunske motnje.⁵⁶⁻⁶⁰

Raziskave na tkivnih kulturah in pri živalih so pokazale, da Hg zaradi povišane tvorbe prostih radikalov deluje na živčne prenašalce: glutaminergični, serotonergični, dopaminergični in holinergični sistem. Hg zavira privzem glutamata in serotonina v astrociti, kar zveča njihovo koncentracijo zunajcelično in povečuje občutljivost sosednjih nevronov za ekscitotoksične učinke glutamata, ki lahko vodijo v apoptozo živčnih celic.^{57, 61, 62} Hg spodbuja tudi povečano tvorbo NO (preko indukcije NO sintaze), ki v reakciji s kisikovimi radikali tvori zelo reaktivne peroksinitrite in znižuje aktivno obliko serotonina.^{63, 64} Zgodnja postnatalna izpostavljenost metil-Hg pri živalih vpliva na aktivnost dopaminergičnih živčnih prenašalcev v osrednjem živčevju.⁶⁵ Povečan metabolizem dopamina se ugotavlja tudi pri otrocih (starost od 8 do 12 let) v povezavi z relativno nizko izpostavljenostjo Hg in kadmiju.⁶⁶ Nekatero raziskavo so pokazale, da Hg znižuje aktivnost holin-acetiltransferaze in s tem tudi sintezo ter vsebnost acetilholina. Pri tem prihaja do povečane odziva in tvorbe holinergičnih receptorjev v OŽ in tudi na periferiji v T-limfocitih (tudi pri človeku!).⁶⁷ Nizke koncentracije zlata metil-Hg, ki ne povzročajo citotoksičnih okvar, pa zaradi sproščanja vodikovega peroksida lahko aktivirajo lokalne vnetne procese in imunske spremembe.^{58, 59} Že dalj časa je znano, da anorg-Hg sproža avtoimunske spremembe, med katere sodi zlasti avtoimunska glomerulopatija.⁶⁸ Etil-Hg in anorganski Hg povzročata podobne imunske spremembe, sprožata sistemske avtoimunske motnje s sistemskim odlaganjem imunskih kompleksov, povišanje nevrotipičnih in gliotipičnih protiteles, povišano tvorbo citokinov in imunoglobulinov. Etil-Hg deluje tudi zaviralno na T in NK celice. Na celični kulturi humanih dendritičnih celic so ugotovili, da etil-Hg spreminja razmerje podvrste celic T pomagalk, z nakazano povečano aktivacijo podvrste celic TH2 in izločanjem citokinov, ki zmanjšujejo znotrajcelične okvare. Omenjeni rezultati podpirajo domnevo, da Hg vpliva na aktivacijo celic TH2 predvsem zaradi znižanja vsebnosti GSH v dendritičnih celicah. Za razvoj avtoimunosti pa se domneva, da je bolj pomembno povišanje interferona- γ , ki ga izločajo tudi celice TH0 pred diferenciacijo v celice TH1 in TH2, kot samo spremenjeno razmerje med temi celicami.^{59, 69, 70}

Obrambni mehanizmi na ravni celice

Za zmanjšanje učinkov Hg je zlasti pomembna vezava Hg na SH skupine reduciranega glutationa (GSH) in njegovih biokemičnih predstopenj cisteina in cisteina, na metalotioneine, beljakovine nizke molekularne teže z veliko vsebnostjo cisteina in vezava na Se. Astrociti lahko varujejo nevrone pred delovanjem Hg tudi s povečano produkcijo metalotioneinov, ki ve-

žejo Hg v relativno netoksično obliko. Ponavljajoča se izpostavljenost pa običajno inducira povečano tvorbo GSH in metalotioneinov. Občutljivost nevronov za delovanje Hg je sicer že izhodiščno nižja, tudi zaradi nizke vsebnosti metalotioneinov in drugih stresnih proteinov.^{20,57,71,72} Selen je esencialni element in sestavni del vrste Se-proteinov, ki se veže s Hg v molekularnem razmerju 1:1 v netoksični kompleks, kar v lizosomih predstavlja zadnjo stopnjo razstrupljanja Hg.^{23,73} Za znižanje prostih radikalov, ki jih sproža Hg je pomembna tudi aktivnost antioksidantnih encimov (superoksid dismutaze, katalaze in Se-encima glutation peroksidaze) ter nevrohormon melatonin.⁷⁴⁻⁷⁶ Melatonin tvori s prostimi radikali stabilne sekundarne in terciarne produkte biogene amine, ki prav tako vstopajo v reakcijo s prostimi radikali, oboji pa zavirajo čezmerno tvorbo NO in njegove proste radikale peroksinitrite ter na ta način zmanjšujejo tudi ekscitotoksične učinke glutamata.

Biološki kazalniki izpostavljenosti in učinkov Hg

Svetovna zdravstvena organizacija^{33, 68} in Ameriška agencija za varovanje okolja⁷⁷ sta predstavili strokovna izhodišča za zdravstveni in biološki nadzor izpostavljenosti in učinkov Hg. Naše izkušnje s tega področja so se pokazale kot dokaj uspešne pri preprečevanju poklicnih zastrupitev s Hg.⁷⁸ Raziskave iz zadnjega obdobja pa so osvetlile nekatere biološke kazalce okoljske izpostavljenosti in vpliva Hg pri otrocih.^{66, 79} Pri nižji okoljski izpostavljenosti Hg se uporabljajo tudi periferni kazalci bioloških učinkov vpliva Hg na živčne prenašalce, med katere sodijo muskarinski holinergični receptorji v limfocitih, aktivnost monoamino oksidaze v trombocitih in vsebnost prolaktina v serumu (kazalec dopaminske aktivnosti).^{66, 67, 80} Med kazalce avtoimunskih sprememb v OŽ sodijo gliotipična in nevrotipična protitelesa.⁶⁹ Ti kazalci niso specifični, doslej pa so se uporabljali le na ravni skupine v posameznih raziskavah.

Peroksidacijo porfirinov v ledvicah, ki jo povzroča Hg in jo spremlja povišano izločanje koproporfirina, prekoprofirina in pentakarboksiporfirina v urinu, se je doslej uporabljala kot biološki kazalec učinkov Hg, le pri poklicni izpostavljenosti Hg.^{81, 82} V zadnjem obdobju pa so se omenjene analize atipičnih porfirinov v urinu pričele uporabljati tudi pri relativno nizki izpostavljenosti Hg, pri otrocih s SAM, pred in po izplavljanju s kelati.^{39, 40} Rezultati analiz, opravljeni v dveh ločenih laboratorijih v ZDA in v Franciji, so bili kljub sorazmerno nizki vsebnosti Hg v biološkem materialu, dokaj skladni. V dosedanjih raziskavah z izplavljanjem Hg s kelati, dimerkaptopropan-sulfonatom (DMPS) in mezo-merkaptosukcinično kislino (DMSA), je uspelo zmanjšati učinke Hg na peroksidacijo porfirinov pri otrocih s SAM.^{39, 40} Spremembe porfirinov v urinu pred in po izplavljanju so bile dokaj specifičen kazalec bioloških učinkov Hg in zalog Hg v ledvicah. Žal pa v omenjenih raziskavah pri otrocih s SAM ni podatkov o nevropsihiatrični obravnavi otrok pred in po izplavljanju Hg. Ker izplavljanje kovin s DMPS ali DMSA lahko spremljajo določeni stranski

učinki, je pred in med izplavljanjem potrebno spremljati tudi stanje nekaterih osnovnih elementov.⁸³

Razpravljanje in zaključki

Glede na dosedanje raziskave lahko povzamemo, da so otroci s SAM gensko občutljiva populacija, pri kateri dosedanja genska proučevanja kar pri 90 % obolelih niso uspela pojasniti genskega polimorfizma. Predstavljene raziskave pri otrocih s SAM so osvetlile nekatere presnovne spremembe aminokislin, ki vplivajo na znižanje GSH in njegove biokemične predstopnje cisteina, bodisi prostega ali vezanega v metalotioneinih, kar je izredno pomembno za vzdrževanje redoks potenciala v celici in imunsko odzivnost. To stanje redoks potenciala pri teh otrocih stalno povečuje tveganje za oksidativni stres, zlasti v celicah OŽ. Zaradi velike porabe kisika je okolje OŽ izredno občutljivo za peroksidacijske učinke. Oksidativni stres in imunske spremembe (kronično aktivacijo mikroglije in astrocitov, avtoimunska aktivnost ter sistemska imunska aktivnost) pri otrocih s SAM lahko motita tudi delovanje nekaterih živčnih prenašalcev, zlasti serotonina in glutamata. Ne le rezultati genskih, temveč tudi rezultati imunskih raziskav, nakazujejo veliko heterogenost znotraj celotne skupine SAM, zato nekateri avtorji⁹ domnevajo, da imajo različne kategorije otrok s SAM različno in specifično etiologijo. S tega vidika je razumljivo, da rezultatov omenjenih raziskav ne moremo posploševati, vsekakor pa nam ti rezultati nudijo možnost primerjati nekatere možne učinke etil-Hg na razvoj SAM pri posameznih kategorijah otrok.

Izpostavljenost otrok etil-Hg v prvem letu starosti dosega referenčne vrednosti, ki pri izpostavljenosti metil-Hg v prednatalnem razvojnem obdobju otroka, običajno ne povzročajo povečanega tveganja za razvojne motnje. Referenčni vnos zagotavlja, da izpostavljenost ne dosega tako imenovanih kritičnih vrednosti⁸⁴ vnosa metil-Hg s prehrano med nosečnostjo, ki lahko podvojijo delež otrok z razvojnimi motnjami. Zaradi razlik v toksikokinetiki metil in etil-Hg vsebnost metil-Hg ni povsem primerna referenca za vrednotenje tveganja, vendar kljub temu lahko ocenimo, da izpostavljenost otrok etil-Hg v prvem letu starosti ni dosegala omenjenih kritičnih vrednosti. Glede na prejeti odmere etil-Hg v prvem letu starosti bi pri zdravih otrocih lahko pričakovali le nekatere povratne biološke učinke, pri populaciji otrok s povečano občutljivostjo pa je tveganje za pojavljanje nepovratnih bioloških in nevropsiholoških učinkov etil-Hg vsekakor večje. Na veliko intraindividualno variabilnost občutljivosti za Hg pri nizki izpostavljenosti otrok, pa so potrdila že pretekla opazovanja.³⁵

Pri otrocih z moteno sintezo GSH po cepljenjih etil-Hg prehaja v OŽ, kjer zaradi vezave na -SH skupine beljakovin peptidov in aminokislin še dodatno znižuje GSH, cistein in metalotioneine v astrocitih ter na ta način še dodatno znižuje antioksidativno zmogljivost astrocitov. Presnovna odvisnost nevronov od astrocitov pri sintezi GSH in deloma tudi metalotioneinov pa pomembno poveča tveganje za razvoj oksidativnega stresa tudi v nevronih. Pri tem domnevamo, da je adap-

tacijski odgovor na Hg⁸⁵ vezan le na povečano sintezo antioksidantnih encimov in morda tudi na antioksidativno aktivnost melatonina, medtem ko sinteza GSH in metalotioneinov verjetno ni zadostna za dvig antioksidativne zmogljivosti. To stanje znižane vsebnosti GSH v astrocitih in levkocitih zaradi vpliva Hg še poveča in pospeši razvoj oksidativnega stresa in imunске motnje. Imunske spremembe pri otrocih s SAM niso povsem identične s tistimi, ki jih povzroča Hg, vendar pa so pri posameznih podskupinah prav tako izraženi avtoimunski procesi v OŽ z aktiviranjem mikroglije, povišanjem nevrotipičnih in gliotipičnih proteinov in spremenjenim profilom citokinov. Hg zaradi že omenjenih imunoloških učinkov lahko še dodatno pospeši in poslabša že prizadeto imunsko stanje posameznih skupin otrok s SAM. Prek omenjenih mehanizmov, zlasti znižanjem GSH in povečanim tveganjem za oksidativni stres, lahko Hg še dodatno moti tudi delovanje živčnih prenašalcev ter pospeši ekscitotoksične učinke glutamata, zavira nevrotrofično aktivnost serotonina ter vpliva na metabolizem acetilholina in dopamina pri posameznih skupinah otrok s povečano občutljivostjo. Nevrotrofična aktivnost serotonina, ki pospešuje dozorevanje korteksa, je najbolj izrazita prav po porodu,⁸⁶ to pa je hkrati tudi obdobje, v katerem so otroci prejeli večji del etil-Hg s cepivom (prvih 6 mesecev po porodu).

Predstavljene raziskave torej podpirajo domnevo, da pri otrocih z določenimi presnovnimi motnjami aminokislin, ki znižujejo vsebnost GSH v celicah, in z imunskimi motnjami, etil-Hg lahko kljub sorazmerno nizkemu odmerku, še dodatno povečuje oksidativno prizadetost astrocitov in nevronov, vpliva na imunsko odzivnost tudi v OŽ ter moti delovanje dopaminergičnega, holinergeričnega, serotoninergičnega in centralnega dopaminergičnega sistema. Pri otrocih s povečano občutljivostjo na učinke Hg, timerosal lahko na ta način vpliva na nekatere nevropsihološke motnje s področja pomnjenja, pozornosti, govora, emocionalnosti in socialne interakcije, ki se pojavljajo pri otrocih s SAM.^{34, 56, 66, 80, 87-89}

Glede na omenjena spoznanja in glede na lastne izkušnje s področja vpliva Hg na človeka se pridružujem mnenju Burbacherja in sodelavcev iz leta 2005,⁵¹ ki so po temeljitem proučevanju toksikokinetike metil in etil-Hg kljub drugačnemu mnenju IOM - Inštituta za zdravje iz leta 2004,⁹⁰ ocenili, da so nadaljnja proučevanja vpliva timerosala na SAM vsekakor potrebna. To stališče podpira tudi raziskava Youngove s sodelavci iz leta 2008.⁴² Morda bodo prav raziskave, usmerjene v presnovo aminokislin, ki motijo tvorbo GSH, imunske motnje in druge biološke spremembe ter spremljavo bioloških učinkov Hg, omogočile bolj ciljane genetske raziskave in bolj usmerjeno preventivno ukrepanje, pri prizadetih podskupinah otrok s SAM. Prepričan sem, da se bo raziskovalna aktivnost na področju potencialnega vpliva Hg na SAM nadaljevala, vprašanje je le, ali bosta naša stroka in naši otroci pri tem tudi aktivni sopotniki.

Ne glede na raziskovalno dejavnost v prihodnosti pa ocenjujem, da je že danes na voljo dovolj argumentov, da pri klinični obravnavi otrok, ki so v zgodnjem otroštvu pri cepljenju prejeli timerosal, upoštevamo, poleg

priporočil Ameriške agencije za pediatrijo iz leta 2007,⁹¹ tudi nekatere osnovne ugotovitve raziskav, ki podpirajo hipotezo o vplivu etil-Hg na patogenezo SAM pri otrocih s povečano občutljivostjo za učinke Hg.

Literatura

1. Fombonne E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 2005; 66 Suppl 10: 3-8
2. Williams JG, Higgins JP, Brayne CE. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child* 2006; 91: 8-15.
3. Macedoni-Lukšič M. Specter Avtistične motnje. In: Kržišnik C, Battelino T, eds. Izbrana poglavja iz pediatrije -18: Novosti v otroški gastroenterologiji, Novosti v pediatriji, Avtizem. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo; 2006. p. 115-26.
4. Freitag CM. The genetics of autistic disorders its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 2-22.
5. Suh JH, Walsh WJ, McGinnis WR, Lewis A, Ames BN. Altered sulfur amino acid metabolism in immune cells of children diagnosed with autism. *Am J Biochem & Biotech* 2008; 4: 105-13.
6. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, Cutler P, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141: 947-57.
7. Sajdel-Sulkowska EM, Lipinski B, Windom H, Audhya T, McGinnis W. Oxidative stress in autism: Elevated cerebellar 3-nitrotyrosine levels. *Am J Biochem & Biotech* 2008; 4: 73-84.
8. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005; 57: 67-81
9. Ashwood P, Wills S, van de Water J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1-15.
10. London EA. The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. *Environ Health Perspect* 2000; 3 Suppl 108: 401-4.
11. Bernard S, Enayati A, Roger H, Binstock T and Redwood L. The role of mercury in autism. *Mol Psychiatr* 2002; 7: 42-3.
12. Geier DA, Geier MR. A comparative evaluation of the effect of MMR immunization and mercury doses from thimerosal-containing childhood vaccines on the population prevalence of autism. *Med Sci Monit* 2004; 27: 133-9.
13. Yel L, Brown L, Su K, Gollapudi S, Gupta S. Thimerosal induced neuronal cell apoptosis by causing cytochrome c and apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Int J Mol Med* 2005; 16: 971-7.
14. Barbaresi WJ, Katusic SK, Voigt RG. Autism. A review of the State of Science for Pediatric Primary Health Care Clinicians. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160: 1167-75.
15. Devlin B, Cook EH, Coon H, Dawson G, Grigorenko EL, McMahon W, Minshe W N, et al. CPEA Genetics Network. Autism and the serotonin transporter: The long and short of it. *Mol Psychiatr* 2005; 10: 1110-6.
16. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 2008; 358: 667-75.
17. Cook EH, Jr. Genetics of autism. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2001; 10: 333-50.
18. Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, et al. Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. *J Autism Dev Disord* 2005; 35: 103-16.
19. Grimble RF. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr* 2006; 136: 1660-5.
20. Dringen R, Gutterer JM, Herrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defence against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4912-6

21. Waly M, Olteanu H, Benerjee R, Choi SW, Mason JB, Parker BS, Sukumar S, et al. Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Mol Psychiat* 2004; 9: 358-70.
22. James SJ, Cultr P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neuberger JA. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1611-7.
23. Falnoga I, Tušek-Žnidarič M. Selenium-mercury interactions in man and animals. *Biol Trace Elem Res* 2007; 119: 212-20.
24. Toplak N, Avčin T. Cepljenje in avtoimunski odziv. Izbrana poglavja iz pediatrije: problematika cepljenj. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo; 2008. p. 50-9.
25. Zimmerman AW, Jyonouchi H, Comi AM, Connors SL, Milstien S, Varsou A, Heyes MP. Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatr Neurol* 2005; 33: 195-201.
26. Whitaker-Azmitia. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 2001; 15: 479-85.
27. Wirleitner B, Neurauder K, Schrocksnadel K, Frick B, Fchs D. Interferon- γ -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem* 2003; 10:1581-91.
28. Chugani DC, Muzik OM, Behem M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, Chugani HT. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic Children. *Ann Neurol* 1991; 45: 287-95.
29. Chandana SR, Behem ME, Juhasz C, Muzik O, Rothermel RD, Magner TJ, et al. Significance of abnormalities in developmental trajectory and asymmetry of cortical serotonin synthesis in autism. *Int J Dev Neurosc* 2005; 23: 171-82.
30. Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 Da proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* 2002; 52: 805-10.
31. Sing VK, Rivas WH. Prevalence of serum antibodies to caudate nucleus in autistic children. *Neurosci Lett* 2004; 355: 53-6.
32. Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook Jr EH, Dawson G, et al. Practice parameter: screening and diagnosis of autism: report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology* 2000; 55: 468-79.
33. WHO. Environmental health criteria 101, methylmercury. Geneva: World Health Organization; 1990.
34. Grandjean P, Weihe P, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19: 417-28.
35. Warkany J, Hubbard DH. Acrodynia and mercury. *J Pediatr* 1953; 42: 365-86.
36. Stehr-Green P, Tull P, Stellfeld M, Mortenson PB. Autism and thiomersal-containing vaccines, lack of consistent evidence for an association. *Am J Prev Med* 2003; 25: 101-6.
37. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Association between thiomersal-containing vaccine and autism. *JAMA* 2003; 290: 1763-7.
38. James SJ, Slikker III W, Melnyk S, New E, Pogribna M, Jernigan S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: Protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology* 2005; 26: 1-8.
39. Nataf R, Skorupka C, Amet L, Lam A, Spriggett A, Lathe R. Porphyrinuria in childhood autistic disorder: Implication for environmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 214: 99-108.
40. Geier DA, Geier MR. A prospective study of mercury toxicity biomarkers in autistic spektrum disorders. *J Toxicol Environ Health* 2007; 70: 1723-30.
41. Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay D, Benson P, Henrichse W, Lewis E, et al. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. *N Engl J Med* 2007; 357: 1281-92.
42. Young H, A, Geier DA, Geier MR. Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: An assessment of computerized medical records in the vaccine safety datalink. *J Neurol Sci*. V tisku 2008.
43. United Nations Environment Programme Chemicals. Global mercury assesment. Geneva: UNEP Chemicals; 2002.
44. Shober SE, Sinks TH, Jones RL, Borger PM, McDowell, Osterloh J. et al. Koncentracije živega srebra v krvi pri otrocih in ženskah v rodni dobi v Združenih državah Amerike, v letih 1999-2000. *JAMA (slovenska izdaja)* 2003; 11: 223-32.
45. Kobal A. Vpliv živega srebra na človeka. *JAMA (slovenska izdaja)* 2003; 11: 215-18.
46. Clements CJ, Ball LK, Pratt RD. Thiomesal in vaccines. *Lancet* 2000; 355: 1279-80.
47. Ball LK, Ball R, Pratt D. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics* 2001; 107: 1147-54.
48. Rice DB, Shoeny R, Mahaffey K. Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the U. S. EPA. *Risk Analysis* 2003; 23: 107-15.
49. Pichichero M, Cernichiari E, Loprelato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thimerosal: a descriptive study. *Lancet* 2002; 360: 1737-41.
50. Gibičar D, Logar M, Horvat N, Marn-Pernat A, Ponikvar R, Horvat M. Simultaneous determination of Trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra (n-propyl) borate as derivatising agent. *Anal Bioanal Chem* 2007. V tisku 2008.
51. Burbacher TM, Shen DD, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1015-21.
52. Kosta L, Byrne AR, Zelenko V. Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature* 1975; 254: 238-9.
53. Bernard SR, Purdue P. Metabolic models for methyl an inorganic mercury. *Health Phys* 1984; 46: 695-9.
54. Magos L. Physiology and Toxicology of Mercury. In: Sigel & H. Sigel, eds. Metal ions in biological systems. New York: Marc Dekker, INC; 1997. p. 321-57.
55. Mottet, N.K., Vahter, M.E., Charleston, J.S., Friberg, L.T. 1997. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. In: Sigel & H. Sigel, eds. Metal ions in biological systems. New York: Marc Dekker, INC; 1997. p. 371-92.
56. Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. Brain research Bulletin 2001; 55: 197-3.
57. Aschner M. Possible mechanisms of methylmercury cytotoxicity. *Molecular Biology Today* 2000; 1: 43-8.
58. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg (II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2017-24.
59. Pollard KM, Hultman P. Effects of mercury on immune system. In: Sigel & H. Sigel, eds. Metal ions in biological systems. New York: Marc Dekker, INC; 1997. p. 421-34.
60. Schara M, Nemeč M, Falnoga I, Kobal AB, Kveder M, Svetek J. The action of mercury on cell membranes. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2001; 6: 299-304.
61. Dave V, Mullaney K, Goderie S, Kimelberg H, Aschner M. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: Effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci* 1994; 16: 222-31.
62. Qu H, Syversen T, Aschner M, Sonnevald U. Effect of methylmercury on glutamate metabolism in cerebellar astrocytes in culture. *Neurochem Int* 2003; 43: 411-6.
63. Ikeda M, Komachi H, Sato I, Himi T, Yuasa T, Murota S. Induction of neuronal nitric oxide synthase by methylmercury in the cerebellum. *J Neurosci Res* 1999; 55: 352-6.
64. Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C, Leprince C, Tauc L, Baux G. Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience* 1999; 93: 597-603
65. Durczok A, Szkilnik R, Brus R, Nowak P, Labus L, Koneski J, Drabek K, et al. Effect of organic mercury exposure during early stage of ontogenetic development on the central dopaminergic system in adult rats. *Polish Journal of Environmental Studies* 2002; 11: 307-14.
66. Burbure de C, Buchet JP, Leroyer A, Nisse C, Hagvenoer JM, Mutti A, Smerhovsky Z, et al. Renal and neurological effect of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: Evidence of early effect and multiple interaction at environmental exposure levels. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 584-90.

67. Cocchini T, Randine G, Castoldi AF, Balloni L, Baiardi P, Manzo L. Lymphocyte muscarinic receptors and platelet monoamine oxidase-B as biomarkers of CNS function: effect of age and gender in healthy humans. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 19: 715-20.
68. WHO. Environmental health criteria 118, Inorganic mercury. Geneva: World Health Organization; 1991.
69. Evans HL. Markers of neurotoxicity: From behavior to autoantibodies against brain proteins. *Clin Chem* 1995; 41: 1874-81.
70. Agrawal A, Kaushal P, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Thimerosal induces TH2 response via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 474-82.
71. Tušek-Znidrič M, Pucer A, Fatur T, Filipič M, Ščančar J, Falnoga I. Metal binding of metallothioneins in human astrocytomas (U87 MG, IPDDC-2A). *BioMetals* 2007; 20: 781-92.
72. Kobal AB, Prezelj M, Horvat M, Krsnik M, Gibičar D, Osredkar J. Glutathione level after long-term occupational elemental mercury exposure. *Environ Res* 2008; 107: 115-23.
73. Kobal AB, Horvat M, Prezelj M, Šešek-Briški A, Krsnik M, Mazej D, Kobal-Grum D, Osredkar J, et al. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 17: 261-74.
74. Falnoga I, Kobal AB, Stibilj V, Horvat M, Stegnar P. Selenoprotein P in subject exposed to mercury and other stress situations such as physical load or metal chelation treatment. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89: 25-33.
75. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbovnik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 137-59.
76. Sener G, Sehirli AO, Ayanoglu-Durler G. Melatonin protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2003; 93: 290-6.
77. US EPA (Environmental Protection Agency). Integrated risk information system, 2005. Dosegljivo na: <http://www.Epa.gov/iris/subst/0073-htm>
78. Kobal AB. Quecksilber aus Idrija - Historisch und aktuell - eine arbeitsmedizinische Betrachtung. *Zbl Arbeitsmed* 1994; 44: 200-10.
79. Wilhelm M, Schulz C, Schwenk M. revised and new reference values for arsenic, cadmium, lead, and mercury in blood or urine of children: Basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int J Hyg Environ-Health* 2006; 209: 301-5.
80. Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. Developmental neuropathology of environmental metal agents. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 87-110.
81. Kobal AB, Kinsky A, Kramberger B. Influence of Increased mercury absorption on the concentration of δ -aminolevulinic acid, porphobilinogen and porphyrins in urine. International Symposium on Porphyrins and Lead intoxication, Marburg 1977. *J Clin Chem Biochem* 1978; 16: 62.
82. Echeverria D, Heyer NJ, Martin MD, Naleway Ca, Woods JS, Bitner AC. Behavioral effect of low-level exposure to Hg²⁺ among dentist. *Neurotoxicol Teratol* 1995; 17: 161-8.
83. Markowitz ME, Weinberger HL. Immobilization-related lead toxicity in previously lead-poisoned Children. *Pediatrics* 1990; 86: 455-7.
84. National Research Council. Toxicological effects of methylmercury. Washington: National Academy Press; 2000.
85. Crawford DR, Davis KJA. Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 25-8.
86. Dori I, Dinopoulos A, Blue ME, Parnavelas JG. Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex. *Exp Neurol* 1996; 138: 1-14.
87. Cheuk DK, Wong V. Attention-deficit hyperactivity disorder and blood mercury level: a case control study in Chinese children. *Neuropediatrics* 2006; 37: 234-40.
88. Desoto Mc, Hitlan RT. Blood levels of mercury are related to diagnosis of autism: a reanalysis of an important data set. *J Child Neurol* 2007; 22: 1308-64.
89. Hohmann CF, Walker EM, Boylan CB, Blue ME. Neonatal serotonin depletion alters behavioral responses to spatial change and novelty. *Brain Res* 2007; 1139: 163-77.
90. IOM (Institute of Medicine). Vaccines and autism. Immunisation Safety Review Committee 2004. Washington: National Academy Press; 2004.
91. Myers SM, Johnson CP. Management of children with autism spectrum disorders. American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. *Pediatrics* 2007; 120: 1162-82.

Prispelo 2008-08-08, sprejeto 2008-12-02