
Ivo Barić (urednik) / NASLJEDNE METABOLIČKE BOLESTI 2011
Glavna tema: Djeca, metali i nove bolesti
PRIRUČNIK

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU - MEDICINSKI FAKULTET

Medicinska naklada, Zagreb

Sva prava pridržana. Ova je knjiga zaštićena autorskim pravima i ne smije se ni djelomično reproducirati, pohraniti u sustavu za reproduciranje, fotokopirati niti prenositi u bilo kojem obliku i na bilo koji način bez dopuštenja autora i izdavača.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU – MEDICINSKI FAKULTET

Katedra za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,
Hrvatsko društvo za humanu genetiku, Hrvatsko pedijatrijsko društvo i Akademija medicinskih
znanosti Hrvatske

sastanak Sekcije za bolesti metabolizma Hrvatskog pedijatrijskog društva
i
poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije

Priručnik

Nasljedne metaboličke bolesti 2011.

Glavna tema:

Djeca, metali i nove bolesti



Voditelj tečaja i urednik priručnika
Prof.dr.sc. Ivo Barić, dr.med.

Zagreb, 14. listopada, 2011.
Mjesto održavanja: Hrvatski liječnički zbor, Šubićeva 9, Zagreb

Popis predavača na tečaju “Nasljedne metaboličke bolesti 2011”:

- Doc.dr.sc. Irena Barbarić, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, KBC Rijeka
- Prof.dr.sc. Ivo Barić, dr.med. specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Doc.dr.sc. Ernest Bilić, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Prof.dr.sc. Ljerka Cvitanović-Šojat, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinička bolnica „Sestre milosrdnice“, Zagreb
- Dr.sc. Melita Čačić Hribljan, dr. med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Mr.sc. Andrea Dasović Buljević, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Peof.dr.sc. Srećko Gajović, dr.med.
Odsjek za neurogenetiku, citogenetiku i razvojnu genetiku,
Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Prof.dr.sc. Ksenija Fumić, specijalist medicinske biokemije
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb
- Mr.sc. Alemka Jaklin Kekez, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb
- Dr.sc. Maja Krželj, dipl. biolog i ekolog
Sveučilišni studijski centar za studije mora, Sveučilište u Splitu
- Prof.dr.sc. Vjekoslav Krželj, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Split
- Iva Martinac, dr.med., znanstvena novakinja
Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Danijela Petković Ramadža, dr.med., specijalizant pedijatrije
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Dr.sc. Silvija Pušeljić, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Osijek
- Doc.dr.sc. Jurica Vuković, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb
- Karin Zibar, dr.med. znanstvena novakinja
Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Mario Ćuk, dr.med., specijalist pedijatar
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagreb

Sadržaj priručnika:

Izazovi terapije matičnim stanicama	7
Srećko Gajović	
Kanalopatija CRAC - prirođena metabolička miopatija s poremećenom imunošću, ektoermalnom displazijom i anhidrozom	10
Mario Ćuk	
Novorođenački skrining na vratima ere tandemske spektrometrije masa	21
Ivo Barić, Ksenija Fumić, Karin Juras, Vladimir Sarnavka	
Što sve poremećaji prometa metala mogu napraviti u krvnoj slici	28
Ernest Bilić	
O neonatalnoj hemokromatozi i intrauterinom liječenju	34
Karin Zibar, Jurica Vuković, Ivo Barić	
Nasljedne homokromatoze- trabaju li zanimati i pedijatra?	42
Irena Barbarić	
Bolesti s nakupljanjem željeza u mozgu	46
Melita Čačić Hribljan	
Koliko je u Hrvatskoj realna mogućnost trovanja djece olovom	56
Sijvija Pušelj, Vesna Milas	
Brojna lica i dijagnostički izazovi Wilsonove bolesti	68
Jurica Vuković, Lana Omerza	
Dječak s fibrozom jetre i povećanom količinom bakra u jetri	71
Alemka Jaklin	
Bolesti mozga zbog poremećaja prometa metala	80
Ljerka Cvitanović-Šojat, Romana Gjergja Juraški	
Problem unosa žive u organizam prehranom namirnicama iz mora	92
Maja Krželj, Radenka Kuzmanić-Šamija, Venera Lakoš, Vida Šimat Vjekoslav Krželj	
Zamke u mjerenju i interpretaciji nalaza oligoelemenata	102
Ksenija Fumić, Karmen Bilić, Marija Zekušić, Ana Škaričić	
Kada treba misliti na manjak selen s prikazom bolesnika s hiposelenemičkom kardiomiopatijom	106
Andrea Dasović Buljević	
Dijete i cink	111
Ivo Barić	

Predgovor

Područje nasljednih metaboličkih bolesti zadnjih se godina razvija vrlo brzo. Otkrivaju se nove bolesti, nove dijagnostičke metode i nove mogućnosti liječenja. Budući da je samo čitajući tekste u standardnim udžbenicima vrlo teško pratiti taj napredak željeli smo ovim priručnikom dijelom pokriti prazninu u edukaciji i informiranosti svih koji s bolesnima od nasljednih metaboličkih bolesti dolaze u dodir. S obzirom da nije bilo moguće osvrnuti se na čitavo ovo područje za ovu priliku odabrali smo kao glavnu temu poremećaje prometa metala i neke nove bolesti u djece.

Ovaj priručnik nije zamišljen kao skup preporuka koje treba obavezno slijediti nego kao smjernice koje predstavljaju stavove autora pojedinih priloga i koje je korisno razmotriti u svakog bolesnika individualno, ovisno o dijagnozi, kliničkoj slici i rezultatima laboratorijskih pretraga. U tom smislu, nadam se da će priručnik biti koristan kako zdravstvenom osoblju tako i bolesnicima koji boluju od metaboličkih bolesti.

Urednik

Izazovi terapije matičnim stanicama

Srećko Gajović

Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 12,
10000 Zagreb

Jedan od najboljih igrača američkog nogometa PeytonManning nedavno je u Europi primio terapiju matičnim stanicama zbog ozljede vrata (1). Terapija koju je dobio nije provjerena, a izvedena je u Europi, jer nije odobrena u Sjedinjenim Američkim Državama. Ozljeda vrata već duže vrijeme sprečava ovog igrača vratitise na teren. PeytonManning je izabran za 8. igrača svih vremena američke lige NFL i jedini je aktivni igrač među prvih 10. Najviše puta (4 puta) dobio je nagradu za najboljeg igrača sezone, MVP (engl. Most ValuablePlayer). Zbog problema s diskom ovaj sportaš je bio već na nekoliko operacija, a navodno je nakon terapije matičnim stanicama bio podvrgnut još jednoj operaciji. Primijenjene su matične stanice dobivene iz njegovog masnog tkiva, te se od njih očekuje da mu pomognu u oporavku oštećenog živca. PeytonManning nije jedina slavna osoba koja je primila neprovjerenu terapiju matičnim stanicama. Jedan od američkih predsjedničkih kandidata koji se natječe za nominaciju Republikanske stranke, trenutno guverner države Teksas, Rick Perry također je primio terapiju matičnim stanicama (2). Zbog bolova u leđima primio je matične stanice za koje se očekuje da će poboljšati rezultate operacije spajanja kralježaka i obnoviti u njegovom tijelu kost i hrskavicu. Za ovu namjenu koriste se (još uvijek neprovjereno) matične stanice koštane srži, no u ovoj je prilici guvernerov osobni prijatelj, ortoped iz Teksasa, Dr. George Q. Daley, primijenio matične stanice dobivene iz masnog tkiva, na vlastitu ruku dodatno mijenjajući prvobitni neprovjereni postupak. Ova primjena izazvala je suprotne reakcije, s jedne strane predstavila je mogućeg predsjedničkog kandidata kao prijatelja znanosti, te spremnog na rizik za potrebe napretka, dok je s druge strane sigurno da je primijenjeni postupak potpuno neprovjeren, da je dvojbeno narušava li federalna zakonska pravila, te konačno da krivo upućuje javnost na prihvatljivost ovakvog načina rješavanja osobnih zdravstvenih problema.

Ova dva primjera prikazuju neprovjerenu primjenu matičnih stanica u odraslih osoba koje su mogle same odlučiti bi li se podvrgle ovakvoj terapiji, a također su i imali novaca nešto si tako priuštiti. Nisu samo riskirali da ova terapija ne bude djelotvorna, već također i ozbiljne nuspojave koje uključuju začepljenje krvnih žila stanicama, infekciju ili tumor. Međutim neprovjerena terapija matičnim stanicama primjenjuje se također i na djeci. Veliki publicitet dobio je slučaj Dakote Clark, djevojčice iz Engleske, koja loše vidi zbog urođene hipoplazije vidnog živca (3). Siromašni roditelji skupili su novčane donacije doslovno na ulici, te su odveli svoju kćer u Kinu, gdje je dobila terapiju matičnim stanicama. Nakon tretmana ustvrdili su veliko poboljšanje vida svoje kćeri, koje nije bilo potvrđeno od liječnika koji su je do tada liječili. Ovi roditelji su potaknuti vlastitim iskustvomproveli veliku medijsku kampanju kako bi pomogli i drugim roditeljima skupiti novce i odvesti svoju djecu u Kinu na terapiju matičnim stanicama.

Pretpostavlja se da danas oko 700 institucija ili pojedinaca nudi neki vid terapije matičnim stanicama. Odrasli i djeca koji se podvrgavaju ovakvim neodobrenim postupcima nisu samo iz inozemstva, već također i iz Hrvatske. Medijsku pozornost stječu oni koji pokušavaju skupiti novce putem medija za odabrani tretman. Jedan od krajnjih primjera je šestomjesečna djevojčica Taša Čiča iz Bakra, koju je nakon medijske kampanje u svim većim časopisima samohrana majka odvela u Kinu, kako bi matične stanice pomogle „oštećenju mozga“ (4). Za ovakvu djecu otvaraju se mrežne strane, na njima se opisuje bolest djeteta i način na koji se može uplatiti novac, no u pravilu nema nikakvih informacija o djetetu poslije liječenja. Dvije godine kasnije Taša Čiča je ponovno u medijima, ovoga puta zbog skupljanja novaca za fizikalnu terapiju u Sjedinjenim državama. Jedan od donatora je ovoga puta politička stranka, što ukazuje na specifičan vid promocije darovatelja kroz pomoć oboljeloj djeci (5).

Očigledno je da postoji velika mogućnost da budemo suočeni s upitima roditelja bi li tretman matičnim stanicama mogao pomoći njihovoj djeci. Stoga je važno navesti razloge da roditeljima ne preporučujemo ovakav vid terapije, te pružiti informacije koje bi se mogle pokazati korisnim u razgovoru s roditeljima:

(1) Neprovjerenja terapija

Premda je izgledno da su matične stanice jedan od mogućih vidova buduće terapije kojom će se liječiti razne bolesti, danas ne postoji niti jedan provjereni vid primjene ove terapije (osim transplantacije koštane srži i transfuzije krvi, koje možemo u širom smislu smatrati terapijom stanicama). Jedini način da se provjeri i odobri novi vid terapije je tzv. klinički pokus. Trenutno su u tijeku različiti vidovi odobrenih kliničkih pokusa na ljudima kojima se provjerava terapija matičnim stanicama, no niti jedan od ovih pokusa nije rezultirao uvođenjem matičnih stanica u svakodnevnu praksu. Većina kliničkih studija koje se trenutno provode su u fazi I, gdje se još ne procjenjuje dobrobit za pacijenta, već moguća štetnost nove terapije. Rezultati kliničkih studija koje se provode ne mogu se procijeniti brzo, jer uključuju dugotrajno praćenje bolesnika nakon primijenjene terapije. Tek nakon potvrde da terapija nije štetna, prelazi se u slijedeću fazu kliničkih studija u kojima se jednako dugotrajno procjenjuje moguća korist za oboljelog. Terapije matičnim stanicama koje se danas nude nisu prošle ovakav vid provjere putem odobrenih i registriranih kliničkih studija.

(2) Nejasan terapijski pristup

Govoriti o matičnim stanicama u liječenju bolesti jednako je općenito kao i govoriti o liječenju neke bolesti lijekovima ili kirurijom. Kao što se razlikuju lijekovi ili kirurški zahvati, tako su i matične stanice vrlo raznolika grupa raznovrsnih stanica koje mogu biti pripremljene na različite načine i stoga imati iznimno različita svojstva. Također ove stanice mogu biti pripremljene na različite načine, te biti dio različitih vrsta pripravaka. U većini slučajeva opis moguće terapije matičnim stanicama koje se nude oboljelima vrlo je neprecizan i ne daje niti osnovne podatke od kuda su matične stanice dobivene niti o kojoj vrsti stanica se radi, jer bi otkrivanje ovih informacija narušilo „poslovnu tajnu“. Stoga je obećanje ponuđača usluge da će primijeniti matične stanice iznimno neprecizno i ne omogućava niti približnu procjenu opravdanosti niti smislenosti mogućeg postupka. Štoviše poneka dostupna informacija koja otkriva detalje ponuđene primjene pokazuje ozbiljne zamjerke ovakvim postupcima. Primjerice, navodi se da su zbog problema s očnim živcem matične stanice djevojčici DakotiClarkebile uštrcane u vene pored oka. Ovakav način primjene je za roditelje vrlo upečatljiv, no znamo da venska krv odvodi matične stanice koje potom moraju proći kroz pluća da bi se raspršile po cijelom tijelu. Primijenjene stanice vjerojatno

uopće nisu stigle do očnog živca.

(3) Nestandardizirani stanični pripravci

Jedan od velikih problema buduće primjene matičnih stanica je na koji način standardizirati stanični pripravak. U ovom slučaju ne radi se o lijeku koji ima jasnu kemijsku formulu i daje se u preciznoj koncentraciji, već o stanicama koje su izolirane iz neke jedinke, uzgajane u kulturi, te konačno nekim postupkom pripremljene za terapiju. Od samog uzimanja stanica, pa duž cijele procedure, moguća je iznimno velika varijabilnost odgovora stanica i stjecanje različitih svojstava ovih stanica, koja mogu biti drugačija od očekivanih. Ovo pokazuje koliko neproverjena primjena može biti neučinkovita i opasna. Odabir upravo onih stanica koje imaju poželjna i moguće blagotvorna svojstva predstavlja jedan od najvećih izazova kako u provođenju temeljnih istraživanja na životinjama, tako i u planiranju odobrenih kliničkih pokusa koji provjeravaju mogućnosti primjene matičnih stanica na ljudima.

(4) Bez procjene učinka

Povoljni učinci matičnih stanica pokazani su pokusima na laboratorijskim životinjama, miševima i štakorima. Ovi povoljni učinci razlog su odobravanja današnjih kliničkih pokusa na ljudima. Na žalost, ovi povoljni učinci nipošto nisu garancija da će tretmani koji su pokazivali poboljšanje kod miševa i štakora biti uspješni u ljudi. Neproverjeni postupci s matičnim stanicama koji se danas nude na tržištu, većinom nisu niti bili testirani na životinjama te zapravo ljudi predstavljaju prvu vrstu živih bića na kojima se ovakva terapija provodi. Štoviše nema čak ni naknadne provjere njene štetnosti ili efikasnosti. Udaljene destinacije za primjenu matičnih stanica poput Kine, pokazuju video isječke u kojima bolesnici odmah (!) svjedoče o značajnim poboljšanjima dok je terapija još uvijek u tijeku. S povratkom kući daljnja mogućnost procjene ove terapije nije predviđena.

(5) Nuspojave terapije matičnim stanicama

Mogućnosti nuspojava tijekom ovih tretmana su ozbiljne i velike. Jedna osoba je umrla u Sjedinjenim Državama od ugruška stvorenog tijekom ustrcavanja matičnih stanica. Naša istraživanja provedena na štakorima, pokazala su da je primjena matičnih stanica unesenih kroz venu u krvni optok moguća samo ako se životinjama daju iznimno snažni vazodilatatori (6). U suprotnom stanice zaostanu u kapilarnoj mreži pluća. Na svim mjestima gdje se nađu matične stanice se mogu dalje razvijati i postoji mogućnost nastanka tumora. U pokusima na životinjama pokazano je da matične stanice ne preživljavaju u tijelu životinje, te da je stoga mogućnost nastanka tumora neznatna, no u ljudi nemamo još podataka koliko je mogućnost nastanka tumora ozbiljna, pogotovo što je životni vijek miša i štakora samo dvije godine.

(6) Neučinkovitost matičnih stanica

Povoljni učinci matičnih stanica u pokusima na životinjama nisu u potpunosti razjasnili mehanizam njihovog djelovanja. Pretpostavlja se da bi dio učinka mogao biti posljedica izlučivanja tvari koje djeluju blagotvorno na njihovu okolinu. Time bi matične stanice zapravo bile izvor vlastitih terapijskih molekula direktno u tkivu, gdje se nalaze. Drugi dio učinka očekuje se postići ugradnjom matičnih stanica kako bi zamijenile stanice izgubljene tijekom bolesti. Posebno privlačna bi bila primjena matičnih stanica u bolestima živčanog sustava, gdje se očekuje da živčane matične stanice zamijene izgubljene neurone. Premda je pokazano da se matične stanice stvarno diferenciraju u živčane stanice u mozgu laboratorijskih životinja, čini se da je uključivanje ovih neurona u djelatne neuronske krugove vrlo upitno. Praćenje matičnih stanica u mozgu laboratorijskih životinja putem magnetske rezonancije pokazalo je da mjesec dana nakon primjene nema niti

jedne više preživjele matične stanice. Ovaj rezultat ukazuje da je većina blagotvornog efekta matičnih stanica u bolestima mozga zapravo rezultat trofičke potpore okolnom tkivu, a ne same ugradnje novih neurona. Stoga trenutna temeljna istraživanja na laboratorijskim životinjama ukazuju ne samo na njihove terapijske mogućnosti, već i na njihova ozbiljna ograničenja. Konačno, oslanjajući se na današnje rezultate pokusa na životinjama, tvrdnja da su matične stanice poboljšale vidni živac djevojčice Dakote Clark djeluje nevjerovatno.

Mogućnosti matičnih stanica otvaraju put budućim novim vidovima terapije bolesti pred kojima smo danas nemoćni. Na žalost ove obećavajuće procjene dovode kako do velikih očekivanja javnosti i želje za što skorijom primjenom matičnih stanica, pa i do nekritičke primjene ovih stanica kroz neprovjerene terapijske postupke. Očigledno je da trebamo još iznimno puno temeljnih istraživanja na laboratorijskim životinjama kroz koje moramo spoznati još brojne detalje biologije matičnih stanica, kako bismo bili u mogućnosti na ispravan način dizajnirati buduću terapiju čovjeka. Ovakva nastojanja danas imaju veliku potporu javnosti. Na žalost, postoji velika opasnost da bi razočaranja do kojih će neminovno dovesti nekritička primjena matičnih stanica, mogla utjecati na stvaranje negativnog stava javnosti prema terapiji matičnim stanicama. Stoga su potpora temeljnim istraživanjima matičnih stanica iistovremenaborba protiv neprovjerenog biznisa s matičnim stanicama vrlo važni u ovim trenucima kako bi se što prije osigurala pomoć oboljelima kojima je ovakva terapija potrebna.

Literatura

1. http://www.huffingtonpost.com/2011/09/19/peyton-manning-stem-cell-treatment_n_970763.html
2. http://www.huffingtonpost.com/2011/08/22/rick-perry-back-surgery-stem-cells_n_932942.html
3. <http://www.mirror.co.uk/news/top-stories/2009/03/05/stem-cell-miracle-gives-gift-of-sight-to-toddler-dakota-clarke-115875-21172334/>
4. <http://www.24sata.hr/zdravlje/mislili-da-nema-nade-tasu-su-spasile-maticne-stanice-130233>
5. <http://fmsdp.org/vijesti/donirano-6-00000-kuna-za-tasu-cicu/>
6. Mitrečić D, Nicaise C, Gajović S, Pochet R. Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant*. 2010;19(5):537-48.

Kanalopatija CRAC - prirođena metabolička miopatija s poremećenom imunošću, ektodermalnom displazijom i anhidrozom

Mario Ćuk

Zavod za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb

Što je to kanalopatija CRAC i zašto o njoj? Kanalopatija CRAC (*Calcium Release Activated Calcium channel*) je nasljedna bolest koja nastaje zbog poremećaja rada kalcijevog kanala CRAC, a očituje se jedinstvenom kliničkom slikom koja uključuje miopatiju, imunodeficienciju, autoimunost i ektodermalnu displaziju s anhidrozom. Iako je u literaturi dosad opisano tek nekoliko bolesnika, proučavanjem ove rijetke kanalopatije došlo se do iznimno važnih temeljnih spoznaja o ulozi kalcija i njegovog kanala CRAC u ljudi. Uz to, imamo i vlastitih iskustava s ovom po život opasnom bolešću. Jedinstvenost, važnost i ponešto iskustva razlozi su koji su nas ponukali na pisanje teksta koji je pred Vama.

Najkraće o kalciju, posebno važnom spoju ljudskog tijela koji čini 1% njegove ukupne mase. Najveći dio tjelesnog kalcija ugrađen je u kosti (99%). Preostalih 1% izvankoštanog kalcija raspodijeljeno je u izvan- ili unutarstanični odjeljak. Polovina izvanstaničnog kalcija je u ioniziranom obliku i predstavlja aktivni oblik kalcija koji ulazi u ekscitabilne i neekscitabile stanice te kao drugi glasnik obavlja brojne zadaće od transkripcije gena do sinteze proteina i važnih spojeva u gotovo svim organskim sustavima. Poremetnje prometa kalcija dovode i do po život opasnih stanja.

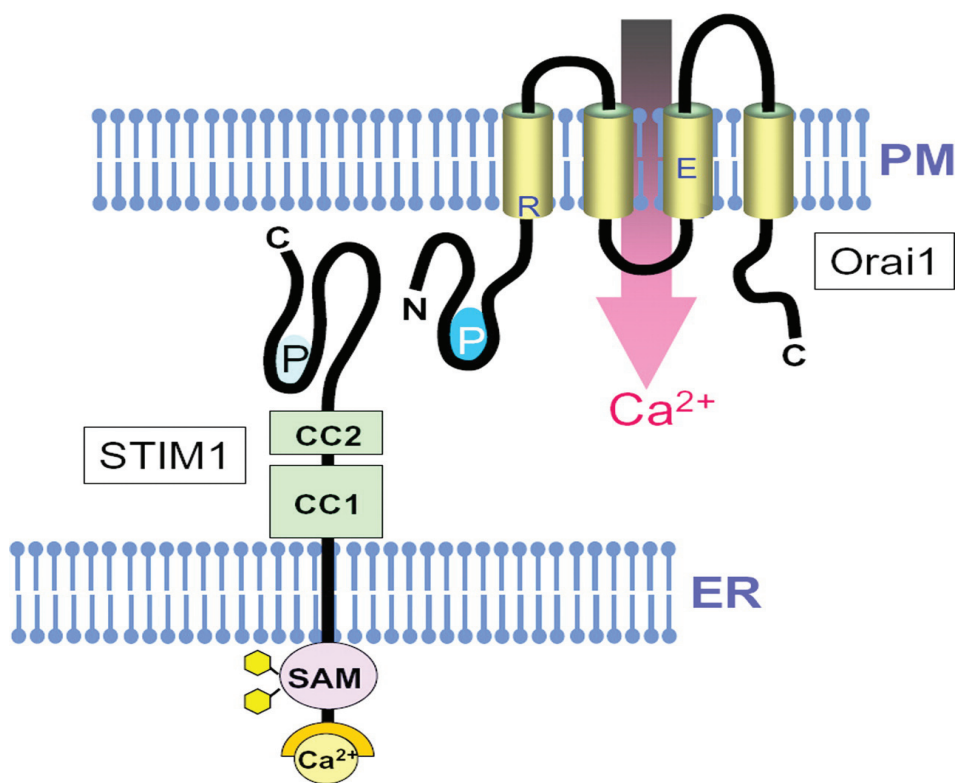
Kako kalcij utiče u stanice? Na više načina. SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*) je jedan od poznatih načina utoka kalcija u endoplazmatski retikul stanica. U trenutku kada su zalihe pohranjenog kalcija pri kraju, uključuju se mehanizmi koji osiguravaju dotok novih količina kalcija kako bi se unutarstanična skladišta popunila. Jedan od kanala koji sudjeluje u procesu popunjavanja rezervi kalcija je kanal CRAC (*Calcium Release Activated Calcium channel*), kalcijev kanal kojeg aktivira pražnjenje skladišta kalcija. Elektrofiziološki, proces SOCE posredovan kanalom CRAC je od ranije poznat, no tek je nedavno razjašnjena njegova genska osnova i proteinska građa.

Kalcijev kanal CRAC je ključni dio sustava namicanja novih količina kalcija koji se pohranjuje u endoplazmatskom retikulumu i kada zatreba, biva promptno iskorišten u biološkim procesima. Kanal CRAC se sastoji od dva dijela: 1) ORAI1 (*prema nazivu iz grčke mitologije Orai, čuvar rajskih vrata*)- protein stanične membrane koji formira poru za utok kalcija u stanicu; 2) STIM1 (*STromal Interaction Molecule 1*)- protein membrane endo/sarkoplazmatskog retikuluma koji obavlja zadaću senzora za pohranjeni kalcij (Slika 1). Kada se endoplazmatsko skladište kalcija isprazni, pobudi se senzorni protein STIM1 koji se potom spaja s proteinom ORAI1 na staničnoj membrani u jedinstveni kanal CRAC. Aktivirani kanal CRAC dovodi do selektivnog utoka kalcija u stanice putem proteina ORAI1 koji na staničnoj membrani formira tetramernu strukturu, poru.

Što su zalihe kalcija u endoplazmatskom skladištu manje, kanal je aktivniji, a utok kalcija veći. Obje komponente kanala CRAC, ORAI1 i STIM1 su izražene u gotovo svim tjelesnim stanicama. U nekim od njih, kanal CRAC je od iznimne važnosti za njihovu funkciju uključujući miocite, limfocite T-CD4⁺ i T-CD8⁺, limfocite B, mastocite, makrofage, epitelne stanice žlijezda znojnice, ameloblaste i druge (Slika 2). Tkiva izgrađena od potonjih stanica posebno su poremećena nedostatnom funkcijom kanala CRAC. Izuzetak su stanice mozga u kojima je iz zasada nejasnih razloga izražena samo komponenta STIM1 i u kojima kanal CRAC nije od presudne važnosti za namicanje kalcija. Slično vrijedi i za ostala tkiva u kojima se kalcij osigurava drugim sustavima.

Bolest se može prepoznati klinički već u prvim tjednima života. Razlikujemo dvije skupine simptoma, imunološke i neimunološke koji se javljaju ovisno o dobi djeteta (Tablica 1).

Dojenče je generalizirano hipotonično, posebno je zahvaćena lična, dišna i aksijalna muskulatura, slabo kontrolira glavu i zaostaje u motoričkom razvoju, ima midrijazu i slabo reaktivne zjenice, ne napreduje na težini, sklono je infekcijama i povišenoj tjelesnoj temperaturi pri čemu se oskudno ili uopće ne znoji, ima povećanu jetru, slezenu i limfne čvorove. Unatoč potonjim pojedinačno nespecifičnim simptomima, klinički je s vremenom sve više očito da dijete boluje od prirodne miopatije, nedostatne imunosti i poremećaja znojenja. Jedinstvena udruženost miopatije, imu-

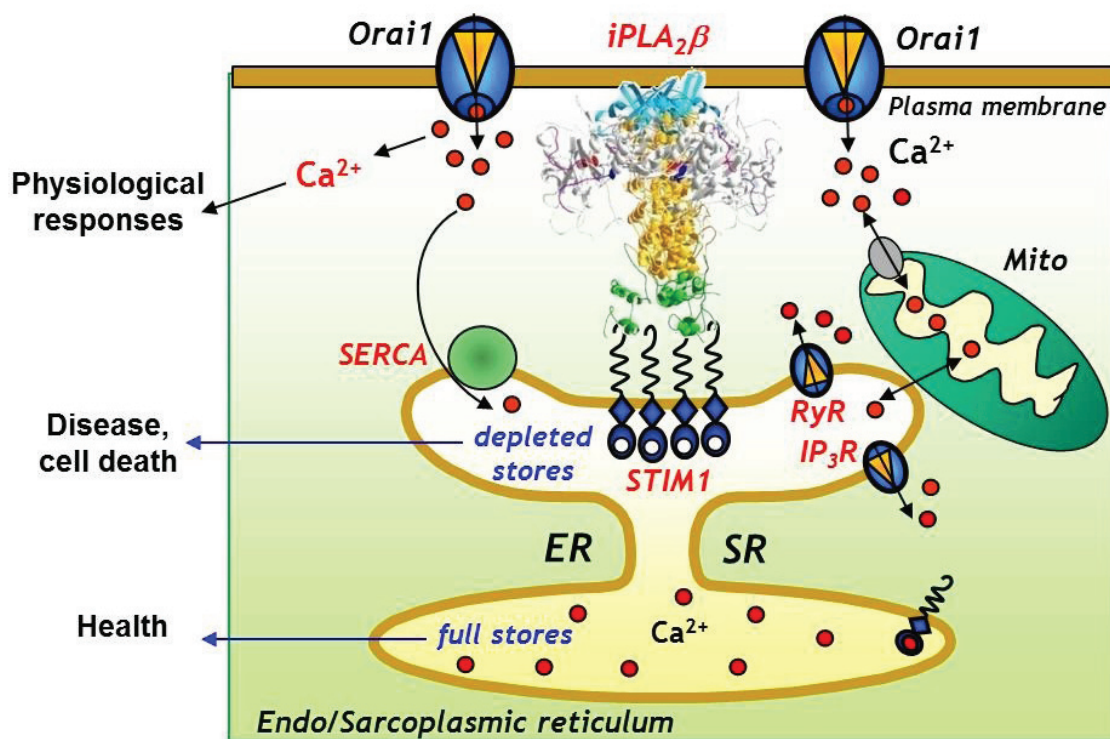


Slika 1. Struktura kanal CRAC- komponenta stanične membrane Orai1 koja formira poru za utok kalcija i komponenta membrane endoplazmatskog retikuluma STIM1 koja predstavlja senzor za kalcija (ER, endoplazmatski retikulum; PM, plazmatska membrana). Preuzeto iz reference 1.

nodeficijencije i anhidroze pobuđuje sumnju, a ukoliko se uz to dokaže i parcijalna hipoplazija šarenice, radnu dijagnozu kanalopatije CRAC je moguće postaviti već u dobi između prvog i drugog mjeseca života.

Tijek bolesti neotkrivene i neliječene djece nemilosrdno vodi u dodatne probleme koji se sve više kompliciraju s dobi djeteta. Tijekom prve godine života mišićna bolest je neprogresivnog tijeka za razliku od brzoprogresivnog nedostatka imunosti, sve složenijih infekcija s pojavom pretjerane imunosti uključujući autoimunu hemolitičku anemiju i po život opasne hemolitičke krize, autoimunu trombocitopeniju i neutropeniju, antifosfolipidni sindrom i drugo. Neobična udruženost pretjerane, uz nedostatnu imunost dodatno upućuje na kanalopatiju CRAC. Neliječena ili bezuspješno liječena djeca umiru u prvoj ili drugoj godini života. Zbog toga je razjašnjenje etiologije i pravovremena dijagnoza preduvjet uspješnog liječenja.

Rutinske laboratorijske i slikovne pretrage nisu patognomonične. Rezultati tih pretraga ovise o tijeku bolesti i vremenu uzorkovanja/slikanja. Laboratorijski nalazi su isprva mahom normalni, a nakon kontakta djeteta sa sve većim brojem mikroorganizama, prvenstveno odražavaju stanje nedostatne imunosti, zatim autoimunosti, a potom komplikacija bolesti. Slično vrijedi i za slikovne pretrage.



Slika 2. Kanal CRAC u mišićnim stanicama. Kalcij se koristi za brojne stanične procese uključujući i proizvodnju energiju u mitohondrijima. Preuzeto iz reference 2.

Kako se dolazi do dijagnoze? Anamneza i jedinstvena klinička slika pobuđuju sumnju koju određenim specijalnim pretragama treba dodatno potkrijepiti, a analizom gena ORAI1/STIM1 i potvrditi. U nastavku ćemo istaknuti pojedinačne, klinički dobro definirane probleme koji svojom udruženošću upućuju na kanalopatiju CRAC:

O miopatiji CRAC

Metabolička miopatija CRAC zasada nije službeno klasificirana.

Klinički se iz dosadašnjeg oskudnog iskustva zna da je miopatija prirođena, uočljiva u najranijoj životnoj dobi kao prvi znak kanalopatije CRAC, generalizirana i neprogresivna. Unatoč neprogresivnom karakteru, izražena slabost dišne muskulature već od prvih dana života može dovesti do zatajenje disanja, posebno uz pridruženu upalu pluća, a kasnije do kronične plućne bolesti. U prvoj godini života bolest se očituje sindromom hipotoničnog dojenčeta. Praćenjem svega nekoliko bolesnika koji su zbog kliničke slike imunodeficijencije uspješno transplantirani i u kojih

Tablica 1 U kojoj se dobi očekuju pojedini problemi, simptomi, znakovi?

	Imunološki	Neimunološki
U prvim danima	Sus Perinatalna infekcija	Hipotonijska/miopatija Moguće zatajenje disanja
U prvim tjednima	Sve očitijske sklonost infekcijama (klinička sumnja na SCID) Bronhitis (RSV) Pneumonija/pneumonitis (CMV, Kandida, Aspergillus, bakterije širokog spektra) Gastroenteritis (ECFA)	Mickijaza Slaba reakcija zjenica Parcijalna hipoplazija šarenice Nenasjedovanje na tjelesnoj težini Anhidroza
U prvim mjesecima	Linfadenopatija Hepatomegalija Splensomegalija Autoimuna hemolitička anemija Autoimuna trombocitopenija Autoimuna neutropenija Antifosfolipidni sindrom Hiperagmaglobulinemija BCGitis (ako je dijete BCGirano) Atenuirana pasivna kutana anafilaksija (ničim izazvane krize tahikardije i crvenila lica)	Poremećaj termoregulacije s krizom hiperspireksije nevezano uz infekciju Rijetka i krhka koža Sukla koža Otežano izazivanje i postupni gubitak dubokih tetivnih refleksa
Krajem prve i početkom druge godine života	Više ili manje komplikacija ovisno o tome je li i u kojoj dobi postavljena dijagnoza te ovisno o uspješnosti liječenja	Poremećaj dentacije sa žutim zubima (amelogenesis imperfecta tipa III) Po život opasna krvarenja u određenim stanjima
Smrtni ishod je moguć u bilo kojoj dobi djeteta zbog slabosti dišne muskulature, brojnih infekcija i komplikacija sa ili bez transplantacije koštane srži		

je naknadno utvrđena točna dijagnoza kanalopatije CRAC, spoznalo se da unatoč hipotoniji i usporenom motoričkom razvoju, djeca ipak prohodaju unatoč tomu što mišićni tonus, snaga i izdržljivost ostaju trajno nedostadni za dob uz pozitivan Gowersov znak. Neuobičajno, parcijalna hipoplazija šarenice je dio miopatije budući nastaje zbog hipoplazije šareničnog mišića. Rezultat potonjeg je midrijaza i slabo reaktivne zjenice.

Kalcij namaknut kanalom CRAC je važan za razvoj i funkciju mišićnih stanica jer je neophodan za izražavanje transkripcijskih činitelja MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) i MyoG (*MyoGenin*) važnih za diferencijaciju mioblasta. Zbog toga poremećena funkcija kanala CRAC remeti diferencijaciju mišićnih stanica tijekom miogeneze i regeneracije mišića. Uz to, poremećen je rad mitohondrija i proizvodnja energije (Slika 2). Budući nedostatak kalcija dovodi do manjka mišićnih stanica i energije što se očituje mišićnom slabošću, s pravom kanalopatiju CRAC nazivamo metaboličkom miopatijom. Povrh toga, ispitivanja na pokusnim životinjama su pokazala da miševi u kojih kanal CRAC nije izražen, umiru perinatalno zbog poremećaja razvoja skeletnih mišića i zatajenja disanja.

Kreatin kinaza je uredna.

EMNG može biti normalan, nespecifičan ili miopatskim potencijalom ukazivati na miopatiju.

Patohistološka analiza svijetlosnim mikroskopom mišića pokazuje nespecifične varijacije u veličini mišićnih vlakana s dominacijom vlakana tipa I i atrofiju vlakana tipa II. Elektronskim mikroskopom mogu se vidjeti mitohondriji koji su nabubreni i nemaju normalan oblik.

Analiza enzima respiratornog lanca potvrđuje mitohondriopatiju zbog nedostatne aktivnosti kompleksa I i IV.

O imunodeficijenciji CRAC

Imunodeficijencija CRAC se ubraja u primarne imunodeficijencije, među njih zasad 19 dobro definiranih teških kombiniranih imunodeficijencija (SCID, *Severe Combined ImmunoDeficiency*). Donedavno se vjerovalo da je razvoj i ukupni broj imunokompetentnih stanica normalan ili neznatno odstupa ($T^+/B^+/NK^+$ SCID) za razliku od njihove poremećene funkcije pa se zbog toga imunodeficijenciju CRAC smatralo funkcionalnim SCID-om. U međuvremenu se otkrio manjak regulatornih limfocita $T-CD4_{Foxp3}$ za čiju je diferencijaciju kanal CRAC očito važan. Želimo li imunodeficijenciju CRAC označiti uobičajnom nomenklaturom predvođeni novim spoznajama to bi izgledalo ovako: $T-CD4^+(CD4_{Foxp3-})/T-CD8^+/B^+/NK^+$ SCID.

Kalcij namaknut kanalom CRAC je važan drugi glasnik imunokompetentnih stanica jer je neophodan za aktivaciju barem jednog transkripcijskog činitelja limfocita T, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) koji pokreće genski program u procesu formiranja specifičnog imunološkog odgovora na razne antigene. Manjak pohranjenog unutarstaničnog kalcija dovodi do manjka regulatornih limfocita $T-CD4_{Foxp3}$, poremećene aktivacije i funkcije ostalih imunokompetentnih stanica (T-CD4, T-CD8, B i NK) i odsustva specifičnog imunološkog odgovora. Uslijed izostanka odgovarajućeg genskog odgovora, naivni i antigen specifični limfociti T i B ne rade kako treba- ne aktiviraju se, ne proliferiraju i ne luče imunoregulatorne citokine, ponajprije interferon gama. Manjak regulatornih limfocita $T-CD4_{Foxp3}$ dovodi do potpuno neučinkovitog i nekoordiniranog imunološkog odgovora, gubitka imunološke tolerancije i autoimunosti.

Klinički, teška kombinirana imunodeficijencija se očituje već u prvim tjednima života prečestim, preteškim i predugim, a ponekad i po život opasnim infekcijama uzrokovanih brojnim virusima, bakterijama i gljivama. Upala dišnih puteva, bronhiolitis, pneumonija, pneumonitis, gastroenteritis, BCGitis, soor i druge kožne kandidijaze su najčešći pojavni oblici i znakovi nedostatne imunosti.

Rutinske imunološke pretrage su isprva uredne, uključujući apsolutni broj granulocita i limfocita, koncentracije imunoglobulina M, G, A i E, apsolutne brojeve i omjere limfocita T-CD4, T-CD8, limfocita B i stanica NK i testove blastične transformacije na mitogene. Tijekom bolesti rezultati tih pretraga se mijenjaju i ovise o vremenu uzorkovanja. Pokazatelji upale često su povišeni iako ne uvijek i u punom obimu, moguće zbog ograničene sposobnosti sinteze C reaktivnog proteina. Može se naći snižen odgovor limfocita T na antigene varicela virusa i toksoida tetanusa, fitohemaglutinin, ionomicin i anti-CD₃ antitijelo. Pojava hemolitičke anemije, trombocitopenije, neutropenije i/ili antifosfolipidnog sindroma nagovještava razvoj autoimunosti što se u laboratorijskim nalazima očituje hipergamaglobulinemijom s koncentracijom IgG i do 20-30 g/L. Najčešće nalazimo anti-eritrocitna, trombocitna, neutrofilna, kardiolipinska, a lako moguće i druga autoantitijela. Razvoj atenuirane pasivne kutane anafilaksije odnosno naizgled ničim izazvane krize lupanja srca i crvenila lica znak je da u krvi potražimo visoke koncentracije IgE, i više od 10 000 U/L.

Mikrobiološki, u primarno sterilnim i drugim uzorcima najčešće se nađu RSV, virus influence, parainfluenca, CMV, Kandida, Aspergillus, Pneumocistis, Rota i Adeno virus, razne bakterije i drugo.

Specijalne imunološke pretrage koje mogu potkrijepiti sumnju na kanalopatiju CRAC se ne rade u našoj rutinskoj laboratorijskoj praksi. Manjak regulatornih limfocita T-CD4_{Foxp3} i nedostatno lučenje citokina, uključujući interferona gama, znakovi su poremećene funkcije kanala CRAC.

Dijagnoza se postavlja na temelju patognomoničnog elektrofiziološkog nalaza nedovoljnog ili potpunog odsutnog utok kalcija u limfocite, a potvrđuje analizom gena ORAI1 ili STIM1.

O ektodermalnoj displaziji CRAC

O ovoj formi kanalopatije CRAC se zasada najmanje zna.

Klinički, poremećaj termoregulacije s krizama hiperpireksije nevezano uz infekciju javlja se u prvim mjesecima života. Dijete ima suhu kožu, ne znoji se kako treba i ovisi o ambijentalnoj temperaturi. Potonji problemi se pripisuju poremećenom radu žlijezda znojnice zbog nedostane funkcije kanala CRAC bez jasno utvrđenog mehanizma. Kosa je rijetka i krhka. U vrijeme kada niču mliječni zubi može se primijetiti da ne izgledaju kako treba i da su žute boje. Zasada se zna da poremećena funkcija kanala CRAC ameloblasta dovodi do nedostatnog utoka kalcija i stvaranja kalcij-hidroksiapatita te hipokalcifikacije cakline (amelogenesis imperfecta tipa III).

Tablica 2 Budući rano prepoznavanje teške kombinirane imunodeficiencije i njeno promptno zbrinjavanje određuje životnu prognozu bolesnika, evo kako u svakodnevnoj praksi postupati s djetetom u kojeg se sumnja na imunodeficienciju:

I. U kojim bi okolnostima pedijatar trebao posumnjati na imunodeficienciju?

Anamnestički i klinički:

1. ako soor u dojenčeta traje duže od uobičajenog
2. u dojenčeta s tvrdokornim proljevom
3. u dojenčeta koje ne napreduje kako bi trebalo
4. ako dojenče boluje od prečestih, preteških i predugih infekcija, posebno ako su one uzrokovane uobičajnim i oportunim uzročnicima (uključujući RSV, ROTA, CMV)
5. ako dojenče oboljeva od atipičnih infekcija (Pneumocistis)

Laboratorijski:

1. ako je apsolutni broj limfocita u dojenčeta u perifernoj krvi manji od $2.8 \times 10^9/L$

II. Što bi od laboratorijskih pretraga bilo opravdano učiniti u bolničkim uvjetima?

1. imunofenotipizaciju limfocita - apsolutne i relativne brojeve i omjere T, B i NK stanica
2. subpopulacije limfocita T - apsolutne i relativne brojeve i omjere $CD4^+$ i $CD8^+$ stanica
3. imunoglobuline - IgG, IgM, IgA, ponekad i IgE

III. Na koji način zbrinuti dijete s vjerojatnom teškom kombiniranom imunodeficiencijom?

1. **Izolacija** - izolirana prostorija s lamelarnim protokom zraka uz stroge mjere antiseptike
2. **Odlučno liječiti postojeće infekcije** - svakodnevno tražiti i najmanji znak infekcije
 - liječiti već i sumnju na infekciju, a po kliničkom tijeku i rezultatima laboratorijskih nalaza odlučiti o terapiji antimikrobnim lijekovima
 - dojenčad koja je primila BCG cjepivo potrebno je liječiti izoniazidom i rifampicinom
3. **Odlučno spriječiti nove infekcije** - profilaksa kotrimoksazolom, flukonazolom i nadomjesnim imunoglobulinima u dozi od 1g/kg iv. (čak i ako su nalazi Ig uredni)
 - odgoditi primjenu živih cjepiva
 - osigurati ozračene i CMV negativne krvne derivate
4. **Ostale mjere** - pažljiva njega djeteta s ciljem sprječavanja ozljede kože, napose perigenitalne regije koja može biti ojedena i mjesto ulaza infektivnog uzročnika
 - sterilna, bezglutenska prehrana, najbolje hidrolizat, ako treba NGS, ako ne tolerira peroralni unos, treba se brzo odlučiti za djelomičnu ili totalnu parenteralnu prehranu
 - određivati parametre upale i pri najmanjoj sumnji na moguću infekciju
 - pluća se slikovno prikazuju MSCT-om češće nego RTG-om
 - jednom tjedno, a po potrebi i češće uzimati nadzorne kulture (obrisak nosa, ždrijela, nazofarinksa, urinokultura, hemokultura i koprokultura)
 - jednom tjedno PCR na CMV, RSV, parainfluenzu i influenzu, EBV, Adeno, po procijeni i HSV
 - započeti HLA tipizaciju djeteta i članova uže obitelji
 - kontaktirati odgovarajući specijalizirani centar
 - roditeljima pružiti potrebnu potporu

IV. Nakon potvrde dijagnoze slijedi definitivno liječenje u specijaliziranom centru

1. transplantacija koštane srži
2. transplantacija krvotvornih matičnih stanica
3. nadomjesno enzimsko liječenje
4. genska terapija
5. ostali pristupi

Ostala i naizgled nezahvaćena tkiva

Kanal CRAC obavlja svoju zadaću osiguranja dovoljnih količina pohranjenog kalcija u brojnim drugim stanicama koje naizgled nisu zahvaćene bolešću uključujući trombocite, stanice jetre, srca, gušterače, glatkih mišića, endotela, nadbubrežne i štitne žlijezde, mikroglije i drugih. Pretpostavlja se da u tim tkivima postoje zamjenski proteini (izoforme ORAI2/STIM2) ili prijenosni sustavi kalcija koji nadomještaju poremećenu funkciju kanala CRAC, barem u bazalnim uvjetima. Poremećena funkcija nekih stanica dolazi do izražaja tek u određenim okolnostima. Primjerice, funkciju kanala CRAC za namicanje kalcija pri aktivaciji trombocita i hemostazi uz normalan broj trombocita mogu nadomjestiti drugi sustavi/proteinske izoforme, no u uvjetima trombocitopenije, takvo nadomještanje više nije dovoljno učinkovito što se očituje po život opasnim krvarenjima zbog nemogućnosti agregacije trombocita i stvaranja trombocitnog čepa.

Prenatalna dijagnoza je moguća u obitelji s poznatom genskom osnovom.

Diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir sva stanja koja se očituju sindromom hipotoničnog dojenčeta, sklonošću infekcijama, autoimunošću i ektodermalnom displazijom.

Terapija teške kombinirane imunodeficiencije provodi se u skladu sa smjernicama *UK Primary Immunodeficiency Network Standards of Care*. Dođe li se do dijagnoze dovoljno rano, terapija izbora je transplantacija koštane srži ili krvotvornih matičnih stanica ukoliko postoji HLA-podudaran davatelj. Transplantacija je složen i moguće opasan postupak. Ako uspije može značiti izliječenje samo imunološke forme kanalopatije CRAC, no ne uspijeva u svih bolesnika. Najveći uspjeh postiže se ukoliko je postupak proveden u prvim mjesecima života. Nakon te dobi uspjeh je sve manji, a nepopravljive komplikacije sve češće. Najbolje je dijete uputiti u visoko specijalizirani centar. Ostale forme kanalopatije CRAC, miopatija i ektodermalna displazija ovaj tren nisu dostupne etiološkom, već samo simptomatskom liječenju. Genska terapija zasad nije moguća.

Prognoza ovisi o brzini postavljanja dijagnoze, početku i uspješnosti liječenja. Neliječena bolest može završiti smrtnim ishodom u prvoj ili drugoj godini života. Posttransplantacijski, prognoza ovisi o oporavku i funkciji imunološkog sustava. Neimunološki problemi ostaju doživotno.

Naš doprinos razumijevanju patogeneze kanalopatije CRAC utemeljen je na kliničkom iskustvu i dodatnim istraživanjima u naših dvoje bolesnika u kojih smo otkrili dosada neopisanu točkastu mutaciju gena ORAI1 (c.G292C/p.G98R) koja rezultira odsutnom ekspresijom proteina ORAI na staničnoj membrani. Po prvi puta smo našli drastično snižen broj regulatornih limfocita T-CD4_{Foxp3} što se dosada opisivalo samo uz mutacije gena STIM1, ali ne i gena ORAI1. Uz to, pokazali smo da je u tih bolesnika poremećena proizvodnja energije u mitohondrijima zbog nedostatne aktivnosti kompleksa I i IV respiratornog lanca što dosada nije opisano u ljudi.

Zaključno, unikatna udruženost prirodene mišićne slabosti, nedostatne imunosti i ektodermalne displazije s anhidrozom glavni je smjerokaz k dijagnozi koju bi trebalo što je prije moguće dokučiti ne bi li liječenje bilo što uspješnije, a količina nepopravljivih komplikacija što je moguće manja. Općenito valja imati na umu da normalan ili povišeni broj limfocita, normalna ili povišena kon-

centracija imunoglobulina ne isključuju imunodeficijenciju. Na temelju vlastitog kliničkog utiska važno je misliti i na poremetnje funkcije određenih organskih sustava usprkos urednim rutinskim laboratorijskim pretragama i pokušati rasvijetliti bolesno stanje znanstveno-istraživačkim pristupom.

Literatura

1. Feske S. CRAC channelopathies. *Eur J Physiol.* 2010;460:417-435.
2. Stiber J at all. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nature Cell Biology.* 2008;10:688-697.
3. Feske S at all. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 2006;44:179-185.
4. Christie-Ann McCarl BS at al. *ORAI1* deficiency and lack of store-operated calcium entry cause immunodeficiency, myopathy and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:1311-8.
5. Picard C at all. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *NEJM.* 2009;360:1971-1980.
6. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7:690-702.
7. UK Primary Immunodeficiency Network Standards of Care <http://www.ukpin.org.uk/home/standards.htm>

Adresa za dopisivanje:

Mario Ćuk, dr.med., specijalist pedijatar Zavoda za bolesti metabolizma, Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra, Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb. Tel: 01/23 88 570, faks: 01/23 76 0234, e-mail: mcuk@kbc-zagreb.hr

Novorođenački skrining na vratima ere tandemске spektrometrije masa

Ivo Barić¹, Ksenija Fumić², Karin Juras¹, Vladimir Sarnavka¹

¹Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta u Zagrebu,

²Metabolički laboratorij Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu i Medicinskog fakulteta u Zagrebu,

Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb

Sažetak

Razvoj novorođenačkog skrininga (probira) u svijetu na nasljedne metaboličke bolesti posljednjih godina ubrzano napreduje. Tome je pridonijela nova laboratorijska tehnika tandemске spektrometrije masa kojom se u kapi krvi mogu identificirati metaboliti specifični za 80-ak bolesti. Uvođenjem te tehnologije se u mnogim razvijenim zemljama značajno povećao broj bolesti uključenih u programe proširenog novorođenačkog skrininga. Primarni cilj skrininga je rano prepoznavanje i liječenje bolesti da bi se smanjila smrtnost i obolijevanje djece. U Republici Hrvatskoj se provodi novorođenački skrining na fenilketonuriju i konatalnu hipotireozu, a tehnologija tandemске spektrometrije masa nije još uvedena. U radu se opisuju dosadašnji rezultati, koristi i negativne strane proširenog novorođenačkog skrininga u svijetu, dosadašnja dostignuća u našoj zemlji, planovi o uvođenju proširenog programa novorođenačkog skrininga u našoj zemlji te različiti problemi i promjene koje nas čekaju i s kojima ćemo se morati suočiti želimo li proširiti novorođenački skrining uvođenjem tehnike tandemске spektrometrije masa.

Definicija i razvoj novorođenačkog skrininga

Novorođenački skrining (probir) je sustav organiziranog traganja za određenim prirodnim bolestima u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji određene regije. Međunarodno je prepoznat kao vitalni dio zdravstvene zaštite kojim se rano otkrivaju bolesti već u pretkliničkoj fazi razvoja ili vrlo ranoj fazi razvoja, što donosi neposredne i posredne koristi pojedincu i zajednici u cjelini. Pojava novorođenačkog skrininga 1962. godine, kada je dr. Robert Guthrie uveo jednostavan test inhibicije bakterijskog rasta za otkrivanje fenilketonurije (1), predstavljala je pravu revoluciju u preventivnoj medicini. Sljedećih godina Guthrie je modificirao test za mnoge druge bolesti te je 20-ak godina kasnije u njegovom laboratoriju bilo moguće otkriti 20-ak bolesti (2). Međutim, vrlo malo njih je tada uključeno u program novorođenačkog skrininga. Da bi se neka bolest mogla uvrstiti u program novorođenačkog probira, a da za to postoji i javnozdravstveno opravdanje, Wilson i Jungner su 1968. godine postavili nekoliko uvjeta (3) koji su poslije široko prihvaćeni. Bolest je morala biti javnozdravstveno značajna, trebala se očitovati prepoznatljivom latentnom fazom i biti poznatog prirodnog tijeka. Test je morao biti jednostavan, pouzdan i neinvazivan. Program skrininga se trebao kontinuirano provoditi, bila je potrebna mogućnost uspješnog liječenja bolesti, te su dijagnoza i liječenje bolesti trebali biti svima jednako dostupni. Isto tako su trebali postojati utvrđeni kriteriji koga liječiti te su troškovi skrininga trebali biti prihvatljivi i uravnoteženi s ostalim zdravstvenim i drugim troškovima zajednice. Obuhvaća procjenu o bolestima koje se uključuju

u program skrininga, organizaciju i provođenje prikupljanja uzoraka krvi novorođenčadi, laboratorijske testove kojima se mjere metaboliti specifični za određene bolesti, interpretaciju nalaza, prikladno obavješćavanje obitelji i zdravstvenih službi o rezultatima testa, daljnji dijagnostički i po potrebi terapijski postupak s novorođenčetom u kojeg rezultat testa nije u okviru normalnog raspona, praćenje bolesnika te trajnu evaluaciju programa skrininga (4, 5, 6, 7). Da bi provođenje skrininga doseglo visoku razinu potrebno ga je jednako dobro i kvalitetno provoditi u svim navedenim dijelovima. Ranih 70-tih godina su uključene u program novorođenačkog skrininga galaktozemija, leucinoza, homocistinurija, hemoglobinopatije i cistična fibroza, 1978. godine konatalna hipotireoza, 1987. godine manjak biotinidaze, a 1995. godine kongenitalna adrenalna hiperplazija. Te su bolesti u razvijenim zemljama Europe donedavno bile i najčešći ciljevi novorođenačkog skrininga uz nešto manju učestalost leucinoze i homocistinurije (8). Tada je vrijedilo pravilo da se jednim testom otkriva samo jedna bolest (9). Velike promjene su se dogodile 1990. godine kada je po prvi puta opisana nova laboratorijska tehnika tandemске spektrometrije masa kojom se u kapi krvi unutar dvije minute mogu identificirati metaboliti specifični za 80-ak bolesti (10, 11). Nekoliko godina nakon prve publikacije metoda je prihvaćena širom svijeta te se u većini razvijenih zemalja ubrzo povećao broj bolesti uključenih u program, sadašnjeg tzv. proširenog novorođenačkog skrining (uključivanjem organskih acidurija, aminoacidopatija, poremećaja karnitinskog ciklusa i poremećaja beta oksidacije) (11, 12, 13). Za očekivati je da će se broj bolesti uključenih u program novorođenačkog skrininga i dalje povećavati i već sada je vidljivo da spomenuti klasični kriteriji za uključivanje bolesti u program proširenog skrininga postaju sve manje čvrsti. Lako je moguće da će u budućnosti metode molekularne genetike, takozvani genski čipovi, kojima se traže već poznate ili nove mutacije gena, zamijeniti današnje metode skrininga. Skrining genskim čipovima će omogućiti da se iz jednoga testa analizira odjednom više mutacija različitih gena (14). Danas se na taj način već u nekim zemljama radi skrining na hemoglobinopatije (15, 16).

Dosadašnji rezultati programa novorođenačkog skrininga u Republici Hrvatskoj

U našoj se zemlji novorođenački skrining na prirodene metaboličke bolesti provodi u okviru aktivnosti Referentnog centra za genetiku i metaboličke bolesti djece Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske koji je dio Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Od 1978. godine provodi se novorođenački skrining na fenilketonuriju, a od 1985. godine na konatalnu hipotireozu (17). Fenilketonurija se od početka otkriva Guthrievim testom. Hipotireoza se isprva otkrivala radioimunoesejom, a od 1990. godine imunoflorescentnom metodom kojom se mjeri tireotropin (Delfia). Već niz godina blizu 100% novorođenčadi je obuhvaćeno programom novorođenačkog skrininga što se može usporediti s postotkom u najrazvijenijim zemljama (15). Od početka programa novorođenačkog skrininga, pa do kraja 2009. godine je ukupno otkriveno i uspješno liječeno 164-ero djece s fenilketonurijom i 206-ero djece s konatalnom hipotireozom. Dakle, ovom je preventivnom aktivnošću u tom razdoblju u našoj zemlji spriječena pojava umne zaostalosti i tjelesne invalidnosti u 370-ero djece.

Rezultati, koristi i negativne strane proširenja novorođenačkog skrininga pomoću tandemске spektrometrije masa u svijetu

U razvijenim državama svijeta, kao što su Sjedinjene Američke Države, Australija i Njemačka, provođenje programa proširenog novorođenačkog skrininga tandemskom spektrometrijom masa

je započelo krajem 1990-tih godina (16, 18, 19). U Europi je prva pilot program uvela 1998. godine Njemačka, a ostale razvijene zemlje Europe počele su se uključivati nakon 2004. godine (18). Premda je nova tehnologija omogućila da se jednim testom identificira odjednom oko 80-ak metaboličkih bolesti, broj bolesti uključenih u program skrininga tandemsom spektrometrijom masa u pojedinim zemljama jako varira, od dvije do više od 50 bolesti. U nekim državama su ograničavajući čimbenici broj educiranog osoblja, oprema i materijalne mogućnosti provođenja proširenog programa skrininga (16, 18, 20). U onim državama u kojima se skrining provodi tandemsom spektrometrijom masa važan razlog za razlike u broju uključenih bolesti su kriteriji za uključivanje pojedinih bolesti u program skrininga. U provođenju skrininga često postoji značajna razlika u biljezima kojima se identificira postoji li bolest i njihovim graničnim vrijednostima kao i u vremenu uzimanja uzoraka (18, 21).

Pomoću tehnologije tandemske spektrometrije masa trenutačno se analiziraju profili acilkarnitina i aminokiseline premda se mogu analizirati i razne druge molekule (npr. koncentracije hormona). Nova tehnologija posjeduje toliko visoku osjetljivost i preciznost da ima mogućnost identificirati acilkarnitine u nanomolima zahtjevajući za to samo 3 μ l krvi uzorka (12, 19, 22). Aminokiseline koje se mogu identificirati pomoću tandemske spektrometrije masa su fenilalanin, tirozin, arginin, ornitin, citrulin, leucin, valin, alanin i glicin (23, 24). Rezultati skrininga tandemsom spektrometrijom masa su pokazali da je za većinu bolesti uključenih u program skrininga incidencija veća nego što se prije procjenivalo, a isto tako su otkrivene raznolike mutacije bolesti i raznoliki biokemijski spektri pojedinih bolesti. Posebno se to odnosi na manjak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca (MCADD), koji je uz fenilketonuriju najčešća bolest uključena u program proširenog skrininga u svijetu tandemsom spektrometrijom masa (18, 19, 25).

Razmatrajući bolesti koje su uključene u program proširenog skrininga, posebno u Sjedinjenim Američkim Državama u kojoj se program skrininga provodi čak na 54 bolesti (16), izdvajaju se sljedeće koristi koje donosi prošireni skrining pomoću tandemske spektrometrije masa (26).

1. Svakako najveća korist je da omogućuje otkrivanje bolesne djece koja boluju od velikog broja bolesti koje se prije nisu otkrivale pomoću skrininga. Time se smanjuje smrtnost, obolijevanje i troškovi liječenja teško oštećene djece, a za djecu u koje se dijagnoza ipak postavi prekasno pozitivan rezultat skrininga pruža korisnu genetsku informaciju obitelji odnosno mogućnost prenatalne dijagnostike u budućeg potomstva (19).

2. U zdrave novorođenčadi omogućuje isključenje postojanja bolesti.

3. Omogućuje otkrivanje nekih bolesnih majki koje mogu biti bez simptoma ili s malo simptoma unatoč niskoj ostatnoj aktivnosti enzima (majke s manjkom karnitinskog nosača, majke s manjkom sintetaze holokarboksilaze), nekih majki s manjkom vitamina B₁₂ ili majki koje mogu biti ugrožene u trudnoći zbog bolesnog ploda kojeg nose (razvoj sindroma HELLP u majke tijekom trudnoće u kojoj plod ima manjak 3-OH-acil-koenzim A dehidrogenaze dugih lanaca) (28, 30).

4. Omogućuje raniji početak liječenja određenih bolesti (naprimjer hiperfenilalaninemija se dosad počinjala liječiti u dobi od 3-4 tjedna, a uvođenjem tandemske spektrometrije masa bilo bi moguće 10-ak dana ranije što nije zanemarivo razdoblje u najranijivijoj fazi razvoja dječjeg mozga).

5. Omogućuje manji broj pretraga kasnije u životu (u bolesnika u kojih se kasnije u životu pojave određene tegobe, dio uzroka otpada iz diferencijalne dijagnoze time što je tim osobama u novorođenačkoj dobi učinjen skrining).

6. Omogućuje otkrivanje bolesne starije braće ili sestara ili retrogradno postavljanje dijagnoze u umrlih.

7. Omogućuje uporabu stroja i za selektivni skrining (stroj ima mogućnost da se na njemu rade pretrage koje se do sada nisu mogle raditi; time se poboljšava mogućnost postavljanja dijagnoze brojnih drugih bolesti).

8. Omogućuje praćenje liječenja djece koja su otkrivena skriningom (smanjuje učestalost vađenja krvi iz vene i omogućuje slanje uzoraka poštom do laboratorija za skrining- naprimjer mjerenje fenilalanina u fenilketonuriji).

9. Stroj je temelj za buduća proširenja skrininga (naprimjer lizosomskih bolesti).

Gledajući s etičkih aspekata brojna se pitanja postavljaju pred ispitanike i njihove obitelji, cjelokupni sustav zdravstvene skrbi i društvenu zajednicu općenito. Premda jasno prevladavaju pozitivne strane proširenog skrininga i njegova korist gledajući s raznih aspekata koji su gore spomenuti, nažalost prošireni novorođenački skrining nosi sa sobom i neke negativne posljedice: (26, 27, 29, 31)

1. Izvrgava često obitelj većem psihičkom stresu nego dosadašnji skrining (zbog naravi bolesti, odnosno njezinih akutnih i po život opasnih manifestacija).

2. Otkrivaju se bolesti koja možda nikad ne bi izazvale probleme (naprimjer MCADD, manjak karnitinskog nosača).

3. Otkrivaju se bolesti koje mogu bez obzira na liječenje loše završiti.

4. Otkrivaju se bolesti koje mogu završiti smrtno ili s ireverzibilnim posljedicama prije nego stigne rezultat skrininga.

5. Veći je broj lažno pozitivnih rezultata skrininga.

6. Posljedice lažno negativnih rezultata skrininga za dodatni broj bolesti.

7. Često teža interpretacija rezultata i složeniji i dulji put do konačne potvrde ili isključenja dijagnoze.

8. Veće opterećenje i stres za zdravstveno osoblje.

9. Viša cijena u odnosu na dosadašnji skrining.

Što moramo usavršiti i promijeniti da bismo novorođenački skrining u Hrvatskoj proširili metodom tandemске spektrometrije masa

U Zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju i Republičkom laboratoriju za skrining KBC-a Zagreb postoje planovi o, nadamo se, skorom uvođenju proširenog novorođenačkog programa u Republici Hrvatskoj. Razmatrajući brojne koristi proširenog skrininga tandemskom spektrometrijom masa u svijetu koje značajno prevladavaju nad negativnima, čini nam se neko- rektno zanemariti novu tehnologiju i brojne njezine mogućnosti ako uz nešto veći trud i ulaganja možemo spasiti veliki broj djece od smrti ili teških nepopravljivih posljedica po zdravlje. Broj- ni uvjeti za proširenje skrininga u našoj zemlji postoje: više od 30 godina iskustva provođenja novorođenačkog skrininga u Republici Hrvatskoj, volja i specifično znanje iz područja nasljednih metaboličkih bolesti skupine ljudi koja radi u Zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedi- jatriju i u Laboratoriju za dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu, razvijene metode za dio testova potvrde, novi prostor za Laboratorij za novorođenački skrining koji se gradi u okviru preuređenja Kliničkog bolničkog centra Zagreb te skorašnja donac- ija uređaja za tandemsku spektrometriju masa. Budući da je incidencija bolesti na kojima kanimo započeti novorođenački skrining u našoj populaciji nepoznata, možemo samo pretpostaviti da će biti slična onoj u zapadnoj Europi i to uzeti kao jedan od kriterija za odabir bolesti koje ćemo u početku uključiti u prošireni program skrininga. Ta odabir uključivao bi: nedostatak acil-CoA-de- hydrogenaze srednjih lanaca (MCADD), nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (LCHADD) uključujući nedostatak trifunkcionalnog proteina (TFPD), nedostatak acil-CoA-de- hydrogenaze vrlo dugih lanaca (VLCADD), nedostatak karnitinskog nosača (CUD), metilmalon- sku acidemiju (MMA), propionsku acidemiju (PA), izovaleričku acidemiju (IVA), glutarnu aci- duriju tipa I (GA-I), bolest javorovog sirupa (leucinozu- MSUD), tirozinemiju tipa I (TIR I), te homocistinuriju (HCY) i ostale izolirane hipermetioninemije (MET).

Premda su brojni uvjeti za provođenje proširenog novorođenačkog skrininga ispunjeni ili će se ubrzo stvoriti, postoje još neke značajne promjene koje ćemo u program skrininga morati uvesti (19, 28, 29, 31, 32):

1. **Vrijeme uzimanja uzorka i vrijeme pristizanja uzorka do laboratorija za skrining.** Do sada su se uzorci uzimali nakon trećeg dana života neposredno prije otpusta djeteta iz rodilišta, a ponekad i nakon otpusta što nije bio veći problem jer su fenilketonurija i konatalna hipotireoza bolesti kroničnog tijeka, pa razlika od nekoliko dana nije bila posebno bitna. S proširenjem skrin- inga vrijeme uzimanja uzorka je dob djeteta točno između 36 do 48 i 72 sata budući da se radi o bolestima koje mogu imati akutan i po život opasan tijek. Što se tiče vremena pristizanja uzorka do laboratorija ono ne bi smjelo biti duže od 48 sati zbog iste činjenice. Do sada su mnoga rodilišta slala uzorke svakih nekoliko dana, a i rjeđe.

2. **Kartice (filtrar papirići)/računala.** Mijenjaju se kartice na kojima se šalju uzorci jer će se un- ositi više podataka nego do sada (naprimjer gestacijska dob djeteta, tjelesna masa, prehrana, lijek- ovi...) jer o nekima ovisi normalni raspon rezultata pretraga. Također će svaka kartica imati svoju omotnicu. U nekim zemljama postoje računalni programi, odnosno računala u svim rodilištima, u koje se unose podaci i šalju u središnji laboratorij koji je povezan preko računala sa svima njima, što omogućuje lakšu obradu rezultata i bolju komunikaciju unutar sustava skrininga.

3. **Ponovljeno testiranje.** Novorođenčad niske porođajne mase, nedonoščad, novorođenčad na

parenteralnoj prehrani (bez mlijeka), novorođenčad koja prima antibiotike, prerano otpuštenu novorođenčad će biti potrebno ponovno testirati nakon 14-ak dana zbog mogućih neinformativnih rezultata pretraga.

4. Informacije o skriningu. Iako je skrining od 1986. godine uvršten u obvezatne mjere zdravstvene zaštite novorođenčadi u Republici Hrvatskoj i za njega nije nužan pristanak roditelja, s obzirom na njegovu novu dimenziju (otkrivanje bolesti koje mogu akutno ugroziti život djeteta, mogućnost kasne dijagnoze i mogućnosti otkrivanja djeteta koje nikada neće biti ugroženo tijekom svoga života), u skladu s inozemnom praksom, i u našim će rodilištima postojati brošure u kojima će na jednostavan i razumljiv način pisati sve o skriningu, njegovim dobrobitima i rizicima ukoliko se ne učini. Iste informacije bit će dostupne i putem interneta. To će proširiti mogućnosti roditeljima da izraze svoju suglasnost ili nesuglasnost o provođenju skrininga.

5. Odluka o spektru metabolita koji će se analizirati. Do sada se jednim testom otkrivala jedna bolest. Budući da nova tehnologija ima mogućnosti otkriti 80-ak bolesti unutar dvije minute pitanje je hoćemo li analizirati sve metabolite ili samo one koji su specifični za bolesti koje ćemo uključiti u program skrininga. U svijetu različite države različito postupaju.

6. Granične vrijednosti. Iskustvo je pokazalo da jednostavno preuzimanje normalnih raspona i graničnih vrijednosti pozitivnih rezultata nije dovoljno dobro, već da samo u početku može poslužiti kao orijentacija, a da je optimalno da svaki laboratorij oblikuje svoje normalne raspone i granične vrijednosti. Tako će i nama trebati vremena da uspostavimo svoje granične vrijednosti, odnosno da test postane što osjetljiviji i specifičniji.

7. Postupak nakon pozitivnog rezultata skrininga. Do sada nije bilo veće dvojbe nakon pozitivnih rezultata skrininga jer su se fenilketonurija i konatalna hipotireoza mogle lako potvrditi ili isključiti dodatnim pretragama unutar tjedan do dva. Pri tom nije bilo veće uznemirenosti roditelja niti zdravstvenog osoblja jer se radi o bolestima u kojima nema akutnih zbivanja. Obitelj je bila obaviještena da se javi s djetetom u naš Zavod prvi radni dan radi dodatne obrade. Kada se proširi program skrininga stvari će se bitno promijeniti jer će biti uključene i neke bolesti koje mogu ugroziti život djeteta već u prvim danima života. Za te će bolesti zato ponekad biti neophodno što hitnije dijete hospitalizirati u najbližoj bolnici ili ga uputiti u našu Kliniku radi dodatne obrade i/ili potvrde dijagnoze i liječenja. Zato će sustav obaviještavanja biti brži, a ne kao dosad telegramima. Pri tom će se događati da će se u obitelj djeteta i/ili zdravstveno osoblje koje nije naviklo na tu vrstu bolesti unositi nemir ili nesigurnost. Važno je naglasiti da će u pojedinim slučajevima vrijeme do potvrde ili opovrgavanja dijagnoze trajati tjednima.

8. Vrijeme postavljanja dijagnoze trebat će maksimalno ubrzati jer i uz to nastojanje neke bolesti imaju tako brz tijek da bolesnik podlegne ili bude u neizlječivom stanju prije nego što stigne rezultat skrininga. Takvi su slučajevi opisani za klasične oblike leucinoze, ponekad za teške oblike propionske ili metilmalonske acidemije, ponekad i za neke poremećaje razgradnje masnih kiselina. Zato će se test raditi unutar jednog dana od prispjeća uzorka.

9. Algoritam za pojedine bolesti. Za svaku bolest mora postojati unaprijed dogovoreni postupnik što dalje nakon dobivenih rezultata skrininga. Iako slični postupnici već postoje treba ih prilagoditi našoj sredini.

10. Mogućnost liječenja. Dosad je liječenje bolesti koje su se otkrivale skriningom jamčilo uspjeh, s djelomičnim izuzetkom djece s fenilketonurijom u čijoj se obitelji nisu dosljedno pridržavali dijete, i rijetkih, vrlo teških oblika konatalne hipotireoze kod koji su već intrauterino nastale ne

sasvim popravljive posljedice. Neke od bolesti koje se otkrivaju proširenim skriningom, npr. propionska i metilmalonska acidemija, mogu ostaviti nepopravljive posljedice bez obzira na provedeno liječenje, a za mnoge bolesti još nema suglasnosti oko optimalnog liječenja. Na to će trebati pripremiti korisnike skrininga i stručnu javnost.

11. Evaluacija testa. Kao i drugdje u svijetu i u nas ćemo morati stalno vrednovati rezultate skrininga i po potrebi mijenjati bolesti na koje provodimo skrining, biokemijske biljege, granične vrijednosti biokemijskih biljega, postupke nakon prispjeća pozitivnih rezultata i druge elemente programa skrininga.

Zaključak

Zaključno se može reći da je proširenje novorođenačkog skrininga na nasljedne metaboličke bolesti uvođenjem tandemske spektrometrije masa značajno promijenilo njegovu učinkovitost i temeljne odrednice, te u mnogome promijenilo našu sliku o mnogim bolestima. Za mnoge od njih se prepoznalo da je incidencija veća, implementacijom proširenog skrininga dosadašnji klasični kriteriji za skrining postaju sve manje obavezujući, već dosadašnjim razmjerno kratkoročnim praćenjem bolesnika postalo je jasno da je prošireni skrining donio brojne dobrobiti za bolesnika, a postojeće loše strane proširenja skrininga se nikako ne mogu mjeriti s dobrobitima koje skrining nosi pojedincu, a i zajednici u cjelini. Sve nas te činjenice upozoravaju da je proširenje novorođenačkog skrininga u našoj zemlji iskorak kojeg treba učiniti, ali i da pri tome ne smijemo biti nekritični, već na stručnim osnovama i pozitivnim općeljudskim zasadama maksimalno odmjereni kako bi se moguća dobrobit skrininga uvećala, a slabe strane neutralizirale.

Literatura

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-343.
2. Guthrie R. Organisation of a regional newborn screening laboratory. In: Bickel H, Guthrie R, Hammersen G, et al. *Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism*. Berlin: Springer-Verlag 1980;259-270.
3. Wilson JMG, Jungner G. *Principles and practice of screening for disease*. Geneva: WHO; 1968. Available from: whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf.
4. Kaye CI; Committee on Genetics, Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Hope N, et al. Introduction to the Newborn Screening Fact Sheets. *Pediatrics* 2006;118:e934-63.
5. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, Eckman Jm, et al. U.S. newborn screening system guidelines: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN). *Screening* 1992;1:135-147.
6. Pass KA, Lane PA, Fernhoff PM, Hinton CF, et al. US newborn screening guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN). *J Pediatr* 2000;137:S1-S46.
7. Academy of Pediatrics. Serving the family from birth to the medical home: A report from the Newborn Screening Task Force convened in Washington DC, May 10-11, 1999. *Pediatrics* 2000;106:383-427.
8. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:430-438.
9. Paul DB. Patient advocacy in newborn screening: Continuities and discontinuities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2008;148:8-14.
10. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990;13:321-324.
11. Copeland S. A Review of Newborn Screening in the Era of Tandem Mass Spectrometry: What's New

for the Pediatric Neurologist? *Semin Pediatr Neurol* 2008;15: 110-116.

12. Marsden D, Larson C, Levy HL. Newborn screening for metabolic disorders. *J Pediatr* 2006;148:577-584.
13. Schulze A, Lindner M, Kohmuller D, Olgemoller K, Mayatepek E, Hoffman GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 2003;111:1399-1406.
14. Dhondt JL. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:418-422.
15. Sarnavka V, Baric I, Gjuric G, Blau N, Mardešić D. Trideset godina novorođenačkog skrininga u Hrvatskoj- rezultati i perspektive. *Pediatr Croat* 2008;52(Supl 1).
16. Watson MS, Lloyd-Puryear MA, Mann MY, Rinaldo P, Howell RR (American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group). Newborn Screening: Towards a uniform screening panel and system-Executive summary. *Genet Med* 2006; 8(5) Suppl: S12-S252.
17. Sarnavka V, Mardešić D, Gjuric G, et al. Screening for congenital hypothyroidism in Croatia- organization and first results. *Acta Med Jug* 1990;40:3-14.
18. Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:439-444.
19. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. *N Engl J Med* 2003;348:2304-12.
20. Levy HL. Newborn screening by tandem mass spectrometry: a new era. *Clin Chem* 1998;44:2401-2402.
21. Pollitt RJ. Introducing new screens: Why are we all doing different things? *J Inherit Metab Dis* 2007;30:423-429.
22. Chace DH, Millington DS, Tereda N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1993;39:66-71.
23. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006;373:27-31.
24. Strnadova K, Holub M, Muhl A, et al. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots used for neonatal screening by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53:717-722.
25. Rhead WJ. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:370-377.
26. Autti-Rämö I, Mäkelä M, Sintonen H, et al. Expanding screening for rare metabolic disease in the newborn: An analysis of costs, effect and ethical consequences for decision-making in Finland. *Acta Paediatr* 2005; 94: 1126-1136.
27. Wilcken B. Ethical issues in newborn screening and the impact of new technologies. *Eur J Pediatr* 2003; 162: S62-S66.
28. Wilcken B. The consequences of extended newborn screening programmes: Do we know who needs treatment? *J Inherit Metab Dis* 2008;31:173-177.
29. Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis* 2007;30:585-592.
30. Pollitt RJ. Newborn blood spot screening: New opportunities, old problems. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:395-399.
31. Lima Leão L, Burle de Aguiar M J. Newborn screening: what pediatricians should know. *J Pediatr* 2008; 84: S80-90.
32. Orzalesi M, Danhaive O. Ethical problems with neonatal screening. *Ann Ist Super Sanita* 2009;45(3):325-330.

Preuzeto iz *Pediatr Croat* 2010;54(2):19-24

Što sve poremećaji prometa metala mogu napraviti u krvnoj slici?

Ernest Bilić

Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, Rebro, Zagreb

Koštana srž je mjesto stvaranja svih krvnih stanica i tijekom jednog sata stvori oko 10^{10} eritrocita i 10^8 granulocita. U slučaju potrebe (npr. krvarenje ili infekcija) broj krvotvornih stanica koji se stvara višestruko se povećava. Krvotvorno tkivo u koštanoj srži osim krvnih stanica čine potporne strukture i tkiva (npr. stroma) koji su neophodni za stvaranje krvnih stanica. Krvotvorni čimbenici rasta su polipeptidi koji reguliraju proliferaciju i diferencijaciju nezerlih krvotvornih stanica, te usmjeravaju njihovo sazrijevanje i kasniju funkciju. Sve čimbenike rasta, osim eritropoetina i dijelom trombopoetina, sintetiziraju stanice strome, tj mikrookružja koštane srži.

Za normalno stvaranje krvnih stanica osim čimbenika rasta potrebni su brojni vitamini (vitamin B-1, B-6, B-12, folna kiselina, pantenonska kiselina, vitamin C, vitamin E,...) , aminokiseline, hormoni (npr. androgeni i tiroksin za eritrocitopoezu), te metali. Manjak bilo koje od navedenih tvari dovodi do poremećaja stvaranje jedne ili više vrsta krvotvornih stanica i nastanka njihovog manjka ili nedostatne funkcije.

U ovom tekstu bit će prikazano što se može dogoditi u krvnoj slici kada dođe do poremećaja prometa metala.

Bakar

Dostatan unos bakra u organizam je nužan za urednu funkciju različitih enzima, uključujući citokrom c oksidazu, ceruloplazmin i bakar/cink dismutazu (1). Enzimi ovisni o bakru sastavni su dio obrane od oksidativnog stresa, a bakar je važan i za funkciju enzima citosolne katalaze. Uobičajenom prehranom u organizam se dnevno unese do 5 mg bakra, od čega se oko 20-50% apsorbira u crijevima. Pretpostavlja se da se bakar apsorbira uglavnom u početom dijelu probavnog sustava. Najčešći uzroci nedostatka bakra u organizmu su sindrom malapsorpcije, sindrom kratkog crijeva, celijakija, cistična fibroza, odstranjenje većeg dijela želuca, te veliki enteralni unos cinka što dovodi do pojačanog lučenja bakra iz organizma. Malapsorpcijski sindromi dovede i do značajnog smanjenja apsorpcije esencijalnih vitamina i oligoelemenata, koji se u oboljelih samo dijelom uspješno nadoknađuju, na nedostatak bakra rijetko se vodi računa.

Hematološke manifestacije nedostatka bakra često su vezane s neurološkim simptomima a to je najčešće mijeloneuropatija. Oko polovice hematoloških manifestacija u bolesnika s nedostatkom bakra očituje se istodobno anemijom i granulocitopenijom, oko 30% ima samo anemiju, 10% pancitopeniju, 5% anemiju i trombocitopeniju , te oko 2% samo neutropeniju (2). Uz nedostatak bakra polovica bolesnika ima istodobno i neki drugi nutritivni nedostatak, najčešće vitamina B-12 i/ili folne kiseline. Nadoknađivanjem samo vitamina B-12 i folne kiseline ne dolazi do normalizacije nalaza krvne slike bez dodavanja bakra. Nije poznato koliko je vremena potrebno da traje

nedostatak bakra u organizmu, da bi došlo do hematoloških manifestacija. Pretpostavlja se da je za to potrebno od 3 mjeseca do više godina. Vrlo rijetko nedostatak bakra u organizmu može biti uzrokovan i davanjem velikih doza desferioksamina koji se daje u slučaju hemokromatoze. Tada osim izlučivanja velikih količina željeza iz organizma dolazi i do izlučivanja bakra i cinka što može dovesti do nedostatka tih metala u organizmu (3).

Anemija je daleko najčešća hematološka manifestacija nedostatka bakra, samostalno ili u kombinacijama sa drugim poremećajima u krvnoj slici se pojavljuje u preko 90% slučajeva. Najčešće je mikrocitna, iako može u određenim slučajevima biti normocitna ili makrocitna, što ovisi i o istodobnom postojanju nedostatka drugih mikronutrijenata. Bakar je sastavni dio proteina potrebnih za normalnu homeostazu željeza poput ceruloplazmina i hefestina. Ceruloplazmin djeluje poput feroksidaze pretvarajući dvovaljano u trovaljano željezo. To je potrebno za lučenje željeza iz stanica izvan crijeva i u slučaju nedostatka može doći do nakupljanja željeza u makrofazima s posljedičnom anemijom i neurodegeneracijom (4). Hefestin je protein koji sadrži bakar i ima funkciju feroksidaze, slično ceruloplazminu, ovaj protein je nužan za otpuštanje željeza iz stanica crijevnog epitela. U slučaju nedostatka bakra može doći do smanjenja funkcije hefestina i posljedično značajnog smanjenja apsorpcije željeza (5). Na animalnim modelima nađeno je da štakori koji imaju nedostatak bakra imaju i značajno osjetljiviju membranu eritocita na oštećenje oksidativnim stresom.

Granulocitopenija se javlja u oko dvije trećine hematoloških manifestacija nedostatka bakra, a vrijednosti apsolutnog broja granulocita variraju od $0,2$ do $1,5 \times 10^9/L$. Etiologija granulocitopenije je manje jasna od etiologije anemije nastale nakon nedostatka bakra. Pretpostavlja se da je usporeno sazrijevanje mijeloidnih preteča granulocita u koštanoj srži, te pojava vakuola u citološkoj analizi mijelograma uzrokom granulocitopenije, kao i moguće „zarobljavanje“ granulocita u plućima kod miševa sa nedostatkom bakra (6). Trombocitopenija je najrjeđa manifestacija nedostatka bakra u krvnoj slici i javlja se u svega oko 15% slučajeva, a vrijednosti trombocita su $24-150 \times 10^9/L$. U nalazu razmaza koštane srži kod osoba s nedostatkom bakra i poremećajem u krvnoj slici mogu se naći povećane količine željeza u plazma stanicama koštane srži, prije spomenute vakuole u mijeloblastima i eritroblastima, te uglavnom uredan nalaz megakariocitopoeze.

Litij

Litij u obliku litij karbonata je lijek koji se duže od pola stoljeća koristi u psihijatriji u liječenju manično-despresivnih poremećaja, a rjeđe kao antidepresiv. Prije četrdesetak godina primjećeno je da bolesnici koji primaju litij karbonat imaju povišene vrijednosti granulocita. Budući su granulocitopenije nakon kemoterapijskih ciklusa tada bile nerješiv problem kod maligno oboljelih, davanje litijeva karbonata je izgledalo kao moguće rješenje granulocitopenije (7). Ubrzo se spoznalo da litij karbonat doista uzrokuje granulocitozu, ali samo u nekih bolesnika. Terapijski učinak granulocitoze kod onkoloških bolesnika je bio skroman, a zbog mogućih neželjenih djelovanja litija (nefrogeni diabetes insipidus, hipotireoidizam, tremor, neurotoksičnost, teratogenost i čak leukemogeneza) indikacija u svrhu povećanja broja granulocita je brzo napuštena.

Zahvaljujući boljoj laboratorijskoj dijagnostici danas se može sa sigurnošću tvrditi da litij kar-

bonat mobilizira matične pluripotentne krvotvorne stanice iz koštane srži, potiče ih na daljnju diferencijaciju što dovodi do granulocitoze, a u manjoj mjeri i do povećanja broja trombocita (8). Litij karbonat je vrlo jeftin lijek pa se i danas se u nekim siromašnim zemljama osim u psihijatriji koristi i u dječjoj onkologiji u svrhu povećanja broja granulocita u perifernoj krvi. Manično-depresivna stanja su izuzetno rijetka u dječjoj i adolescentnoj dobi, te je granulocitoza kao nuspojava litija vrlo rijedak nalaz u djece.

Cink

Prema nekim procjenama oko 2 milijarde ljudi na Zemlji ima blaži ili teži oblik nedostatka cinka (9). Nedostatak cinka klinički se očituje dermatitisom, bulama po koži, proljevastim stolicama, alopecijom, emocionalnim poremećajima, gubitkom na tjelesnoj težini i učestalim infekcijama.

Cink se nalazi i u krvnim stanicama on je dio enzima karbon anhidraze unutar eritrocita, a također je i sastavni dio membrane eritrocita. U slučaju težeg nedostatka cinka u organizmu dolazi do povećane fragilnosti eritrocitne membrane, dok je cink unutar eritrocita manje ovisan o serumskim koncentracijama. Cink se nalazi u vrlo malim količinama u granulocitima i trombocitima. I ta mala količina cinka u granulocitima je važna, jer u nedostatku cinka granulociti imaju slabiju fagocitnu aktivnost.

Kada nedostaje cinka u organizmu, on se može nadoknađivati peroralno u dozi 10-20 mg na dan ovisno o dobi i tjelesnoj težini djeteta. U slučaju potrebe za dugotrajnom nadoknadom cinka teoretski može doći do smanjenja apsorpcije bakra u crijevima, što dovodi i do slabijeg otpuštanja željeza iz stanica i posljedične anemije. Brojni radovi su o navedenoj problematici napisani, ali novije meta-analize pokazuju da čak i dugotrajna peroralna nadoknada cinka ne dovodi do pojave sideropenijske anemije u djece (10). S druge strane postoje radovi kojima se dokazuje da istodobno postojanje nedostatka magnezija i cinka može dovesti do nastanka anemije (11).

Nedostatak cinka u organizmu dovodi i do brojnih imunoloških poremećaja. Smanjena je aktivnost NK stanica i makrofaga, zbog čega dolazi do poremećene fagocitoze i unutarstaničnog ubijanja patogena. Poremećena je i proizvodnja citokina posebice interleukina-2 i interferona gama. Nedostatak cinka dovodi i do poremećaja funkcije T i B limfocita a to je najizraženije u smanjenju broja pomagačkih T limfocita (tj. CD3+CD4+ limfocita), sa posljedičnom inverzijom CD4/CD8 omjera. Zbog navedenog djeca sa nedostatkom cinka imaju učestale infekcije posebice uzrokovane virusima i parazitima. Primijećeno je da nedostatak cinka može dovesti i do pojačane reakcije presatka protiv primatelja, nakon alogeničnog presađivanja koštane srži (9). Promijenjen metabolizam cinka se dovodi u vezu i sa nastankom i imunološkim odgovorom organizma na promijelocitnu leukemiju (12). Cjelovito gledajući, metabolizam cinka značajno utječe na brojne funkcije T-limfocita, pa nedostatak tog metala dovodi do brojnih imunoloških poremećaja.

Selen

Selen je element kojeg ima u mesu, voću i povrću, njegov nedostatak rijetko nalazimo i to uglavnom u područjima u kojima je zemlja na kojoj se uzgaja povrće siromašna selenom. Selen zajedno sa vitaminom E ima ulogu u sklopu zaštite stanica od oksidativnog stresa i upravo zbog

tih svojstava neko vrijeme se mislilo da štiti od karcinogeneze. Sastavni je dio enzima glutation peroksidaze i jodinaze tiroidnog hormona. Usljed nedostatka selenla javlja se mišićna slabost i bol u mišićima, opisuju se i autoimunosne neuropatije, a može se razviti i kardiomiopatija.

Nedostatak selenla ima utjecaja i na krvnu sliku. U više radova je statističkom raščlambom dokazana povećana učestalost anemija u nedostatku selenla (13,14). Opisan je i utjecaj selenla na limfocite i imunološki sustav. Kod bolesnika sa nedostatkom selenla praćene su vrijednosti serumskih imunoglobulina, limfocitne podvrste, te kožni test kasne hipersenzitivnosti na različite tvari (kandida, virus zaušnjaka, trihofiton, tuberkulin i tetanus toksin). Kod djece u koje je nedostajao selen nađen je manji broj NK stanica i limfocita.

Nakon nadoknade selenla, a što je dokazano praćenjem koncentracije u serumu, došlo je do povećanja broja NK stanica i limfocita, uz povećanje broja receptora za interleukin-2 na površini limfocita. Iznenadujuće, nakon nadoknade selenla razvila se anergija na gore navedene antigene ubrizgane u kožu. Autori studije zaključuju da je uloga selenla u imunotoleranciji i staničnoj imunosti još uvijek nejasna. (15).

Utjecaj ostalih metala na nastanak anemije

U djece sa sideropeničnom anemijom primjećeno je u nekim slučajevima i istodobno povećanje koncentracije olova i kadmija u serumu (16). Cink je sastavni dio nekih transkripcijskih čimbenika koji potiču diferencijaciju eritropoeze (npr. GATA-1), ali ga u suvišku olovo i kadmij mogu zamijeniti što dovodi do poremećaja sazrijevanja crvene krvne loze (17).

Kadmij može potiskujuće djelovati na HIP-1, čimbenik koji se izlučuje tijekom hipoksije i glavni je poticatelj lučenja eritropoetina. Zbog toga dolazi do snižene količine eritropoetina i nastanka anemije. Kod vrlo teških deficita ili pak potpunog nedostatka kobalta ili mangana dolazi i do težeg poremećaja eritrocitopoeze (18).

U eksperimentalnim uvjetima dokazano je da povećana količina aluminija u organizmu može dovesti i do povećanih koncentracija aluminija u eritrocitu što dovodi do pojačanog oksidativnog stresa i skraćenja životnog vijeka eritrocita te u konačnici do anemije (19).

Utjecaj metala na trombocite

Prethodno je opisan utjecaj nedostatka bakra na trombocite, u 15% oboljelih s manjkom bakra prisutna je trombocitopenija blažeg ili značajnijeg stupnja. Trombocitopenija uzrokovana nedostatkom bakra je uglavnom posljedica nedostatne nadoknade bakra tijekom potpune parenteralne prehrane (20). Osim na broj trombocita metali mogu djelovati i na funkciju trombocita. Primjerice, nedostatak željeza može izazvati poremećaje agregacije trombocita a nakon nadoknade željeza agregacija trombocita se normalizira (21).

Idiopatska trombocitopenična purpura (ITP) je u djece nakon dojenačke dobi najčešći uzrok trombocitopenije. Ova bolest u oko 80% slučajeva spontano prolazi tijekom 2-6 tjedana. Prije dvadeset godina u literaturi se pojavilo nekoliko radova koji su preporučivali davanje magnezija kod

djece oboljele od ITP, koji je kako se mislilo štitio membranu trombocita od vezanja protutijela na nju. Za navedenu hipotezu nije bilo dovoljno dokaza pa se ubrzo odustalo od terapije magnezijem kod ITP.

Zaključak

Svi koji su bilo kada imali okus krvi u ustima znaju da krv ima metalan okus. Kada razmišljamo o bolesniku s hematološkim poremećajem ili hematološkim poremećajem s pridruženim znakovima mogućeg oštećenja drugih organskih sustava (neurološkim, kardiološkim, gastroenterološkim) trebamo razmišljati i izvan uobičajenih okvira u kojima tragamo za manjkom željeza kao najčešćim uzrokom hematoloških poremećaja. Razvojem laboratorijskih mogućnosti u prilici smo izmjeriti koncentracije i drugih metala, prije svega bakra i cinka i to je indicirano učiniti češće nego što to činimo u svakodnevnoj praksi. U dijagnostici djeteta s nerazjašnjenim poremećajem u krvnoj slici biti će veliki korak ako s određivanja koncentracije parametara sideropenične anemije koraknemo prema drugim za zdravlje važnim metalima.

Literatura

1. Uauy R, Olivares M, Gonzales M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;67:952S-59S
2. Halfdanarson TR, Kumar N, Li CY, Phylly L, Hogan WJ. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur J Haematol* 2008;80:523-31.
3. de Virgilis S, Congia M, Turco MP, et al. Depletion of trace elements and acute ocular toxicity induced by desferrioxamine in patients with thalassaemia. *Arch Dis Chil* 1988;63:250-55.
4. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004;117:285-97
5. Reeves PG, Demars LC, Johnson WT, Lukaski HC. Dietary copper deficiency reduces iron absorption and duodenal enterocyte hephaestin protein in male and female rats. *J Nutr* 2005;135:92-8
6. Gordon SA, Lominadze D, Saari JT, et al. Impaired deformability of copper-deficient neutrophils. *Exp Biol Med* 2005;230:543-48.
7. Rothstein G, Clarkson D, Larsen W, et al. Effect of lithium on neutrophil mass and production. *N Engl J Med* 1978;298:178-180.
8. Focosi D, Azzara A, Kast RE. Lithium and hematology: established and proposed uses. *J Leuk Biol* 2009;85:20-28.)
9. Prasad AS. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Mol Med* 2008;14:353-57
10. Dekker LH, Villamor E. Zinc supplementation in children is not associated with decreases in hemoglobin concentrations. *J Nutr* 2010;140:1035-40.
11. van Nhien N, Khan NC, Ninh Nx, et al. Micronutrient deficiencies and anemia among preschool children in rural Vietnam. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17:48-55.
12. Alonzo ES, SantAngelo DB. Development of PLZF-expressing innate T cells. *Curr Opin Immunol* 2011;23:220-27
13. Semba RD, Ricks MO, Ferruci L, et al. Low serum selenium is associated with anemia among older adults in the United States. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:93-9.
14. Van Nhien NV, Yabutani T, Cong Khan N, et al. Association of low serum selenium with anemia among adolescent girls living in rural Vietnam. *Nutrition* 2009;25:6-10.
15. Hawkes WC, Hwang A, Alkan Z. The effect of selenium supplementation on DTH skin responses in healthy North American men. *J Trace El Med Biol* 2009;23:272-80
16. Turgut S, Polat A, Inan M, et al. Intereaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper,

cadmium and lead in children. Ind J Pediatr 2007;74:827-30

17. Ermentrout RM, Layon ME, Ackley CJ et al. The effects of lead and cadmium on GATA-1 regulated erythroid gene expression. *Blood Cells mol Dis 2006;37:164-72.*

18. Labar B. Eritrocitopoeza. U: Labar B, Hauptman E, ur. Hematologija 4 izd. Zagreb: Školska knjiga 2007,17-21

19. Guo CH, Hsu GSW, Lin LY i dr. Distribution patterns of trace metals and lipid peroxidation in plasma and erythrocytes of rat exposed to aluminium. *Biol Trace Element Res 2004;101:61-71.*

20. Fuhrman MP, Herrmann V, Masidonski P, Eby C. Pancytopenia after removal of copper from total-parenteral nutrition. *J Parent Ener Nutr 2000;24:361-6.*

21. Kurtoglu E, ugur A, Baltaci AK, Halifeoglu I. Effect of trace element levels on platelet aggregation. *Biol Trace Element Res 2004;99:93-98*

O neonatalnoj hemokromatozi i intrauterinom liječenju

Karin Zibar, Jurica Vuković, Ivo Barić

Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,
Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb

Neonatalna hemokromatoza (NH) je rijetka gestacijska fetomaternalna aloimuna bolest koja se klinički očituje već u novorođenačkoj dobi *teškom jetrenom bolesti* udruženom s *izvanjetrenom siderozom*. Jedan je od najčešćih prepoznatljivih uzroka jetrenog zatajenja u novorođenačkoj dobi. Prvi put je opisana 1957. godine, a do današnjih dana je potvrđena u bar dvjestotinjak bolesnika. Donedavno se nije znao pravi uzrok nastanka bolesti, mislilo se da pripada skupini nasljednih bolesti (opisivala se kao autosomno recesivna bolest, kodominantna bolest, autosomno dominantna bolest s različitom penetracijom, čak se govorilo i o mitohondrijskom načinu nasljeđivanja). Zbog sličnog načina raspodjele nakupljanja željeza u tijelu kao u hereditarnoj hemokromatozi mislilo se da postoji određena genska poveznica između te dvije bolesti, pa se čak i danas klasificira u primarne hemokromatoze (OMIM 231100). Danas se zna da je *maternalna aloimunost* izravno prema *fetalnim hepatocitima* pravi uzrok nastanka ove gestacijske bolesti, u kojoj je glavna značajka *fetalno jetreno oštećenje*. Zbog toga se još naziva i *kongenitalnim aloimunim hepatitisom*. Prognoza bolesti je većinom loša, fatalna, a nerijetko je i uzrok presađivanju jetre u novorođenačkoj dobi. Postoji, međutim, široki spektar kliničkih fenotipova bolesti: od unutarmaternične smrti ploda u drugom ili trećem trimestru, novorođenčadi s fulminantnim jetrenim zatajenjem do bolesnika koji se spontano oporave; opisani su i bolesnici s akutnim jetrenim zatajenjem u odsutnosti izvanjetrene sideroze. Rizik pojavljivanja bolesti u idućim trudnoćama u majki koje su već rodile dijete s NH je vrlo visok, ponekad i do 90%. Spoznaja da je aloimuna reakcija uzrok bolesti otvorila je mogućnost primjene visokih doza *imunoglobulina* u rizičnih majki tijekom trudnoća u svrhu sprječavanja nastanka teškog oblika NH u novorođenčeta.

O patogenezi bolesti

Sama riječ hemokromatoza u nazivu bolesti kaže da željezo ima određenu ulogu u patogenezi bolesti. U NH, za razliku od hereditarne hemokromatoze, *željezo se sekundarno nakuplja*, kao rezultat fetalnog jetrenog oštećenja. Da bismo to objasnili ukratko ćemo se podsjetiti na *metabolizam željeza u fetusa*. Metabolizam željeza je posredovan prijenosom željeza od majke preko posteljice k fetusu, da bi plod mogao normalno rasti i podmirivati potrebe za kisikom. Postoje regulacijski mehanizmi u fetusu koji nadziru dotok željeza od majke. Pri tomu je značajan *hepcidin*, jetrena signalna molekula koja regulira dotok željeza kroz posteljicu preko *feroportina*. Feroportin se nalazi u stanicama trofoblasta, a njegov se izražaj povećava s gestacijskom dobi djeteta, proporcionalno potrebama ploda za željezom. Pri suvišku željeza fetalna jetra povećava izražaj hepcidina kako bi smanjila dotok željeza u plod. Smatra se da teško fetalno jetreno oštećenje dovodi do smanjene proizvodnje hepcidina, koji više ne uspijeva nadzirati djelovanje feroportina, te dolazi do pretjeranog prijenosa željeza preko posteljice u plod i posljedične jetrene sideroze. Iako je vrlo

jasno da je fetalno jetreno oštećenje primaran događaj zbog kojega dolazi do nakupljanja željeza u jetri, mehanizam nakupljanja željeza u izvanjetrenim organima još uvijek nije poznat. Za razliku od jetre, izvanjetreni organi koji su zahvaćeni siderozom nisu oštećeni, što upućuje na neizravan mehanizam nakupljanja željeza. U bolesnika s NH nalazimo sniženu koncentraciju transferina (vjerojatno zbog smanjene sintetičke jetrene funkcije), a povećanu saturaciju transferina, tako da je koncentracija slobodnog željeza (nevezanog za transferin) povišena. Pretpostavlja se da povišena koncentracija slobodnog željeza uzrokuje odlaganje željeza u obliku hemosiderina u tkivima, odnosno izvanjetrenu siderozu.

O maternalnoj aloimunosti kao uzroku nastanka bolesti

Kako je već rečeno, donedavno se mislilo da je NH nasljedna bolest. Ono što je potaknulo na razmišljanje da bi se moglo raditi o aloimunoj bolesti je *neobičan obrazac pojavljivanja bolesti*. Pokazalo se da je vrlo visoka učestalost pojavljivanja bolesti u potomaka majki koje su već rodile dijete s NH. U prethodnim trudnoćama majke bi radale zdravu djecu, ali nakon rođenja prvog djeteta s NH bi vrlo velik postotak idućih trudnoća završio unutar materničnom smrću djeteta ili rođenjem djeteta s NH. Oko 60-80% djece rođene od majki koje su već rodile dijete s NH ima opet NH. Uočeno je da se bolest ponavlja u istih majki, a različitih očeva, ali ne i obratno. Isto tako, bolest nije opisana u potomaka majčine braće ili sestara.

Fetomaternalna aloimunost je posredovana *protutijelima IgG* koji aktivno prelaze kroz posteljicu od 18-og tjedna trudnoće kako bi stvorili humoralnu imunost u fetusa protiv različitog broja mikrobioloških uzročnika kojima fetus do tada nije bio izložen. Načelo aloimunosti se osniva na činjenici da se majka izlaže fetalnim antigenima koje ne prepoznaje kao vlastite, te reagira stvaranjem protutijela razreda IgG, koja su sposobna prepoznati i vezati fetalni antigen. *Fetalni antigen* u NH predstavljaju djetetovi *hepatociti*. Aloimuna je reakcija u NH posredovana aktivacijom *komplementa* (IgG 1 i 3 podrazredi protutijela vežu se za receptor Fc i na taj način aktiviraju komplement), koja završava stvaranjem *membranolitičkog sklopa*, od *engl. membrane attack complex (MAC)*. MAC se stvara u završnoj kaskadi komplementa redoslijedom reakcija C5b s C6, C7 i C8. Vežući se za lipidnu membranu hepatocita sklop C5b-8 privlači C9 te polimeriziraju, stvarajući MAC, koji zatim prodire kroz membranu hepatocita i uzrokuje jetreno oštećenje.

Patohistološka slika bolesti

Budući da je NH u velikom broju slučajeva teška bolest, koja rezultira gubitkom ploda u drugom ili trećem trimestru ili smrću u novorođenačkoj dobi, obdukcijski uzorci su najviše pridonijeli patološkom opisu bolesti.

Jetreno oštećenje je toliko teško te je neusporedivo s drugim oblicima hemokromatoza. *Ciroza* je gotovo uvijek prisutna. *Fibroza* je naglašena, pogotovo u reznjicima i oko središnje vene. Mogu biti prisutni regeneracijski čvorići. U najtežim slučajevima gotovo nema hepatocita. Preostali teško oštećeni hepatociti (većinom subakutno ili kronično) različite su veličine i oblika, s pseudoacinarnim promjenama. Često je prisutna zrnata sideroza. Uočljiva je kolestaza.

Sideroza zahvaća i *izvanjetrena tkiva*, većinom gušteraču, srce, štitnjaču, žlijezde slinovnice, u manjoj mjeri i neka druga tkiva i organe, a karakteristično je da je retikuloendotelni sustav

pošteđen.

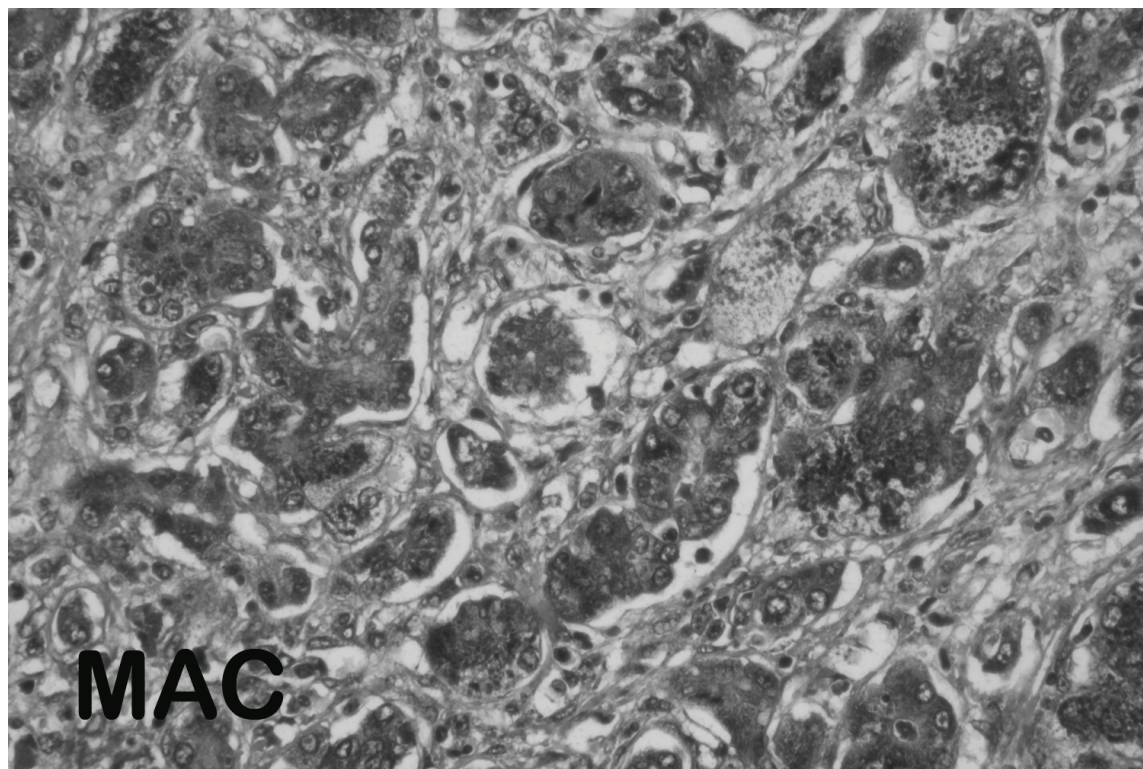
Djeca s teškom kliničkom slikom imaju i disgenezu proksimalnih tubula.

Potvrđivanje aloimunosti imunohistokemijskom metodom

Whittington iz Chicaga je imunohistokemijskim postupkom bojanja dokazao da majčina protutijela uzrokuju bolest u djeteta pomoću stvaranja monoklonskih protutijela na ljudski sklop C5b-9- *antigen završne kaskade aktivacije komplementa*, od engl. *terminal complement cascade (TCC)-neoantigen*, koji se stvara u sklopu MAC-a u hepatocitima djeteta. Preostali hepatociti u NH pokazuju izrazitu obojenost na TCC-neoantigen, što dokazuje prisutnost MAC-a, odnosno potvrđuje aloimuno podrijetlo bolesti (Slika 1).

Klinička slika bolesti

Većina novorođenčadi koja preživi fetalno razdoblje ima neki znak fetalnog oštećenja (unutarmaternični zastoj rasta, oligo- ili polihidramnion), a nemali broj djece čini nedonoščad. Klinički se NH očituje već u prvim satima nakon rođenja teškom jetrenom bolesti uz višeorgansko zatajenje. Nerijetko se postavlja dijagnoza teške novorođenačke septe. Laboratorijski se bolest očituje hipoglikemijom, teškom koagulopatijom, hipoalbuminemijom, edemima s ili bez ascite-



Slika 1. Imunohistokemijski postupak dokazivanja prisutnosti sklopa C5b-9 (MAC) u jetri. Skoro svi hepatociti su obojeni (tamno sivo) što potvrđuje prisutnost MAC-a. Također oblikuju multinuklearne gigantske stanice i pseudorozete. Prisutna je fibroza. Ovaj nalaz je tipičan kod gestacijske aloimune jetrene bolesti. (uvećanje 200x)

sa, žuticom (uz porast i konjugiranog i nekonjugiranog bilirubina) te oligurijom. Aminotransferaze su nekarakteristično niske s obzirom na stupanj jetrenog oštećenja, dok je koncentracija α -fetoproteina karakteristično vrlo visoka. Prisutne su anemija i trombocitopenija. Koncentracija transferina je snižena uz hipersaturaciju transferina i hiperferitinemiju. Karakterističan ultrazvučni nalaz je široko otvoren duktus venozus (za što se ne zna uzrok).

Dijagnoza

1. Na NH bi trebalo posumnjati u svakog djeteta s jasnom jetrenom bolesti u antenatalnoj ili u vrlo ranoj novorođenačkoj dobi, kao i u svakog mrtvorođenog djeteta u kojega je nerazjašnjen uzrok smrti. Tablica 1 prikazuje i druge bolesti koje se očituju jetrenim zatajenjem u novorođenačkoj dobi. Iako uglavnom nije prva bolest na koju posumnjamo u takve djece, NH je najčešći uzrok jetrenog zatajenja u novorođenačkoj dobi.

2. Donedavno se prisutnost *izvanjetrene sideroze* smatrala obveznom za potvrdu dijagnoze. Budući da većina djece umire u novorođenačkoj dobi, dijagnoza bolesti (izvanjetrena sideroza) se većinom postavlja na *obdukciji*. U žive se djece većinom radi *biopsija žlijezda slinovnica*, no moguće je dobiti lažno negativan nalaz zbog neodgovarajuće uzetog uzorka koji ne sadrži submukozne žlijezde u kojima se nakuplja hemosiderin. Međutim, sideroza žlijezda slinovnica može biti prisutna i u nekih drugih bolestima. Zahvaljujući kliničkoj slici bolesti i laboratorijskim pretragama možemo razlikovati te bolesti od NH. Izvanjetrenu siderozu je moguće prikazati i *magnetskom rezonancijom trbušnih organa*, budući da organi preplavljeni željezom (jetra i gušterača) pokazuju različit intenzitet signala (umanjen) u odnosu na nezahvaćene organe (slezenu).

Nalaz *jetrene sideroze* nije dijagnostički važan zbog nekoliko razloga: a) jer postoje mnoge druge bolesti u novorođenačkoj dobi koje se mogu očitovati siderozom jetre - manjak 3-oksosteroid 5-reduktaze, infekcije echovirusom 9, citomegalovirusom, herpes simpleks virusom, rubelom, parvovirusom B19, neonatalni eritematozni lupus, tirozinemija tipa 1, mitohondrijska bolest, Zellwegerov sindrom, prirođena fibroza jetre; b) jer odsutnost jetrene sideroze ne isključuje dijagnozu NH, budući da u teškim oblicima NH više i nema hepatocita, pa se željezo nema gdje nakupljati.

3. Danas, zahvaljujući novoj *imunohistokemijskoj metodi* dokazivanja aloimune reakcije u hepatocitima, prisutnost izvanjetrene sideroze više nije nužna za postavljanje dijagnoze NH te je *dokazivanje aloimunosti zlatni standard za postavljanje dijagnoze*. To je uvelike promijenilo pristup, jer su opisani pacijenti u kojih nije moguće dokazati prisutnost izvanjetrene sideroze. Za sada nije opisana niti jedna druga jetrena bolest koja je uzrokovana izravno humoralnim imunološkim oštećenjem hepatocita.

Tablica 1 Diferencijalna dijagnoza jetrenog zatajenja u novorođenačkoj dobi	
Metaboličke bolesti	galaktozemija, tirozinemija tipa 1, manjak 3-oksosteroid 5-reduktaze, nasljedni manjak fruktoza-1,6-difosfataze, manjak α_1 -antitripsina, Zellwegerov sindrom, Niemann-Pickova bolest tip C, glikogenoza tip IV, mitohondrijska bolest
Zarazne bolesti	parvovirus B19, echovirus 9, coxsackie virus, adenovirus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, hepatitis A, B, C virus, rubella, syphilis, toxoplasma, humani herpes virus 6
Ostale bolesti	hemofagocitna limfohistiocitoza, neonatalni eritematozni lupus, jetreni neuroblastom, Budd-Chiarijev sindrom

Prognoza i liječenje

Prosječni životni vijek srednje teško zahvaćenog djeteta je nekoliko dana do nekoliko tjedana. Vrlo često je NH indikacija za presađivanje jetre u novorođenčeta. Postoje brojne poteškoće pri planiranju transplantacije jetre, zbog prematuriteta, niske porođajne težine te višeorganskog zatajenja organa. Isto je tako, s druge strane, moguće da se dijete potpuno oporavi uz samo simptomatsku terapiju, pa je upitno kada je transplantacija jetre stvarno indicirana. Bez obzira na navedene činjenice, *transplantacija jetre je terapija izbora* u svih bolesnika u kojih terapija lijekovima ne pokazuje uspjeha, iako se dugoročno preživljenje procjenjuje na samo 50%. Postoji malo iskustva o uspjehu liječenja NH lijekovima. Dosadašnji lijekovi (*koktel antioksidansa i vezivača željeza*) nisu pokazali veliki uspjeh u liječenju NH (samo 10-20% novorođenčadi preživi), a neki su od njih čak i toksični. U posljednje vrijeme (otkada se zna da je aloimunost uzrok bolesti) NH se liječi *dvostrukom izmjenom volumena krvi*, od engl. *double volume exchange transfusion* (dio s koncentratom eritrocita, dio sa svježe smrznutom plazmom) kako bi se prvo uklonila majčina protutijela, a onda se još dodaju *imunoglobulini* intravenski, kako bi se stvorila humoralna imunost u djeteta. Učinak ove terapije nije još dovoljno jasan, ali bi mogao biti obećavajući (stopa preživljenja je iznosila 75% uspoređujući sa 17% u djece koja nisu primala imunoglobuline).

O unutar materničnom liječenju imunoglobulinima

Istraživanje koje su proveli Whittington i Hibbard, utemeljeno na činjenici da je NH aloimuna bolest, dovelo je do *prekretnice* u povijesti NH, jer su pokazali da preventivno liječenje unutar materničnim davanjem imunoglobulina rizičnim trudnicama, koje su već rodile dijete s NH, smanjuje težinu kliničke slike bolesti u djeteta i uklanja potrebu za presađivanjem jetre u rođene djece. Do sada se terapija imunoglobulinima provela u 50-ak trudnoća, te je većina djece preživjela novorođenačku dob zahvaljujući samo simptomatskoj terapiji (oko 80% novorođenčadi prema laboratorijskim nalazima bilo je zahvaćeno bolešću- povišen α -fetoprotein i feritin te produljeno protrombinsko vrijeme). U suprotnosti s tom činjenicom, 92% neliječenih trudnoća je završilo unutar materničnom smrću ploda, novorođenačkom smrću ili jetrenim zatajenjem koje je zahtijevalo transplantaciju jetre. *Načelo djelovanja imunoglobulina* je višestruko: 1. smanjuju majčin imunosni odgovor na fetalne antigene, 2. nespecifična protutijela se natječu s protutijelima majke za prijenos preko posteljice, pa smanjuju njihov prijelaz u fetus, 3. nespecifična protutijela se vežu za fetalne antigene, pa smanjuju vezivanje majčinih protutijela. Liječenje se sastoji od davanja imunoglobulina intravenski počevši od 14-og tjedna trudnoće sve do 35. tjedna gestacije. Postoji *protokol o antenatalnoj terapiji imunoglobulinima* kojega je stvorio Whittington (Tablica 2).

Dosadašnji uspjesi, novi izazovi, još uvijek nepoznate činjenice...

1. Još uvijek nije utvrđeno *koji jetreni antigen* uzrokuje aloimunu reakciju u majke i zašto.
2. Budući da se pretpostavlja da su fetalni hepatociti jedini izvor antigena koji dovodi do aloimune reakcije i nastanka bolesti, u budućnosti će vjerojatno uvođenje *serološkog testa* omogućiti brže i lakše dijagnosticiranje bolesti.
3. Još uvijek se ne zna zašto su u nekih slučajeva hepatociti akutno oštećeni, a u većine njih ipak subakutno ili kronično (moguće je da različiti antigeni izraženi u različito vrijeme u fetalnom jetrenom razvoju dovode do *2 različita oblika bolesti*).

Tablica 2 Predloženi protokol o provođenju antenatalne terapije imunoglobulinima radi prevencije nastanka teškog oblika NH (preuzeto od Whittingtona)						
Terapija imunoglobulinima	Skrb o majci tijekom trudnoće	Nadzor ploda	Vrijeme porođaja	Nadzor majke nakon porođaja	Evaluacija novorođenčeta	Nadzor i njega bolesnog djeteta
<u>Relativne kontraindikacije:</u> manjak IgA, hipogamaglobulinemija, srčana bolest <u>Manje nuspojave:</u> glavobolja, mučnina, slabost, hipertenzija <u>Teža nuspojava:</u> aseptični meningitis opisan u 1 pacijentice <u>Nuspojave u fetusa nisu opisane</u>	Nadležni ginekolog bi trebao moći pratiti trudnoću	Ne treba ništa češće praćenje razvoja ploda	Preporučuje se porođaj na termin unatoč završetku terapije u 35. tjednu trudnoće	Rutinski	Provjeriti boluje li dijete od NH- u prvom danu života učiniti pretrage (feritin, AST, ALT, protrombinsko vrijeme, α -fetoprotein, ultrazvuk trbuha)	- u djeteta sa samo <u>laboratorijskim znakovima NH</u> (povišen feritin i/ili α -fetoprotein) može se dati <u>vitamin E</u> u dozi od 25 IU/kg/dan u razdoblju od 6 tjedana
<u>Laboratorijske pretrage prije početka terapije:</u> koncentracija IgA u serumu	Nadležna institucija treba imati napisane protokole o provođenju terapije imunoglobulinima i oni bi trebali stajati uz trudnicu prilikom primjene terapije	Iskustva su pokazala da je moguće jedino teški oblik NH prepoznati <i>in utero</i> . U neličenih trudnica znakovi bolesti su smanjeni fetalni pokreti, zaostatak u rastu fetusa, oligohidramnion, ultrazvučno se vidi hiperehogen a jetra, ascites, abnormalno sti protoka.	Osim klasičnih indikacija za carski rez drugih nema			- dijete koje ima <u>značajno oštećenje jetrene funkcije</u> (poremećenu koagulaciju) treba zbrinuti u <u>jedini</u> <u>intenzivne skrbi</u> te isključiti druge komplikacije jetrene bolesti (hipoglikemiju), također se preporučuje liječenje <u>imunoglobulinima</u> i <u>dvostrukom izmjenom volumena krvi</u> (dio s koncentratom eritrocita, dio sa svježe smrznutom plazmom). Može se dati i <u>vitamin E</u> u dozi navedenoj gore i <u>N-acetilcistein</u> u dozi od 200 mg/kg/dan.
<u>Doza:</u> 1g/kg prema tjelesnoj težini majke između 14.-18. tjedna trudnoće, maks. doza 60 g. <u>Shema davanja:</u> 1. doza u 14. tjednu gestacije, 2. doza u 16. tjednu, a od 18. tjedna svaki tjedan po jedna doza do 35. tjedna gestacije Sveukupno 20 doza.	Shema planiranih pregleda: - 1x mjesečno do 24. tjedna trudnoće; kod svakog pregleda provjeriti: vitalne znakove, procijeniti veličinu maternice, fetalne srčane otkucaje, urin (bjelancevine i glukoza), majčinu tjelesnu težinu - 1x tjedno od 24. tjedna trudnoće do porođaja; kod svakog pregleda provjeriti gore navedeno uz procjenu stanja majke općenito.		U slučaju progresivne jetrene bolesti može se planirati raniji porođaj.			Ne preporučuje se davanje koktela antioksidansa i vezivača željeza, jer neki lijekovi, kao desferriksamin, mogu biti toksični, a njihov pozitivni učinak nije dokazan.
<u>Praćenje mogućih nuspojava</u> tijekom terapije. U slučaju pojave nuspojava većinom treba samo usporiti brzinu infuzije, osim u slučaju anafilaktične reakcije.						

4. Dosadašnja dostignuća (dokaz aloimune podloge bolesti) podržavaju težnju da se *NH ukloni s popisa primarnih hemokromatoza*. To je važan korak zbog toga što se *NH* za sada i dalje, uglavnom, smatra nasljednom bolesti.
5. Iako je preventivna terapija imunoglobulinima u rizičnih majki vrlo učinkovita, te je pokazala revolucionaran uspjeh u sprječavanju nastanka teškog oblika bolesti u novorođenčeta, još uvijek ostaje upitno *kako uspješno liječiti djecu rođenu iz, do tada, nerizičnih trudnoća*.

Literatura

1. Bellini C, Mazzella M, Scopesi F, et al. Spontaneous recovery in neonatal hemochromatosis. *J Hepatol* 2004;41:882-883.
2. Bradley J, Leibold EA, Harris ZL, et al. Influence of gestational age and fetal iron status on IRP activity and iron transporter protein expression in third-trimester human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R894-R901.
3. Branch DW, Porter TF, Paidas MJ, et al. Obstetric uses of intravenous immunoglobulin: successes, failures, and promises. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(4):S133-S138.
4. Gruper Y, Bar J, Bacharach E, et al. Transferrin receptor co-localizes and interacts with the hemochromatosis factor (HFE) and the divalent metal transporter-1 (DMT1) in trophoblast cells. *J Cell Physiol* 2005;204:901-912.
5. Hayes AM, Jaramillo D, Levy HL, et al. Neonatal hemochromatosis: diagnosis with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1992;159:623-625.
6. Hoogstraten J, de Sa DJ, Knisely AS. Fetal liver disease may precede extrahepatic siderosis in neonatal hemochromatosis. *Gastroenterology* 1990;98:1699-1701.
7. Inui A, Fujisawa T, Kubo T, et al. A case of neonatal hemochromatosis-like liver failure with spontaneous remission. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:374-377.
8. Kelly AL, Lunt PW, Rodrigues F, et al. Classification and genetic features of neonatal haemochromatosis: a study of 27 affected pedigrees and molecular analysis of genes implicated in iron metabolism. *J Med Genet* 2001;38:599-610.
9. Kershnik MM, Knisely AS, Sun CC, et al. Cytomegalovirus infection, fetal liver disease, and neonatal hemochromatosis. *Hum Pathol* 1992;23:1075-1080.
10. Knisely AS. Neonatal hemochromatosis. *Adv Pediatr* 1992;39:383-403.
11. Knisely AS, Mieli-Vergani G, Whittington PF. Neonatal hemochromatosis. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:877-889.
12. Murray KF, Kowdley KV. Neonatal hemochromatosis. *Pediatrics* 2001;108:960-4.
13. Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, et al. Novel Mechanism of Fetal Hepatocyte Injury in Congenital Alloimmune Hepatitis Involves the Terminal Complement Cascade. *Hepatology* 2010;51:2061-2068.
14. Rand EB, Karpen SJ, Kelly S, et al. Treatment of neonatal hemochromatosis with exchange transfusion and intravenous immunoglobulin. *J Pediatr* 2009;155:566-571.
15. Rodrigues F, Kallas M, Nash R, et al. Neonatal hemochromatosis: medical treatment vs. transplantation: the King's experience. *Liver Transpl* 2005;11:1417-1424.
16. Shneider BL. Genetic counseling in neonatal hemochromatosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:328.
17. Udell IW, Barshes NR, Voloyiannis T, et al. Neonatal hemochromatosis: radiographical and histological signs. *Liver Transpl* 2005;11:998-1000.
18. van Dijk JP. Regulatory aspects of placental iron transfer: a comparative study. *placenta* 1988;9:215-226.
19. Whittington PF, Hibbard JU. High-dose immunoglobulin during pregnancy for recurrent neonatal haemochromatosis. *Lancet* 2004;364:1690-1698.
20. Whittington PF, Malladi P. Neonatal hemochromatosis: is it an alloimmune disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:544-549.
21. Whittington PF. Neonatal hemochromatosis: a congenital alloimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*

2007;27:243-50.

22. Whittington PF. Fetal and infantile hemochromatosis. *Hepatology* 2006;43:654-660.

23. Whittington PF, Kelly S. Outcome of pregnancies at risk for neonatal hemochromatosis is improved by treatment with high-dose intravenous immunoglobulin. *Pediatrics* 2008;121:e1615-1621.

24. Witzleben CL, Uri A. Perinatal hemochromatosis: entity or end result? *Hum Pathol* 1989;20:335-340.

Nasljedne hemokromatoze – trebaju li zanimati i pedijatra?

Irena Barbarić

Zavod za neurologiju, intenzivno liječenje i bolesti metabolizma, Klinika za pedijatriju
Kliničkog bolničkog centra Rijeka, 51000 Rijeka

Uvod

Nasljedne hemokromatoze (*hereditarne hemokromatoze, HH*) su nasljedni poremećaji metabolizma željeza karakterizirani povećanom crijevnom apsorpcijom i odlaganjem željeza u različita tkiva.

Bolest je prvi puta opisana u europskoj literaturi sredinom XIX. stoljeća, a *gen HFE*, čije mutacije uzrokuju hereditarnu hemokromatozu otkriven je tek pred dvadesetak godina. Iz tog razdoblja potječe i prvo istraživanje koje je pokazalo da je preživljavanje oboljelih jednako onoj u općoj populaciji, ako se bolest otkrije prije razvoja komplikacija.

Podjela

Najčešći oblik hemokromatoze je *hemokromatoza uzrokovana mutacijama gena HFE (HFE-povezana hemokromatoza)*. To je najčešći autosomno recesivni poremećaj u populaciji sjeverne Europe. Većina oboljelih su homozigoti za mutaciju *C282Y* (prevalencija 1:250), ali klinički se manifestiraju i složeni heterozigoti *C282Y/H63D*.

Ostali nasljedni oblici se klasificiraju kao *HFE-nepovezana hemokromatoza* i tu pripadaju juvenilna hemokromatoza, Afričko preopterećenje željezom te preopterećenje željezom zbog mutacije hepcidina, transferinskog receptora *TfR2* ili feroportina 1.

Juvenilna hemokromatoza je karakterizirana brzim nagomilavanjem željeza, a radi se o poremećaju homojuvelina, bjelančevine čija funkcija za sada nije utvrđena. Mutacija na *hepcidinskom genu (HAMP)* također dovodi do juvenilnog oblika na način da je poremećena funkcija hepcidina, bjelančevine koja smanjuje apsorpciju željeza. Mutacija na *genu TfR2* dovodi do bolesti slične HFE-povezаноj HH, dok se mutacija na *feroportinu 1* nasljeđuje autosomno dominantno, ali mehanizam poremećaja nije poznat.

Afričko preopterećenje željezom javlja se u subsaharske populacije. Povezuje se s nehotičnim uzimanjem većih količina željeza, a u 20% oboljelih nađen je poremećaj feroportina 1.

Patofiziologija

U patofiziologiji bolesti se mogu izdvojiti tri elementa koji se nadovezuju jedan na drugog: 1. promijenjena funkcija HFE-bjelančevine, 2. povećana crijevna apsorpcija željeza i 3. oštećenje tkiva i nastanak fibroze.

Mutirana HFE-bjelančevina C282Y se smanjeno prezentira na površini stanice, pojačano se zadržava u endoplazmatskom retikulumu i ubrzano razgrađuje.

Količina željeza u organizmu registrira se u stanicama duodenalnih kripta koje se diferenciraju u apsorptivne enterocite i migriraju na vršak crijevnih resica. Ovdje se apsorpcija željeza događa preko divalentnog metalnog transportera-1 (DMT-1) kojeg se više sintetizira ako su zalihe željeza manje. Normalna HFE-bjelančevina olakšava uzimanje željeza iz plazme, a kad je mutirana i nefunkcionalna povećava se aktivnost DMT-1, a vjerojatno i ostalih proteina.

Fibroza i ciroza jetre nastaju zbog peroksidacije lipida u membrani staničnih organela pa hepatociti propadaju. Kupferove stanice u jetri stvaraju profibrogenične citokine pa zvjezdolike jetrene stanice (Ito stanice) proizvode više kolagena i nastaje fibroza. Ostala tkiva u kojima se odvija sličan proces jesu srčano, žljezdano i gušteračino.

Klinička slika

Do pred dvedesetak godina bolest se dijagnosticirala uglavnom u simptomatskih bolesnika u dobi od 40 do 50 godina. Prevladavaju bolesnici muškog spola jer su u žena zbog gubitka željeza menstrualnim krvarenjem i porođajem, simptomi manje izraženi.

Najčešći simptomi jesu slabost i letargija, artralgijske boli u trbuhu i gubitak potencije u muškaraca. Nađe se hepatomegalija s komplikacijama kronične jetrene bolesti (splenomegalija, ascites, edemi, žutica). Karakteristične pojave poput šećerne bolesti i brončane/sive kože, danas se nađu izuzetno rijetko. Asimptomatski bolesnici se prospektivno dokazuju obiteljskim ili populacijskim probirom.

Kad se bolest dijagnosticira nakon što se ciroza razvila, čak i nakon učinkovitih venepunkcija, može se razviti hepatocelularni karcinom. Srčane komplikacije uključuju kardiomiopatiju, atrijske i ventrikulske aritmije te kongestivno srčano zatajivanje. Artropatično su najčešće promijenjeni metakarpofalangealni zglobovi. Rijetko se nađu hondrokalcinoza, stvaranje subarahnoidalnih cista, osteopenija i oticanje zglobova. Češće su infekcije listerijom, jersinijom i vibriom.

Dijagnoza

Dijagnostička obrada započinje mjerenjem aktivnosti jetrenih enzima i testova na željezo. Mjeri se koncentracija serumskog željeza i TIBC i/ili zasićenje transferina. Zasićenje transferina se izračunava prema formuli: $Fe/TIBC \times 100\%$. Ako se na bolest misli, postavljanje dijagnoze je relativno lako kada nađemo povišene vrijednosti željeza i feritina, te zasićenje transferina iznad 45%. Povišene vrijednosti su dovoljno specifične i karakteristične da ukažu na moguću hemokromatozu, pa tada treba uraditi i analizu HFE-mutacije. Također se može učiniti biopsija jetre radi mjerenja količine željeza u suhoj tvari jetre, koja se sve manje radi nakon uvođenja analize gena (Tablica 1).

Ako je bolesnik homozigot za mutaciju C282Y ili složeni heterozigot (C282Y/H63D), mlađi od 40 godina, s koncentracijom serumskog feritina ispod 1000 ng/mL, s normalnim enzimima jetre i bez hepatomegalije, biopsija jetre nije potrebna. Ako se radi zbog procjene jetrenog oštećenja,

Tablica 1 Vrijednosti laboratorijskih pretraga u bolesnika s HH i zdravih osoba

	Osobe s HH	Zdrave osobe
Željezo/S ($\mu\text{mol/L}$)	32 - 54	11 - 32
Željezo u jetri ($\mu\text{mol/g}$)	53 - 563	5 - 27
Feritin/S ($\mu\text{g/L}$)		
muškarci	300 - 3000	20 - 200
žene	250 - 3000	15 - 150
Transferin/S (%)	55 - 100	20 - 50

uzima se uzorak za histološki pregled i za mjerenje količine željeza u uzorku. Treba znati da se željezo u jetri nagomilava i kod nekih drugih kroničnih bolesti jetre i ostalih organskih sustava. I u tom slučaju nam za procjenu pomaže genska analiza, gdje nalaz homozigota C282Y ili složenog heterozigota C282Y/H63D upućuje na hemokromatozu.

Liječenje i prognoza

Većina bolesnika se liječi venepunkcijama. Venepunkcije se započinju jednom tjedno uz kontrolu laboratorijskih nalaza feritina i transferina jednom u tri mjeseca. Koncentracija serumskog feritina obično progresivno opada sa smanjenjem zaliha željeza, dok saturacija transferina ostaje povišena neposredno sve do postizanja normalizacije zaliha željeza.

Kad zalihe željeza padnu ispod do donje normalne koncentracije, očekuje se koncentracija feritina ispod 50 ng/mL, a saturacija transferina ispod 50%. Tada se venepunkcije rade svaka dva do tri mjeseca.

Ako se venepunkcije počnu prije razvoja fibroze i ciroze jetre, dužina života je jednaka onoj u općoj populaciji. Hepatocelularni karcinom je češći u ovih bolesnika pa se preporuča kontrola alfa-fetoproteina i UZ abdomena svakih 6 mjeseci. Deferoksamin se daje u bolesnika sa srčanim simptomima, a transplantacija jetre je često manje uspješna zbog oštećenja i drugih organa.

Srodnicima oboljelih od hemokromatoze u slučaju nalaza homozigota C282Y i složenih heterozigota C282Y/H63D je potrebno također provoditi venepunkcije, čak i ako su asimptomatski. U slučaju ostalih mutacija, nije potrebno praćenje niti venepunkcije. Jetrena bolest u ovih bolesnika javit će se samo u slučaju komorbiditeta s virusnim hepatitisom, masnom jetrom i sl.

Zaključak

Obzirom na učestalost bolesti te mogućnost genske analize, svakako treba i u pedijatrijskoj populaciji misliti na ovu bolest. Gensku analizu treba učiniti i u srodnika oboljelih. Venepunkcije započete na vrijeme, prije pojave kroničnih promjena u jetri i ostalim organima, znače jednaku dužinu života kao i u općoj populaciji.

Literatura

1. Powel LW. Hereditary hemochromatosis. *Pathology* 2000; 32: 24-36
2. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: A new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;

350: 2383-2397

3. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M i sur. *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. Nat Genet* 2003; 33: 21-22
4. Pietrangelo A. *Non-HFE hemochromatosis. Hepatology* 2004; 39: 21-29
5. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH i sur. *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. Nat Genet* 2004; 1: 77-82
6. Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus W. *Recognition and management of hereditary hemochromatosis. Am Fam Physician* 2002; 5: 853-860
7. Bacon BR, Britton RS. *Hemochromatosis. U: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease, 8th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier* 2006; 1589-1599

Adresa za dopisivanje:

Doc.dr.sc. Irena Barbarić, dr.med. Klinika za pedijatriju, KBC Rijeka, Zavod za neurologiju, intenzivno liječenje i bolesti metabolizma, Istarska 43, 51000 Rijeka, e-mail: irena.barbaric@gmail.com

Bolesti s nakupljanjem željeza u mozgu

Melita Čačić Hribljan

Zavod za dječju neurologiju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb

U sisavaca je željezo ključan element za funkciju velikog broja enzima i prostetskih grupa, prije svega hema i kompleksa željezo-sumpor. Već dulje vrijeme je poznato da se željezo nakuplja u bazalnim ganglijima i nukleus dentatusu mozga u sklopu normalnog procesa starenja, kao i u nizu entiteta poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, sindromu nemirnih nogu, encefalopatiji kod HIV-a te određenom broju genetskih neurodegenerativnih poremećaja. Raste broj dokaza da je disregulacija metabolizma željeza jedan od početnih uzroka za smrt neurona u nekim od tih neurodegenerativnih bolesti bez obzira je li ona primarni uzrok bolesti (nasljedne monogenske bolesti) ili se radi o sekundarnom učinku u kojem je oksidativno oštećenje konačni rezultat multifaktorske neurodegenerativne bolesti. U novije vrijeme u engleskoj literaturi genetske neurodegenerativne bolesti u kojima se željezo taloži u mozgu se svrstavaju u grupu nazvanu „*neurodegeneration with brain iron accumulation*“ koja obuhvaća progresivne ekstrapiramidne poremećaje čija je poveznica upravo nakupljanje željeza u središnjem živčanom sustavu. Pojam „neurodegenerativne bolesti s nakupljanjem željeza u mozgu“ je dovoljno širok da objedini spektar bolesti prethodno poznat kao Hallervorden-Spatzov sindrom kao i niz tek nedavno izdvojenih zasebnih entiteta. Eponim za ovu grupu bolesti je odavao priznanje dvojici njemačkih neuropatologa, Juliusu Hallervordenu i Hugu Spatzu, no njihove neetične metode korištene u znanstvenim istraživanjima u vrijeme Drugog svjetskog rata su dovele do diskreditacije unatoč nesumnjivom znanstvenom doprinosu koji su ostavili kao svoju baštinu. Tako su danas pojam „*neurodegeneration with brain iron accumulation*“ i akronim NBIA prihvaćeni u stručnoj literaturi i objedinjuju sve veći broj klinički i genetski različitih entiteta kojima je zajedničko nagomilavanje željeza prvenstveno u bazalnim ganglijima uz patohistološki nalaz aksonalne distrofije. Najučestalija bolest iz ove grupe je za pantotenat kinazu vezana neurodegeneracija uzrokovana mutacijom u genu *PANK2* i nju ima oko polovica bolesnika s NBIA. Nedavno su se molekularno genetski razjasnile i infantilna neuroaksonalna distrofija (mutacije u genu *PLA2G6*), aceruloplazminemija (mutacije u genu *CP*) te neuroferitinopatija (mutacije u genu *FTL*). Da se radi o značajnom broju entiteta koji se skrivaju pod kišobranom NBIA govori i podatak da je zadnjih godina broj gena čije mutacije dovode do bolesti s nakupljanjem željeza u mozgu povećan za još tri: *FA2H*, *ATP13A2* i *C2orf37*. Čini se da će ih uskoro biti i više jer i dalje postoje bolesnici čija klinička slika i MR nalaz govore da boluju od NBIA, ali mutacija nekog od spomenutih gena nije u njih nađena pa ih se ne može uvrstiti niti u jednu od gore spomenutih bolesti. Kako raste količina informacija o patogenezi oštećenja koje u svakoj od ovih bolesti rezultira nakupljanjem željeza, novi podaci koji se trenutačno fokusiraju na ulogu željeza, lipida i energetskog metabolizma u ovim bolestima daju nadu da će uskoro biti dostupna i ciljana terapija bazirana upravo na poznavanju patofiziologije.

S pozicije kliničara, gledajući NBIA kao grupu, do dijagnoze u pojedinačnog bolesnika se dolazi

relativno lako.

Većina pacijenata s neurološkim znacima i simptomima prije ili kasnije ima u dijagnostičkom algoritmu neuroradiološku obradu. Nakupljanje željeza u mozgu je radiološki dobro vidljivo i magnetna rezonancija (MR) mozga je vrlo važno dijagnostičko sredstvo. Karakteristike promjena na MR mozga su vrlo senzitivne i specifične i do dijagnoze NBIA se dolazi već nakon prve slikovne pretrage. Depoziti željeza karakteristično se prikazuju kao područja smanjenog intenziteta signala (hipointenzitet) na T2 mjerenim snimkama, FLAIR-snimkama (engl. *fluid-attenuated inversion recovery*), te T2* prvenstveno u globusu palidusu i substanciji nigri. Nalaz izointenziteta u T1 mjerenim snimkama u navedenim dijelovima mozga pomaže u diferencijalnoj dijagnozi prema taloženju kalcija. U velike većine bolesnika se čak i različiti podtipovi NBIA mogu s velikom sigurnošću razlikovati navedenim tehnikama otvarajući tako put za brzu dijagnozu koju u konačnici treba potvrditi ciljanom molekularnom dijagnostikom.

Neurodegeneracija vezana za pantotenat kinazu

Za pantotenat kinazu vezana neurodegeneracija (engl. *pantothenate kinase-associated neurodegeneration*; PKAN) je autosomno-recesivna bolest za koju se procjenjuje da obuhvaća 50% djece koja imaju neurodegeneraciju udruženu s nakupljanjem željeza u mozgu. Vjeruje se da je prevalencija 1-3 na milijun stanovnika. Prije deset godina je otkriveno da do bolesti dovode mutacije u genu *PANK2* koji kodira enzim pantotenat kinazu, katalizator prvog koraka sinteze koenzima A (CoA). Sintaza CoA počinje kod životinja fosforilacijom pantotenata koji mora biti prisutan u ishrani životinja, dok ga biljke i mikroorganizmi sintetiziraju sami. CoA je jedna od središnjih molekula u metabolizmu i predstavlja nosač aktiviranih acetilnih ili drugih acilnih skupina te ima ključnu ulogu u sintezi adenozin-trifosfata, metabolizmu masnih kiselina i neurotransmitora. Izoforma pantotenat kinaze, *PANK2* je enzim koji katalizira svoje reakcije u mitohondriju mozga te je upravo mitohondrijska disfunkcija uslijed mutacija u genu *PANK2* uzrok neurodegeneracije. Poremećeno funkcioniranje ovog enzima uzrokuje nakupljanje cisteina koji je snažan kelator željeza čime dovodi do sekundarnog nakupljanja željeza i, inducirajući oksidativni stres, dodatno pojačava oštećenje neurona.

Klinički se bolesnici mogu svrstati u klasične i atipične forme PKAN. Dvije trećine oboljelih ima klasični oblik bolesti koji počinje rano, već u dobi malog djeteta i to obično do 6. godine života (6 mjeseci do 12 godina). Prije uočavanja jasnih simptoma djecu se smatra nespretnima, a ubrzo se shvati da su problemi s hodom i posturalne poteškoće u stvari sekundarna posljedica distonije. U ovoj bolesti ekstrapiramidni simptomi dominiraju, jasnu distoniju ima oko 90% oboljelih, dok se koreja, rigiditet i parkinsonizam opisuju znatno rjeđe. Kao pravilo, bolesnici imaju oromandibularnu distoniju i dizatriju, često znakove oštećenja kortikospinalnog puta s povišenim tonusom, hiperrefleksijom, spasticitetom i dorzofleksijom palca na plantarni podražaj. Njihovim teškoćama znatno doprinose i problemi s vidom i kognitivna disfunkcija. Većina ima pigmentni retinitis i kataraktu koji uzrokuju značajno slabljenje vida. Bolest progredira s tipičnim razdobljima pogoršanja za koje nisu otkriveni okidači čimbenici poput infekcija ili kataboličkog stresa, te većina bolesnika u iduće desetljeće do dva izgubi sposobnost samostalnog kretanja. U kasne komplikacije se ubrajaju disfagija i teškoće hranjenja, gastroezofagealni refluks te opstipacija. Smrt najčešće

uzrokuju kardiorespiratorne komplikacije, prije svega aspiracijske pneumonije.

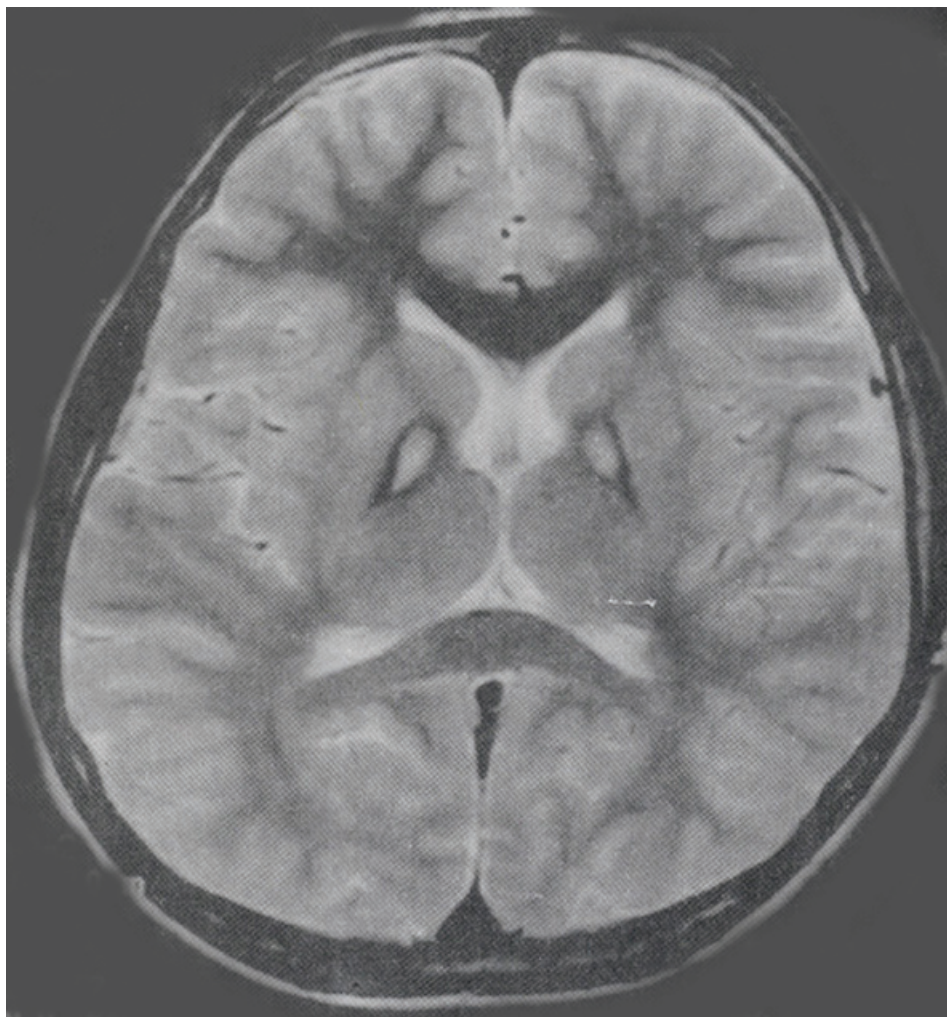
Atipična forma bolesti se očituje nešto kasnije, obično u pubertetu ili čak u odrasloj dobi, no moguć je početak i u ranijem djetinjstvu. Postoji fenotipsko preklapanje s klasičnim oblikom bolesti, no češće se očituje teškoćama govora poput dizatrije ili palilalije, blažim problemima u hodu ili neuropsihijatrijskim simptomima iz domene smetnji ponašanja, emocionalne nestabilnosti ili frontotemporalnom demencijom. Većina u sklopu progresije bolesti razvije ekstrapiramidne simptome, no distonija je znatno manje izražena nego u klasičnoj formi. Znaci kortikospinalnog oštećenja su prisutni, retinitis pigmentosa rjeđe. Gledajući atipični oblik bolesti kao grupu, može se reći da se radi o sporo progresivnoj formi koja je blaža klinički i bolesnici zadrže sposobnost samostalnog kretanja niz godina nakon postavljanja dijagnoze.

Sindrom poznat pod akronimom HARP (hipoprebetalipoproteinemija, akantocitoza, retinitis pigmentosa i palidalna degeneracija) je također uzrokovan mutacijama gena *PANK2* i danas se smatra dijelom spektra PKAN.

Za postavljanje dijagnoze PKAN-a najkorisnija pretraga je MR mozga. Karakteristična promjena koja se nalazi na T2 mjerenim snimkama je poznata kao „znak tigrovog oka“ (Slika 1). Riječ je o kombinaciji signala visokog intenziteta u središtu globusa palidusa (područje nekroze) koji okružuje područje signala niskog intenziteta (depoziti željeza). Do unazad nekoliko godina ovaj radiološki znak je smatran pouzdanim dijagnostičkim kriterijem za PKAN bolesnike s mutacijom u genu *PANK2*, no u novije vrijeme su opisani bolesnici koji imaju klasičnu formu bolesti i dokazanu mutaciju a da nemaju navedenu radiološku promjenu na MR mozga. Kako raste broj bolesnika s kliničkom slikom i radiološkim dokazom nakupljanja željeza u mozgu izdvojena je i populacija koja ne boluje od PKAN-a a da također ima „znak tigrovog oka“ na MR mozga poput bolesnika s neuroferitinopatijom. Stoga se može reći da ovaj neuroradiološki znak, iako vrlo karakterističan za PKAN, ipak nije 100% niti specifičan niti senzitivan za PKAN te ga treba uvijek pažljivo interpretirati u skadu s kliničkim kontekstom. Od dodatnih pretraga nalaz akantocitoze (oko 10% bolesnika), subkliničke retinopatije na elektroretinogramu i oftalmološka odstupanja govore u prilog dijagnozi, no mogućnost konačne potvrde bolesti genskom analizom treba koristiti kod svakog pojedinačnog bolesnika.

Neurodegeneracija vezana za fosfolipazu a grupe 6

Zadnjih godina zasebna heterogena grupa autosomno-recesivnih neurodegenerativnih bolesti povezana je uz mutacije u genu *PLA2G6* koji kodira o kalciju neovisnu fosfolipazu A2 engl. *phospholipase A2 group 6 associated neurodegeneration*, PLAN). Taj enzim katalizira hidrolizu glicerofosfolipida stvarajući slobodne masne kiseline, obično arahidonsku i ostatni lizofosfolipid. Na taj način je uključen u remodeliranje fosfolipidnog membranskog dvosloja i važan je za održavanje homeostaze stanične membrane. Gubitak funkcije ovog proteina može dovesti do aksonalne patologije kako središnjeg, tako i perifernog živčanog sustava uz nakupljanje željeza u mozgu. Spektr poremećaja vezanih za *PLA2G6* danas čine tri različita fenotipa koji se na temelju dobi početka bolesti dijele u one koji počinju u dojenačkoj ili u dobi vrlo malog djeteta (infantilni PLAN ili klasična infantilna neuraksonalna distrofija), one koji počinju u djetinjstvu (atipična



Slika 1. Znak tigrovog oka

neuroaksonalna distrofija i Karakov sindrom) te one koji počinju u odrasloj dobi (adultni PLAN ili distonija-parkinsonizam s ranim početkom). Brojne mutacije se opisuju u genu *PLA2G6* i za sada se ne čini da postoji potpuna korelacija između genotipa i fenotipa. Infantilna neuroaksonalna distrofija (INAD) je nekada bila poznata pod eponimom Seitelbergerova bolest po autoru koji ju je prvi opisao 1952. godine. Ubrzo je shvaćeno da ta rijetka neurodegenerativna bolest ima fenotip koji uključuje klasične i atipične oblike bolesti, a danas su obje forme izdvojene kao zasebne fenotipske varijante šire skupine poznate pod akronimom PLAN.

Klasični oblik bolesti (klasični INAD novijeg naziva infantilni PLAN) počinje između dobi 6 mjeseci i 3 godine u djece koja su do tada pokazivala primjeren psihomotorni razvitak. Prvi simptomi uključuju zastoje u tom razvoju ili češće gubitak već stečenih razvojnih stadija (regres-

iju). Od znakova dominira značajna generalizirana hipotonija uz znakove oštećenja piramdnog puta s razvojem spastične tetrapareze. Od okularnih simptoma rano se viđa nistagmus, javi se do tada nepostojeći strabizam, a detektira se i optička atrofija. Neka djeca imaju izraženu bulbarnu disfunkciju, obično vidljivu do 5. godine života, ataksiju i ponekad generaliziranu epilepsiju. Većina razvija deformitete kralješnice poput kifoskolioze te kontraktуре. Bolest je brzo progresivna uz napredovanje kognitivnog propadanja, jaki spasticitet i oštećenje vida te rezultira letalnim završetkom u prvoj dekadi života obično uslijed kardiorespiratornih komplikacija ili infekcije. Na MR mozga u te djece se već vrlo rano nalazi cerebelarna atrofija, dok se s vremenom detektira i cerebelarna gliozna. Sekundarno se opisuju abnormalnosti stražnjeg dijela korpus kalozuma čiji je splenijum tanak, izdužen i vertikalno položen. Oko polovice bolesnika ima znakove nakupljanja željeza u globus palidusu, nukleus dentatusu i substanciji nigri koje se pojačava s dobi. Nalaze se i znakovi optičke atrofije tj. umanjeni volumen optičkih živaca i kijazme, te u nekih atrofija bijele tvari mozga uz povišen signal na T2 mjenim snimkama. Do 2006. godine dijagnoza se utvrđivala na temelju kliničke slike i patološkog nalaza biopsije (nalaz proširenih aksona i sferodinih tjelešaca na biopsiji kože, konjunktive, sluznice rektuma ili suralnog živca uz elektronskomikroskopski distrofične aksone koji imaju povećan promjer i tanke membrane). Otkrićem gena *PLA2G6* čije mutacije uzrokuju bolest analiza gena je uvedena u dijagnostički algoritam te u većine slučajeva otklanja potrebu za biopsijom. Uz navedene promjene na MR mozga, dijagnostičku sumnju na ovu bolest pobuđuje i nalaz brze visokovoltazne aktivnosti u EEG-u. U elektromiogramu se vide znakovi denervacije, a neurografski se potvrđuje distalna aksonalna senzomotorna neuropatija.

Atipična neuroaksonalna distrofija ili PLAN dječje dobi je znatno rjeđa od klasične infantilne forme i pokazuje veću varijabilnost kliničke slike. U pravilu se javlja kasnije uz prosječan početak u dobi 4-5 godina te ju karakterizira sporije napredovanje bolesti čime klinički podsjećaja na statičke encefalopatije barem u početnom tijeku bolesti, no tipično je pogoršanje u drugom desetljeću života. Očituje se nestabilnošću u hodu ili ataksijom poput infantilne forme bolesti, ali češće dominira kašnjenje u razvoju govora ili smanjena socijalna komunikacija čime djeca imaju određena obilježja klasičnog autizma. Psihomotorna regresija, progresivna distonija i dizartriya, psihijatrijski poremećaji, spasticitet, kontraktуре zglobova se javljaju uz napredovanje bolesti. Nistagmus i optička atrofija su prisutni, a neki bolesnici imaju i epilepsiju. Nalaz cerebelarne atrofije i glioze može biti znak na MR mozga dok je nakupljanje željeza gotovo uvijek prisutno te uključuje i globus palidus i substanciju nigru. U PLAN-u koji počinje u dječjoj dobi brzi ritam u EEG-u nije prisutan, no nalaz epileptiformne aktivnost jest ako dijete ima i epilepsiju. Vidni evocirani potencijali pokazuju produljene latencije i snižene amplitude potencijala. U pravilu su EMG i elektroretinogram uredni. Nalaz biopsije je identičan kao kod infantilne forme.

PLAN koji počinje u odrasloj dobi je u literaturi poznat kao adultna distonija-parkinsonizam ili PARK14 i uključuje za sada malu skupinu bolesnika koji pokazuju znatno preklapanje s Kufo-Rakebovim sidromom. Svi do sada objavljeni bolesnici bili su iz obitelji s konsagvinitetom i svi su imali homozigotne *missense* mutacije gena *PLA2G6*. Klinički ih karakterizira distonija-parkinsonizam s hipomimijom lica, generaliziranim rigiditetom, tremorom u mirovanju, bradikinezijom i distonijom s početkom u kasnoj adolescenciji ili u odrasloj dobi. Evolucijom bolesti se pojavljuju

piramidni znaci i abnormalnosti okulomotorike. Brzo kognitivno propadanje i promjene ličnosti su dio kliničke slike, dok se cerebelarni znaci i simptomi ne opisuju. MR mozga je u početku negativna, a kasnije su promjene nespecifične i uključuju generaliziranu atrofiju ili promjene signala bijele tvari periventrikularno, dok se cerebelarne ili promjene bazalnih ganglija ne opisuju.

Aceruloplazminemija

Aceruloplazminemija je autosomno-recesivni nasljedni poremećaj kojeg uzrokuje nedostatak ceruloplazmina. Ceruloplazmin je alfa 2 glikoprotein koji se sintetizira u jetri i na koji je vezano više od 95% bakra u plazmi. Ima i feroooksigenaznu aktivnost i katalizira pretvorbu fero u feru formu željeza tijekom prijenosa na transferin. Smatra se da je interakcija ceruloplazmina s feritom ključna za ugradnju željeza. Potpuni nedostatak ceruloplazmina dovodi do nakupljanja fero željeza i u retikuloendotelnim i u parenhimskim stanicama. Mutacije gena za ceruloplazmin (*Cp*) na kromosomu 3q rezultiraju kliničkom slikom šećerne bolesti, pigmentne degeneracije retine, ekstrapiramidnim znacima, cerebelarnom ataksijom i demencijom. Patohistološki se nalazi nakupljanje željeza u jetri, gušterači, retini i središnjem živčanom sustavu gdje je prisutan značajan gubitak neurona u neostriatumu, nukleus dentatusu i talamusu. Iako točna patogeneza oštećenja mozga u aceruloplazminemiji nije jasna, čini se da željezom posredovani oksidativni stres doprinosi propadanju neurona. Posljedični neurološki simptomi su odraz specifičnog mjesta neurodegeneracije i odlaganja željeza. MR mozga ukazuje na te abnormalnosti vrlo izraženim hipointenzitetima na T2 mjeranim snimkama u putamenu, nukleusu kaudatusu i nukleusu dentatusu što je odraz odlaganja željeza.

Neuroferitinopatija

Neuroferitinopatija je progresivna bolest kretanja koja počinje u odrasloj dobi a uzrokovana je mutacijama u genu za laki lanac feritina (*FTLI*). Do danas su opisane četiri patogene mutacije pri čemu je upravo prvo otkrivena, mutacija 460InsA prisutna u većine oboljelih. Ta promjena pomiče okvir čitanja kod transkripcije, produljuje peptid i remeti terciarnu strukturu te uzrokuje akumulaciju feritina i željeza prvenstveno u neuronima središnjeg živčanog sustava. Neuroferitinopatija je primjer direktne veze između poremećene pohrane željeza i neurodegeneracije. Na temelju nevelikog broja do sada objavljenih kliničkih opisa, ekstrapiramidni poremećaj dominira kliničkom slikom s fokalnom distonijom, korejom ili parkinsonizmom u oboljelih članova obitelji. Tako je neuroferitinopatija jedna od diferencijalnih dijagnoza znatno češćih poremećaja poput idiopatske Parkinsonove bolesti, idiopatske torzijske distonije ili Huntingtonove bolesti. Imajući u vidu da molekularna dijagnostika omogućava brzu potvrdu dijagnoze, jasno je da je ona indicirana u slučaju kliničke sumnje, no imajući u vidu znatno veću prevalenciju Parkinsonove bolesti i distonije, genetski laboratoriji očekuju dobru selekciju bolesnika prije slanja na molekularno testiranje. Dosadašnje analize, većinom u bolesnika s mutacijom 460InsA u genu *FTLI* su pokazale da bolest u pravilu prosječno počinje u dobi od 40-tak godina (13 do 63 godine) s korejom u većini oboljelih, fokalnom distonijom donjih ekstremiteta i u manjem broju parkinsonizmom. Mnogi oboljeli imaju krivo postavljenu obiteljsku dijagnozu Huntingtonove bolesti. Progresija bolesti je nemilosrdna dovodeći u idućih 5 do 10 godina do afonije, disfagije i teškog motornog oštećenja uz subkortikalnu/frontalnu kognitivnu disfunkciju kao kasni znak. Akcijska facijalna distonija je karakteristična i javlja se u 65% bolesnika, a u većine njih ses vidi asimetrija

simptoma. Vrijednosti serumskog feritina su niske u većine muških i postmenopauzalnih žena, a unutar referentnih vrijednosti u žena generativne dobi. MR mozga pokazuje abnormalnosti u svih zahvaćenih, a ponekad čak i u presimptomatskih nositelja. Za pomoć u diferencijalnoj dijagnozi se pokazalo da je izolirani parinsonizam rijedak u neuroferitinopatiji, a za razliku prema Huntingtonovoj bolesti kognitivne promjene su odsutne ili vrlo diskretne u ranim stadijima neuroferitinopaije. Snižene vrijednosti feritina bi mogle biti test probira uz MR mozga te tako selekcionirati bolesnike za ciljanu genetsku obradu.

Neurodegeneracija vezana uz hidroksilazu masnih kiselina

U skupini do tada nediferenciranih NBIA bolesnika 2010. izdvojen je novi entitet nazvan engl. *fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration* (FAHN) uzrokovan mutacijama u genu za hidroksilazu masnih kiselina *FA2H*. Mutacije u genu *FA2H* su već ranije opisivane u bolesnika s hereditarnom spastičnom paraplegijom SPG35 te u progresivnoj obiteljskoj leukodistrofiji, a sada su dokazane i u određenoj populaciji bolesnika s NBIA. Gen *FA2H* kodira 2-hidroksilazu masnih kiselina koje se tako hidrosilirane inkorporiraju u 2-hidrozydilceramid i 2-hidroksiceramid. Ti spojevi imaju važnu ulogu u održavanju integriteta mijelinskog omotača. Broj bolesnika s dokazanom mutacijom *FA2H* je za sada mali zbog čega je klinička slika još nedovoljno poznata, no iz do sada opisanih bolesnika može se zaključiti da se bolest manifestira u dobi od 3 do 5 godina nestabilnošću u hodu uz učestale padove te postupnim razvojem spastične parapareze. Djeca imaju i divergentni strabizam, s vremenom razvijaju dizartriju, disfoniju i bradilaliju. Bolest je progresivna, neurološko propadanje napreduje skokovito uz pojavu sve jače ataksije, dizmetrije, distonije, spasticiteta uz gubitak sposobnosti samostalnog kretanja, dok se u nekih javlja i epilepsija. Očne manifestacije uključuju abnormalne pokrete očiju s horizontalnim nistagmusom i okularnom apraksijom, a nalazi se i optička atrofija. Gastrointestinalne komplikacije poput disfagije i ponavljajućih aspiracija indiciraju postavljanje perkutane gastrostome. U odnosu na jako oštećenje motorike postoji relativna ušćuvanost kognitivnih funkcija. Neuroradiološka obrada pokazuje T2 hipointenzitete u globusu palidusu u skladu s predilekcijskim taloženjem željeza, jaku pontocerebelarnu atrofiju te blažu generaliziranu koritkalnu atrofiju, konfluirajuće periventrikularne T2 hiperintenzitete u bijeloj tvari uz stanjenje korpusa kalozuma.

Kufor-Rakebov sindrom

Kufor-Rakebov sindrom (KRS) ili PARK9 karakterizira juvenilni L-dopa reaktivni parkinsonizam s piramidnim znacima, demencijom i supranuklearnom paralizom okulomotora za koji je nedavno otkriveno da je uzorokovan mutacijama u genu *ATP13A2*. Produkt tog gena je veliki lizosomski transmembranski protein koji pripada grupi 5 P-tipa ATPaza. P-tip ATPaze koriste energiju hidrolize ATP-a za stvaranje gradijenta za prijenos iona kroz membrane. Substratna specifičnost proteina ATP13A2 nije točno definirana, no zna se da je ukljućen u transport nekoliko kationa poput mangana, kadmija, nikla i selena iz citosola u lumen lizosoma. Na MR mozga opisane su nedavno promjene u bazalnim ganglijima koje sugeriraju akumulaciju željeza te je tako i ova bolest postala dio spektra NBIA.

Terapijski postupci u bolesnika s NBIA

Za sada ne postoji specifično lijećenje ni za jednu od bolesti ukljućenih u skupinu NBIA. Pali-

jativne medikamentozne i kirurške mjere za uklanjanje simptoma i unapređenje kvalitete života zahtijevaju timsko praćenje. Dobra njega uz adekvatnu prehranu kojom bi se sprječavala opstipacija i gastroezofagealni refluks, te pravovremeno postavljanje perkutane gastrostome za odabrane bolesnike su temeljna pretpostavka održavanja somatskog napretka. Distoniju i spasticitet mogu umanjiti baklofen i triheksifenidil, no učinak im je izrazito individualan. U pravilu kod bolesnika s PKAN-om L-dopa nema učinka dok se u drugim oblicima bolesti u kojima je parkinsonizam jače izražen pokazala korisnom, naročito u varijantama s kasnim početkom simptoma. Učinak kelirajućih lijekova nije dokazan. Liječenje ev. pridružene epilepsije te psihijatrijskih simptoma treba provoditi kao i kod bolesnika u kojih se ne nalazi taloženje željeza u mozgu. Vrlo je važno posvetiti adekvatnu pažnju održavanju motiliteta i sprječavanju deformiteta koštanog sustava te ne odgađati uvođenje ortoza ako je to indicirano. Davanje injekcija botulin toksina je učinkovito kod fokalnih distonija i spasticiteta, a postupci duboke stimulacije mozga usmjereni na globus palidus su također uspješni kod selekcionirane populacije.

Zaključno se može reći da iako za sada nema ciljane terapije koja bi izliječila ili čak usporila napredovanje bolesti, bolesnicima današnje terapijske mogućnosti, iako na razini palijacije, ipak značajno mogu poboljšati kvalitetu života.

Literatura

1. Abbruzzese G, Cossu G, Balocco M i sur. *A pilot trial of deferiprone for neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Haematologica* 2011; u štampi
2. Aggarwal A, Schneider SA, Houlden H i sur. *Indian-subcontinent NBIA: unusual phenotypes, novel PANK2 mutations, and undetermined genetic forms*. *Mov Disord* 2010;25:1424-1431.
3. Burn J, Chinnery PF. *Neuroferritinopathy*. *Semin Pediatr Neurol* 13:176-181.
4. Carriho I, Santos M, Guimaraes A i sur. *Infantile neuroaxonal dystrophy: What's most important for the diagnosis?* *Eur J Paediatr Neurol* 2008;12:491-500.
5. Chinnery PF, Crompton DE, Birchall D i sur. *Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTLI 460InsA mutation*. *Brain* 2007;130:110-119.
6. Clement F, Devos D, Moreau C, Coubes P, Destee A, Defebvre L. *Neurodegeneration with brain iron accumulation: clinical, radiographic and genetic heterogeneity and corresponding therapeutic options*. *Acta Neurol Belg* 2007;107:26-31.
7. Connor JR, Ponnuru P, Wang X-S, Patton SM, Allen RP, Earley CJ. *Profile of altered brain iron acquisition in restless legs syndrome*. *Brain* 2011; 134:959-968.
8. Crompton DE, Chinnery PF, Fey C, Curtis ARJ, Morris CM, Kierstan J i sur. *Neuroferritinopathy: A window on the role of iron in neurodegeneration*. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:522-531.
9. Di Fonzo A, Chien HF, Socal M i sur. *ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease*. *Neurology* 2007;68:1557-1562.
10. Egan RA, Weleber RG, Hogarth P, Gregory A, Coryell J, Westaway SK i sur. *Neuro-ophthalmologic and electrophoretographic findings in pantothenate kinase-associated neurodegeneration (formerly Hallervorden-Spatz syndrome)*. *Am J Ophthalmol* 2005;140:267-274.
11. Garcia-Castineiras S. *Iron, the retina and the lens: A focused review*. *Exp Eye Res* 2010;90:664-678.
12. Gregory A, Hayflick SJ. *Neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Folia Neuropathol* 2005;43:286-296.
13. Gregory A, Hayflick SJ. *Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011;11:254-61.
14. Gregory A, Polster BJ, Hayflick SJ. *Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain*

iron accumulation. *J Med Genet* 2009;46:73-80.

15. Grisoli M, Piperno A, Chiapparini L, Mariani R, Savoiaro M. MR imaging of cerebral cortical involvement in aceruloplasminemia. *Am J Neuroradiol* 2005;26:657-661.

16. Hayflick SJ, Hartman M, Coryell J, Gitschier J, Rowley H. Brain MRI in neurodegeneration with brain iron accumulation with and without PANK2 mutations. *Am J Neuroradiol* 2006;27:1230-1233.

17. Ke Y, Qian ZM. Brain iron metabolism: Neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol* 2007;83:149-173.

18. Koeppen AH. A brief history of brain iron research. *J Neurol Sci* 2003;207:95-97.

19. Kurian MA, McNeill A, Lin JP, Maher ER. Childhood disorders of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Dev Med Child Neurol* 2011;53:394-404.

20. Kruer MC, Hiken M, Gregory A i sur. Novel histopathologic findings in molecularly-confirmed pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Brain* 2011;134:947-958.

21. Kwiatkowski A, Ryckewaert G, Jissendi Tchofo P, Moreau C, Vuillaume I. Long-term improvement under deferiprone in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Parkinsonism Relat Disord* 2011, u štampi.

22. Luscieti S, Santambrogio P, d'Estaintot BL i sur. Mutant ferritin L-chains that cause neurodegeneration act in a dominant-negative manner to reduce ferritin iron incorporation. *J Biol Chem* 2010;285:11948-11957.

23. Madhavi T, Hayflick SJ, Jankovic J. Clinical heterogeneity of neurodegeneration with brain iron accumulation (Hallervorden-Spatz syndrome) and pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Mov Disord* 2004;19:36-42.

24. McNeill A, Birchall D, Hayflick SJ i sur. T2* and FSE MRI distinguishes four subtypes of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Neurology* 2008;70:1614-1619.

25. McNeill A, Chinnery PE. Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Handb Clin Neurol* 2011;100:161-172.

26. Mills E, Dong X, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem* 2010;2:51-64.

27. Moos T, Rosengren Nielsen T, Skjorringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 2007;103:1730-1740.

28. Ohta E, Takiyama Y. MRI findings in neuroferritinopathy. *Neurol Res Int* 2012; doi:10.1155/2012/197438

29. Park J-S, Mehta P, Cooper AA i sur. Pathogenic effects of novel mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) causing Kufor-Rakeb syndrome, a form of early-onset parkinsonism. *Hum Mutat* 2011;32:956-964.

30. Pearce JMS. Neurodegeneration with brain iron accumulation: A cautionary tale. *Eur Neurol* 2006;56:66-68.

31. Polster BJ, Moon YY, Hayflick SJ. Characterization of the human PANK2 promoter. *Gene* 2010;465:53-60.

32. Rana A, Seinen E, Siudeja K i sur. Pantethine rescues a *Drosophila* model for pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6988-6993.

33. Roy CN, Andrews NC. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 2001;10:2181-2186.

34. Schipper HM. Neurodegeneration with brain iron accumulation – Clinical syndromes and neuroimaging. *Biochim Biophys Acta* 2011; u štampi

35. Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *TRENDS Mol Med* 2001;7:103-108.

36. Rouault TA, Cooperman S. Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:142-148.

37. Santoro L, Breedveld GJ, Manganello F i sur. Novel ATP13A2 (PARK9) homozygous mutation in a fam-

ily with marked phenotype variability. *Neurogenetics* 2011;12:33-39.

38. Schenck JF. Magnetic resonance imaging of brain iron. *J Neurol Sci* 2003;207:99-102.

39. Schneider SA, Bhatia KP. Rare causes of dystonia parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010;10:431-439.

40. Timmermann L, Pauls KAM, Wieland K i sur. Dystonia in neurodegeneration with brain iron accumulation: outcome of bilateral pallidal stimulation. *Brain* 2010;133:701-712.

42. Vincze A, Kapas I, Molnar MJ, Kovacs GG. Clinicopathological variability in neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ideggyogy Sz* 2010;63:129-135.

43. Zolkipli Z, Dahmouh H, Saunders DE, Kling Chong WK, Surtees R. Pantothenate kinase 2 mutation with classic pantothenate-kinase-associated neurodegeneration without „eye-of-the-tiger“ sign on MRI in a pair of siblings. *Pediatr Radiol* 2006;36:884-886.

44. Zorzi G, Zibordi F, Chiapparini L i sur. Iron-related images in patients with pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) treated with deferiprone: Results of a phase II pilot trial. *Mov Disord* 2011;26:1755-1759.

Koliko je u Hrvatskoj realna mogućnost trovanja djece olovom?

Silvija Pušeljić, Vesna Milas

Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek

Uvod

Olovo je kemijski element koji u periodnom sustavu elemenata nosi simbol Pb, atomski broj 82, a atomska masa mu je 207,2. Ime je dobio od latinske riječi *plumbum*, što znači tekuće srebro. Metal je sivkasto plave boje, sjajan, mekan, netopiv u vodi, a na zraku potamni od stvorenog zaštitnog sloja oksida i karbonata. Iza željeza i cinka, olovo je najjeftiniji tehnički metal. Vrlo je otrovan, naročito opasan zbog svog kumulativnog efekta. Spojevi su mu također otrovni ako se unesu u organizam. Najčešće olovne rude su cerusit (PbCO_3) i anglesit (PbSO_4). Talište olova vrlo je nisko, $327,5^\circ\text{C}$, a iz rastaljenog olova hlape i daleko ispod vrelišta (1750°C) znatne količine otrovnih olovnih para. Olovo se vrlo brzo otapa samo u nitratnoj i octenoj kiselini koje daju topljive soli, dok fosfatna, kloridna i sulfatna kiselina tvore na površini olova tanak, netopljiv sloj, koji ga štiti od daljnjeg nagrivanja. Olovo je otporno i prema kloru, fluoridnoj kiselini, sadri, vodovodnoj vodi, vlažnom zraku, sumpor-dioksidu, sumporovodik i otopinama sulfata. Neke organske kiseline, alkalne lužine, cement i destilirana ili mekana voda polako ga nagriva.

Metalno olovo upotrebljavalo se već 5000 prije naše ere, jer se na pojedinim mjestima nalazi nagomilano u rudama iz kojih ga je lako dobiti. Stari Egipćani su ga koristili za izradu skulptura, zdjelarstvo i nakit. U antičko doba olovo se naveliko koristilo za izradu oplata brodova i brodskih sidara, u graditeljstvu za povezivanje kamenih blokova i izradu cijevi za dovodenje vode u kuće bogatih, rabilo se u izradi alata, nakita i kućnih potrepština, pa čak i kao dodatak hrani. Trovanje olovom opisano je još u rimsko doba zbog njegove uporabe u slavinama za vodu te za oblaganje kontejnera za čuvanje vina. Alkemičari su vjerovali da je olovo najstariji metal povezan s planetom Saturnom, odakle i naziv saturnizam za trovanje olovom. Već i u ta davna vremena uočeno je da rudari u rudnicima olova obolijevaju, odnosno da je olovo otrovno, no tek u 16. stoljeću liječnik Georgius Agricola u svojoj knjizi »De re metallica« (O rudarstvu) navodi sustavno simptome trovanja olovom kod rudara i topioničara u rudnicima. Tada nije bilo poznato da su već i male količine olova opasne za zdravlje.

Izvori olova

U moderno doba olovo se koristi za obradu konzervi za hranu, u izradi električnih krugova i spojeva zato što se brzo i lako tali, zatim u bojama jer ima vrlo dobru pokrivnu moć, u zaštiti od radijacije zbog svoje velike gustoće, u pogonskom gorivu za poboljšanje učinkovitosti te u baterijama. Od njega se prave akumulatori, plaševi i kablovi, električni osigurači, kemijski uređaji, crpke, cijevi, uređaji otporni protiv sumporne kiseline. Od olova se prave ili se njime podstavljaju posude za skladištenje i prijenos korozivnih kemikalija i plinova. Olovne folije i tube služe za ambalažu, olovne cijevi za vodovodne instalacije, ali i u kiparstvu za lijevanje kipova. Olovo(II)-oksid (PbO_2), teški smeđi, u vodi i nitratnoj kiselini netopljiv prah, jako je oksidacijsko sredstvo,

upotrebljava se u smjesi s crvenim fosforom za plohe na kojima se pale žigice, zatim u pirotehnici, za elektrode i dr. Olovo-nitrat (PbNO_3), bijeli kristalni prah ili veliki prozirni kristali, dobiva se otapanjem olovo(I)-oksida, olovnog bjelila u vrućoj razrijeđenoj nitratnoj kiselini; služi u industriji boja, tiskanju pamuka, kao kemijski reagens i za dobivanje drugih spojeva olova. Olovo-sulfat (PbSO_4), kao mineral anglezit, bijeli kristalni prah teško topljiv u vodi, služi za otežavanje tekstila, za pravljenje firnisa, kao bijela boja. Olovo-arsenat, $\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$, bijel, u vodi netopljiv prah, sredstvo je protiv biljnih štetočina. Olovo-kromat je osnova kromnih boja. Olovo-stearat dodaje se gumi, služi kao podloga za lakove i pri preradi plastičnih masa. Kozmetička industrija, kao i proizvodnja igračaka koriste olovo kao podlogu za proizvod.

Gdje smo izloženi olovu?

Olovo nije sastavni dio organizma i nije potrebno ni za jednu tjelesnu funkciju. U organizam dolazi uglavnom inhalacijom ili ingestijom. Olovo se nalazi u tragovima u gotovo svakoj hrani, kao i u "zdravoj hrani". Smatra se da odrasla osoba svakodnevno u organizam unese oko 300 μg olova, od čega se apsorbira prosječno oko 10%. Vodom u gradskim naseljima prosječni stanovnik unese oko 10 μg /dan olova, od čega odrasle osobe apsorbiraju prosječno oko 10%, a djeca 30%-50%. Ukupna količina olova koja se tijekom života unese u organizam čovjeka iznosi do 200 mg. Gotovo cjelokupno onečišćenje olovom u našem okolišu je posljedica ljudske aktivnosti. Dva su glavna izvora onečišćenja: olovo iz boja, te olovo u tlu iz motornih vozila, a kod odraslih još i onečišćenje na radnome mjestu prvenstveno u industriji baterija, automobilske i metalurške industriji. Premda je posljednjih godina većina razvijenih zemalja gotovo potpuno izbacila iz uporabe olovni benzin, Svjetska zdravstvena organizacija navodi da ga još uvijek koristi gotovo 100 država u svijetu. Budući da se olovo ne raspada niti izgara, sićušne čestice iz automobilskih ispušnih plinova onečišćuju tlo duž cesta, a mi potom udišemo tu olovnu prašinu. Zbog dugotrajne uporabe olovnog benzina, čak je i danas olovo u visokim koncentracijama još uvijek nazočno u tlima, posebice oko cestovnih prometnica. Dopuštena količina olova u tlu je od 50 do 100 mg/kg materije. Nekada su uglavnom industrijski i visoko urbani dijelovi imali povišene koncentracije olova u zraku, a danas i ruralna područja pokazuju sličan trend zbog prijenosa olova vjetrom. Literatura je prepuna podataka o olovu u bojama za kućanstvo koje su se najviše koristile u Americi i kojima su pretežito bila izložena djeca, udisanjem prašine i jedenjem komadića boje. Na sreću u našim područjima se nikada nisu koristile takve boje nego se tradicionalno koristilo gašeno vapno za «krečenje», tj. bojanje zidova. Boje s olovnom komponentom su zabranjene i prestale su se proizvoditi sredinom sedamdesetih godina u Americi tako da do nas nisu nikada niti stigle.

Kakva je opasnost od olovnih cijevi za vodu koje su se nekada koristile, a danas su najčešće zamijenjene plastičnim masama iako su još uvijek u uporabi u brojnim kućanstvima? Izvor olova je tu minimalan i smatra se zanemarivim osim ako voda koja kroz njih teče nije zdravstveno neispravna, tj. ima viši pH od uobičajenog ili sadržava neka druga onečišćenja koja ju čine «kiselom» i mogu otapati olovo iz olovnih cijevi. Prema preporukama klinike Mayo uputno je da se prije korištenja vode iz takvih cijevi mlaz hladne vode pušta barem 30 do 60 sekundi. Vruća voda iz takvih cijevi ne bi se trebala koristiti za piće i kuhanje, posebno ne za pripremanje dječje hrane. Osim toga, postoje još neki manje uobičajeni izvori onečišćenja olovom i to stare konzerve ili iz zemalja bez pozitivnih propisa koje su spajane olovnim slitinama iz kojih se uslijed povišenog

pH hrane olovo otapa, keramičke posude s olovnom glazurom, neki etnički lijekovi, te bojice i igračke tretirane bojama koje sadržavaju olovo.

U novije vrijeme hrvatsko tržište je preplavljeno jeftinim igračkama među koje pripada i dječji pribor za pisanje i crtanje uglavnom s Dalekog istoka, ali i odjeća i obuća. Vrlo često takve stvari su nekontroliranog podrijetla i sadržaja, te mogu sadržavati znatne količine olova. Na proizvodima koja su podrijetlom s Dalekog istoka, a označeni su s CE znači da se proizvode za Europsku uniju te da su kontrolirani i s ispravnim deklaracijama. Neke domaće tvrtke također imaju ugovore i proizvode igračke npr. u Kini (na njima piše *made in China*), ali one podliježu pozitivnim propisima Hrvatske ili EU i istaknuto je da su proizvedene za određenu hrvatsku tvrtku. Dakle, opasnost su uglavnom predmeti bez deklaracija s tezgi i kineskih na malo i veliko trgovina, te onih «sve za 12 kn» i sličnih trgovina. U SAD, koje se smatraju najrigoroznijima po pitanju ispravnosti dječjih proizvoda, dozvoljena granica udjela olova u igračkama je 0,03%, za proizvode namijenjene djeci mlađoj od 12 godina. U Kanadi je u postupku donošenje zakona kojim bi se reguliralo da olovo u proizvodnji igračaka i potrepština za djecu mlađu od tri godine neće smjeti prijeći granicu od 0.009%. U Hrvatskoj prema Zakonu o predmetima opće uporabe (»Narodne novine«, br. 85/06) i pravilniku o ispravnosti i sigurnosti igračaka za izradu metalnih dječjih igračaka ne smiju se koristiti olovo i cink, niti slitina što sadrži više od 1% olova, dok dječje igračke izrađene od elastomera koje pri predviđenoj uporabi dolaze u dodir s usnom šupljinom pripadaju tzv. »Posebnoj kategoriji elastomera«, udio olova u gotovom proizvodu ne smije biti veći 0,01%. Osim igračaka, zakon propisuje korištenje olova u minimalnim količinama i u drugim proizvodima koje djeca stavljaju u usta - slamkama, žličicama, čašicama, dudama, bočicama i slično. Igranje igračkama koje sadrže povećane razine olova ne mora nužno značiti opasnost za zdravlje, ali gutanje olova kroz duže razdoblje preko grickanja igračke i njezina slinjenja te stavljanja u usta, može dovesti do trajnih oštećenja mozga.

Pozornost je potrebna i kod uporabe lijekova i pripravaka «tradicionalne medicine» od kojih se danas neki nalaze i na hrvatskom tržištu:

- Ayurvedska medicina – neki preparati iz tradicionalne Tibetanske medicine.
- Azarcon (greta, alarcon, luiga, Maria Luisa, rueda) sve su sinonimi za fini narančasti prah koji se u državama Latinske Amerike koristi za liječenje bolova u želucu, zatvor, proljev ili povraćanje. Također se koristi i u dojenačkoj dobi kao sredstvo za ublažavanje boli kod nicanja zubi dojenčeta.

Ba-Baw-san - kineski biljni lijek koristi za liječenje abdominalnih dojenačkih kolika.

- Bint Al Zahab – iranski prah u mješavini s medom i maslacom upotrebljava se za umirenje dojenačkih kolika.
- Ghasard - smeđi prah koristi se kao tonik za poboljšanje probave u Indiji.
- Daw tway – u Tajlandu se upotrebljava za umirenje bolova u trbuhu i probavnih poteškoća, sadrži visoke količine olova i arsena.
- Litargirio - poznat kao olovna gleđ, prah u boji breskve koristi se kao dezodorans, posebice u Dominikanskoj Republici.
- Pay-loo-ah – crveni prah iz Vijetnama za liječenje vrućice i osipa
- Surma – indijski crni prah upotrebljava se kod nicanja zubi dojenčeta

- Tibetanski biljni vitamini – koriste se za poboljšanje funkcije mozga

Oprez je potreban i kod uporabe dekorativne kozmetike (ruževi za usne, sjenila, maskare, tuševi za oči) posebice porijekla s Dalekog istoka gdje nema adekvatne kontrole proizvoda. Bojilo kao dominantna sirovina u tom proizvodu, masno je i kao takvo najlakše može nositi tragove metalne nečistoće. Maksimalna dozvoljena količina olova koju kozmetički pripravci mogu otpuštati je 20 mg/kg materijala. Analiza pojedinih proizvoda pokazala je od 10 do 100 puta veću koncentraciju olova u pojedinim kozmetičkim preparatima. Kao i kozmetika, nakit koji se izrađuje u zemljama bez adekvatne kontrole tržišta, nerijetko sadrži visoku koncentraciju olova, koji se kod nošenja vrlo lako otpušta i aporpira putem kože. Oprez je potreban i kod uporabe konzervirane hrane neprovjerenih proizvođača, bez adekvatnih deklaracija (u Americi i Europi je zabranjeno upotrebljavati olovo u konzervama za hranu od početka osamdesetih). Olovom također mogu biti onečišćeni hrana i piće pripremljeni u keramičkim posudama s olovnom glazurom, kakve se obično koriste u nekim dijelovima Azije i Latinske Amerike. Olovna glazura daje keramičkim predmetima glatku, sjajnu površinu, no opasnost je u tome što se olovo može otapati, posebno ako je posude bilo zagrijano ili ako se u njemu nalazilo neko voće i povrće.

Mehanizam djelovanja olova

Olovo može biti organskog ili anorganskog porijekla, a pripada kategoriji teških metala, te nema prirodnu funkciju u ljudskom tijelu. Većina slučajeva trovanja su iz anorganskih izvora istim mehanizmima koji su uključeni u apsorpciju važnih elemenata, kao što su kalcij i željezo. Olovo može ući u tijelo gutanjem, udisanjem ili apsorpcijom preko kože. Olovo se može apsorbirati i kod dojenčeta dojenjem majčinog mlijeka. Proces izlučivanja metala kroz mliječne žlijezde nije još u potpunosti razjašnjen, a vjerojatno se razlikuje od procesa kojim se izlučuju lipofilni spojevi. Olovo iz mlijeka općenito se bolje apsorbira nego iz drugih namirnica. Apsorpcija ovisi o sljedećim čimbenicima:

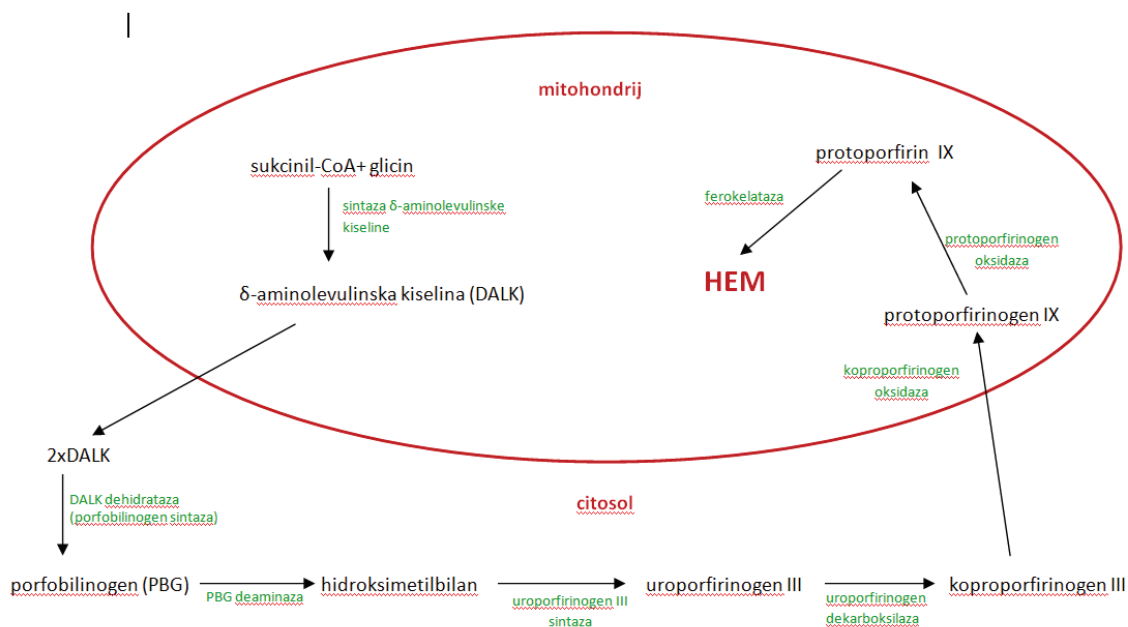
- topljivost - olovne soli su topive u kiselom mediju.
- veličina čestice - veće čestice slabo se apsorbiraju, dok se fine čestice iz prašine vrlo lako apsorbiraju
- nutritivni nedostaci - manjak željeza, kalcija, cinka ili bakra omogućuju bolju apsorpciju olova
- smanjeni unos masti i ulja dovode do povećane apsorpcije olova

Apsorpcija anorganskog olova putem kože je minimalna, dok organsko olovo kao što je tetraetil-olovo (olovni benzin) lako ulazi kroz kožu, te se u tijelu pretvara u trietil-olovo i anorgansko olovo. Kod udisanja benzinskih para sa olovom manja je apsorpcija, jer su čestice velike te češće izazivaju kašalj, no tako iskašljane mogu se progutati te na taj način apsorbirati. Kod adolescenta trovanje olovom može nastati kod udisanja olovnog benzina u svrhu zloporabe. Teški metali mogu izravno oštetiti meka tkiva osobito jetre, bubrega i živčanog sustava. Kad olovo inhalacijom ili ingestijom dospije u cirkulaciju, oko 95% veže se za hem u eritrocitima, a oko 5% se nalazi u plazmi. Na površini eritrocita odlaže se u obliku agregata olovnog fosfata, a vezanjem na tiolske i fosfatne ligande na membranama stanica povećava fragilnost eritrocita. U plazmi se olovo sastoji od dviju frakcija, jedne koja je vezana za proteine plazme, i druge koja je dijalizibilna i predstavlja metabolički aktivni dio ukupne količine olova u tijelu. Otrovnici učinci olova povezani

su s njegovim interakcijama s enzimima, koji su ovisni o nazočnosti slobodnih sulfhidrilnih (SH) skupina s kojima stvara merkaptide, te ih organizam više ne može koristiti za stvaranje hemoglobina i citokroma. Olovo ometa sintezu hema inhibicijom triju enzima koji sadrže SH skupine. To su sintetaza delta aminolevulinske kiseline (S-DALK), dehidrataza delta aminolevulinske kiseline (D-DALK) i hem-sintetaza (ferokelataza). Inhibicijom D-DALK dolazi do zastoja pretvaranja delta aminolevulinske kiseline u porfobilinogen, što ometa dalju sintezu hema. Inhibicija hem-sintetaze (ferokelataze) na unutarnjoj membrani mitohondrija, dovodi do nakupljanja koproporfirina u eritroblastima, te protoporfirina u eritroblastima i eritrocitima. Tu nastaje koproporfinurija, koja je karakteristična za djelovanje olova, a vjerojatno je posljedica intramedularnog propadanja eritroblasta (*grafikon 1*).

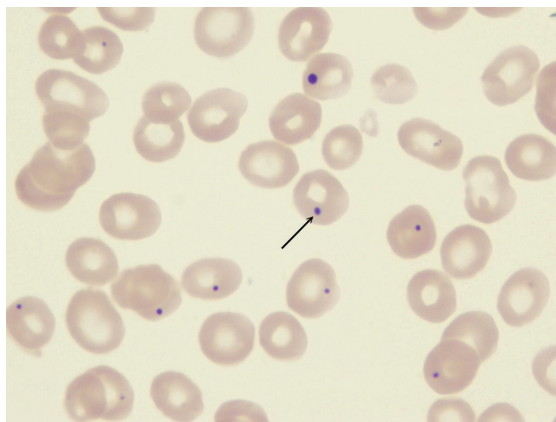
U koštanoj se srži događa obilna proliferacija eritropoeze, te dolazi do promjena u citoplazmi i jezgri eritroblasta. Zbog inhibicije 5-pirimidin nukleotidaze u citoplazmi se u eritroblastima počinju stvarati bazofilne punktacije (ostaci bazofilne citoplazme ranijih nezrelih eritroblasta) (*slika 1*).

Zbog inhibicije hem-sintetaze ostaje veća količina neupotrijebljenog željeza, koje se nakuplja u eritroblastima - sideroblastima, koji mogu biti prisutni u koštanoj srži u visokom postotku čak i do 100%. Osjetljivost organizma čovjeka na učinak olova i inhibiciju sinteze hema je individualna i može biti posljedica genetskog polimorfizma. Osim toga olovo se nakuplja u svim tkivima, posebno u bubrezima gdje izaziva oštećenje proksimalnih tubula bubrega te dovodi do deficita eritropoetina, u jetri, živčanom sustavu gdje interferira s gama-amino maslačnom kiselinom (GABA) te snižava koncentraciju na interneuronskim vezama, u krvi i koštanoj srži, a prolazi i transplacen-



Grafikon 1: Put biosinteze hema: PBG = porfobilinogen; DALK = δ-aminolevulinnska kiselina

tarno. Olovo smanjuje kapacitet tijela da metabolizira vitamin D, a budući da dolazi u obliku sličnom kao i kalcij najviše se nakuplja u kostima i zubima. Skeletni sustav raste i razvija se, te znatna količina olova unešena u organizam u djetinjstvu ostaje pohranjena u kostima tijekom cijelog života. Oko 90% od ukupne količine olova u tijelu nakuplja se u kostima, a sastoji se iz dvaju dijelova: u medularnom dijelu nalazi se izmjenjiva frakcija olova, što predstavlja 1/4 količine, a u korteksu kosti nalazi se neizmjenjiva frakcija, što predstavlja 3/4 količine u kosti odnosno 2/3 količine u cijelom tijelu. Olovo se posebno nakuplja u kostima koje brzo rastu, a to su tibija i femur.



Slika 1: Bazofilne punktacije eritrocita kod trovanja olovom (ostaci bazofilne citoplazme ranijih nezrelih eritroblasta).

Klinički znakovi kod povišene koncentracije olova u krvi

Trovanje olovom je kumulativan proces koji ima nespecifične simptome, pa se olovom možemo trovati godinama, a da na to uopće ne posumnjamo. Nakon ulaska u organizam olovo se krvotokom rasprostire u organe i tkiva, a ponajprije oštećuje krvotvorne organe uzrokujući tzv. olovnu anemiju budući da inhibira sintezu hemoglobina. Uz bljedilo, pojavljuje se i plavosivo obojenje zubnog mesa (»olovni rub«) zbog taloženja čestica olovnog sulfida na tome mjestu. Daljnjim unošenjem olovo se nakuplja u koštanom, moždanom i plućnom tkivu, a djelomice i u bubregu, uzrokujući poremećaje u njihovim funkcijama. Klinička slika koja upućuje na moguće trovanje olovom izrazito je heterogena, a prvenstveno ovisi o vremenu izloženosti i koncentraciji olova u krvi. Postoji veći broj mogućih simptoma trovanja olovom. Kod dugotrajne izloženosti nižim koncentracijama olova dominiraju opći simptomi, no tijekom vremena, čak i niske koncentracije olova mogu imati jako velike posljedice na kognitivni razvoj djeteta. Kratka izloženost visokim koncentracijama olova može imati vrlo dramatičnu kliničku sliku s lošim ishodom. Gastrointestinalni simptomi uključuju bolove u trbuhu s pojavom grčeva (nerijetko mogu biti i prvi znak visoke toksične doze olova), pojavu povraćanja i proljeva ili opstipacije, gubitak apetita. Kod manje djece pri dužoj izloženosti niskim dozama olova pojavljuju se promjene u ponašanju, poremećaji sna, agresija, razdražljivost, glavobolje, smanjenje pažnje, gubitak prethodno usvojenih vještina, usporenje rasta, a kod školske djece neuspjeh u školi, smanjenje kvocijenta inteligencije, poremećaj hoda, oštećenje sluha, te kod akutizacije simptoma uslijed edema mozga dolazi do pojave konvulzivnih ataka, poremećaja svijesti i konačno kome s mogućim smrtnim ishodom. Cerebralne promjene posljedica su degeneracije kortikalnih i ganglijskih neurona. Istraživanja pokazuju da dječji organizam apsorbira i do 50% progutanog ili udahnutog olova, dok je kod odraslih taj postotak znatno niži i obično iznosi od 10% do 15%. Neki simptomi mogu spontano nestati u slučaju da prestane izlaganje olovu, a drugi se mogu pogoršati ako se izlaganje nastavi. Kod odraslih trovanje olovom može izazvati mnoge probleme od povišenog krvnog tlaka i kardiovaskularnih bolesti pa do problema s probavom, oštećenja bubrega, bolova u mišićima i zglobovima, motoričkih

problema, poremećaja raspoloženja i smanjenja fertilnosti kod muškaraca. Posebice rizična skupina su trudnice, dojilje ili žene u menopauzi kod kojih dolazi do jačeg otpuštanja kalcija pa time i olova iz kostiju u krvotok. Olovo također prolazi kroz placentu do fetusa i majčinim mlijekom do dojenčeta. Svjetski centar za kontrolu i prevenciju bolesti iz Atlante (CDC – Center for Disease Control) utvrdio je koncentraciju od 10 µg/dL krvi kao gornju dopuštenu vrijednost iznad koje se počinju javljati značajni problemi. Ipak treba imati na umu da to nije apsolutno pouzdana granica i da ispod nje ne postoji opasno djelovanje olova na organizam. Pri tim i višim koncentracijama vidljivi su poremećaji u učenju, a neke studije pokazuju kako se sa svakim povećanjem od 1 µg smanjuju rezultati standardiziranih testova iz matematike i čitanja. Utjecaj nižih doza također može biti opasan iako su očitovanja slabije vidljiva na pojedincima, tj. ona su subklinička. Takve promjene se prate malim odstupanjima od prosjeka i prate se na većim skupinama. Kliničke promjene uslijed trovanja olovom mogu biti dramatične i dugotrajne. Na žalost trovanje olovom se liječi teško, a posljedice ostaju čak i kada se koncentracija u krvi znatno smanji.

Dijagnostički postupci kod sumnje na trovanje olovom

Danas znamo da čovjek može dnevno primiti u organizam najviše 1 miligram olova. To je količina koja neće izazvati otrovanje. Ako svakodnevno u organizam dospijeva više od 1 mg olova, doći će do postupnog razvoja simptoma trovanja. Olovo i metaboliti koji mogu nastati njegovom kumulacijom u ljudskom tijelu mogu se mjeriti u krvi, urinu, kostima, zubima i kosi. Olovo koje je mjerljivo u cirkulaciji iznosi oko 2% od ukupne količine u tijelu.

Od laboratorijskih parametara potrebno je učiniti kompletnu krvnu sliku gdje može biti prisutna umjerena mikrocitna i hipokromna anemija kao znak deficita željeza s porastom broja retikulocita i bazofilnim punktacijama eritrocita, koji se bolje uočavaju u citološkom razmazu periferne krvi. Bazofilne punktacije eritrocita nisu nužan nalaz i nisu u korelaciji s težinom otrovanja olovom. Svakako je potrebno učiniti dopunske biokemijske testove prvenstveno aminotransferaze, ureju, kreatinin, alkalnu fosfatazu, te izmjeriti serumsku vrijednost kalcija i fosfata. Sinteza hema poremećena je inhibicijom dehidrataze DALC (delta-aminolevulinska kiselina), pa je posljedica takvog djelovanja olova izlučivanje velikih količina DALC u mokraći. Mjerenje porfirina u urinu s posljedičnim pojačanim izlučivanjem ukazuje na toksične efekte na biosintezu hema. Zbog inhibicije hem-sintetaze (ferokelataze) dolazi do nakupljanja koproporfirina sa posljedičnom jakom koproporfinurijom te protoporfinurijom. Aktivnost DALC, koproporfirina i porfirina najpouzdanije je mjeriti u 24 satnom urinu. (tablica 1).

Tablica 1 Vrijednosti delta-aminolevulinata i porfirina u 24 satnom urinu

Metaboliti	Referentni intervali	Jedinica
Uroporfirini	4 do 29	nmol/dU
Ukupni koproporfirini	21 do 119	nmol/dU
Ukupni porfirini	do 120	nmol/dU
Porfobilinogen	do 15	µmol/dU
Delta-aminolevulinat	11,4 do 57,2	µmol/dU

Najpouzdaniji test je mjerenje direktne koncentracije olova u krvi. Serumska koncentracija olova pokazuje trenutnu količinu olova, ali ne i količinu pohranjenu u tijelu. Olovo unešeno u djetinjstvu ostaje pohranjeno cijeli život u kostima. Američka akademija za pedijatriju definirala je trovanje olovom kao vrijednost venske koncentracije olova od 10 µg/dl (0,50 µmol/L). Ova koncentracija često se i pogrešno tumači kao toksikološki prag, iako su istraživanja pokazala intelektualna oštećenja kod djece sa serumskom razinom olova i manjom od 10 µg/dl (*tablica 2*). U Hrvatskoj olovo kao i druge teške metale u krvi moguće je odrediti atomskom apsorpcijskom spektrometrijom pri Zavodima za javno zdravstvo pojedine županije, a ova pretraga u nadležnosti je službe za ekologiju.

Kosa uz masno tkivo predstavlja skladište tvari koje cirkuliraju u organizmu. Kosa raste oko jedan centimetar svaki mjesec, tako da teoretski analizom dva centimetra kose pri tjemenu možemo dobiti uvid u koncentraciju teških metala unutar dva zadnja mjeseca. Analizom olova u kosi neki laboratoriji nude procjenu dugotrajnog izlaganja toksičnim elementima kako na radnom mjestu, tako i u školi, kući ili okolišu. Samo testiranje provodi se uzimanjem dva centimetra nebojene i drugim kemikalijama ne tretirane kose, očišane uz tjeme. Ipak tumačenje analitičkih podataka predstavlja složen problem budući da su elementi u tragovima u ljudskoj kosi pod utjecajem brojnih čimbenika, uključujući dob i spol, rasu kao i mjesto boravka. Važno je stoga da se svi ovi čimbenici uzmu u obzir. Zapravo nema jasne suglasnosti koja je to koncentracija olova izmjerena u kosi, koja bi se smatrala jasno patološkim nalazom, prvenstveno radi jakog utjecaja vanjskih čimbenika koji su vrlo promjenjivi, a taj je faktor praktički nemoguće kontrolirati. Čak i tamo gdje je bilo moguće kontrolirati vanjske utjecaje podaci pokazuju da sadržaj olova u kosi ne korelira s koncentracijama u serumu. Multicentrične studiju pokazuju veliku varijabilnost u nalazima izmjerenima u kosi kod osoba bez znakova trovanja, kao i bez pratećeg porasta vrijednosti olova u serumu (od 3,5 do 67 ppm – *part per million*). Većina autora se slaže da analiza kose nije koristan postupak, a u mnogim slučajevima ona daje podatke koji nas mogu dovesti u zabludu. Djelatnosti laboratorija koji oglašavaju i daju takve analize na komercijalnoj osnovi za sada su prihvaćeni sa skepsom. Ovu pretragu moguće je učiniti i u nekim privatnim laboratorijima u Hrvatskoj.

Osim laboratorijskih metoda standardna radiografija također može otkriti neka tipična obilježja trovanja olovom. Važno je napomenuti da uredan radiografski nalaz skeleta ne isključuje otrovanje olovom. Olovo se posebno nakuplja u kostima koje brzo rastu, a to su tibija i femur, te se i

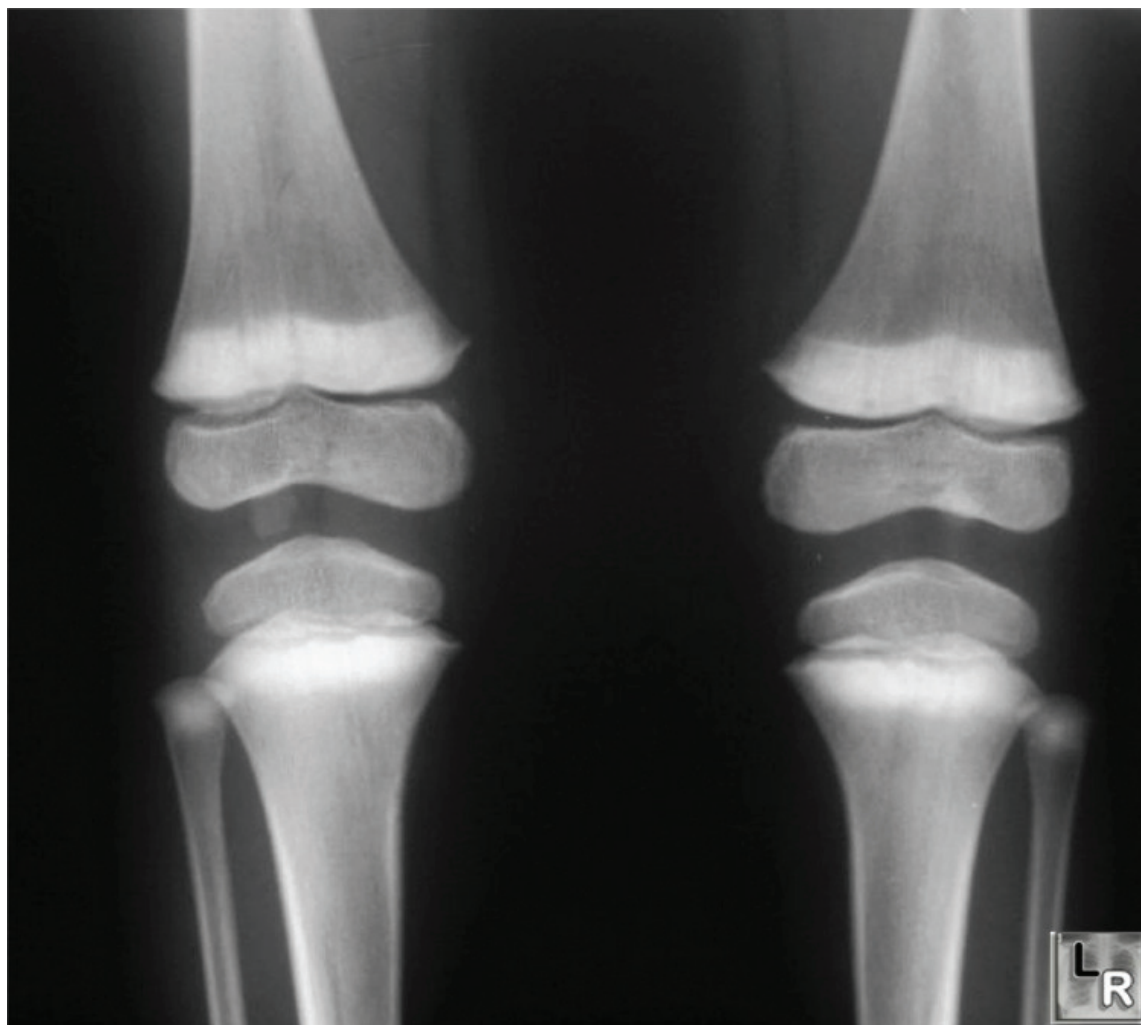
Tablica 2 Vrijednosti serumske koncentracije olova i moguće kliničke promjene kod djece.

Koncentracija olova u krvi (µg/dl)	Kliničke manifestacije kod djece
do 10	Kod fetusa – niska porođajna težina Kod djece: smanjen IQ, poremećaj sluha, rasta, mišićna atonija, poremećaji ponašanja
20 - 40	Poremećaj metabolizma kalcija i vitamina D, poremećaj rasta i razvoja kostiju, smanjenje IQ, oštećenje motorike
41 - 50	Anemija, smanjen IQ, poremećaj sluha, rasta, anemija, bolovi u trbuhu
51 - 100	Kolike, anemija, oštećenje bubrega, oštećenje mozga, encefalopatija
više od 100	Smrt

standardni radiogram područja koljenskog zgloba koristi u dijagnostici. Može se naći šira linija pojačane gustoće u području metafize dugih kostiju, no nalaz je neophodno interpretirati u sklopu kliničke slike i pripadajućih laboratorijskih nalaza jer sličnu sliku možemo naći i kod trovanja drugim teškim metalima, hipervitaminoze D ili rahitisa (*Slika 2*). Slikovni prikaz središnjeg živčanog sustava magnetnom rezonancom (MR) ili kompjuteriziranom tomografijom (CT) nije specifičan za trovanje olovom. Kod teških otrovanja nalazimo sliku nespecifične encefalopatije, može se naći edem mozga, zone mikrokrvarenja, odnosno točkaste kalcifikacije na CT-u. Kod kronične izloženosti nalazimo promjene bijele tvari, područja hipointenziteta u T1 mjernoj slici na MR-u.

Terapijski pristup povišenoj vrijednosti olova u krvi

Kod niskih vrijednosti olova u krvi od 10 $\mu\text{g/dl}$ ili manje terapijski pristup obuhvaća uklanjanje toksina, odnosno izloženosti, adekvatnu prehranu te praćenje serumske vrijednosti olova. Konz-



Slika 2. RTG koljenskog zgloba kod otrovanja olovom - šira linija pojačane gustoće u području metafize dugih kostiju

miranje hrane bogate kalcijem, željezom i vitaminom C, pomaže smanjenju apsorpcije olova. Kalcij se natječe s olovom za apsorpciju u probavnom sustavu, željezo korigira nastalu anemiju, kao posljedicu inhibicije sinteze hema, vitamin C pospješuje apsorpciju željeza. Osim toga namirnice koje sadrže cink, vitamin E i tiamin smanjuju toksični učinak olova.

Liječenje trovanja olovom danas je vrlo uspješno primjenom kelata koji se spajaju s olovom u kompleksni spoj koji se izlučuje preko bubrega i simptomi trovanja brzo iščezavaju. Kod djece ovaj terapijski pristup provodi se tek kod značajno povišene koncentracije olova, odnosno iznad 45 µg/dl. Kontroverzni su stavovi o pokušaju liječenja asimptomatske ili oligosimptomatske djece primjenom kelata s koncentracijom olova u krvi ispod 45 µg/dl. Američka akademija za pedijatriju smatra da se terapija kelatima ne preporuča rutinski ukoliko je koncentracija serumskog olova ispod 45 µg/dl. Preporuča se uzorak ponoviti nakon 48 sati, te ako se potvrdi koncentracija od 45 µg/dl i više, obavezno pokušati pronaći izvor trovanja te započeti liječenje. Kelacija je terapijski postupak kojim se iz organizma olakšano uklanjaju teški metali, osobito olovo, aluminij, arsen, bakar, željezo i živa, te radioaktivni elementi uran i plutonij. Za kelacijsku terapiju koriste se spojevi etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA), dimerkaptosukcinička kiselina (DMSA), 2,3-dimerkapto-1-propansulfonična kiselina (DMPS) i alfa lipoička kiselina (ALA). Kelirajući agens se može primijeniti intravenozno, intramuskularno ili oralno. Nakon što kelirajući agens na sebe veže teški metal on se izluči iz tijela, no u isto vrijeme iz organizma se izlučuju i važni vitamini, prvenstveno C i E, te ih je neophodno nadoknaditi.

Za vrijednosti od 45 µg/dl do 69 µg/dl kod djece može se primijeniti oralna terapija, a za vrijednosti 70 µg/dl i više obavezna je hospitalizacija i intravenozna primjena terapije. Kod djece se oralno najčešće primjenjuje DMSA, a preporuke za doziranje variraju. Za manju djecu doza je 10 mg/kg svakih osam sati tijekom pet dana, a potom se smanjuje doza na dva puta dnevno tijekom dva tjedna. Ciklus se ovisno o nalazu može i ponoviti. Kod ovakvog oblika primjene česte su gastrointestinalne nuspojave. Za odrasle i stariju djecu preporučuje se režim od 100 mg tri puta dnevno, ali da se uzima svaki drugi dan, te da se provodi u trajanju od najmanje pet tjedana. Tada su bitno manje izražene neugodne nuspojave. Nakon završene terapije tijekom slijedeća tri tjedna potrebno je provjeriti vrijednost olova u krvi. Oralno se može primijeniti i EDTA ali se samo 4% do 18% oralne doze apsorbira, stoga nije terapija izbora za oralnu primjenu u dječjoj dobi. Za vrijednost olova u krvi od 70 µg/dl i više obavezna je hospitalizacija i intravenozna primjena terapije, a izbor je parenteralna primjena EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) koja se daje kao kontinuirana infuzija ili kao intramuskularne injekcije. EDTA je u postupak kelacije uvedena još 40-tih godina prošlog stoljeća za radnike tvornice akumulatora, a do danas je objavljeno više od 1800 znanstvenih članaka o uporabi EDTA kod trovanja teškim metalima. Za djecu je preporuka da terapiju provodi liječnik iskusan u postupcima kelacije, a preporučena doza za intravensku primjenu je 1-1,5 g/m²/d kao kontinuirana infuzija tijekom 8 do 24 sata ukupnog trajanja 5 dana. Brza infuzija EDTA može biti smrtonosna zbog naglog povećanja intrakranijalnog tlaka u bolesnika koji već imaju cerebralni edem. Najčešće nuspojave odnose se na akutno nastalu hipotenziju, mučninu, povraćanje, proljev, te grčevite bolove u trbuhu. Važna je svakodnevna kontrola krvne slike radi moguće depresije koštane srži s pojavom pancitopenije. EDTA je nefrotoksičan spoj te može izazvati akutnu tubularnu nekrozu. Tijekom infuzije može doći do pojave febriliteta,

zimice, teške mialgije, artralgijske, te histaminske reakcije kao što je pojava crvenila, znojenja, kihanja i nosne kongestije. EDTA uklanja samo ekstracelularno nakupljeno olovo te ne može vezati ono koje je nataloženo u stanicama stoga je preporuka da se uvijek koristi u kombinaciji sa dimerkaprolom (BAL) koji se primjenjuje intramuskularno od drugog dana terapije EDTA u dozi od 4 mg/kg (75 mg/m²) kao početna doza, a od drugog do sedmog dana 3 mg/kg (50 mg/m²) svaka 4 sata. Terapiju kelatima uputno je da vodi osoba koja ima iskustva u primjeni ovih spojeva, odnosno da se ti bolesnici koncentriraju na jednom mjestu, radi adekvatnog nadzora.

Zaključak

Izvori olova izrazito su raznovrsni, te nije teško doći u kontakt s istima bilo inhalacijom, ingestijom ili apsorpcijom putem kože. Poznato je da povišene serumske koncentracije olova dovode do smanjenja kvocijenta inteligencije, oštećenja fizičkog i mentalnog razvoja, kao i drugih sustavnih promjena. Možemo li simptome hiperaktivnosti, autizma, poremećaja ponašanja i slične kod djece u Hrvatskoj povezati s mogućim toksičnim učincima teških metala ostaje otvoreno pitanje. Nema sustavne epidemiološke studije o serumskoj koncentraciji olova kod djece u Hrvatskoj, stoga niti nemamo poznatu stvarnu incidenciju. Povećana koncentracija olova u krvi prema sustavnom istraživanju u Americi (uključujući djecu i odrasle) izmjerena je kod oko 3,5 milijuna ljudi. Koliki je taj broj u Hrvatskoj?

Literatura:

1. Flora SJ. Lead exposure: health effects, prevention and treatment. *J Environ Biol* 2002;23(1):25-41.
2. Piomelli S. Childhood lead poisoning. *Pediatr Clin North Am* 2002;49(6):1285-304.
3. McGuigan MA. Chronic poisoning: Trace metals and others. In: Goldman L, et al. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2008.
4. Centers for Disease Control and Prevention, et al. Recommendations for blood lead screening of Medicaid-eligible children aged 1-5 years: An updated approach to targeting a group at high risk. *MMWR*. 2009;58:1.
5. Meyer PA, Brown MJ, Falk H. Global approach to reducing lead exposure and poisoning. *Mutat Res* 2008;659(1-2):166-75.
6. Interpreting and managing blood lead levels < 10 microg/dL in children and reducing childhood exposures to lead: recommendations of CDC's Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2007;56:1-16.
7. Woolf AD, Goldman R, Bellinger DC. Update on the clinical management of childhood lead poisoning. *Pediatr Clin North Am*. Apr 2007;54(2):271-94.
8. Mennel EA, John SD. Osteosclerotic metaphyseal dysplasia: a skeletal dysplasia that may mimic lead poisoning in a child with hypotonia and seizures. *Pediatr Radiol* 2003;33(1):11-4.
9. Tuzun M, Tuzun D, Salan A, Hekimoglu B. Lead encephalopathy: CT and MR findings. *J Comput Assist Tomogr* 2002;26(3):479-81.
10. Hu H, Milder FL, Burger DE. X-ray fluorescence measurements of lead burden in subjects with low-level community lead exposure. *Arch Environ Health* 1990;45(6):335-41.
11. Trope I, Lopez-Villegas D, Lenkinski RE. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of regional brain structure in a 10-year-old boy with elevated blood lead levels. *Pediatrics* 1998;101(6):7.
12. Trope I, Lopez-Villegas D, Cecil KM, Lenkinski RE. Exposure to lead appears to selectively alter metabolism of cortical gray matter. *Pediatrics* 2001;107(6):1437-42.
13. Zou HJ, Ding Y, Huang KL, et al. Effects of lead on systolic and diastolic cardiac functions. *Biomed*

Environ Sci 1995;8(4):281-8.

14. Tutar HE, Atalay S, Uysalel A, et al. Recurrent pericardial effusion due to gunshot wound of the heart in ahemodynamically stable child--a case report. *Angiology* 1999;50(4):337-40.

15. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Lead exposure in children: prevention, detection, and management. *Pediatrics* 2005;116(4):1036-46.

16. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Lead. In: *Handbook of Pediatric Environmental Health*. American Academy of Pediatrics. Elk Grove, IL: AAP; 1999:131-43.

17. Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, et al. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med* 2003;348(16):1517-26.

18. CDC. Screening Young Children for Lead Poisoning. Guidance for State and Local Public Health Officials. Atlanta, GA: United States Department of Health and Human Services; 1997.

19. Rogan WJ, Dietrich KN, Ware JH, et al. The effect of chelation therapy with succimer on neuropsychological development in children exposed to lead. *N Engl J Med* 2001;344(19):1421-6.

20. Lanphear BP, Winter NL, Apetz L, Eberly S, Weitzman M. A randomized trial of the effect of dust control on children's blood lead levels. *Pediatrics* 1996;98(1):35-40.

21. Florin TA, Brent RL, Weitzman M. The need for vigilance: the persistence of lead poisoning in children. *Pediatrics* 2005;115(6):1767-8.

22. Koller K, Brown T, Spurgeon A, Levy L. Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children. *Environ Health Perspect* 2004;112(9):987-94.

23. Lanphear BP, Hornung R, Ho M. Screening housing to prevent lead toxicity in children. *Public Health Rep* 2005;120(3):305-10.

24. Markowitz M. Lead poisoning. *Pediatr Rev* 2000;21(10):327-35.

25. Schaffer SJ, Campbell JR. The new CDC and AAP lead poisoning prevention recommendations: consensus versus controversy. *Pediatr Ann* 1994;23(11):592-9.

26. Tong S, von Schirnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ* 2000;78(9):1068-77.

27. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti predmeta širokepotrošnje te zdravstvenoj ispravnosti i sigurnosti igračaka. *Narodne novine* 2006; br.85

28. Grier MT, Meyers DG. So much writing, so little science: a review of 37 years of literature on edetate sodium chelation therapy. *Ann Pharmacother*. 1993;27:1504-1509.

29. Questions and answers on edetate sodium. FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2008.

Tomas L. Clinical laboratory diagnostics. Ed. Th-Books. Verlagsgesellschaft, Frankfurt, Germany 1998;448-462

Brojna lica i dijagnostički izazovi Wilsonove bolesti

Jurica Vuković, Lana Omerza

Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta u Zagrebu,
Kišpatićeva 12, Rebro, 10000 Zagreb

Wilsonova bolest nastaje zbog mutacija gena ATP7B kojemu je genski produkt enzim (adenozin trifosfataza) prijenosnik bakra kako u ceruloplazmin, tako i u žuč. Njegov je manjak odgovoran za prekomjerno nakupljanje bakra u raznim organima (jetra, bazalni gangliji, rožnica, eritrociti, bubrezi). Nasljeđuje se autosomno-recesivno.

Bolest je dobila ime po američkom neurologu Kinnearu Wilsonu koji je još 1912. opisao karakterističnu kliničku sliku.

Klinička slika i patogeneza

Iako nemogućnost bilijarne ekskrecije bakra postoji od rođenja, prava je rijetkost susresti klinički manifestnog bolesnika prije 5. godine života.

Nakon što se zasiti jetreni kapacitet za akumuliranje bakra u lizosomima, on se u svojoj slobodnoj formi počinje akumulirati u CNS-u, korneji, bubrežima i drugim organima. Toksičnost bakra osniva se na njegovu prooksidacijskom djelovanju s pojačanim stvaranjem hidroksilnih slobodnih radikala i oštećenjem staničnih organela. U skladu s tim do desete godine života u više od 80% bolesnika dominira jetrena slika bolesti, da bi se do završetka adolescencije taj odnos približio uobičajenom u odraslih.

Klinička slika jetrene bolesti je najrazličitija, od asimptomatske hepatomegalije, akutnog i/ili fulminantnog hepatitisa preko kroničnog hepatitisa (najčešća prezentacija u pedijatrijskoj populaciji) do dekompenzirane ciroze. Neurološke i psihijatrijske smetnje najčešće se razvijaju prikriveno, obično ne prije adolescentne dobi (sve veće teškoće u školovanju, promjene ponašanja, intencijski tremor, disartrija). Kaiser-Fleischerov prsten (tamnozelen pigmentacija na periferiji rožnice) patognomoničan je, ali i često odsutan u bolesnika koji nemaju neurološke simptome.

Značajka je bolesti velika varijabilnost u vremenu pojavljivanja tegoba i u težini kliničke slike. To je dijelom posljedica velikog broja (preko 300) mutacija istoga gena (alelna heterogenost), ali i drugih čimbenika, budući da se i bolesnici s istim genotipom mogu fenotipski jako međusobno razlikovati.

Iza desete godine života nije rijetka inicijalna prezentacija sa slikom Coombs-negativne hemolitičke anemije. Prisutnost ili renalne, ili hematološke ili endokrinološke bolesti uz jetrenu bolest obvezuje nas na aktivno traženje Wilsonove bolesti. Postoji i konsenzus da svakog adolescenta koji se prezentira s jasnom psihijatrijskom patologijom treba obraditi u tom smislu.

Dijagnostički postupak

Nema obrade koja će s potpunom sigurnošću potvrditi dijagnozu. To posebno vrijedi za tzv. asimptomatske slučajeve (oni sa slučajno otkrivenim poremećenim jetrenim nalazima prilikom rutinskog laboratorijskog ispitivanja i članovi obitelji u kojoj prvi rođak ima Wilsonovu bolest). Nema ni jednoznačno specifičnog biokemijskog nalaza. Niska koncentracija serumskog ceruloplazmina (manja od 0,2 g/L) upućuje tek na potrebu mjerenja kupriurije u 24-satnom urinu. U neonatalnoj dobi koncentracija ceruloplazmina normalno je značajno niža (0,05-0,26 g/l) i raste tijekom prvih godina života. Vrijednosti normalne za odraslu dob postižu se tek tijekom adolescencije. Ceruloplazmin je i protein akutne faze upale pa je povišen u svim upalnim stanjima. Koncentracija ceruloplazmina ispod 0,05 g/l smatra se dijagnostički značajnom, ali s druge strane u kroničnoj jetrenoj insuficijenciji bilo kojeg uzroka smanjena je sinteza proteina pa tako i ceruloplazmina.

Gubitak proteina crijevom, malapsorpcijski sindromi kao i nefrotski sindrom također uzrokuju smanjenje koncentracije ceruloplazmina u serumu. Normalna kupriurija manja je od 40 µg/24h, a koncentracija bakra veća od 100 µg/24h upućuje na moguću Wilsonovu bolest. Ako je kupriurija značajna, potrebno je učiniti pokus s jednodnevnom davanjem penicilamina u ukupnoj dozi od 750 mg/m² tjelesne površine, podijeljeno u dva davanja. Ako se utvrdi peterostruko do deseterostruko povećanje izlučivanja bakra mokraćom, Wilsonova bolest je vrlo vjerojatna. Idući je korak biopsija jetre: histološke promjene nemaju specifičan karakter, ali povećana koncentracija bakra u bioptatu jetre (>250 mikrog/g suhe tvari) potvrđuje dijagnozu Wilsonove bolesti.

Nekadašnji kriterij o obavezno sniženoj koncentraciji serumskog ceruloplazmina nije više valjan, ali se čini da koncentracije iznad 0,35 g/L s velikom vjerojatnošću isključuju bolest. Koncentracija serumskog bakra nije pouzdan ključ za dijagnozu.

Svi članovi uže obitelji bolesnika trebali bi proći biokemijske pretrage na presimptomatsku Wilsonovu bolest (ceruloplazmin, 24-satna kupriurija).

Dijagnozu temeljimo na sniženim serumskim vrijednostima ceruloplazmina, povećanoj bazalnoj kupriuriji, značajnom povećanju kupriurije nakon opterećenja penicilaminom i određivanju koncentracije bakra u suhoj tvari jetre. Egzaktne laboratorijske vrijednosti ovih pretraga koje predstavljaju jasnu crtu razdjelnice između bolesti i zdravlja do dana današnjeg stalan su predmet reevaluacije pogotovu u svjetlu genotipske varijabilnosti bolesti uočene od otkrivanja gena ATP7B 1993. godine.

U dilemi koja je nerijetka pribjegavamo i genetskom testiranju na najčešću mutaciju u ovim krajevima (His1069Glu9). Prisustvo neurološke simptomatologije uz odgovarajući nalaz magnetske rezonancije mozga, te prisustvo Kaiser-Fleischerovog prstena rijetke su prigode kad je postavljanje dijagnoze značajno jednostavnije.

Liječenje

Penicilamin dan peroralno bolesnicima s Wilsonovom bolešću višestruko pojačava ekskreciju

bakra urinom. Wilsonova bolest postala je tako prva nasljedna metabolička bolest koja se (od godine 1956.) farmakološki učinkovito liječi. Penicilamin u dozi od 750 mg/m² tjelesne površine na dan (ili 20 mg/kg/dan), podijeljeno u dva davanja, standardni je oblik liječenja djece. Budući da je penicilamin antimetabolit vitamina B₆, treba istodobno davati i taj vitamin.

Bolesnici koji zbog (rijetkih) nuspojava ne podnose penicilamin mogu se liječiti trietilen-tetramin-dihidrokloridom. Cinkov acetat još je jedna terapijska mogućnost. Dijetni režim ovih bolesnika mora isključivati svu hranu bogatu bakrom (jetra, morske školjke i rakovi, orasi, kikiriki, kakao, čokolada). Trebaju piti vodu u kojoj koncentracija bakra ne prelazi 0,1 mg/L.

Kelacijska terapija cinkom, iako atraktivna po obrascu učinkovitosti i netoksičnosti još se treba dugoročno i nedvojbeno dokazati kao lijek izbora pa je u našoj populaciji d-penicilamin još uvijek prvi lijek izbora u liječenju Wilsonove bolesti koja se očituje jetrenom bolešću.

Prognoza

Bolesnici koji se pojave sa slikom fulminantnog hepatitisa imaju najlošiju prognozu i čak u slučaju pravodobne transplantacije jetre mortalitet je oko 50%. Svi neliječeni bolesnici s drugim oblicima Wilsonove bolesti također će umrijeti zbog komplikacija bolesti. Prognoza uspjeha liječenja u različitim stadijima bolesti individualna je i ovisi o stupnju uznapredovalosti u času početka liječenja; ako liječenje počne u subkliničkoj fazi bolesti, progresija bude potpuno zaustavljena.

Literatura

1. Loudainos G, Gitlin JD. Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 2000 (3); 353-364
2. Roberts EA, Schilsky ML. *Diagnosis and Treatment of Wilson Disease: An Update Hepatology* 2008; 2089-2111.
3. Senečić-Čala I, Votava-Raić A, Dujšin M, Tješić-Drinković D, Omerza L, Vuković J. Bolesti na koje često mislimo, a rijetko ih nalazimo. U Tješić-Drinković D, Barišić N, Vuković J, ur. *Prepoznamo jetrene bolesti na vrijeme. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb* 2010; 37-49.
4. Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:157-65.
5. Iorio R, D'Ambrosi MD, Marcellini M et al. Serum transaminases in children with Wilson's disease. *JPGN* 2004;33:1-6.
6. Koppikar S, Dhawan A. Evaluation of the scoring system for the diagnosis of Wilson's disease in children. *Liver Int* 2005, 25:680-1.
7. Manolaki N, Nikolopoulou G, Daikos GL et al. Wilson disease in children: Analysis of 57 cases. *JPGN* 2008;48:72-7.
8. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 2007;56:115-20.
9. Nicastro E, Ranucci G, Vajro P et al. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology* 2010;52(6):1948-56.

Dječak s fibrozom jetre i povećanom količinom bakra u jetri- prikaz bolesnika

Alemka Jaklin Kekez

Referentni centar za dječju gastroenterologiju i prehranu, Klinika za dječje bolesti Zagreb, KBC Sr. Milosrdnice, Klaićeva 16, Zagreb

Metabolizam bakra i poremećaji vezani za bakar

Bakar je jedan od elemenata u tragovima, normalno prisutan u organizmu. U pravilu je vezan za aminokiseline i proteine, nosače bakra, dok je slobodnih iona koji u suvišku mogu biti toksični, malo. Ujedno je esencijalni mikronutrijent, neophodan za funkcioniranje pojedinih enzimskih sustava u kojima ima ulogu kofaktora. Vrlo lako stupa u redukcijske i oksidacijske procese zbog dobre sposobnosti primanja i otpuštanja elektrona. Tako sudjeluje u procesima dobivanja energije (prijenosu elektrona u respiratornom lancu), antioksidativnim procesima, stvaranju vezivnog tkiva, sintezi i metabolizmu neurotransmitera (kateholamina, serotonina) i mijelina u središnjem živčanom sustavu, homeostazi željeza, regulaciji kolesterola, formiranju pigmenta, te doprinosi urednom odvijanju nekih imunoloških funkcija. U tablici 1 pobrojani su osnovni enzimi za čije je uredno funkcioniranje potreban bakar. Dodatno ima ulogu u regulaciji genske ekspresije, te su tako poznati o bakru ovisni transkripcijski faktori (pr. regulacija gena superoksid dismutaze, katalaze).

U organizam se unosi hranom, a fiziološka ravnoteža održava se složenim metaboličkim procesima koji obuhvaćaju njegovu apsorpciju, distribuciju, iskorištavanje, skladištenje, te izlučivanje. Apsorpcija bakra zbiva se u tankom crijevu, a regulacijski mehanizmi prilagođavaju količinu trenutnim potrebama organizma. Po apsorpciji, bakar se vezan za albumine i aminokiseline portalnim krvotokom upućuje prema jetri koja je glavni skladišni i regulacijski organ homeostaze bakra, a manjim dijelom usmjerava prema drugim tkivima. Dio se u jetri veže za ceruloplazmin i ponovo vraća u krv. Prekomjerna količina bakra izlučuje se iz organizma putem žuči. U stanice bakar ulazi putem transportnih proteina, gdje ga preuzimaju drugi molekularski kompleksi (također transportni,

Tablica 1 Enzimi za čije je funkcioniranje potreban bakar

Enzim	Uloga
Citokrom c oksidaza	Prijenos elektrona u respiratornom lancu
Superoksid dismutaza	Antioksidativno djelovanje
Lizil oksidaza	Sinteza kolagena i elastina
Tirozinaza	Sinteza melanina
Dopamin β monooksigenaza	Sinteza kateholamina
Amin oksidaza	Deaminacija amina
Ceruloplazmin (feroksidaza)	Oksidacija divalentnog željeza

ali i enzimski sustavi za koje je nužan) tako da nije u slobodnom obliku. Sama hijerarhija distribucije unutar stanice nije u potpunosti poznata.

Poremećaji vezani za bakar proizlaze iz deficita ili suviška bakra u organizmu i/ili poremećaja metaboličkih puteva u kojima bakar sudjeluje. Najčešće se radi o prirodnim uzrocima, dok su stečeni rjeđi. Obzirom da su organizmu potrebne vrlo male količine bakra, normalna prehrana i zdrav gastrointestinalni trakt osiguravaju normalne potrebe za bakrom. Stoga, uz preduvjet urednih regulacijskih mehanizama, stečeni manjak bakra u organizmu nalazimo zaista rijetko, i to kod teških malapsorpcija ili sindroma kratkog crijeva. Čak i dugotrajno uzimanje prehrane s redukcijom bakra rijetko dovodi do klinički značajnog deficita bakra. Na resorpciju se može utjecati uzimanjem velikih količina cinka, koji je umanjuje. Nasljedne deficijencije bakra dovode do značajne patologije budući da se zbog poremećaja metaboličkog puta bakar ne može dovoljno apsorbirati i iskoristiti. Tako enzimski sustavi koji koriste bakar kao kofaktor ne mogu adekvatno funkcionirati. Od genetskih uzroka manjka bakra najznačajnija je Menkesova bolest.

Prekomjerni unos bakra i/ili gomilanje bakra u pojedinim stanicama zbog metaboličkog poremećaja također imaju toksične učinke na organizam. Smatra se da suvišak bakra u stanicama stimulira oksidativno djelovanje i stvaranje slobodnih radikala, utječe na stabilnost stanične membrane, nukleinskih kiselina, mitohondrija, te lizosoma iz kojih se oslobađaju enzimi; također narušava sintezu proteina u endoplazmatskom retikulumu. Odrasla osoba prosječno hranom unose oko 2-5 mg bakra na dan, a djeca i manje. Od toga se 50-75% resorbira što otprilike odgovara dnevnim potrebama. Tablica 2 pokazuje preporučeni dnevni unos bakra. Istraživanja su pokazala da za odraslu osobu unos bakra i do 10 mg dnevno, zbog dobrih regulacijskih mehanizama ne izaziva nikakve toksične nuspojave. Za djecu su te vrijednosti, ovisno o dobi, niže (Tablica 3). Stoga, iznimno rijetko nailazimo na stečene intoksikacije: primjer za to je duga konzumacija vode ili hrane koja je kontaminirana putem bakrenih spremnika, cijevi ili posuđa, što je danas rijetko. Također su moguća slučajna otrovanja bakrenim solima, primjerice modrom galicom (bakrov II sulfat). Simptomi akutnog otrovanja su mučnina, povraćanje, proljev, a u težim slučajevima hemoliza, zatajenje bubrega i jetre.

Vrlo rijetke bolesti zbog intoksikacije bakrom čija etiologija u potpunosti nije sasvim rasvijetljena

Tablica 2 Preporučeni dnevni unos bakra

Preporučeni dnevni unos bakra	
Dob	mg/dan
0-12 mjeseci	0,2
1-3 godine	0,3
4-8 godine	0,4
9-13 godina	0,7
14-18 godina	0,8
odrasli	0,9

su indijska dječja ciroza, te idiopatska toksikoza bakrom. Prva je karakteristična za Indiju, a druga je klinički, histološki i po količini nakupljenog bakra gotovo identična indijskoj jedino se javlja u drugim regijama, uključujući i Europu. Tipično obolijevaju dojenčad hranjena mlijekom koje je stajalo u posuđu koje sadrži bakar, ali patogenezi najvjerojatnije doprinose i neki drugi okolišni faktori, a moguće i genetski. Histološki se nalazi baloniranje hepatocita, Malloryeva tjelešca, te pericelularna fibroza koja prerasta u mikro-mikronodularnu cirozu. Također su karakteristične izuzetno visoke vrijednosti bakra u suhom tkivu, prosječno oko 1400 $\mu\text{gr/gr}$, a zabilježene su i vrijednosti preko 4000 $\mu\text{gr/gr}$. Progresija i jedne i druge bolesti je vrlo brza, a smrtni ishod bez terapije nastupa između 1-3 godine. Čak i uz terapiju kelatima ishod je neizvjestan.

Ipak, najčešća bolest zbog poremećaja prometa bakra je Wilsonova bolest (WB). Radi se o autosomno recesivnoj bolesti koja je vezana za 13. kromosom, a karakterizira je poremećaj funkcije P tipa transportne ATP-aze, zbog mutacije ATP7B gena. Primarna funkcija ATPaze u hepatocitima je intracelularni transport koji omogućava izlučivanje bakra iz jetrene stanice u žučne kanaliće i upravo poremećaj tog mehanizma odgovoran je za pojavu bolesti. Druga funkcija koja je također narušena je ugradnja bakra u ceruloplazmin. Bakar nakupljen u suvišku u jetrenim stanicama, djeluje u smislu promoviranja oksidativnog stresa i dovodi do propadanja jetrenih stanica. Bakar se potom otpušta u krv i nakuplja u drugim organima – stanicama mozga (bazalni gangliji), tubulima bubrega, rožnici i drugim, gdje također ima citotoksičan učinak, iz kojeg proizlazi klinička slika. Danas je poznato preko 300 različitih mutacija, čemu se pripisuje i heterogenost kliničke slike. Naime i težina i simptomatologija bolesti variraju (jetrena, neurološka, psihijatrijska, hematološka, očna itd), kao i dob javljanja prvih simptoma. Bolest se obično javlja između 5. i 35. godine, a kod djece najčešća je upravo prezentacija od strane jetre, dok sve druge mogu izostati. Klinička slika varira od presimptomatski povišenih transaminaza, kronične bolesti jetre, s ili bez portalne hipertenzije do fulminantnog zatajenja jetre. U nalazima, tipično je snižen bakar u serumu i ceruloplazmin, povišeno izlučivanje bakra u 24satnom urinu, pozitivan penicilaminski test, te visok bakar u suhom tkivu jetre (iznad 250 $\mu\text{gr/gr}$). Najveće značenje među testovima ima penicilaminski test, te nalaz bakra u suhom tkivu jetre. Sam patohistološki nalaz nije patognomoničan za bolest (često se vidi makro/mikrovezikularna steatoza, fokalne nekroze, kasnije fibroza, s ili bez upale). Bojenja (rodaninom, orceinom) na bakar, mogu i ne moraju biti pozitivna. Kako niti jedan

Tablica 2 Preporučeni dnevni unos bakra

Gornja granica unosa bakra	
Dob	mg/dan
0-12 mjeseci	nije precizno ustanovljeno
1-3 godine	1
4-8 godine	3
9-13 godina	5
14-18 godina	8
odrasli	10

od nalaza nije dovoljno senzitivan i specifičan sam za sebe, dijagnoza se postavlja kombinacijom kliničko- laboratorijskih kriterija.

Povišen bakar u jetri nalazimo ponekad i posljedično. Primjerice, kod kolestatskih bolesti jetre (nezavisno od primarne etiologije kolestaze) u kojima je poremećeno izlučivanje bakra putem žuči, bakar se sekundarno gomila u tkivu jetre. Također uznapredovala bolest jetre bilo koje etiologije koja dovodi do velike destrukcije parenhima može dovesti do nakupljanja bakra zbog nedovoljne mogućnosti eliminacije. Ipak, tada izmjerene vrijednosti bakra u suhom tkivu jetre obično nisu tako visoke (rijetko prelaze 250 $\mu\text{gr/gr}$ suhe tvari) kao što je to slučaju kod WB ili idiopatske toksikoze bakrom. Nedovoljno je poznato koliko sekundarno nagomilan bakar dodatno doprinosi daljem oštećenju jetre.

Prikaz bolesnika

Četverogodišnji dječak F.P. prvi puta je upućen u Kliniku za dječje bolesti Zagreb u travnju 2009. godine zbog hepatosplenomegalije nejasnog uzroka. Ista je zamijećena nekoliko dana prije u Centru Suvag gdje je bio na pregledu neuropedijatra radi dislalije.

Iz osobne anamneze se saznaje da su trudnoća i porod bili uredni. Dojen je 2mjeseca, dalje je uzimao adaptirano dojanačko mlijeko, a dohrana je početa s 5 mjeseci. Psihomotorno se dječak normalno razvijao, osim poremećaja sposobnosti jezičnog razumijevanja i izražavanja zbog nerazlikovanja zvučno sličnih glasova. Povremeno se žalio na svrbež kože što se pripisivalo atopiji. Prebolio je vodene kozice. Ostala anamneza je bila neupadljiva, a na ranijim sistematskim pregledima primarnog pedijatra nije zamijećeno odstupanja u kliničkom statusu. Obiteljska anamneza je bila bez osobitosti; roditelji i 2 brata su zdravi. Dječak živi u obiteljskoj kući, u seoskom domaćinstvu, gdje za piće koriste bunarsku vodu. Jede raznovrsnu hranu.

Pri prijemu dječak je bio dobro uhranjen i razvijen, dobrog općeg stanja, afebrilan i bez drugih znakova akutne infekcije, limfni čvorovi se nisu palpirali, koža je bila suha, bez osipa i bez žutice, ali se žalio na svrbež, a mjestimično su bile vidljive ekzorijacije od češanja. Na srcu i plućima nalaz je bio uredan, a kliničkim statusom je dominirao prominentan abdomen zbog opsežne hepatosplenomegalije: jetra se palpirala tvrda, 4cm ispod desnog rebrenog luka, a slezena čak 8cm ispod lijevog. Također je na koži trbuha bio izražen venski crtež. Ostali status je bio uredan.

Kod dječaka je učinjena široka dijagnostička obrada kako bi se otkrio uzrok hepatosplenomegalije. U laboratorijskim nalazima izdvajamo:

Kompletna krvna slika- uredna (osim nešto nižih trombocita, Trc 100×10^9)

Jetreni testovi- bilirubin uredan, ali AST 294, ALT 298, GGT 312, AP 1195 U/L- povišeni

Testovi sintetske funkcije jetre (protrobinsko vrijeme, albumini)- uredni

Profil glukoze, acidobazni status, elektroliti, amilaze, kreatinin, urea, kreatin kinaza, laktat dehidrogenaza, imunoglobulini, feritin, urična kiselina, alfa fetoprotein, urin biokemijski- uredni

Kolesterol-povišen (7,7mmol/l, LDL 3,7mmol/l), trigliceridi- uredni

Žučne kiseline u serumu- povišene (33,4 $\mu\text{mol/l}$, N do 10)

Laktat, piruvat, amonijak, acil karnitin, aminokiseline u serumu i urinu, organske kiseline u urinu,

hitotriozidaza- uredni; reducirajući šećeri u urinu- negativni
Markeri na hepatitis A,B,C negativni; serologija na EBV- negativna
Kloridi u znoju, te fekalna elastaza- uredni
Genotipizacija alfa1 antitripsina: PiMM- normalan genotip
ANA, AGLM, LKM protutijela- negativna
Bakar u serumu i ceruloplazmin, te bakar u 24h urinu- uredni
Razmaz periferne krvi i citološka analiza punktata koštane srži pokazale su uredno hematopoetsko tkivo, bez stranih stanica ili stanica nakupljanja.

Ultrazvučnim pregledom abdomena verificirana je uvećana jetra, neravnih granica, izrazito difuzno inhomogene strukture, u cijelosti nodularno promjenjena, dok su žučni vodovi bili uredni. Slezena je također bila značajno uvećana 13x5cm, uredne ehostrukture, naglašene vene hilusa. Bubrezi i mokraćni mjehur su bili uredni. Nije bilo slobodne tekućine intraabdominalno. Dopplerom je potvrđen uredan smjer protoka kroz venu portu koja je granično dilatirana.

Također je učinjena biopsija jetre koja je pokazala umjerenu portalnu i periportalnu fibrozu, dok je arhitektura jetrenih režnjica očuvana, uredne su centralne vene i žučni vodovi, diskretno zadebljanje portalnih ograna. Nije bilo znakova upale, niti kolestaze. Bojenjem po rodaninu nije dokazano nakupljanje bakra, ali je bakar u suhom tkivu jetre bio značajno povišen (457 µgr/gr, normala do 50 µgr/gr).

Magnetska kolagniopankreatografija (MRCP) je potvrdila uvećanu jetru, valovitih kontura i nehomogena parenhima, te uvećanu slezenu. Intrahepatalni žučni vodovi nisu dilatirani, a koledokus je opisan gracilan.

Dodatno su učinjeni pregled okuliste, kardiologa sa ultrazvukom srca, te rentgen kralježnice koji su uredni.

Mišljenje je genetičara da fenotip dječaka ne sugerira bolesti nakupljanja, niti neki od sindroma hipoplazije žučnih puteva.

U terapiju je uvedena ursodeoksikolna kiselina i kolestiramin, uz koje dolazi do poboljšanja nalaza jetrenih testova, te smanjenja svrbeža. Kod otpusta je još uvijek nejasno što je uzrokovalo fibrozu jetre i posljedičnu portalnu hipertenziju.

Roditeljima je savjetovano da testiraju bunarsku vodu koju koriste za piće, na bakar- učinjeni nalaz pokazao je urednu koncentraciju za pitku vodu.

Nova hospitalizacija radi kontrolnih nalaza i planirane endoskopije bila je 5 mjeseci nakon prve. Tada učinjene transaminaze su značajno bolje (AST 88, ALT 76, GGT 138 U/L), također i AP 599 U/L. Endoskopski se prikažu blagi varikoziteti jednjaka, ali nema portalne gastropatije.

Kako je i dalje nejasana etiologija bolesti preporuča se i pregled u Zavodu za bolesti metabolizma u KBC Rebro, gdje se dječak hospitalizira u dva navrata (12mj. 2009. i 8.mj. 2010). Tijekom tih boravaka dopuni se obrada u smjeru mogućih bolesti metabolizma: izoelektrično fokusiranje transferina, glukocerebrozidaza i sfingomijelinaza, aminokiseline u serumu kvantitativno, homocistein, adenoilmetionin u serumu, te oligosaharidi u urinu- svi nalazi su bili uredni. Obzirom na

ranije povišen bakar u suhom tkivu jetre ponovljeni su i bakar u serumu, ceruloplazmin i bakar u 24h urinu koji su uredni, a također i penicilaminski test koji ne pokaže značajno povećanje izlučivanja bakra urinom ($3,9 \mu\text{mol/dU}$). Ponovi se i biopsija jetre: nalaz je sukladan prethodnoj biopsiji, dodatno je sada naznačena proliferacija žučnih vodova, a značajno je manji nalaz bakra u suhom tkivu jetre ($99 \mu\text{gr/gr}$). Pregled elektronskim mikroskopom nije uspio. MRI mozga ne pokaže znakova odlaganja metala, niti hipomijelinizacije. Ultrazvučni nalaz nepromijenjen je u odnosu na ranije, osim što se registriira rekanalizacija umbilikalne vene. Nastavljena je terapija ursodeoksikolnom kiselinom i kolestiraminom.

U inozemstvu su još učinjeni poliol i šećeri u urinu koji su urednog profila, kako bi se isključila deficijencija transaldolaze B. Parafinske kocke biopata jetre poslane su također na drugo mišljenje u King's College Hospital u Londonu. Opis nalaza sukladan je nalazima kod nas. Bojenja na bakar su bila negativna; imunohistokemija na progresivnu familijarnu intrahepatalnu kolestazu (PFIC) tip 3 je bila uredna.

Dječak je dalje praćen, s periodičkim kontrolama svaka 3-4 mjeseca, te je još jednom hospitaliziran u 4mj. 2011. Nalazi jetrenih testova su cijelo vrijeme sličnih vrijednosti, žučne kiseline su se normalizirale, a sintetska funkcija jetre je trajno uredna. No, uočava se progresija portalne hipertenzije: pojačava se splenomegalija, uz znakove hipersplenizma (vrijednosti trombocita $75-95 \times 10^9/\text{l}$, leukocita oko $3,5 \times 10^9/\text{l}$), a ultrazvučno, doplerom i na kraju MR venografijom vidi se sada već reverzni protok kroz v. portu, rekanalizirana umbilikalna vena, uz značajne lijenalne varikse. Isto tako kontrolna endoskopija pokaže pojačanje varikoziteta jednjaka.

Dječak je uključen u praćenje dječjeg kirurga radi razmatranja selektivnog (splenorenalnog shunta).

Rasprava

Prema anamnezi, kliničkom tijeku, te do sada učinjenim nalazima radi se o dječaku s fibrozom jetre i povišenim bakrom u tkivu jetre, te portalnom hipertenzijom koji se u dobi 4,5 godine klinički prezentirao hepatosplenomegalijom.

Kod prve hospitalizacije nametalo se pitanje da li se radi o akutno nastaloj hepatosplenomegaliji budući da ranije nije bila zamojećena, ili je ista posljedica kronične bolesti. No, kod dječaka nije bilo nikakvih znakova akutne infekcije, niti kliničkih, niti laboratorijskih, a negativni su bili nalazi na moguće hepatotropne viruse. Također su razmazi periferne krvi i punkcija koštane srži otklonili sumnju na limfoproliferativnu bolest. Palpatorno tvrda jetra, te prisutan venski crtež na koži abdomena klinički su sugerirali da se radi o kroničnoj bolesti jetre, te splenomegaliji kao prezentaciji portalne hipertenzije što je potvrdila dalja obrada i tijek bolesti. Redom su kao uzrok otklonjeni kronični virusni hepatitis, cistična fibroza, deficijencija alfa 1 antitripsina, autoimuni hepatitis. Negativan je bio metabolički skrining na moguće bolesti nakupljanja (glikogenoze, lizosomske bolesti), a protiv toga je govorio i nalaz biopsije jetre i punkcije koštane srži.

Dominanta fibroza jetre potvrđena ponovljenim biopsijama, s očuvanim jetrenim režnjićima, bez znakova upale i kolestaze, dijagnostiku je usmjerila prema kongenitalnoj hepatalnoj fibrozi. Ista se u pravilu manifestira portalnom hipertenzijom; patohistološki nalazimo portalnu i periportalnu fibrozu, koja okružuje otoke normalnog parenhima jetre, a mogu se naći i promjene na malim

žučnim vodovima. Uz to u većini nalazimo i zahvaćenost bubrega, najčešće autosomno recesivnu policističnu bolest bubrega (ARPB), za što kod dječaka nije bilo kliničko-laboratorijskih znakova (svi parametri bubrežne funkcije, urin biokemijski, ultrazvuk bubrega uvijek su bili uredni). Za bolju procjenu zahvaćenosti bubrega potrebna bi bila biopsija bubrega, ali se za sada nismo za nju odlučili. Fibroza jetre može biti i u sklopu CDG sindroma (kongenitalni poremećaj glikozilacije) tip Ib, međutim izostali su drugi prateći simptomi (nenapredovanje na tjelesnoj masi, proljevi, hipoalbuminemija, koagulopatija), te fenotipske karakteristike. Uz to je nalaz izoelektričnog fokusiranja transferina bio uredan. Tešku fibrozu jetre može uzrokovati i deficijencija transaldolaze B (enzima pentoza fosfatnog puta) koja obično ide s prezentacijom već u dojenačeta i to najčešće krvarenjem, trombocitopenijom, hepatosplenomegalijom. Naš bolesnik nije imao simptoma u dojenačkoj dobi, a skrining test za deficijenciju je bio negativan (uredan profil šećera i poliola u urinu). Idiopatska hepatportalna skleroza je također mogući uzrok necirotične fibroze jetre koja se upravo manifestira teškom portalnom hipertenzijom, dok je funkcija jetre održana. U prilog istoj govori očuvana arhitektura jetrenih režnjića usprkos uznapredovaloj fibrozi koja je dominantno upravo u portalnim prostorima, te zadebljanja i promjene nekih ogranaka portalnih vena registrirani na prvoj biopsiji, dok za istu nisu tipične promjene na žučnim vodovima. Također očekivane bi bile značajnije promjene stijenke i širine same v.porte.

Ipak, iznenađujući nalaz je bila vrlo visoka vrijednost bakra u suhom tkivu jetre, što primarno ne vidimo niti kod jedne ranije navedene bolesti. Eventualna kontaminacija uzorka (držanjem tkiva prije obrade u epruveti/spremniku koji je načinjen od materijala koji sadrži bakar) je odmah eliminirana. Cijeli postupak uzimanja uzorka kod jedne i druge biopsije, te pripreme preparata bili su bez doticaja s bakrom. Sljedeće se nametalo pitanje radi li se uopće o primarnom poremećaju prometa bakra ili se radi o posljedičnom nakupljanju bakra u jetri kod uznapredovale bolesti jetre druge etiologije.

Što se tiče najčešće poremećaja prometa bakra -Wilsonove bolesti, u pravcu nije su govorile visoke vrijednosti bakra u suhoj tvari kod prvog uzorka (preko 250 $\mu\text{gr/gr}$). Niži nalaz kod drugog uzorka (99 $\mu\text{gr/gr}$), također ne isključuje bolest, jer neravnomjernu raspodjelu bakra vidamo upravo kod uznapredovale WB. Ipak, izolirano povišenje bakra u tkivu jetre nije dovoljno za dijagnozu WB. Heterozigoti za WB također mogu imati povišen bakar u tkivu jetre, no vrijednosti ne prelaze 250 $\mu\text{gr/gr}$ i nema kliničke slike. Protiv WB su govorili dob dječaka, te odsustvo drugih tipičnih laboratorijskih nalaza. Naime, dječak je već u dobi 4 godine imao uznapredovalu jetrenu bolest, što je neuobičajeno za WB koja se tipično prezentira kasnije. Ipak, kako su opisani rijetki slučajevi i u ranijoj dobi i to upravo s ekspresijom na jetri, te odsustvom drugih kliničkih simptoma, nastavili smo s dijagnostikom u tom smjeru. Međutim 2x ponavljani ceruloplazmin, bakar u serumu, te bakar u 24h urinu su bili potpuno uredni. Nalaz penicilaminskog testa nije bio signifikantan za WB (značajne bi bile vrijednosti 25 $\mu\text{mol/dU}$ i više, a kod dječaka je vrijednost bila 3,9 $\mu\text{mol/dU}$). Očni pregledom nije nađen Kayser Fleischerov prsten, a MRI mozga je također bez odstupanja. Stoga, sveukupno gledajući nije bilo dovoljno kriterija za WB.

Što se tiče idiopatske toksikoze bakrom kod dječaka nismo našli nikakvih rizičnih faktora u anamnezi (nije konzumirao hranu ili vodu koja je mogla sadržavati prekomjerne količine bakra, tj.

biti zagađena bakrom). Poznato je da su upravo dojenčad sklonija nakupljanju bakra u slučaju prekomjernog unosa, zbog slabijih regulacijskih sposobnosti, pa smo tako posebno provjerili kako je dječak hranjen u prvoj godini života, koju je vodu koristio i iz kakvog je posuda uzimao hranu i vodu. Budući da ukućani koriste bunarsku vodu, provedeno je testiranje uzorka vode na koncentraciju bakra koje je pokazalo uredne vrijednosti (u skladu s Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, NN 47/2008). Također niti histološka slika (odsustvo mikronodularnih promjena, Malloryevih tjelešaca), niti visina bakra u suhom tkivu jetre (očekivane bi bile još veće vrijednosti) nisu na to upućivali.

Preostaje da je velika vrijednost bakra u suhom tkivu nastala sekundarno zbog kolestatske ili druge uznapredovale bolesti jetre nevezano za primarnu etiologiju. Tada su češće umjereno povišene vrijednosti bakra u suhom tkivu (55-250 $\mu\text{gr/gr}$), dok se iznimno opisuju veće vrijednosti. Povišeni GGT, AP, žučne kiseline usmjeravali su na kolangiopatiju, čemu u prilog bi govorilo i poboljšanje nalaza GGTA i alkalne fosfataze, te manji svrbež po uvođenju terapije ursodeoksi-kolnom kiselinom iolestiraminom. Medjutim prva biopsija jetre i MRCP pokazali su potpuno uredne žučne vodove. Druga biopsija je pokazala tek diskretnu proliferaciju malih žučnih vodova, no bez znakova kolestaze. Isto tako niti fenotip dječaka, niti evaluacija drugih organskih sustava (okulistički pregled, eho srca, rentgen kralježnice) nisu uputili na neki od sindromskih poremećaja žučnih vodova (primjerice Allagile). Dolazila je u obzir i progresivna familijarna intrahepatalna kolestaza, tip 3 (MD3 deficijencija), ali imunohistokemijskim bojenjima učinjenim u inozemstvu nije dokazana. Sveukupno gledajući nismo dokazali bolest kolestatskog tipa. Na kraju ostaje da se vjerojatno radi o sekundarnom poremećaju prometa bakra zbog bolesti jetre, čak ne primarno kolestatskog tipa.

Zaključno uznapredovala fibroza jetre s povišenim bakrom u suhom tkivu, te kliničkom slikom portalne hipertenzije najvjerojatnije je uzrokovana kong. hepatálnom fibrozom ili hepatportalnom sklerozom, dok je nalaz bakra u suhom tkivu jetre posljedica, a ne primarni poremećaj prometa bakra.

Literatura:

1. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* 2007;44(11):673-88.
2. Balasubramaniam S, Wamelink MC, Ngu LH, Talib A, Salomons GS, Jakobs C, Keng WT. Novel heterozygous mutations in *TALDO1* gene causing transaldolase deficiency and early infantile liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:113-16.
3. Beyersdorff A, Findeisen A. Morbus Wilson: Case report of a two year old child as first manifestation. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41:496-97.
4. Dhiman RK, Chawla Y, Vasishta RK i sur. Non-cirrhotic portal fibrosis (idiopathic portal hypertension): experience with 151 patients and a review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(1):6-16.
5. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, D.C.: National Academy Press; 2001:224-57.

6. Iorio R, D'Ambrosi M, Mazzarella G, Varrela F, Vecchione R, Vegnente A. Early occurrence of hypertransaminasemia in a 13 month old child with Wilson disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:637-38.
7. La Fontaine S, Mercer JF. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2007; 463(2): 149-67.
8. Roberts EA, Schilsky ML. AASLD practice Guidelines. Diagnosis and treatment on Wilson disease: An update. *Hepatology* 2008; 47: 2089-111.
9. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Childhood liver disease and metabolic disorders. U: Scheuer PJ, Lefkowitz JH, ur. *Liver biopsy interpretation*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006, str. 267-98.
10. Sokol RJ, Narkewicz MR. Copper and iron storage disorders. U: Suchy F, Sokol RJ, Balistreri W, ur. *Liver disease in children*. Cambridge: University press; 2007, str. 626-60.
11. Tanner MS. Disorders of copper metabolism. U: Kelly DA, ur. *Disease of liver and biliary system in children*. Oxford: Blackwell; 2004; 243-57.
12. Tümer Z, Möller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet* 2010; May; 18(5): 511-18.
13. Uauy R, Maass A, Araya M. Estimating risk from copper excess in human populations. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 867S-71S.
14. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 952S-59S.

Bolesti mozga zbog poremećenog prometa metala s prikazom bolesnika

Ljerka Cvitanović-Šojat, Romana Gjergja Juraški

Klinika za pedijatriju, Neuropedijatrijski odsjek, KBC Sestre milosrdnice, Vinogradska cesta 29., 10000 Zagreb

Metali su prisutni u tragovima u organizmu, a najviše ima željeza i cinka. Metali se nalaze u proteinima (metaloproteinima) kao kofaktori, neophodni su za aktivnost enzima, kao i za transport i nakupljanje proteina. Metali su potrebni za funkciju 1/4 do 1/3 svih proteina. Bolesti mozga zbog poremećaja metabolizma metala mogu nastati zbog poremećaja u transportu bakra, željeza, molibdena, cinka, magnezija ili selen. U ovom poglavlju će biti spomenuti samo neki od tih poremećaja. Poremećaji prometa željeza, cinka i selen opisani su u drugim poglavljima ovog priručnika.

Nasljedni poremećaji metabolizma bakra- Menkesova bolest

Uvod

Menkesova bolest (MB) je nasljedni X-vezani recesivni multiorganski letalni poremećaj u metabolizmu bakra. Bolesnici uglavnom imaju teži klinički tijek s egzitusom u ranoj dječjoj dobi, iako postoje različite forme, kao što je npr. sindrom okcipitalnog roga (OHS, *od engl. occipital horn syndrome*) s nešto blažom kliničkom slikom.

Gen ATP7A na X kromosomu, lokus Xq12-q13, kodira protein ATP7A, koji je uključen u prijenos bakra u secernirane enzime koji koriste bakar i izlazak viška bakra iz stanica. Normalni i izmijenjeni metabolizam bakra u ljudi i drugih organizama zadnjih godina je u žarištu istraživanja i ima novih saznanja.

Normalan i promijenjen metabolizam bakra

Bakar je treći najčešći element u tragovima u tijelu (nakon željeza i cinka) koji je potreban je za normalno funkcioniranje nekoliko enzima koji sudjeluju u važnim metaboličkim procesima. Bakar je uključen u stanično disanje (citokrom-c oksidaza (COX)); biosinteza neurotransmitera (dopamin b-hidroksilaza); maturacija peptidnih hormona (peptidil a-amidirajući enzim); uklanjanje slobodnih radikala (superoksid dismutaza); križno povezivanje elastina i kolagena (lizil oksidaza) i keratin (sulfhidril oksidaza); produkcija melanina (tirozinaza); i homeostaza željeza (ceruloplazmin i hephaestin). Bakar također sudjeluje i u procesu mijelinizacije, regulaciji cirkadijanog ritma te je važan za koagulaciju i angiogenezu (1,2). Bakar je esencijalan, ali zbog svojih kemijskih osobina, može biti visoko toksičan. Bakar ima dva oksidacijska stanja - Cu(I) i Cu(II), a reverzibilne izmjene ova dva stanja su osnova enzimskih reakcija. To isto može rezultirati produkcijom slobodnih radikala koji imaju štetan utjecaj na sastojke stanice. Uredna regulacija homeostaze bakra je dakle vitalno važna za sve žive organizme.

Stanični metabolizam bakra. Unos bakra preko plazmatske membrane najvjerojatnije se odvija putem membranskog transportera ovisnog o energiji (CTR1) (3). U citoplazmi je bakar vezan na

male proteine kao što su metalotionein (4) i glutation (5) ili bakar specifični molekularni pratioci, te je tako stanica zaštićena od toksičkih utjecaja slobodnog iona bakra. Tri poznata prenositelja (engl. *chaperons*) bakar - CCS, ATOX1 i COX17 vežu ion bakra i vode ga do različitih lokacija u stanici dovodeći dovoljno bakra enzimima. CCS dovodi bakar za superoksid dismutazu koja se nalazi u citosolu i u mitohondrijima (6), COX17 vodi bakar mitohondrijima da bi bili inkorporirani u COX gdje se nalaze drugi proteini koji su uključeni u COX metilaciju bakra (kao što su COX11, SCO1 i SCO2 (7)). ATOX1 vodi bakar u trans-Golgijevu mrežu (TGN), gdje je inkorporiran u enzime koji trebaju bakar (8). Bakar specifične ATPaze - ATP7A i ATP7B (defektne su u MB i u Wilsonovoj bolesti) vode bakar preko membrane u lumen TGN do sekretornih enzima. ATP7A ima ekspresiju u gotovo svakom organu osim jetre gdje je dominantna ATP7B. Prema tome, bakar je inkorporiran u ceruloplazmin pomoću ATP7B u hepatocitima, dok je ATP7A važna za ostale tipove stanica u transportu do tkivospecifičnih enzima. Ovo također upućuje da je MB sistemni poremećaj, dok je u Wilsonovoj bolesti najviše zahvaćena jetra. ATP7A (i ATP7B) imaju dvostruku ulogu u stanici, pa su osim punjenja enzima bakrom u sekretornim putevima, važne i za ATP-ovisan odvoz bakra iz stanica (9). Kod fizioloških koncentracija bakra, ATP7A je lokalizirana u TGN, transportirajući bakar u lumen do enzima ovisnih o bakru. Kod visokih koncentracija bakra ATP7A je premještena u vezikule ili u membranu plazme. (10,11).

Metabolizam bakra u tijelu. U sisavaca je jedini izvor bakra hrana i za ljude je prosječan dnevni unos 1mg. Bakar iz hrane apsorbira se kroz lumen crijeva preko mukozne barijere u intestinalnu tekućinu i u portalnu krv. Nespecifični transporteri metala, DMT1, ATP7A i CTR1 su uključeni u ovaj proces (11,12). Iz krvi bakar ide uglavnom u jetru i u manjim količinama u bubrege i druga tkiva uključujući i mozak. U jetri koja je centralni organ za skladištenje i homeostazu bakra, bakar se izlučuje u krv vezan s ceruloplazminom ili uz žuč. Oba procesa su kontrolirana s ATP7B; defektan ATP7B će tako dovesti do povećanih količina bakra u jetri i drugim organima kao kod bolesnika sa Wilsonovom bolesti. Glavni ekskretorni put bakra je žuč, a gubitak urinom je beznačajan. Slobodni ioni bakra praktički ne postoje u živom organizmu. Ceruloplazmin je najveći protein nosač bakra u serumu, ali nije potpuno jasna njegova uloga u metabolizmu bakra (13). Bakar vezan za albumine je u ravnoteži s bakrom vezanim za aminokiseline i vjerojatno čine puferski sustav koji osigurava dostupnost dovoljno bakra svim tkivima i štiti od toksičnosti bakra. Bakar se transportira u mozak preko krvnomoždane barijere u endotel mozga i u likvor u koroidnom pleksusu. Detalji transporta bakra u mozak su još nepoznati. Transporteri bakra CTR1, ATP7A i ATP7B imaju jaku ekspresiju u frakcijama moždane barijere, što govori o vjerojatnoj ulozi tih nosača u prijenosu bakra u mozak (14). U mozgu je ATP7A uključena u normalno funkcioniranje enzima ovisnih o bakru. Ekspresija ATP7A u mozgu je regulirana razvojem i visoka je u ranom postnatalnom razdoblju (15).

Klinička slika Menkesove bolesti

MB pokazuje značajnu varijabilnost u težini bolesti. **Klasična MB** je najteži i najčešći oblik. Progresivna neurodegeneracija i značajna disfunkcija vezivnog tkiva su obilježja ove teške forme i smrt obično nastupa prije treće godine života. Trudnoća je obično nekomplikirana, a premda se većina djece rodi u terminu i s urednom težinom, moguć je prijevremeni porod. Pri porodu se opisuju kefalhematomi i spontane frakture. Rana neonatalna žutica, hipotermija, hipoglikemija i teškoće

hranjenja, *pectus excavatum*, umbilikalne i ingvinalne hernije su također prisutne u ranoj dobi. Međutim, prvi znak MB može biti neobična tanka i rijetka kosa na glavi koja postane zapletena na vršku glave u dobi od 1–2 mjeseca. U to doba izgled djeteta može biti i neobičan: s blijedom kožom, frontalnim i okcipitalnim izbočenjima glave, mikrognatijom, s debljim obrazima i licem s malo mimike. Ove su promjene često vrlo slabo izražene, da bi već tada privukle pažnju. Rani psihomotorički razvoj je obično neupadljiv do 2.–4. mjeseca. Dojenče tada prestaje s daljnjim razvojem i postupno gubi neke od naučenih vještina. Razvojno propadanje postaje jasno vidljivo s 5–6 mjeseci. Mnogi pacijenti razviju farmakorezistentnu epilepsiju od 2–3 mjeseca života. Dodatni simptomi su nenapredovanje, slab apetit, povraćanje i proljev. Mišićni tonus je često snižen u ranoj dobi, ali kasnije nastupa spastičnost i slabost ekstremiteta. Napredovanjem motoričkih smetnji, spontani pokreti postaju ograničeni, te nastupaju pospanost i letargija.

Na MB se dakle može posumnjati u dobi 3–6 mjeseci, češće zbog nenormalne kose - hipopigmentirana i depigmentirana kosa sliči čeličnoj vuni, te djeluje “ispucana”, pogotovo na dijelovima vlasišta koji su često na podlozi. Vaskularne, urogenitalne i koštane abnormalnosti su brojne. Bolesnici imaju promjene na kostima, *pectus excavatum* ili *carinatum* te spontane frakture zbog generalizirane osteoporoze. Zglobovi su hiperekstenzibilni, a suha i blijeda koža se zapaža vrlo rano. Seboroični dermatitis je također čest. Rutinska oftalmoskopija je obično normalna, ali u kasnijim stadijima bolesnici često ne prate vidne stimuluse. Kasne manifestacije bolesti su sljepoća, subduralni hematomi i respiratorna insuficijencija. Mnogi bolesnici umiru do treće godine zbog infekcija, vaskularnih komplikacija kao što su iznenadna masivna cerebralna krvarenja uslijed vaskularnih ruptura ili zbog neurološke degeneracije.

OHS (*Occipital horn sindrom*). OHS je umjeren oblik MB i njegove glavne kliničke značajke su povezane s promjenama veziva. Glavna razlika između OHS i drugih formi MB je radiološka opservacija karakterističnih okcipitalnih rogova. To su simetrične egzostoze koje protrudiraju s okcipitalne kosti prema dolje. Trudnoća je obično normalna. Koža djeteta može izgledati naborana pri rođenju i često je prisutna ingvinalna hernija. Unutar nekoliko dana razvija se hipotermija, žutica, hipotonija i problemi s hranjenjem. Klinički problemi postaju jasni postupno i prvi znaci su obično uporan proljev ili recidivi urinarnih infekcija. Unatoč ovoj kliničkoj slici, dijagnoza se obično postavi tek oko 5.-10. godine. Motorički razvoj je usporen uslijed hipotonije mišića i nespretnosti. Visina je obično normalna, ali uz disporporciju s dugim trupom, uskim toraksom i ramenima, torakolumbalnom kifoza ili skolioza te deformitetima prsnog koša. Zglobovi su hiperobilni. Zglob lakta ima često ograničenu mobilnost i tendenciju dislokacije. Izgled lica postupno se mijenja i uključuje dugo, tanko lice, često s visokim čelom, prema dolje spuštene oči, prominentan nos, dugački filtrum, visoko nepce, prominentne velike uške. Laksitet kože je varijabilan i može se pojačati s dobi. Kosa obično djeluje normalna, iako neki bolesnici imaju neobično grubu kosu.

Vaskularne anomalije, kao što su varikoziteti vena i aneurizme arterija su česte. Značajan problem je ortostatska hipotenzija. Intelektualni kapacitet se opisuje kao graničan. Razvoj puberteta je normalan. Klinički tijek je obilježen kroničnim proljevom, divertikulima mokraćnog mjehura s recidivima urinarnih infekcija i povremenim spontanim rupturama mjehura, ortostatskom sinko-

pom, kao i nestabilnošću donjih ekstremiteta i ograničenošću pokreta u laktovima. Neki bolnici imaju progresivnu torakolumbalnu kifozu, spontanu ablaciju retine kao i insuficijenciju mitralne valvule. Očekivano trajanje života u OHS je varijabilno, iako značajno dulje neko u MB. **Intermedijarni fenotipovi.** Opisani su bolesnici sa blažim simptomima i kasnijim početkom bolesti, ali ti oblici još nisu dovoljno kategorizirani te se koriste različiti opisi bolesti. **Homeostaza bakra u MB.** Eliminacija bakra iz stanica u osnovnom poremećaju u MB, u gotovo svim tkivima osim jetre i mozga, rezultirati će akumulacijom prevelikih količina bakra. Iako je razina bakra tada visoka, ne dostiže toksično stanje u MB. Razlog tome je dijelom u već smanjenoj apsorpciji bakra iz crijeva, jer je defektan transport bakra iz mukoznog epitela, a dijelom zbog odstranjivačke uloge metalotioneina. U jetri bolesnika sa MB, niski sadržaj bakra nastaje zbog potreba drugih tkiva za metalom, prije nego zbog poremećenog metabolizma bakra, budući je u normalnoj jetri ATP7B glavni transporter bakra, a ne ATP7A. Razlog niskih vrijednosti u mozgu u bolesnika sa MB je drugačiji. Mozak sisavaca je jedan od organa u tijelu koji je najbogatiji bakrom. Regulacija nivoa bakra nije dobro shvaćena, ali ATP7A definitivno mora sudjelovati u ovom procesu, jer MB dovodi do niskih nivoa bakra u mozgu. U bolesnika s MB, bakar je vjerojatno zarobljen u krvno likvorskoj barijeri, dok neuroni i glija stanice pate od nedostatka bakra (16). Ovo također potvrđuje ulogu ATP7A u preuzimanju bakra u mozgu. Demijelinizacija neurona se također događa u bolesnika sa MB zbog ATP7A inaktivacije (17). Posredovanje u otpuštanju bakra vezanog uz ATP7A putem aktivacije NMDA-receptora otkriva novu ulogu ovog proteina u disfunkciji mozga osim deprivacije enzima ovisnih o bakru (18). Tako je vjerojatno da napadaji i neuronalna degeneracija koju vidimo u bolesnika s MB također možemo povezati s poremećenom transmisijom i oštećenom funkcijom NMDA receptora (18).

Genetska osnova MB

Incidencija MB je oko 1 in 300 000 na temelju ispitivanja velike populacije u pet zemalja Europe (19,20) i 1 na 360 000 u Japanu (21) Sekvenca ATP7A od 8.5-kb je organizirana u 23 egzona, čineći 140-kb genomske regije (22) (UCSC Genome Browser; <http://genome.cse.ucsc.edu/>). Danas poznamo oko 170 različitih mutacija u ATP7A genu (od supstitucija jedne aminokiseline do velikih delecija ili kromosomskih aberacija) (23-27) (Human Gene Mutation Database (HGMD); www.hgmd.org). Većina bolesnika su muški, ali su ženski bolesnici također opisani. Većina ženskih bolesnika ima translokaciju X kromosoma i autosoma, gdje je normalni X kromosom inaktiviran (24). Oko 25% ATP7A mutacija su velike delecije u veličini od jednog egzona do delecije cijelog gena, osim prva dva egzona (26). Mutacije mogu utjecati na sintezu proteina, stabilnost proteina, promet i lokalizaciju, katalitičku aktivnost kao i post-translacijske modifikacije.

Nema jasne korelacije između mutacije i kliničkog tijeka MB. To pokazuje postojanje inter i čak intrafamilijarne fenotipske varijabilnosti u MB/OHS pacijenata koji nose istu ATP7A mutaciju. (28). Općenito, pacijenti s blažim fenotipom kao OHS imaju veći udio mutacija koje dovode do proteina s parcijalnom funkcijom ili rezultiraju u smanjenim količinama inače normalnog proteina (27). Velike delecije gena rezultiraju težom klasičnom formom MB. Bolesnici s velikim delecijama mogu imati dugo preživljenje unatoč teškim simptomima, a opisan je bolesnik koji je umro sa 18 godina, a svi su egzoni ATP7A gena osim prva dva bili deletirani (26).

Dijagnostički pristup

Inicijalno dijagnoza MB može već biti postavljena na temelju kliničkih obilježja (pogotovo tipične promjene kose) te podržana laboratorijskim nalazom sniženih vrijednosti serumskog bakra i ceruloplazmina. U novorođenačkom razdoblju ove markere bi trebalo interpretirati s oprezom, jer u zdravog novorođenčeta mogu biti nižih razina. U to vrijeme, analiza kateholamina u plazmi (omjer DOPA u odnosu na dihidroksifenilglikol) indikativna za deficijenciju dopamin b-hidroksilaze može biti izbor brzog dijagnostičkog testa (29). Druge laboratorijske pretrage kao što su cistouretragrafija, CT, MR, radiološke metode korisne su u otkrivanju kliničkih obilježja MB. RTG snimke bolesnika s klasičnom MB pokazuju brojne specifične abnormalnosti: generaliziranu osteoporozu, *flaring* metafiza dugih kostiju, periostalnu reakciju dijafiza i stanjenje, te crvolike kosti u kranijalnim suturama. Fraktura rebara zbog osteoporoze čest je nalaz koji dovodi do pogrešne dijagnoze sindroma tučenog djeteta. U OHS bolesnika tipični su radiološki znaci okcipitalnih rogova i mogu se naći u dobi od 1-2 godine, ali se češće nađu tek sa 5–10 godina, a rastu i dalje do rane odrasle dobi. Pregled kose svjetlosnim mikroskopom pokazuje pojedine dlake koje su uvrnute oko njihove osnovne osi (*pili torti*), s različitim dijametrima (*monilethrix*) i fragmentacijom u regularnim intervalima (*trichorrhexis nodosa*). Definitivan biokemijski test za MB se temelji na intracelularnom nakupljanju bakra zbog oštećenog prijenosa bakra izvan. Nakupljanje se evaluira u kultiviranim stanicama, uglavnom fibroblastima, mjereći retenciju radioaktivnog bakra (^{64}Cu) i oštećen izlazak. Ove analize zahtijevaju ekspertnost i obavljaju se u nekoliko specijaliziranih centara u svijetu (30). Konačna dijagnoza MB se odnosi na otkrivanje mutacija u ATP7A genu. Zbog veličine gena i različitosti mutacija u različitim obiteljima to može zahtijevati vrijeme.

Otkrivanje nositelja i prenatalna dijagnostika

U rizičnim obiteljima treba evaluirati muške fetuse i brzo određivanje spola može se napraviti koristeći specifične DNA sekvence za Y kromosom. Otkrivanje nositelja mjerenjem akumulacije radioaktivnog bakra u kulturi fibroblasta nije pouzdano zbog slučajne X inaktivacije, pa treba napraviti analizu mutacija. U obitelji koje su informativne, mogu se koristiti intragenski polimorfni markeri. U rizičnim trudnoćama gdje se ne zna mutacija u obitelji, biokemijska analiza ostaje jedina mogućnost određivanja genetskog defekta. U prvom tromjesečju ukupni sadržaj bakra u korionskim resicama može se mjeriti direktno osjetljivim i točnim metodama kao što su analiza aktivacije neutrona i apsorpcije atoma, a u drugom tromjesečju akumulacija bakra se mjeri u kulturi stanica plodove vode. Ove analite rutinski se mjeri u Centru Kennedy u Danskoj od 1975. godine (30).

Liječenje

MB je progresivni poremećaj koji dovodi do smrti u ranom djetinjstvu kada je riječ o teškom obliku, iako neki bolesnici prežive i iznad 5 godina. Liječenje je simptomatsko i prikazi slučajeva dokazuju da je pravilna njega važan čimbenik u duljini preživljavanja. Pažljiva medicinska njega i mogućnost administracije bakra, može produljiti život do 13 godina i više. Do sada je prikazano više teže zahvaćenih bolesnika s MB koji imaju dulje preživljenje. Cilj specifične terapije za MB je osigurati više bakra tkivima i enzimima koji su ovisni o bakru. Oralno dodavanje bakra nema efekta, jer je bakar "zarobljen" u crijevima; trebalo bi ga dati parenteralno ili supkutano. Među dostupnim pripravcima, bakar-histidin se pokazao najefikasniji (31-32). Pozitivan ishod suplemen-

tacije s bakar histidinom ovisi o ranom početku davanja i prisutnosti barem parcijalne funkcije ATP7A. Opisani pacijenti su jasno pokazali blaži klinički tijek bez konvulzija, blagu do osrednju ataksiju i gotovo normalan intelektualni razvoj (32). Određeni problemi u autonomnoj disregulaciji, kao što je posturalna hipotenzija i kroničan proljev su ostali. Prema autorima liječenje bakar-histidinom nije moglo prevenirati koštane abnormalnosti (32). Rano supkutano davanje histidina je opisano u 12 mladih bolesnika s dobrim rezultatima (33). Zadnja 2 opisana bolesnika počeli su s terapijom od 5 i 3 mjeseca života i liječeni do 9 odnosno do 5 godina života. Prvi bolesnik je pokazao jako dobar intelektualni status, ali i neželjene efekte terapije bakar histidinom - tubulointersticijsko oštećenje bubrega i deformitete kostiju. Drugi pacijent je razvio punu kliničku sliku bolesti unatoč terapiji i egzistirao u dobi od 5 godina (34). Zaključno, iako je rano liječenje bakar-histidinom važno u prevenciji neurološkog oštećenja, na temelju dosadašnjih iskustava kliničara i znanstvenika bakar-histidin ne može biti prihvaćen kao definitivan lijek za MB.

Prikaz bolesnika

Naš bolesnik M.J. je dijete zdravih roditelja koji nisu u krvnom srodstvu. Imaju dva zdrava sina. M.J. je rođen iz 3. trudnoće prijevremenim porodom, u 36. tjednu gestacije, bez znakova perinatalnog infekta, PM 2090 g, PD 43 cm, Apgar 9/10. Imao je novorođenačku hiperbilirubinemiju, a od dobi od 2 mjeseca i ingvinalnu herniju. Slabo je napredovao na težini, a u dobi od 7 mjeseci zbog hipotonije i tjelesnog nenapredovanja pregledan je u našoj neuropedijatrijskoj ambulanti te nakon toga i hospitalno obrađen u našoj klinici. Tada je imao vrlo kratku, svijetlu i neobičnu kosu temporo-okcipitalno dok je kosa u parijetalnim regijama bila urednog izgleda. Dermatološki pregled kose nije ukazivao na tzv. nalaz promjena u smislu «pilli torti». Na CT mozga je bila izražena difuzno redukcija bijele tvari. U više navrata su učinjene vrijednosti bakra i ceruloplazmina u serumu i vrijednosti su uvijek izuzetno niske: Cu 6, 5 ili 5.3 mikromola/L (14.3-22.2) i ceruloplazmin 0.095, 0.108 ili 0.111 g/L (0.2000-0.600).

Zbog trajno niskih vrijednosti bakra i ceruloplazmina postavljena je sumnja na Menkesovu bolest, ali dijete nije imalo drugih sigurnih kliničkih naznaka te bolesti. Širokom obradom isključili smo nasljedne metaboličke bolesti u smislu organoacidopatija, masnih kiselina vrlo dugih lanaca te manjak biotinidaze. Nije bila riječ niti o kromosomskom poremećaju. Neurotransmiteri u likvoru su pokazali uredan nalaz. MR mozga je u dobi od 4 godine pokazala hipoplastične hemisfere malog mozga uz uredan vermis, hipoplaziju korpusa kalozuma, blaže proširen ventrikularni sustav i periventrikularno visoke intenzitete signala u reduciranoj bijeloj moždanoj tvari. Na ranijem CT mozga frontalno kortikalno lijevo je opisan subduralni hematoma koji je na ovoj MR mozga praktički resorbiran. Nalaz subduralnih hematoma i cerebrovaskularne bolesti bez anamneze o traumi glave je čest u djece s Menkesovom bolesti. U dobi od 2.5 godine u kliničkoj slici postaju primjetne mioklonije, a na EEG se počinju uočavati paroksizmi uz žarišne promjene obostrano temporo-okcipitalno. Uz antiepileptičku terapiju (valproat) je nalaz EEG-a bitno bolji, a mioklonija manje. M.J. je sada u dobi od 9 godina, ima dolichocefaličnu glavu, konvergentni strabizam, svijetlu kosu, koja je nejednake kvalitete i dalje, tj. kratka, svijetla, polomljena obostrano temporo-okcipitalno. Tipično za Menkesovu bolest je da je kosa kraća i tanja postranično i straga na glavi, ali prema nalazu dermatologa nema tipičan nalaz za «pilli torti». Mario se izuzetno puno znoji i po danu i po noći, što možemo pripisati sideropeničnoj anemiji, ali i autonomnoj disfunkciji u

okviru Menkesove bolesti. Sada se neurološki prezentira s teškim psihomotoričkim zaostajanjem, ne zauzima niti jedan lokomotorni položaj.

U dječaka je PCR analizom, SSCP analizom i direktnim sekvencioniranjem varijanti pretraženo 23 egzona u ATP7A genu te je pronađena *frameshift* mutacija u egzonu 4 koja rezultira nefunkcionalnim proteinom.

Ostali poremećaji koji se dovode u vezu s prometom bakra i bolestima mozga (mitohondriopatije)

Bakar je esencijalni kofaktor mnogih bioloških procesa, uključujući mitohondrijsku oksidativnu fosforilaciju, eradikaciju slobodnih radikala, sintezu i maturaciju neurotransmitera i metabolizam željeza. Prijenos bakra na površini stanice i dovodenje bakra enzimima unutar stanice predstavlja izuzetno važne događaje u normalnoj homeostazi stanice. Četiri do sada poznata gena utječu na stanično preuzimanje i prijenos bakra do specifičnih staničnih dijelova i proteina. To je hCTR1, koji regulira unos bakra u stanicu; HAH1 koji posreduje u transferu bakra u MB i Wilsonovoj bolesti; CCS koji je povezan sa prijenosom bakra do superoksid dismutaze te hCOX17 koji usmjerava promet bakra do mitohondrijske citokrom-c oksidaze. Fu i ostali su 2003. testirali mogućnost da defekt u unosu bakra ili unutarstanična translokacija predstavlja bazični defekt u etilmalonskoj encefalopatiji, mitohondriopatijama nepoznate etiologije i razvojnim abnormalnostima u kojima postoji nalaz snižene razine bakra. Nisu nađene mutacije navedena 4 gena važna za transport bakra (35).

Rjeđi poremećaji metabolizma metala

Deficijencija molibdenskog kofaktora

Molibdenski kofaktor je esencijalna komponenta četiriju enzima u ljudi: aldehid oksidaza, reducirajuća komponenta mitondrijskog amidoksima (mARC), ksantin oksidoreduktaza i sulfitna oksidaza. Deficijencija kofaktora dovodi do kombinirane deficijencije ovih enzima. Bolest je rijetka, a nešto se češće opisuje u dijelovima arapske populacije u Sjevernom Izraelu. Deficijencija molibdenskog kofaktora je rijedak metabolički poremećaj kojeg obilježavaju rano i teško progresivno neurološko propadanje, oštećenje autonomne funkcije, pretjerane “startle” reakcije, dizmorfija lica, promjene u tonusu mišića, progresivna cerebralna paraliza, mikrocefalija, neonatalne konvulzije i rana smrt. Bolest najčešće uzrokuje gubitak funkcije sulfitne oksidaze, jednog od četiri enzima ovisna o molibdenskom kofaktoru u ljudi. Približno 2/3 pacijenata sa deficijencijom ovog kofaktora imaju nedostatak cikličkog piranopterin monofosfata (cPMP) i klasificirani su kao MoCD tip A.

Prenatalna dijagnoza se provodi od 1983. godine mjerenjem aktivnosti sulfitne oksidaze. Topcu i suradnici su 2001. (36) opisali troje djece s deficijencijom molibdenskog kofaktora koji su imali refrakterne konvulzije, dismorfiju, hiperekscitabilnost, nisku uričnu kiselinu u krvi, pozitivan sulfitni test u urinu, povišen S-sulfo-L-cisteina u krvi i urinu. Kulturom fibroblasta je potvrđena dijagnoza, a MR mozga je pokazala encefalomalaciju s cističnim promjenama u smislu hipoksičko-

ishemijske encefalopatije. Moramo uvijek isključiti mogućnost deficijencije kofaktora molibdena u novorođenčeta s refrakternim konvulzijama i sa CT ili MR promjenama u smislu hipoksično-ishemijske encefalopatije. Sulfitni test u urinu mora biti dio evaluacije ove djece u neonatalnim jedinicama intenzivne njege (37).

Većina mutacija koja dovodi do deficijencije moloibdenskog kofaktora danas je identificirana u genu MOCS1 (tip A deficijencije), a ostale su MOCS2 genu (tip B deficijencije), te jedna u GPHN genu.

Za tip A deficijencije efikasna supstitucijska terapija je nedavno postala realnost (38). Ranije je bila moguća samo suportivna i simptomatska terapija (antiepileptici). Sada je u tipu A ovog poremećaja moguće supstitucijom cPMP riješiti metaboličke abnormalnosti što dovodi do dramatičnog kliničkog poboljšanja djeteta. Administracija cPMP je izuzetno uspješna u ponovnom uspostavljanju urednih ili skoro urednih vrijednosti *S*-sulfocisteina, tiosulfata, ksantina i urata; dobro se tolerira u dnevnim dozama od 80 do 320 g/kg. Za sada u literaturi nema objava o nuspojavama terapije. Lijek se dozira prateći kliničko poboljšanje i metabolite u urinu. Nije sasvim jasno da li su nivoi *S*-sulfocisteina i tiosulfata u urinu baš optimalni za razvoj mozga. Iako se cPMP daje kao dnevna infuzija kroz CVK, u budućnosti bi mogli biti dostupni i drugi načini davanja terapije.

Veldman i sur. 2010. godine opisuju novorođenče s deficijencijom molibdenskog kofaktora, tvrdokornim konvulzijama i progresivnom atrofijom mozga unutar mjesec dana života, prije nego je započeta supstitucija cPMP (39). Iako je došlo do značajnog poboljšanja kliničke slike tog bolesnika, preporuka je svakako postaviti dijagnozu i početi liječenje prije kraja prvog mjeseca života. U istom radu autori opisuju karakterističan metabolički profil, povišen ksantin i smanjenu uričnu kiselinu u uzorku suhe kapi krvi uzete u 3. danu za novorođenački probir. Da bismo postigli ranu dijagnozu, trebali bismo raditi probir urina metodom spektroskopije masa u novorođenčadi kod kojih sumnjamo na nasljednu metaboličku bolest (ovdje su to bile konvulzije nepoznate etiologije).

Bolesti vezane uz odlaganje mangana u bazalnim ganglijima

Depoziti mangana (Mn) mogu biti odgovorni za hiperintenzitete na T1 mjerenim MR snimkama u bolesnika sa cirozom. Zadnjih 10 godina istražuje se regionalna specifičnost nakupljanja mangana i povezanost sa portalnim-sistemskim shantom ili hepatobilijarnom disfunkcijom (40). Kronična intoksikacija s Mn može biti uzrok degenerativne bolesti poremećaja pokreta, pod nazivom manganizam, čija klinička slika nalikuje Parkinsonovoj bolesti. Nedavni dokazi sugeriraju da ozljeda bazalnih ganglija mijenja normalnu suportivnu funkciju glija stanica u aktivirano stanje koje rezultira povećanom ekspresijom inflamatornih gena kao što su inducibilna sintaza dušikovog oksida (NOS2), koja može priizvesti neurotoksične razine dušikovog oksida (NO). Slične neuroglialne interakcije se dogode u drugim degenerativnim bolestima kao što su Parkinsonova i Huntingtonova bolest.

Intoksikacija manganom je opisana u djece na dugotrajnoj parenteralnoj prehrani, sa slikom poremećaja jetre i živčanog sustava. Kada se u takve djece nađu na MR mozga depoziti mangana u ba-

zanim ganglijima nema izražene bolesti jetre i neuroloških manifestacija, prognoza je dobra, ako se na vrijeme prepozna i prekine preveliki unos mangana. Tada se i na MR mozga putem indeksa intenziteta može pratiti kako se depoziti mangana u bazalnim ganglijima smanjuju (41).

Primarni poremećaji metabolizma magnezija

Magnezij je intracelularni kation, te zbog toga koncentracije magnezija u krvi nisu adekvatne za određivanje ukupne količine dostupnog magnezija. Oko polovica sadržaja magnezija u tijelu nalazi se u kostima, s visokim koncentracijama i u jetri, mišiću i mozgu. Većina magnezija u serumu je vezana za kelatore kao što su ATP, ADP, proteini i citrat. Oko 33% magnezija je vezano za proteine, a 5–10% čini tzv. “slobodni” magnezij koji je esencijalan za regulaciju intracelularnog magnezija. Normalne vrijednosti magnezija u serumu su 0.69–0.94 mmol/l. Osim što ima važnu ulogu u neuromuskularnoj ekscitabilnosti, magnezij je kofaktor u preko 300 reakcija reguliranih enzimima; najvažniji je ATP odnosno kinaza. Tako ima i direktan utjecaj na natrijeve, kalijeve i kalcijeve kanale. Magnezij ima djelovanje na neuromišićnu funkciju slično kao kurare, te posjeduje deprimirajući efekt na središnji živčani sustav. U generaliziranim epilepsijama je nađena direktna korelacija s niskom koncentracijom magnezija i učestalošću napadaja. Točan način kako hipomagnezija uzrokuje konvulzije još nije dobro rasvijetljen. Pretpostavlja se da hipomagnezija može maknuti inhibitorni utjecaj N metil-D-aspartat (NMDA) glutamatnih receptora.(42) Simptomatska hipomagnezija nastaje pri koncentracijama ispod 0.7-1.4 mmol/L.

Primarna hipomagnezija (kongenitalna hipomagnezija, familijarna hipomagnezija ili primarna hipomagnezija sa sekundarnom hipokalcemijom, izolirana intestinalna malapsorpcija magnezija) je rijetko stanje u djece. Fenotipske osobitosti tih pacijenata i istraživanja s animalnim modelima pružili su nova saznanja o mehanizmima transporta magnezija. Transporteri ovog kationa su pronađeni u crijevima i bubrezima. Autosomno dominantne varijante poremećaja su povezane sa hipokalcijurijom i genom FXD2 na kromosomu 11q23 koji kodira podjedinicu Na-K-ATPaze na distalnom kolekcijskom tubulu. Većina fenotipova kongenitalne hipomagnezije je u korelaciji s defektom u transportu magnezija. Primarni deficit apsorpcije crijeva magnezija je odgovoran za hipomagneziju i posljedičnu hipokalcemiju. Defekti apsorpcije magnezija u Henleovoj petlji induciraju hipomagneziju s hipokalcijurijom i nefrokalcinozom, autosomno dominantnom hipokalcemijom i Bartterovim sindromom. Mehanizmi recesivne izolirane hipomagnezije ostaju za sada još nepoznati. Postoji mnogo graničnih fenotipova i korelacija fenotipa i genotipa je još u razmatranju (43, 44)

Hipomagnezija je povezana i s drugim abnormalnostima u kontekstu specifičnih sindroma, pa hipomagnezija sa hipokalemijom sugerira Gitelmanov sindrom čije je obilježje i metabolička alkalozna te visoki renin i aldosteron. Gitelmanov sindrom je uzrokovan mutacijom u SLC12A3 genu na kromosomu 16q13 s funkcijom K/Cl tiazid senzitivnog kotransportera. U izoliranoj dominantnoj hipomagneziji i Gitelmanovom sindromu, abnormalnost u distalnom konvulutu tubula može objasniti primarnu hipomagneziju radi gubitka bubregom. Obiteljska hipomagnezija sa hipokalcemijom je nasljedna bolest povezana s mutacijom u TRPM6 genu na 9q21 čija mutacija dovodi do defekta u renalnom i crijevnom transportu magnezija (42).

Hipomagnezemija, hiperkalciurija i nefrokalcinoza čine rijetku autosomno recesivnu bolest s poliurijom i hiperuricemijom. Naddene su mutacije u CLDN16 genu na 3q koji kodira parastanične transporte.

Budući da je primarna hipomagnezemija rijetka u djece, trebamo isključiti sekundarnu hipomagneziju koju pronalazimo nakon uklanjanja paratireoidne neoplazme, u dijabetičkoj acidozi, malapsorpciji radi ozljede ili resekcije crijeva, dugotrajnijeg gubitka intestinalne tekućine, hiperaldosteronizma te prevelike upotrebe diuretika. Često je povezana i s drugim metaboličkim poremećajima kao što su elektrolitski disbalansi, hipoosmolalitet, septikemija zbog kojih je teško prepoznati hipomagneziju.

Novorođenče može imati prolaznu hipomagneziju zbog dijabetesa majki, intrauterinog zastoja rasta, prolaznog hipoparatireoidizma ili zbog hipomagnezije majke oboljele od celijakije. Generalizirane ili parcijalne konvulzije su također opisane u pacijenata kod kojih je hipomagnezija inducirana ketogenom dijetom radi tvrdokorne epilepsije, terapije ciklosporinom A ili radi visokih doza ibuprofena.

Kako je magnezij izrazito važan u održavanju normalne funkcije stanice, poremećaji magnezija povezani su i s ostalim biokemijskim poremećajima: hipokalijemijom, hipokalcemijom i metaboličkom acidozom. Organski sustavi na koje se odražava deficit magnezija su kardiovaskularni sustav i periferni živčani sustav. Koštane, hematološke, gastrointestinalne i abnormalnosti gentito-urinarne sustava su rjeđe opisane. Neuromišićne manifestacije hipomagnezije uključuju mišićnu slabost, tremor, konvulzije, parestezije, tetaniju, pozitivan Chvostekov znak i Trousseauov znak, vertikalni i horizontalni nistagmus. Kardiovaskularne manifestacije mogu uključivati: elektrokardiografske abnormalnosti, nespecifične promjene T-U vala, prolongirani QT i QU interval, aritmije (prijevremene ventrikularne tahikardije - monomorfna ventrikularna tahikardija, *torsade de pointes*, ventrikularna fibrilacija), povećana toksičnost digitalisa. Metaboličke manifestacije uključuju - hipokalemiju i hipokalcemiju.

Hipermagnezemija je rjeđa od hipomagnezije i rezultat je poremećene ekskrecije ili povećanog unosa magnezija, a može dovesti do neuromišićnih manifestacija, hipotenzije ili drugih kardiovaskularnih poremećaja.

Literatura

1. Tumer Z, Horn N: Menkes disease; in Roach ES, Miller VS (eds): *Neurocutaneous Syndromes*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, p222–233.
2. Horn N, Tumer Z: Menkes disease and the occipital horn syndrome; in Royce PM, Steinmann B (eds): *Connective Tissue and its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*. New York: John Wiley and Sons Inc., 2002, 2nd edn 651–685.
3. Lee J, Penea MMO, Nose Y, Thiele DJ: Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* 2002;25:40253–40259.
4. Formigari A, Irato P, Santon A: Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007;146:443–459.
5. Speisky H, Go'mez M, Burgos-Bravo F et al: Generation of superoxide radicals by copper-glutathione

complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem* 2009;17:1803–1810.

6. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV: Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:747–758.

7. Turski ML, Thiele DJ: New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J Biol Chem* 2009;284:717–721.

8. Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD: Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1215–1220.

9. Camakaris J, Petris MJ, Bailey L et al: Gene amplification of the Menkes (MNK;ATP7A) P-type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2117–2123.

10. Monty JF, Llanos RM, Mercer JF, Kramer DR: Copper exposure induces trafficking of the menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice. *J Nutr* 2005;135: 2762–2766.

11. Linder MC, Zerounian NR, Moriya M, Malpe R: Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. *Biometals* 2003; 16:145–160.

12. Nose Y, Kim BE, Thiele DJ: Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab* 2006; 4:235–244.

13. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL: Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 36857–36861.

14. Choi BS, Zheng W: Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood–CSF barrier. *Brain Res* 2009; 1248: 14–21.

15. Niciu MJ, Ma XM, El Meskini R, Ronnett GV, Mains RE, Eipper BA: Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience* 2006;139:947–964.

16. Nishihara E, Furuyama T, Yamashita S, Mori N: Expression of copper trafficking genes in the mouse brain. *Neuroreport* 1998;9:3259–3263.

17. Liu PC, Chen YW, Centeno JA, Quezado M, Lem K, Kaler SG: Downregulation of myelination, energy, and translational genes in Menkes disease brain. *Mol Genet Metab* 2005;85:291–300.

18. Schlieff ML, Craig AM, Gitlin JD: NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 239–246.

19. Horn N, Morton NE: Genetic epidemiology of Menkes disease. *Genet Epidemiol* 1986;3:225–230.

20. Tonnesen T, Kleijer WJ, Horn N: Incidence of Menkes disease. *Hum Genet* 1991; 86:408–410.

21. Gu YH, Kodama H, Shiga K, Nakata S, Yanagawa Y, Ozawa H: A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:473–478.

22. UCSC Genome Browser; <http://genome.cse.ucsc.edu/>.

23. Das S, Levinson B, Whitney S, Vulpe C, Packman S, Gitschier J: Diverse mutations in patients with Menkes disease often lead to exon skipping. *Am J Hum Genet* 1994;55:883–889.

24. Tumer Z, Muller LB, Horn N: Mutation spectrum of ATP7A, the gene defective in Menkes disease. *Adv Exp Med Biol* 1999;448:83–95.

25. Gu YH, Kodama H, Murata Y et al: ATP7A gene mutations in 16 patients with Menkes disease and a patient with occipital horn syndrome. *Am J Med Genet* 2001;99:217–222.

26. Tumer Z, Muller LB, Horn N: Screening of 383 unrelated patients with Menkes disease and finding of 57 gross deletions in ATP7A. *Hum Mutat* 2003;22:457–463.

27. Muller LB, Bukrinsky JT, Mølgaard A et al: Identification and analysis of 21 novel disease-causing amino acid substitutions in the conserved part of ATP7A. *Hum Mutat* 2005;26:84–93.

28. Borm B, Muller LB, Hausser I et al: Variable clinical expression of an identical mutation in the AT-

- P7A gene for Menkes disease/occipital horn syndrome in three affected males in a single family. *J Pediatr* 2004;145:119–121.
29. Kaler SG: Menkes disease. *Adv Ped* 1994;41:263–304.
30. Tumer Z, Horn N: Menkes disease: recent advances and new aspects. *J Med Genet* 1997;34:265–274.
31. Kreuder J, Otten A, Fuder H et al: Clinical and biochemical consequences of copper–histidine therapy in Menkes disease. *Eur J Pediatr* 1993;152:828–832.
32. Christodoulou J, Danks DM, Sarkar B et al: Early treatment of Menkes disease with parenteral copper–histidine: long-term follow-up of four treated patients. *Am J Med Genet* 1998;76:154–164.
33. Kaler SG, Holmes CS, Goldstein DS et al: Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N Engl J Med* 2008;358:605–614.
34. Monlleo L, del Toro M, Raspall M et al. Long term treatment with copper histidine in Menkes disease: report of two patients with different clinical course). *JIMD*. 2011;34(Suppl3):S123).
35. Fu X, Rinaldo P, Hahn SH, Kodama H, Packman S. Mutation analysis of copper transporter genes in patients with ethylmalonic encephalopathy, mitochondriopathies and copper deficiency phenotypes. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(1):55-66.
36. Reiss, J., Christensen, E., Dorche, C., Molybdenum cofactor deficiency: First prenatal genetic analysis, *Prenatal Diagnosis*, 1999;19:386-388.
37. Topcu, M., Coskun, T., Haliloglu, G., and Saatci, I. Molybdenum cofactor deficiency: Report of three cases presenting as hypoxic-ischemic encephalopathy, *Journal of Child Neurology*, 2001;16:264-270.
38. Reiss, J. and Hahnwald, R. Molybdenum Cofactor Deficiency: Mutations in GPHN, MOCS1, and MOCS2, *Human Mutation*, 2011;32:10-18.
39. Veldman et al. Successful Treatment of Molybdenum Cofactor Deficiency Type A With cPMP *Pediatrics* 2010;125:1249
40. Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L, Todd K et al. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology*. 1999;117(3):640-4
41. Kafritsa Y, Fell J, Long S, Bynevelt M, Taylor W et al. Long term outcome of brain manganese deposition in patients on home parenteral nutrition. *Arch Dis Child* 1998;79:263-265
- 42 Engel J Jr, Pedley TA. *Epilepsy, Second edition.*, Wolters Kluwer; 2008:p1664.
43. Moutagne D, Perimenis P, Douillard C, Wemeau JL, Vantyghem MCCongenital hypomagnesemia. *Presse Med*. 2004;33:1341-8.
44. H. Shalev, M. Phillip, A. Galil, R. Carmi, and D. Landau Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia *Arch Dis Child*. 1998 February; 78(2): 127–130.

Problem unosa žive u organizam prehranom namirnicama iz mora

Maja Krželj¹, Radenka Kuzmanić-Šamija², Venera Lakoš², Vida Šimat¹, Vjekoslav Krželj²

¹ Sveučilišni studijski centar za studije mora, Sveučilište u Splitu, Livanjska 5/III, 21 000 Split

² Klinička bolnica Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Spinčićeva 1, 21 000 Split

Hrana je neophodno potrebna za život svakog organizma jer se preko nje osigurava unos tvari potrebnih za metabolizam. Isto tako u hrani se može pronaći i čitav niz ksenobiotika koji mogu negativno djelovati na zdravlje ljudi, a najčešći su pesticidi, metali, poliklorirani bifenili, dioksini, furani, policiklički aromatski ugljikovodici i radioaktivni elementi (1). Velika pažnja posvećuje se kontaminaciji hrane tijekom proizvodnje, transporta i skladištenja, dok se rijetko uzimaju u obzir čimbenici kojima je hrana podvrgnuta prije ulaska u lanac proizvodnje kao i toksikanti s kojima je prije toga došla u kontakt.

Teški metali su kemijski elementi čija je relativna gustoća veća od 5 g/cm³, a dijele se na esencijalne (Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni, Cr, Co) i neesencijalne (Cd, Pb, Hg, As, Sn). Esencijalni su potrebni za pravilno funkcioniranje organizma, pa njihov nedostatak može biti štetan za organizam, isto kao i njihova visoka koncentracija u organizmu, tako da je pitanje njihove toksičnosti samo pitanje količine. Teški metali predstavljaju značajnu sirovinu za brojne industrijske grane, neophodni su za žive organizme, mogu poboljšati produktivnost u poljoprivredi, a ujedno su i značajni zagađivači. U vidu finih čestica prašine mogu dospjeti u atmosferu, odakle se talože u vodama i tlu. U organizam se mogu unijeti inhalacijom ili ingestijom, a procijenjeno je da se namirnicama unese oko 90 % metala prisutnih u organizmu (1). Zahvaljujući biogeokemijskom ciklusu u prirodi postoji više različitih kemijskih vrsta nekog metala s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima koje se odražavaju u njihovoj različitoj postojanosti i toksičnosti.

Živa (Hg) je kemijski element koji pripada teškim metalima, te je jedini metal koji se na sobnoj temperaturi nalazi u tekućem stanju (2). U okolišu je široko rasprostranjena (nalazi se u tlu, vodi i zraku), a prisutna je u elementarnom, anorganskom i organskom obliku. Jedan je od najopasnijih zagađivala i može se pronaći u sve četiri Zemljine sfere (atmosfera, hidrosfera, litosfera i biosfera) jer u okoliš dopijeva iz prirodnih i iz antropogenih izvora (3). Isto tako je jedino zagađivalo, osim patogenih bakterija, koje je čovjek ispustio u more i time uzrokovao smrt ljudi. Ovaj teški metal biogeokemijskim ciklusom kruži različitim dijelovima okoliša, evaporacijom se prenosi u atmosferu, potom u hidrosferu i biosferu (4). Tijekom biogeokemijskog kruženja dolazi do pretvaranja žive iz elementarnog oblika u anorganske i organske spojeve. Prirodni izvori ispuštanja žive u okoliš su prvenstveno erupcije vulkana, erozija tla, oslobađanje iz stijena koje sadrže živu i bakterijska razgradnja organskih živinih spojeva (3,5). U antropogene izvore spadaju rudarenje i dobivanje žive iz živine rude, izgaranje fosilnih goriva, industrije koje koriste živu u tehnološkim procesima, termoelektrane, spaljivanje otpada, rudnici i rafinerije zlata i srebra, proizvodnja cementa, prerada sulfidnih ruda itd. (3,5). Ispuštanje žive u okoliš iz antropogenih izvora je najčešće direktno, u obliku izlijevanja otpadnih voda, ispuštanja plinova ili odlaganja krutog otpada koji

sadrži živu.

Ovisno o tome na koji način i u kojem obliku je unesena u more, živa se može pronaći u različitim spojevima i akumulirati u sedimentu ili u organizmima. Živa se u moru najčešće nalazi u obliku spojeva živinog klorida (HgCl_4 i HgCl_3) ili u organskim spojevima koji se stvaraju u moru, dok se u anoksičnim sedimentima može pronaći kao elementarna živa (Hg) i u spojevima živinog sulfida (HgS i HgS_2). Morski mikroorganizmi imaju sposobnost pretvaranja svih anorganskih oblika žive u organsku metil-živu (CH_3Hg), koja se zatim ispušta u vodeni stupac i može se akumulirati u morskim organizmima (6). Svi oblici žive i živinih spojeva su potencijalno toksični, perzistentni i bioakumulativni, a njihova toksičnost ovisi o koncentraciji u pojedinom organizmu (7).

Zbog fizikalnih i kemijskih svojstava, te uvriježenog vjerovanja u njeno blagotvorno djelovanje, živa se dugi niz godina koristila u medicini za liječenje brojnih, najrazličitijih bolesti. Osobito je popularno bilo liječenje sifilisa s preparatima žive. Mnoge su poznate osobe poput Mozarta, Beethovena, Paganinija, Schuberta, Schumann i Smetane bile bolesne od sifilisa i liječena preparatima žive, ali se na osnovu simptoma koji su zabilježeni pretpostavlja da je često otrovanje živom, a ne sifilis bio uzrok smrti (8,9,10). Živa se također koristila za izradu krema za izbjeljivanje pigmentacija kože, kao sastojak dječjih pudera i praškova za navodno olakšavanje rasta zubi, kao dezinficijens i antiseptik, antihelmintik, sastojak preparata za liječenje kašlja, opstipacije i proljeva (11). I danas se upotrebljava u stomatologiji za izradu amalgamskih plombi, zatim za proizvodnju toplomjera i drugih mjernih instrumenata, fluorescentnih žarulja, električnih naprava, baterija, boja, protuobraštajnih sredstava, u kozmetičkoj i gumarskoj industriji, u procesu odvajanja zlata iz rude, itd.. Istraživanja su pokazala da je unos žive u more jednako zastupljen iz prirodnih izvora kao i iz antropogenih izvora, zbog čega su donesene stroge zabrane direktnog ispuštanja žive u morski okoliš, kao i zabrana uporabe žive u nekim proizvodima (6).

Otrovanje živom se naziva merkurijalizam. Otrovanja živom poznata pod nazivom „lude šeširdžije“ zabilježena su kod radnika u proizvodnji šešira koji su, zbog upotrebe živinog nitrata za ukrućivanja dlaka u izradi šešira, uz znakove trovanja pokazivali neurološke i psihijatrijske simptome. Lik ludog šeširdžije prikazan je i u priči Alisa u zemlji čuda. Otrovanje živom na britanskom brodu Triumph (1810.) dogodilo se zbog izlivanja žive na palubi broda, uslijed čega su se mornari otrovali inhaliranjem živinih para. U Engleskoj su već 1860. zabilježeni slučajevi otrovanja metil-živom i smrti uzrokovane otrovanjem (4). Nadalje, istraživanja su pokazala da su u organizmu stomatologa koji koriste živu za izradu zubnih plombi izmjerene visoke koncentracije žive, te da se živa iz plomba ispušta u organizam. Iako tako otpuštena živa po svemu sudeći ne izaziva vidljive posljedice otrovanja, u novije se vrijeme nastoje koristiti „bijeke plombe“ (4). Najpoznatija masovna otrovanja živom zabilježena su u Japanu u zaljevima Minamata i Niigata (6,12,13.). Zaljev Minamata u Japanu poznat je kao poprište jedne od najvećih svjetskih ekoloških katastrofa, gdje je oko 27 tona žive ispušteno u more u razdoblju od 1932. do 1969. godine uslijed ispuštanja neobrađenih industrijskih otpadnih voda iz tvornice Chisso u kojoj se živa koristila kao katalizator u proizvodnji acetaldehida. Otrovanje je nastalo kao posljedica konzumiranja ribe koja je u sebi sadržavala visoke koncentracije metil-žive, a bolest je dobila naziv „Minamata bolest“. Glavni opisani simptomi su bili nekontrolirani tremor, poremećaj osjećaja u udovima, gubitak mišićne

koordinacije, poremećaj govora, suženje vidnog polja i gubitak ravnoteže. Nadalje, 1964. i 1965. godine ovi su se simptomi počeli masovno pojavljivati i među stanovništvom oko donjeg dijela toka rijeke Agano u Niigata, ali nije došlo do zatvaranja pogona tvornice sve do 70-ih godina. Otrovanja živom su zabilježena i u Iraku (1971. i 1972.) i u SSSR-u (1968.) kao posljedica konzumiranja kruha proizvedenog od žita impregniranog metil-živinim fungicidom, a slična otrovanja su zabilježena u Gani, Gvatemali i Pakistanu (4,6,13).

Na području Republike Hrvatske je zabilježeno zagađenje mora s povećanom koncentracijom žive u Kaštelanskom zaljevu, zbog direktnog ispuštanja otpadnih voda iz tvornice Jugovinil u kojoj je elementarna živa korištena kao katoda u elektrolizi za proizvodnju lužine (NaOH) i klor. U more ispred tvornice su se desetljećima ispuštale otpadne vode s elementarnom živom, a tragovi žive mogu se još uvijek pronaći u tom području, pogotovo u morskom sedimentu koji je svojevrsni spremnik svakog zagađivala koje se u njemu akumulira do ponovnog otpuštanja u vodeni stupac i zatim ulazi u organizme (14-18). Iako je to bilo jedno od najvećih zagađenja mora na našoj obali, sretna je okolnost bila to što ljudi nisu konzumirali puno ribe i školjke iz ovog područja, te što je u Kaštelanski zaljev ispuštala elementarna živa, a ne metilirana živa kao u Japanu. Nakon što je emisija zaustavljena, primijećen je značajan pad koncentracije žive ispred tvornice, ali je uočen porast koncentracije u sedimentu ispred Kaštel Starog i kod Divulja, u smjeru struje koja je pridonijela prirodnoj redistribuciji. Istraživanja su potvrdila da su u domicilnim vrstama školjkaša i riba koncentracije žive ispod maksimalno dozvoljenih vrijednosti, unatoč tome što su nekoć bile i do 10 puta više od maksimalno dopuštene količine (MDK).

Osobitosti otrovanja živom su različite ovisno o tome da li je izazvano elementarnom, anorganskom ili organskom živom, akutnom ili kroničnom izlaganju otrovu, količini unesene žive i individualnoj reakciji bolesnika. Otrovanje živom se dokazuje laboratorijski mjerenjem koncentracije u krvi, 24-satnom urinu i kosi. S obzirom da se metil-živa izlučuje putem žuči pri otrovanju organskom živom nisu povišene vrijednosti u mokraći (19,20). Liječenje otrovanja živom je potpuno i simptomatsko, a u akutnom otrovanju mogu od koristi biti kelati dimercaprol (BAL) koji se upotrebljava intramuskularno i sukcimer (DMSA) koji je derivat BAL-a za peroralnu upotrebu. Otrovanje organskom metil-živom se ne smije liječiti kelatima jer povećava redistribuciju metil-žive u mozak i tako povećava neurotoksičnost (19).

Otrovanje elementarnom živom nastaje inhalacijom jer lako isparava i dobro se apsorbira u plućima te potom brzo distribuiraju po organizmu i u centralni nervni sustav zbog visoke topivosti u mastima. Izlučuje se urinom, a poluvijek eliminacije je oko 60 dana. U slučaju da elementarna živa dospije u probavni sustav nije opasna jer se veoma loše apsorbira iz crijeva (19). Danas su najčešći izvori intoksikacije elementarnom živom razbijeni toplomjeri i drugi mjerni instrumenti, baterije, neke boje, razbijene fluorescentne žarulje, izrada dentalnih amalgamskih plombi, krematoriji, rudnici žive i srebra te u nekim krajevima svijeta etnički i religijski obredi. U razvijenom svijetu uzroci otrovanja elementarnom živom u djece su u pravilu incidenti s nekontroliranim oslobađanjem ovog teškog metala. Međutim u mnogim nerazvijenim zemljama djeca rade u rudnicima te u opasnom procesu prerade zlatne rude (6,21). Inhalacija elementarne žive može izazvati akutne i kronične kliničke simptome intoksikacije. Simptomi su kašalj, dispneja, bol u prsištu, povišena

temperatura, zimica, glavobolja, tremor, ataksija, smetnje kordinacije, polineuropatija, poremećaji perifernih refleksa, poremećaji vida, nesanica, lošije pamćenje, promjena ponašanja, kožni simptomi poput simptoma akrodinije, edema ekstremiteta, eritema. Ovisno o težini intoksikacije plućni simptomi mogu progredirati u nekrotizirajući bronhiolitis, intersticijsku pneumoniju, plućni edem i smrt zbog plućnog zatajenja. Preživjeli mogu imati različite stupnjeve oštećenja plućne funkcije. Probavni simptomi su manje izraženi nego li u trovanju anorganskim solima žive, a mogu biti prisutni obilna salivacija, metalni okus, povraćanje i proljev. Oštećenja bubrežne funkcije se mogu javiti u subakutnoj fazi otrovanja. Intenzitet kliničkih simptoma ne mora korelirati s razinom žive u organizmu ili intenzitetu izloženosti otrovu (6,19,22). U radu s djecom bi trebalo ukloniti sve potencijalne izvore otrovanja elementarnom živom. Živine toplomjere, tlakomjere i druge instrumente trebaju zamijeniti elektronski aparati. U slučaju da se razbije toplomjer potrebno je odmah otvoriti prozore u prostoriji, izvesti djecu te potom pokušati skupiti razlivenu živu. Obično se zaboravi da je osnovna opasnost otrovanja od razlivenne žive po prostoriji udisanje para koji se oslobađaju te potom inhaliraju.

Anorganski spojevi žive imaju antiseptička, laksativna i diuretska svojstva, ali se više ne upotrebljavaju u liječenju. Anorganske soli žive se nalaze i danas u mnogim zemljama u razvoju u kremama za izbjeljivanje kože i sapunima (6). U Argentini je zabilježena apsorpcija žive kroz kožu dojenčadi preko kontaminiranih pelena (23). Anorganske živine soli su prisutne u nekim pesticidima, pigmentima, baterijama, eksplozivima i u konzervansima nekih medicinskih preparata. Najpoznatiji konzervans je timerosal, koji se metabolizira u organski oblik etil-živu i tiosalicilat, a upotrebljavao se u cjepivima. Krajem prošlog i početkom ovog stoljeća timerosal se povlači iz upotrebe pri izradu cjepiva. Unatoč brojnim kontroverzama o mogućem utjecaju timerosala na pojavu autizma i posljedica otrovanja živom izgledno je da on nije imao utjecaja na učestalost pojave autizma, niti je mogao u dozama u kojim je upotrijebljen izazvati otrovanje (6,19,24-27). Anorganske soli žive unijete na usta akutno imaju snažno korozivno djelovanje na probavni sustav, izazivaju akutnu tubularnu nekrozu te mogu izazvati kardiovaskularni šok i smrt. Nefrotoksičnost je značajno više izražena nego li u otrovanju elementarnom ili organskom živom.

Klasični trijas kroničnog otrovanja anorganskim živinim solima obuhvaća tremor, neuropsihijatrijske poremećaje i gingivostomatitis (19). Treba napomenuti da su simptomi kroničnog otrovanja gotovo isti i za elementarnu te organsku živu. Tremor je u početku fini, intencioni tremor prstiju koji se gubi noću, da bi postupno progredirao, zahvaćao i lice, imao karakteristike koreoatetoze te naposljetku i spasticiteta. Miješana senzomotorna neuropatija i problemi s vidom su također često prisutni. Psihički problemi variraju od emocionalne labilnosti do delirija, anoreksije, gubitka pamćenja i nesanicе. Bubrežni poremećaji kroničnog otrovanja živom se kreću u rasponu od asimptomatske proteinurije do nefrotskog sindroma (19). Akrodinija je oboljenje dječje dobi karakterizirano brojnim kožnim promjenama koje nastaju kao posljedica kroničnog otrovanja s elementarnom živom ili njenim anorganskim solima. Naziv sindroma je izvedenica grčkog porijekla i znači bolni ekstremiteti. Sinonimi za akrodiniju su: Pink Disease, Swift Disease, Feer Disease, Selter Disease, Erythroderma i Erythroderma polyneuritis. Uz karakteristične kožne promjene u acrodyniji se opisuju i drugi simptomi kroničnog otrovanja živom i to posebno promjene u temperamentu, neurološki simptomi s izraženim generaliziranim bolovima i parestezijama, znojenje,

tahikardija, stomatitis, ispadanje zubi i kose. Osip je tipične roze boje, najizraženiji simetrično po rukama i stopalima, skarlatiniforman po nosu i obrazima, praćen je svrbežom, papule mogu progredirati u skvame i ulkuse. Ponekad se pojave i vezikule te hemoragijske promjene po koži. Akrodinija je prvi put opisana davne 1828. godine. Postojale su brojne teorije o etiologiji ovog oboljenja, sumnjalo se na preosjetljivost na živu, da bi se 1948. godine konačno utvrdilo otrovanje živom kao uzrok oboljenja zbog upotrebe dječjih prašaka za zube sa živinim solima. Tada je živa bila u širokoj upotrebi u liječenju djece kao sadržaj preparata protiv crijevnih parazita, kašlja, opstipacije, proljeva, a i za nespecifične uzroke uslijed vjerovanja u ljekovita svojstva žive. Obolijevala su djeca u dobi do tri godine, a najčešće oko devetog mjeseca života. U prošlosti je smrtnost iznosila 5%, a danas je oboljenje veoma rijetko (6,11,19).

Organska živa se u organizam unosi isključivo hranom i to kao spoj metil-živa (CH_3Hg). Zbog industrijske primjene živa je toliko prisutna u okolišu da se može evidentirati u raznovrsnim namirnicama, pogotovo morskoj hrani (školjke, ribe i rakovi). Živa se u elementarnom i anorganskom obliku rijetko pojavljuje u namirnicama, a uglavnom zbog slučajnih kontaminacija kada je u namirnicama prisutna u vrlo malim koncentracijama (5-50 $\mu\text{g/kg}$). Vodeni organizmi koji se koriste za prehranu u sebi obično sadrže veće koncentracije žive i to najčešće u organskim spojevima kao što je metil-živa. Oni mogu apsorbirati živu u anorganskom ili u organskom obliku, nakon čega se ista akumulira u njihovim organizmima vežući se za proteine, te biomagnificira kroz hranidbeni lanac dosežući najviše razine u top predatorima kao što su velike ribe, ptice i sisavci koji se hrane ribom (7). Čovjek je jedini organizam koji se nalazi „poviše“ vršnih predatora i na samom vrhu hranidbenog lanca, tako da je konzumiranjem istih izložen visokim koncentracijama organske žive.

Metali su česta zagađivala u okolišu i u hrani, tako da je kontrola hrane i procjena unosa metala u organizam važna za određivanje izloženosti ljudi njihovom štetnom djelovanju. Zbog toga Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*; WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (*Food and Agriculture Organization*; FAO) donose preporuke o maksimalno dopuštenim količinama (MDK) toksikanta u namirnicama, njihovom ukupnom dnevnom (*acceptable daily intake*; ADI) i tjednom unosu (*provisional tolerable weekly intake*; PTWI) za odrasle, nakon čega svaka država prema svojim studijama i prema preporukama WHO i FAO donosi nacionalne pravilnike u kojima su propisane najveće dopuštene količine određenih zagađivala u hrani. Utvrđene vrijednosti u namirnicama moraju biti unutar granica propisanih maksimalno dopuštenih količina (MDK) koje su propisane navedenim pravilnicima.

Preporučene WHO PTWI vrijednosti unosa ukupne žive iznose 0,005 mg/kg tjelesne težine, tako da je većina zemalja uvela granične vrijednosti od 0,5 – 1,0 ppm ukupne žive (26). Maksimalne dopuštene količine žive u hrani u Republici Hrvatskoj određene su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/08), te iznose 0,5 i 1,0 mg/kg mokre težine, ovisno o vrsti vodenog organizma. U zemljama u kojima se češće kao hrana konzumiraju vodeni organizmi (npr. Japan) zabilježene su znatno više koncentracije ovog kontaminanta kod ljudi, nego u zemljama u kojima se većinom konzumiraju ostali tipovi namirnica. Tako je zabilježeno da je prosječna dnevna apsorpcija žive po stanovniku u Velikoj Britaniji, Kanadi i Švedskoj

4 do 8 puta niža nego u Japanu, što ukazuje na povezanost koncentracije žive i načina prehrane (26).

Najtoksičniji oblik žive je metil-živa. Metil-živa je organski spoj žive koji najčešće nastaje mikrobiološkim pretvaranjem iz anorganskih spojeva u vodenim ekosustavima ili u vodenim organizmima pa se unosi hranom i to gotovo isključivo ribom, školjkama i rakovima. Jednom unesena u organizam živa ima sposobnost lakog vezanja za $-SH$ i $-NH_2$ skupine, te na taj način inhibira enzimске aktivnosti i stvara stabilne spojeve s dugim poluvremenom zadržavanja u tkivima pa se lako akumulira u organizmima. Metil-živa je topiva u mastima, dobro se apsorbira iz crijeva, lako prolazi hemato-likvornu barijeru te se nakuplja u mozgu, zatim u bubrezima, jetri, srcu i masnom tkivu, odlaže se u dlakama, a iz organizma se izlučuje sporo. Dok se iz organizma urinom mogu izlučiti elementarni i neorganski oblici žive (vrijeme polueliminacije 40-60 dana), organski se najčešće izlučuju preko žuči s vremenom polueliminacije oko 70 dana (19). Kod žena se živa izlučuje i mlijekom za vrijeme laktacije, metil-živa lako prolazi transplacentarno, zbog čega se dojiljama i trudnicama ne preporuča konzumiranje morskih organizama koji bi mogli sadržavati nedozvoljene količine metil-žive, jer bi mogli ugroziti fetuse i djecu. Nekoliko istraživanja je dokazalo direktnu povezanost i pozitivnu korelaciju koncentracije metil-žive i kardiovaskularnih bolesti, a posebno s poremećajima ritma i povišenim arterijskim tlakom (6, 20, 28). Klinička slika otrovanja organskom živom dosta varira i nije uvijek u korelaciji s koncentracijom detektiranog agensa u organizmu (20). Najčešće dolazi do oštećenja središnjeg živčanog sustava kako je ranije opisano za kronična otrovanja živom, dok su klinički simptomi probavnog sustava i bubrega prisutni ali manje izraženi nego li u otrovanju organskim solima. Akrodinija se ne javlja u otrovanja organskom živom.

Istraživanja pokazuju da je kod otrovanja metil-živom koncentracija u kosi obično oko 300 puta veća nego u ukupnom volumenu krvi pa je analiza kose bolji pokazatelj za kroničnu intoksikaciju. Uobičajena koncentracija žive u krvi manja je od $10 \mu\text{g/L}$ (19-20), a postoje i stavovi da je normalna vrijednost koncentracije žive manja od $5 \mu\text{g/L}$ (6, 29). Koncentracija žive u krvi je očekivano kod otrovane osobe veća od $35 \mu\text{g/L}$. Neurološki simptomi se u pravilu javljaju kada je vrijednost u krvi iznad $100 \mu\text{g/L}$, ali su opisani i kod znatno nižih vrijednosti pa čak i $10 \mu\text{g/L}$. Vrijednosti u krvi se mogu normalizirati već nakon jednog dana od akutnog izlaganja trovanju živom (30). Koncentracije žive u 24 satnom urinu u osobe izložene prekomjernom unosu žive su veće od $20 \mu\text{g/L}$, a u otrovane osobe su veće od $150 \mu\text{g/L}$ (6,19). Koncentracije u urinu su bolji pokazatelj od vrijednosti u krvi i kosi, ali i tu je vidljiv široki raspon individualnih reakcija pri ispoljavanju kliničke slike otrovanja. Većina ljudi imaju vrijednost žive u kosi manju od $1 \mu\text{g/g}$ (ppm). U odraslih su zabilježeni neurološki simptomi pri razini od $4,2 \text{ ppm}$ u kosi, a u djeteta koje je prenatalno bilo izloženo živi su uočeni u pojedinačnim slučajevima neurorazvojna odstupanja pri koncentraciji od $1,2 \text{ ppm}$ i u najniže zabilježenoj vrijednosti od samo $0,3 \text{ ppm}$ u majčinoj kosi (20). To pokazuje kolika je izrazita osjetljivost mozga fetusa na izloženost malim koncentracijama metil-žive.

U istraživanju koje je provedeno u Zagrebu uspoređena je koncentracija žive u krvi, kosi i urinu žena koje su podijeljene u grupe ovisno o prehranbenim navikama: vegetarijanke koje nikada ne konzumiraju ribu i nevegetarijanke koje jednom tjedno konzumiraju ribu. Kod svih žena, neovi-

sno o prehrambenim navikama, pronađeni su tragovi žive u kosi, krvi i urinu, te je zabilježeno da su koncentracije u krvi i kosi znatno niže u vegetarijanki, a u urinu kod nevegetarijanki (31).

Mozak fetusa je osjetljiviji na utjecaj metil-žive nego odrasli, zbog toga što ona inhibira podjelu i migraciju živčanih stanica, te na taj način oštećuje moždane stanice. Environmental Protection Agency (EPA) je zbog epidemioloških podataka iz dugogodišnjih istraživanja utjecaja žive na fetuse zbog izlaganja roditelja kontaminaciji, smanjila ADI metil-žive sa 0,5 µg/kg na 0,1 µg/kg, što je ekvivalentno 198 g tune tjedno (32). Djeca su osjetljivija na utjecaj metil-žive zbog većeg unosa hrane u odnosu na tjelesnu masu i manje sposobnosti eliminacije žive iz tijela, a zabilježeno je da djeca čije su majke tijekom trudnoće bile otrovane živom pokazuju znakove oštećenja živčanog sustava i mentalne zaostalosti. Kod djece otrovane u Minamati su zabilježene cerebralna paraliza, zaostalost u tjelesnom razvoju, mikrocefalija, autizam, gluhonijemost i sljepoća, mentalne smetnje, oštećenje živčanog sustava i smrt, dok je nakon smrti u mozgu izmjerena 20% veća koncentracija žive nego kod njihovih majki. Osim toga, na istom području je zabilježen i slučaj majke, koja je za vrijeme trudnoće jela ribu zatrovanu metil-živom i nije se zatrovala, dok je njezino dijete kasnije umrlo zbog otrovanja. U tri opsežna istraživanja provedenim na Farskim Otocima, Sejšelimima i Novom Zelandu promatrala se povezanost prenatalnog izlaganja fetusa metil-živi s psihološkim i neurološkim razvojem u djetinjstvu. Prenatalna izloženost žive mjerila se koncentracijom u majčinoj kosi, krvi iz pupkovine i kosi djece. Ispitivao se kvocijent inteligencije, pamćenje, koncentriranost, govor i orijentacija u prostoru. Istraživanja na Farskim Otocima i Novom Zelandu su pokazala pozitivnu korelaciju izloženosti metil-živi i smetnjama u razvoju, dok u istraživanju na Sejšelimima to nije bio slučaj (33-40).

U istraživanjima provedenima na području Kaštelanskog zaljeva mjerene su koncentracije žive u uzorcima placenti roditelja koje često konzumiraju ribu iz tog područja, kako bi se izmjerile koncentracije žive unesene u tijelo trudnica i procijenio stupanj ugroženosti fetusa. Utvrđeno je da je koncentracija žive u korelaciji sa brojem ribljih obroka, te da je količina unesene žive bila ispod maksimalno dozvoljenog unosa zbog čega nije bilo znakova merkurijalizma.

Zbog bioakumulacije i biomagnifikacije najviše koncentracije žive u morskim organizmima mogu se zabilježiti u top predatorima kao što su sabljarka, tuna, morski psi, dupini, kitovi itd.. Većina morskih riba sadrži 150 µg/kg (0,15 ppm) žive u mišićnom tkivu, dok se u riba u zagađenim područjima mogu zabilježiti znatno više koncentracije. Koncentracija žive u navedenim organizmima je proporcionalna rastu i starosti organizma, tako da se u organizmima koji su teži od 115 kg i kod 50% organizama težih od 60 kg može očekivati >1ppm žive u mišićnom tkivu, od čega je više od 90% metil-živa, što ih čini neprikladnima za prehranu. Kod ptica visoke koncentracije žive su zabilježene u jetri i u perju koje služi za izbacivanje žive iz organizma, te može poslužiti i za dugoročno praćenje onečišćenja okoliša.

Tuna je jedna od najcjenjenijih namirnica na tržištu i jedan od najkonzumiranijih morskih organizama jer je najdostupnija u jeftinim konzerviranim proizvodima, zbog čega se preporuča u različitim dijetama kao zdrava hrana s visokim postotkom proteina i omega 3 masnih kiselina, te niskim postotkom zasićenih masti i kolesterola. Smatra se da je dokosaheksaenska (DHA) omega 3 masna

kiselina potrebna za razvoj mozga i oka (41). Međutim, često se u propisivanju ovih dijeta ne uzima u obzir visoka koncentracija metil-žive koju tuna sadrži i koja bi mogla biti kontraproduktivna, odnosno štetna za zdravlje ljudi koji je redovito konzumiraju. Istraživanja su pokazala da samo jedan riblji obrok s visokom koncentracijom žive ($> 2,0 \mu\text{g/g}$) može uzrokovati oštećenja u razvoju fetusa. U istraživanjima provedenim na tunama ulovljenim u vodama Malte i Libije, te uzgajanim u Jadranu, izmjerene su koncentracije žive $0,490\text{--}1,809 \mu\text{g/g}$ u mišićnom tkivu i $0,324\text{--}3,248 \mu\text{g/g}$ u jetri. Proučavane tune su u trenutku uzorkovanja težile $100\text{--}300 \text{ kg}$, a 41% uzoraka njihovog mišićnog tkiva sadržavalo je koncentracije žive više nego što je zakonom propisano (7).

Riba je bez sumnje korisna i kvalitetna namirnica koju je nužno koristiti u prehrani. Međutim pri odabiru vrste i količine ribe treba voditi računa o mogućnosti intoksikacije metil-živo. Osobito treba biti oprezan u prehrani trudnica zbog izrazite toksičnosti na nervni sustav fetusa, te odabrati ribu s malom količinom metil- žive, odnosno male ribe na početku hranidbenog lanca (npr. inćun i srdela).

Literatura

1. Sutlović D, Marušić J, Stipišić A, Poljak V, Laštre Primorac D, Majić Z, Luetić S, Knezović Z, Papić J, Žafran Novak J, Fulgosi H, Pollak L, Žuntar I, Plavšić F. Toksikologija hrane. Sutlović, Davorka (ur.). Split : Redak, 2011.
2. Risher JF, Amler SN. Mercury Exposure: Evaluation and Intervention The Inappropriate Use of Chelating Agents in the Diagnosis and Treatment of Putative Mercury Poisoning. *NeuroToxicology* 2005; 26: 691–699.
3. Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxson P. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* 2010; 44: 2487–2499.
4. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N Engl J Med* 2003; 349:1731-7.
5. Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, Finkelman RB, Friedli HR, Leaner J, Mason R, Mukherjee Ab, Stracher GB, Streets DG, Telmer K. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmos. Chem. Phys.*, 2010; 10, 5951–5964.
6. Bose-O'Reilly S, McCarty MK, Steckling N, Beate Lettmeier B. Mercury Exposure and Children's Health *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2010; 40: 186–215.
7. Srebocan E, Pompe-Gotal J, Prevendar-Crnic A, Ofner E. Mercury concentrations in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) farmed in the Adriatic Sea. *Veterinarni Medicina*, 2007; 52 (4): 175–177.
8. Scheidt W. Mercury poisoning in Mozart, Beethoven and Schubert? *Med Klin*. 1967; 62:195-6.
9. Franzen C. Syphilis in composers and musicians--Mozart, Beethoven, Paganini, Schubert, Schumann, Smetana. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27:1151-7. Epub 2008 Jul 1.
10. Marcelo Miranda C, Luz Navarrete Ta, Gonzalo Zúñiga Nb. Niccolo Paganini: Medical aspects of his life and work. *Rev Méd Chile* 2008; 136: 930-936.
11. Bjorklund G. Mercury and acrodynia. *Journal of Orthomolecular Medicine*. 1995; 10: 145-6.
12. Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Review Toxicology* 1995; 25:1–25.
13. Springer O, Springer D. Otrovani modrozeleni planet. Meridijani, Samobor, 2008.
14. Mikac N, Picer M. Živa u okolišu VI. Tvornice klor-alkalija kao izvor zagađenja živom, primjer zagađenja Kaštelanskog zaljeva. *Kem Ind* 1984; 33: 653-60.
15. Stegnar P, Vukadin I, Smodiš B, Vakselj A, Prosenc A. Trace elements in sediments and organisms

from Kaštela bay. *Ves Journees Etud Pollutions CIESM* 1980;596-600.

16. Mikac N, Roje V, Cukrov N, Foucher D. Mercury in aquatic sediments and soils from Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006;57:325-332.
17. Bogner D. Površinski sedimenti i utjecaj njihovih fizičko-kemijskih svojstava na raspodjelu teških kovina u Kaštelanskom zaljevu. MSc thesis. Zagreb. University of Zagreb, 1996.
18. Mikac N, Foucher D, Kwokal Ž, Barišić D. Mercury and radionuclides in sediments of the Kaštela bay (Croatia) – evaluation of the sediment pollution history. *Croat Chem Acta* 2006;79:85-93.
19. Mahajan PV. Heavy metal intoxication. U Kliegman: *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia; Saunders, 2007; 2909-13.
20. Silbernagel SM, Carpenter DO, Gilbert SG, Gochfeld M, Groth E 3rd, Hightower JM, Schiavone FM. Recognizing and preventing overexposure to methylmercury from fish and seafood consumption: information for physicians. *J Toxicol*. 2011;2011:983072. Epub 2011 Jul 13.
21. Bose-O'Reilly S, Lettmeier B, Gothe RM, Beinhoff C, Siebert U, Drasch G. Mercury as a serious health hazard for children in gold mining areas. *Environ Res*. 2008; 107:89-97.
22. Sevetoglu E, Hatipoglu S, Gedikbasi A, Kilic A. Accidental inhalation of mercury vapour in child. *Ann Saudi Med* 2011;31:201-2.
23. Gotelli CA, Astolfi E, Cox C, Cernichiari E, Clarkson TW. Early biochemical effects of an organic mercury fungicide on infants: "dose makes the poison. *Science*. 1985; 227:638-40.
24. Baker JP. Mercury, vaccines, and autism: one controversy, three histories. *Am J. Public Health*. 2008; 98:244-53.
25. Silbergeld EK. Mercury, vaccines, and autism, revisited. *Am J. Public Health*. 2008; 98:1350.
26. World Health Organization. Exposure to mercury: A major public health concern. WHO, Public Health and Environment; Geneva: 2007.
27. World Health Organization - Global Advisory Committee on Vaccine Safety. Statement on Thiomersal. World Health Organization; Geneva: 2006. Available at: http://www.who.int/vaccine_safety/topics/thiomersal/statement200308/en/index.html
28. Guallar E, Inmaculada Sanz-Gallardo M, Van't Veer P, Bode P, Aro A, Gómez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martín-Moreno JM, Kok FJ. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2002; 347: 1747-54.
29. New York State Department of Health, "Section 22.7 reportable levels of heavy metals in blood and urine," 2010, <http://www.health.ny.gov/regulations/nycrr/title 10/part 22/ #s226>.
30. Goldman LR, Shannon MW. Committee on Environmental Health, American Academy of Pediatrics. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics*. 2001; 108:197-205.
31. Janev Holcer N. Utjecaj prehrane ribom na opterećenje živom u žena generativne dobi. Prirodoslovno-matematički fakultet. Sveučilište u Zagrebu. 2010. 128.str. Doktorska disertacija.
32. Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury. Washington, D.C.: Environmental Protection Agency, January 2001. (EPA-823-R-01-001.)
33. Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S, Mantell C. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage I: Preliminary Tests at Age 4. National Swedish Environmental Protection Board; Solna, Sweden: 1986.
34. Kjellstrom, T.; Kennedy, P.; Wallis, S.; Stewart, A.; Friberg, L.; Lind, B. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage II: Interviews and Psychological Tests at Age 4. National Swedish Environmental Protection Board; Solna, Sweden:1989.
35. Grandjean P, Weihe P, Jorgensen PJ, Clarkson T, Cernichiari E, Videro T. Impact of maternal sea-food diet on fetal exposure to mercury, selenium, and lead. *Arch Environ Health*. 1992; 47:185-95.
36. Grandjean P, Weihe P, White RF. Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology*. 1995; 16:27-33.

37. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 1997; 19:417–28.
38. Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, et al. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA.* 1998; 280:701–7.
39. Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Marsh DO, Tanner MA. Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months. *Neurotoxicology.* 1995; 16:677–88.
40. Marsh DO, Clarkson TW, Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Cernichiari E. The Seychelles study of fetal methylmercury exposure and child development: introduction. *Neurotoxicology.* 1995; 16:583–96.
41. Oken E, David C, Bellinger DC. Fish consumption, methylmercury and child neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr.* 2008 April ; 20: 178–183.

Zamke u mjerenju i interpretaciji nalaza oligoelemenata

Ksenija Fumić, Karmen Bilić, Marija Zekušić, Ana Škaričić

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

Element u tragu (oligoelement) je onaj element periodičnog sustava kojeg u organizmu ima manje od 0,01% ukupne tjelesne mase. Svi oligoelementi zajedno čine manje od 0,2% tjelesne mase. Dije se na esencijalne i neesencijalne elemente. Esencijalni su potrebni za život i normalno odvijanje metaboličkih procesa: željezo, bakar, cink, krom, mangan, fluor, jod, stroncij, molibden, kobalt, selen, nikal i vanadij. Njihove količine u organizmu kreću se od 1,5 mg do 4,2 g. Neesencijalni elementi u tragu (aluminij, olovo, živa, talij, kadmij, arsen i dr.) nisu potrebni za život, a u većim su količinama otrovni. Patološke promjene u koncentraciji esencijalnih oligoelemenata u organizmu nastaju radi nedovoljnog unosa hranom, intoksikacije ili mogu biti posljedica bolesti. Značajne promjene koncentracija pojedinih esencijalnih oligoelemenata (npr. željezo, bakar, cink, selen) u krvi i tkivima obilježja su nekih nasljednih metaboličkih bolesti koje se opisuju u drugim tekstovima u ovom izdanju priručnika. Međutim, ove promjene mogu biti i sekundarne, uzrokovane nekim drugim poremećajima, prvenstveno bolestima jetre i gastrointestinalnog trakta. Nakupljeni toksični neesencijalni elementi mogu djelovati kao stanični otrovi ili mogu kompeticijom istisnuti esencijalne elemente u tragu i time prouzročiti njihov manjak u organizmu. Na navedene poremećaje liječnika mogu uputiti izmjerene vrijednosti oligoelemenata u serumu, plazmi, punoj krvi, eritrocitima, mokraći ili biopsatima tkiva. Pri sumnji na intoksikaciju, toksikološki laboratoriji koriste i druge vrste uzoraka (npr. kosa) za mjerenje oligoelemenata. Da bi nalaz imao pravu kliničku pouzdanost, pri njegovom tumačenju trebalo bi uzeti u obzir niz čimbenika vezanih za bolesnika i vrstu uzorka kao i analitičku pouzdanost rezultata mjerenja oligoelemenata.

Kako u kliničkom laboratoriju mjerimo oligoelemente?

Zbog izuzetno niskih koncentracija oligoelemenata u biološkim uzorcima za njihovo mjerenje neophodna je primjena osjetljivih tehnika. U Hrvatskoj se za rutinsko mjerenje osnovnih esencijalnih oligoelemenata bakra i cinka u laboratorijima kliničkih bolničkih centara uglavnom koriste atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), a za selen atomska apsorpcijska spektrometrija-grafitna tehnika (GF-AAS, *engl.graphite furnace atomic absorption spectrometry*). Za mjerenje željeza dovoljne su manje osjetljive spektrofotometrijske metode. Ove metode koriste se i za mjerenje bakra i cinka u laboratorijima koji nemaju AAS. Budući da su ovi elementi jako rasprostranjeni u okolišu, postoji mogućnost kontaminacije uzoraka. To se najčešće događa zbog neodgovarajućeg pranja staklenog pribora (nedovoljno ispiranje nakon pranja deterdžentom) te uporabe kemikalija i vode nezadovoljavajuće čistoće. Preporučena tehnologija za sve elemente u tragovima je masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS, *engl.inductively coupled plasma mass spectrometry*). Ova tehnologija još nije u uporabi u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici, već se primjenjuje u referentnim toksikološkim i forenzičkim laboratorijima. Mjerenje oligoelemenata u laboratorijima koji koriste AAS i/ili GF-AAS tehnologiju uz kontinu-

irano provođenje unutrašnje kontrole kvalitete i vanjske procjene kvalitete, smanjuje mogućnost analitičke pogreške na najmanju mjeru.

Najčešći uzroci pogrešaka prije mjerenja oligoelemenata

Dosadašnja iskustva pokazala su da najveći broj uzroka koji mogu dovesti do pogrešnog tumačenja izmjerenih vrijednosti oligoelemenata potiče od neodgovarajuće pripreme bolesnika prije uzimanja uzorka, nepravilnog postupka uzimanja ili neodgovarajuće vrste uzorka za mjerenje (*tzv. predanalitička faza*).

Priprema bolesnika. Željezo je oligoelement koji se najčešće mjeri u kliničkom laboratoriju. Prije dolaska na vađenje krvi koje uključuje i mjerenje željeza, bolesnik bi trebao biti upoznat da 24-48 sati prije vađenja krvi ne pije sokove obogaćene vitaminima i mineralima. Ukoliko je na terapiji, kontrolno mjerenje željeza trebalo bi napraviti najmanje tjedan dana nakon prestanka peroralne terapije željezom, tri dana nakon intravenozne terapije, odnosno mjesec dana nakon intramuskularnog davanja željeza. Na izmjerene vrijednosti oligoelemenata koji su u krvi vezani za proteine utječe i položaj tijela (sjedeći ili ležeći) prilikom vađenja krvi. Primjerice, ako je bolesnik ujutro ambulantno vadio krv za mjerenje željeza, te je iza toga zaprimljen na odjel gdje se vadila krv u ležećem položaju, razlike u koncentraciji mogu biti od 5-10%.

Vađenje krvi. Za mjerenje esencijalnih oligoelemenata željeza, bakra i cinka najčešće se koriste jednokratne sterilne epruvete s podtlakom bez antikoagulansa. Danas su te epruvete, čepovi i igle od materijala koji minimalno utječu na mjerenje spomenutih metala. Međutim, preporuka struke je korištenje epruveta (za uzimanje krvi i pohranu seruma) napravljenih od specijalnog materijala koji ne interferira s oligoelementima u krvi. Te epruvete, neovisno o proizvođaču, imaju tamno plavi čep. Njihova viša cijena u odnosu na druge jednokratne sterilne epruvete je najčešće ograničavajući čimbenik za uporabu u rutinskim laboratorijima. Ako se bolesniku zbog zatraženih pretraga krv treba istovremeno uzimati u nekoliko epruveta s različitim antikoagulansima, pokazalo se da je najmanja mogućnost kontaminacije ako je epruveta namijenjena za određivanje oligoelemenata (tamno plavi čep) zadnja u nizu.

Uzimanje mokraće. Određivanje oligoelemenata iz uzorka 24-satne mokraće daje klinički vrijedne nalaze pri sumnji na poremećaje metabolizma oligoelemenata. Prije sakupljanja mokraće bolesnik bi trebao biti upozoren da koristi isključivo jednokratne posude namijenjene u tu svrhu. Korištenje nedovoljno dobro opranih i ispranih posuda, „čistih“ boca od mineralnih voda i sl., mogući su izvor lažno povišenih vrijednosti.

Odabir uzorka za određivanje. Serum i/ili plazma pogodni su za određivanje oligoelemenata koji se prenose krvlju otopljeni ili vezani za proteine. Takva je većina oligoelemenata. Iznimka su olovo, arsen i bizmut. Izmjerena koncentracija olova u serumu ne daje uvijek pravu sliku trovanja organizma olovom. Naime i izmjerene koncentracije olova koje se približavaju maksimalno dozvoljenim koncentracijama u krvi, mogu uzrokovati biokemijske promjene i subkliničke simptome otrovanja. Razlog je tomu što je sinteza hema vrlo osjetljiva na olovo. Olovo inhibira aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kiseline i koproporfirinogen oksidaze što dovodi do po-

rasta δ -aminolevulinske kiseline u serumu i mokraći te do koproporfirije. Olovo osim toga inhibira ugradnju željeza u protoporfirin, koji se stoga nakuplja u eritrocitima. Zato su koncentracija protoporfirina u eritrocitima, koncentracija δ -aminolevulinske kiseline u serumu i aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kiseline u eritrocitima bolji pokazatelji mogućeg trovanja olovom nego njegova izmjerena koncentracija u serumu. Kadmij, kobalt, molibden, talij nakupljaju se većinom u eritrocitima, pa je za njihovo mjerenje pogodnija *puna krv* ili *izolirani eritrociti*. Budući da je koncentracija cinka u eritrocitima 10 puta veća od onih u serumu, cirkulirajući cink treba se mjeriti isključivo u nehemoliziranim uzorcima. Pri kliničkoj sumnji na Wilsonovu bolest, uz mjerenje bakra i ceruloplazmina u serumu i bakra u mokraći, u nekih se bolesnika uzima i *biopat jetre*. U uznapredovaloj fazi Wilsonove bolesti zapaženo je neravnomjerno taloženje bakra u hepatocitima što može uzrokovati krivo tumačenje nalaza dobivenog iz uzorka biopтата. Oligoelementi se mogu mjeriti i iz *uzorka kose*. Međutim, kontaminacija prašinom i kemikalijama kojima je kosa tretirana može značajno utjecati na izmjerene vrijednosti. Također pri tumačenju nalaza treba uzeti u obzir da oligoelementi nisu u ravnomjernoj koncentraciji uzduž duljine vlasi. Zbog toga se uzorak kose za mjerenje oligoelemenata koristi uglavnom u forenzičkim laboratorijima.

Klinička pouzdanost izmjerenih vrijednosti oligoelemenata

Tumačenje izmjerenih vrijednosti oligoelemenata samo prema referentnim rasponima može dovesti do pogrešnih kliničkih zaključaka. Klinička pouzdanost rezultata u značajnoj mjeri ovisi i o biološkim čimbenicima. Primjerice, u iste osobe vrijednosti željeza u serumu mogu varirati i do 100% unutar nekoliko dana zbog dnevnih varijacija (smanjene koncentracije željeza poslije podne i uvečer) ili menstrualnog ciklusa (10-30% povećane koncentracije prije, a smanjene nakon ciklusa). Koncentracije željeza u serumu su povećane kod uzimanja acetilsalicilne kiseline, kloramfenikola, oralnih kontraceptiva, multivitamina i kemoterapije (cisplatine i metotreksata), dok se smanjenje koncentracije željeza može nalaziti kod upalnih stanja i zloćudnih bolesti. Zbog navedenih razloga, izolirani nalaz koncentracije željeza u serumu nema veliku dijagnostičku vrijednost.

Vrijednosti cinka u serumu podliježu dnevnim varijacijama. Koncentracije cinka znatno se smanjuju nakon uzimanja obroka, a povećavaju nakon kratkotrajnog gladovanja. Postoji i razlika ovisno o vrsti uzorka (serum ili plazma), jer su koncentracije cinka u serumu za 5-15% veće od onih u plazmi (tijekom procesa zgrušavanja otpušta se cink iz eritrocita i trombocita). Iako određivanje koncentracije cinka u serumu može ukazati na njegov manjak, ipak uvijek ne odražava i stvarni status cinka u organizmu. Koncentracija cinka u plazmi u korelaciji je s koncentracijom albumina, glavnim proteinskim nosačem cinka. Stoga izmjerena snižena koncentracija cinka u stanju hipoalbuminemije (npr. kod ciroze jetre i malnutricije), može zapravo odražavati smanjenu mogućnost vezanja cinka. Pri tumačenju nalaza treba uzeti u obzir da izmjerena koncentracija cinka u krvi ne odražava uvijek njegovu koncentraciju u tkivima.

Vrijednost izmjerenog bakra u serumu može se odgovarajuće tumačiti jedino uz poznavanje koncentracije ceruloplazmina (95% serumskog bakra se ugrađuje u jetri u ceruloplazmin). Prilikom tumačenja nalaza u vidu treba imati da su bakar i ceruloplazmin povišeni u žena u trudnoći i za vrijeme uzimanja estrogena, da je ceruloplazmin nespecifično povišen za vrijeme trajanja upalnih procesa, a bakar za vrijeme terapije karbamazepinom i fenobarbitonom.

Prilikom tumačenja nalaza seleni u plazmi, u obzir treba uzeti osim referentnih raspona navedenih u nalazu i vrstu prehrane bolesnika.

Za kliničku procjenu trovanja oligoelementima, nužno je uzeti u obzir i sve čimbenike toksikokinetike, a posebno obratiti pozornost na poluživot oligoelemenata. Primjerice, i olovo i magnezij se dobro apsorbiraju i nakupljaju u eritrocitima ali se njihovo vrijeme poluživota bitno razlikuje: poluživot olova je oko mjesec dana, te se ono vrlo polako izlučuje iz organizma u mokraću, dok je poluživot magnezija u cirkulaciji oko 24 sata te se on vrlo brzo izlučuje iz organizma putem žuči i fecesa.

Zaključak

Osim bolesti na konačni rezultat mjerenja oligoelemenata mogu utjecati brojni čimbenici koji po svojoj prirodi mogu biti biološki i metodološki. Njihovo uvažavanje može pomoći liječniku pri tumačenju izmjerenih vrijednosti.

Literatura

1. Fell GS. *Analytical procedures for diagnosis of trace element disorders.* *J Inher Metab Dis* 1983;1:5-8.
2. Tondo M, Lambruschini N, Gomez-Lopez L, Gutierrez A, Moreno J, Garcia-Carazola A, Perez-Duenas B, Pineda M, Campistol J, Vilaseca M, Artuch R. *The monitoring of trace element in blood samples from patients with inborn errors of metabolism.* *J Inher Metab Dis* 2010;6:211-214.
3. Hsieh CS, Andrade JD, Costa R. *Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry.* *Clin Chem* 1977;43:2303-2311.

Kada treba misliti na manjak selen Prikaz bolesnika s hiposelenemičkom kardiomiopatijom

Andrea Dasović Buljević

Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Uloga selen u organizmu

Selen je esencijalan mineral u tragu u ljudskom organizmu. Već gotovo četiri desetljeća poznato je kako njegova deficijencija rezultira sniženom aktivnošću glutathion peroksidaze. Glutathion peroksidaza (GPx) je zajedničko ime za enzimsku obitelj čija je glavna biološka uloga zaštita organizma od posljedica oksidativne ozljede, odnosno slobodnih kisikovih radikala. Biokemijska uloga je redukcija organskih (lipidnih) peroksida u njihove odgovarajuće alkohole i redukcija vodikovog peroksida u vodu. Glutathion peroksidaza nalazi se u obliku osam, dosada opisanih, izoenzima koji su kodirani različitim genima na kromosomima 1, 3, 5, 6, 14 i 19, a razlikuju se po stanicama i tkivima gdje su najzastupljeniji, kao i po supstratima na koje djeluju. Količinski ima najviše glutathion –peroksidaze 1 (GPx 1) koja je sadržana u citoplazmi gotovo svih stanica sisavaca, a prioritetan joj je supstrat vodikov peroksid. Fosfolipidni peroksidi supstrat su za GPx 4. GPx 2 najzastupljenija je u gastrointestinalnom sustavu, smještena unutar stanica i izvan njih, dok je GPx 3 isključivo ekstracelularni enzim kojeg ima najviše u plazmi. GPx 6 je također važan selenoprotein (jedan od 25 u ljudi aktivnih proteina koji sadrže selenocisteinski ostatak). Koliko je održanje celularnih membrana (unutarnjih i vanjskih) i očuvanje DNK ovisno o aktivnosti glutathion peroksidaza, toliko je antioksidativni zaštitni sustav same GPx obitelji uvelike ovisan o prisutnosti selen.

Selen predstavlja značajnu sastavnicu u formiranju imunogenog odgovora organizma, pri čemu mu se velika uloga pripisuje u obrani od nekih virusnih bolesti, osobito herpes- zoster, hepatitisa B i C, ptičje gripe, Ebola-virusne bolesti. O ulozi selen u obrani od HIV-a u literaturi su mišljenja podijeljena.

Od kraja sedemdesetih godina prošloga stoljeća selen se smatra moćnim antikancerogenom, a hiposelenemija povezuje s višom incidencijom smrti od malignih bolesti. Međutim, rezultati brojnih istraživanja pokazuju ograničene mogućnosti selen u prevenciji i kontroli malignih bolesti, a djelotvornost je sužena na samo neke, kolorektalni karcinom, karcinom kože i prostate.

Selen se nalazi u svim tjelesnim stanicama, ali ponajviše u bubregu, jetri, slezeni, gušterači i testisima, dok se najviša koncentracija selen u organizmu nalazi u štitnjači. Tamo se osim u sustavu GPx nalazi i kao sastavnica drugih enzimskih sustava, tioredoksin reduktaze, jodotironin 5'-dehidrogenaze tip I i II te kao selenoprotein P (inače prisutan u visokim koncentracijama u plazmi). Najvažnija mu je uloga u pretvorbi T4 u aktivni T3.

Izvori seleni u prirodi i nadoknada

U ujednačenoj ljudskoj prehrani manjak seleni je izuzetno rijedak, a za održanje normalne koncentracije u organizmu potreban je vrlo malen dnevni unos. U različitim literaturnim izvorima unos od oko 100 µg na dan smatra se poželjnim, dok su za djecu od 1 do 3 godine preporučljive količine od najmanje 20µg/dan, za onu od 4 do 8 godina 30µg, od 9 do 14 godina 40µg, a za one iznad 14 godina 55µg koliko je dostatno i za odrasle; trudnim ženama potrebno je najmanje 60, a dojiljama 70µg/dan. Manje od navedenog ostvaruju stanovnici na jednoličnoj prehrani u ruralnim pokrajinama sjeveroistočne i jugozapadne Kine, a niže koncentracije serumskog seleni nalaze se i u stanovnika nekih dijelova Novog Zelanda, Danske, Finske i Kanade uz Atlantski ocean. U tim je državama odobreno obogaćivanje hrane selenom, a u Finskoj je od 1984.g. svim stanovnicima oba spola u generativnoj dobi propisana primjena dodatnog seleni.

Količina seleni u hrani ovisna je o koncentraciji seleni u tlu, a ugradnja u usjeve o aciditetu istoga tla. Količina seleni u tlu manja od 0,6 mg/kg smatra se nedostatnom. U Hrvatskoj ne postoji sustavno određivanje prisutnosti seleni u tlu.

Od biljne hrane selenom su najbogatiji: pivski kvasac, pšenične klice, sjemenke suncokreta, heljda, soja, mekinje, bijeli luk te orašasti plodovi ponajprije brazilski i indijski oraščići, bademi. Od animalnih izvora najbogatiji su: morska riba, od jadranskih prvenstveno tuna, skuša i gavuni, potom školjke (Jakobove kapice, kamenice), jastog, a od sisavaca jetra i maslac.

Pri odluci o primjeni seleni valja znati kako je raspon esencijalnih i toksičnih koncentracija seleni uzak: kreće se od stotukih pa do samo desetostotukih razlika u vrijednosti. Stoga je primjena seleni u preventivne svrhe sasvim neopravdana. Steroidi, soli zlata i valproat mogu sniziti serumske koncentracije seleni, dok selen može izazvati hemoragijsku dijatezu koja se teško kontrolira u bolesnika u kojih se primjenjuju klopidogetrel, varfarin, heparin ili aspirin u uobičajenim dozama.

Prekomjeren unos seleni može povećati rizik od nastanka šećerne bolesti tipa II u odraslih, a na pedijatrijskoj populaciji, očekivano, nema istraživanja.

Kliničke posljedice manjka seleni

Brojne uloge seleni u organizmu podrazumijevaju i široku lepezu moguće ekspresije njegova nedostatka. Tako se opisuju brojna stanja i bolesti uz niske serumske vrijednosti seleni, bez obzira što je točan uzrok hiposelenemiji. U endemskim područjima pojave Keshan-ske kardiomiopatije u Kini osnovni je razlog teška oskudica seleni u tlu, međutim, epidemijska pojava i jednolična prehrana siromašnog stanovništva žitaricama zaraženim nekim plijesnima situaciju oko etiologije bolesti čine složenijom. To je po svemu biogeokemijska bolest u kojoj se isprepliću primarni okidač bolesti, čimbenici pojačanja i direktan uzrok; tako se nalazi prostora za razna etiološka objašnjenja, od Coxackie viroze serotipovima B2 i B6, pa i nekih njima sličnih virusa, prvenstveno Echo, do djelovanja citreoviridina, mikotoksina iz nekih plijesni (*Penicillium* i *Aspergillus* spp) koji uništava mitohondrijsku citokrom-C-oksidadu i ATP-azu. Bolest je po puta opisana 1935.g. kada je u istoimenoj pokrajini velik broj djece i mladih žena tijekom nekoliko mjeseci podlegao srčanoj slabosti. Kasnije je masovan pomor više stotina žena i djece, osobito dječaka

do 15. godine života u Dinastiji Quing početkom 20.-tog stoljeća također objašnjena posljedicom hiposelenemije. Primjenom iskustava iz studija na domaćim životinjama koje su bolovale od miopatije (bolest «bijelih mišića»), u bolesnika s Keshanskom bolešću polovicom šezdesetih godina po prvi puta je primijenjen natrijev selenit; ubrzo su primijećeni pozitivni učinci. Kasnijim planiranim studijama u sedamdesetima nedvojbeno je dokazano kako primjena seleno može dovesti do oporavka miokarda i tako u bolesnika spriječiti smrtni ishod ili ublažiti težak tijek bolesti. Patohistološki su posrijedi oštećenja endokarda i karakteristična multifokalna miokardna nekroza u području središnjeg dijela muskulature lijeve klijetke, a manje u desnoj te u pretklijetkama. Nekrotične lezije su izolirane, bez upalnog odgovora i vaskularnih poremećaja. Dilatacijska kardiomiopatija je najozbiljnija posljedica hiposelenemije, a izvješća o pojavi slične bolesti izvan navedenih endemskih područja u Kini, u bijelaca u Europi i Americi pojavljuju se samo kao prikazi slučajeva. O obolijevanju drugih rasa podatci nisu dostupni.

Osim kardiomiopatije uz hiposelenemiju opisuju se skeletne miopatije, gubitak pigmenta u koži i derivatima, kosi i noktima, makrocitoza eritrocita, pa i hipotiroidizam. Sva navedena stanja dugo ostaju reverzibilna uz primjenu seleno.

Hiposelenemija se može očekivati u čitavom nizu stanja i bolesti koja onemogućuju dostatnu crijevenu apsorpciju, u bolesnika koji su podvrgnuti dugotrajnoj potpunoj parenteralnoj prehrani, iako je kod primjene uobičajene formule elemenata u tragovima u propisanoj količini vjerojatnost za to mala. Posebno su ugroženi bolesnici čija se pothranjenost odnosi prvenstveno na proteine, oni sa sintetskom prehranom potrebnoj kod fenilketonurije, a hiposelenemija se opisuje i u bolesnika s teškim oštećenjem središnjeg živčanog sustava koji se dugotrajno hrane isključivo enteralnim pripravcima za prehranu sondom. Slično je i u dojenčadi i male djece sa sindromom kratkoga crijeva, a kao najraniji znak manjka seleno opisuju se zaostatak u rastu, alopecija i psuedoalbinizam.

Kod liječenja epilepsije ketogenom dijetom opisane su srčane komplikacije, od srčanog popuštanja pa sve do nagle smrti, koje su isključivo povezane s hiposelenemijom. Naime uz normalne koncentracije seleno u bolesnika na ketogenoj dijeti nisu dosada opisane! Osnovni razlog smrti u tih bolesnika je produljenje QT intervala s posljedičnim fatalnim aritmijama (*torsade de pointes*).

Fatalni ishod u oko 10 % bolesnika s distrofičnom buloznom epidermolizom povezan je također s hiposelenemičkom kardiomiopatijom.

Opisan je jedan bolesnik s miopatijom kod limfangiomatoze zbog gubitak seleno u hloznom sadržaju.

S hiposelenemijom se povezuju i rijetki slučajevi familijarne pojave mišićne distrofije i mentalne retardacije.

Prikaz bolesnika

U našem kliničkom radu imamo iskustvo iz 1997.g. s novorođenčetom rođenim u terminu nakon prve, anamnestički normalne trudnoće u roditelja koji su negirali bilo kakve teškoće sa zdravljem.

Porod je protekao normalno, dijete imalo 3,5 kg i relativno se dobro neposredno adaptiralo na ekstrauterine uvjete života. Međutim, već je u prvome satu po porodu bilo je tahikardno (više nego tahipnoično), imalo nizak tlak i slabo pipljive pulse, na radiogramu srca i pluća viđena je kardiomegalija i zasjenjenje oba pluća. Za transporta iz lokalnog, manjeg rodilišta u najbližu bolnicu s pedijatrijskim odjelom, a potom u našu Jedinicu intenzivnog liječenja djetetovo se stanje pogoršalo do same granice preživljenja. Pri prijmu smo ubrzo isključili prirođenu srčanu grješku i ustanovili da je riječ o teškoj dilatacijskoj kardiomiopatiji. Dijete smo zbrinuli po svim aspektima, ali se srčana funkcija vrlo sporo oporavljala, stanje je dugo bilo neizvjesno, ali je nakon nekog vremena ipak postojala mala naznaka poboljšanja. Sumnjali smo na intrauterini miokarditis s posljedičnom dilatacijom srca koje čiji je miokard obje klijetke bio stanjen na nekoliko milimetara, a ejekcijska frakcija iznosila tek 10 do 15%. Dijete i majku opsežno smo serološki obradili, osobito na kardiotropne, ali i druge viruse, međutim rezultati su bili negativni. Želeći iskoristiti vrijeme do oduzimanja parnih seruma obradu smo proširili i odredili i serumsku koncentraciju selen: vrijednosti su bile izrazito niske. Kako dotada nismo imali iskustva s tom pretragom ponovili smo je, uzevši tada i majčin uzorak, kao i uzorak jednog zdravog dragovoljca. Nalaz je u djeteta bio identičan prethodnome, u majke su vrijednosti bile značajno ispod normale, a u zdravog ispitanika normalne. Započeli smo enteralnu nadoknadu s najprije 25 µg, a potom 50 µg selen, a u majke sa 100 µg. Parni serumu nisu nam dali nikakve nove informacije o eventualnom virusnom podrijetlu bolesti. Dijete se postupno oporavljalo, tako da je u dobi od šest tjedana bilo sposobno samostalno jesti na bočicu bez znatnijeg zamaranja. S namjerom smanjenja zaopterećenja postupno smo uveli inhibitor angiotenzin-konvertirajućeg enzima, bez neželjenih učinaka. U dobi od deset tjedana malenog smo bolesnika otpustili kući u vrlo zadovoljavajućem stanju, s ejekcijskom frakcijom od 45%, urednim ritmom sna i hranjenja te normalnim ponašanjem mladog dojenčeta. Majka je odbila daljnju obradu koju smo u nje prvenstveno željeli usmjeriti prema procjeni funkcije štitnjače jer se u kliničkom dojmu (bez pregleda koji je majka također odbila) nazirala hipotireoza. Bolesnika nikada više nismo vidjeli. Na telefonske pozive je majka tvrdila kako je dijete dobro, da se cijepi i redovito odlazi na kontrole svome pedijatru; kolega je isto potvrdio, a roditelji su bili suglasni u opiranju kontroli u našoj ustanovi. Izgubili smo s njima svaki kontakt. Čuli smo kako je dijete u dobi od 18 mjeseci umrlo u lokalnoj bolnici ubrzo po prijmu zbog upale pluća. Pretpostavljamo kako je otežano disanje i plavljenje te pjena na ustima najvjerojatnije bio izraz ireverzibilnog srčanog popuštanja, ali točan odgovor nikada nećemo doznati. Uzorke tkiva nismo dobili jer su roditelji odbili obdukciju.

Literatura

1. Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E. et al. *Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science* 1973;179:588-90.
2. Litov R.E., Combs G.F. *Selenium in pediatric nutrition. Pediatrics* 1991;87:339-51.
3. Fleming C.R., Lie J.T., McCall J.T. et al. *Selenium deficiency and fatal cardiomyopathy in a patient on home parenteral nutrition. Gastroenterology* 1982;83:689-93.
4. Mills G.C. *Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem.* 1957;229(1):189-97.
5. Gupta U.C., Gupta S.C. *Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. Communications in soil science and plant analysis* 2000;31:1791-1807.
6. Nezelof C., Bouvier R., Dijoud F. *Multifocal myocardia necrosis: a distinctive cardiac lesion in*

- cystic fibrosis, lipomatous pancreatic atrophy and Keshan disease. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*. 2002;21(3):343-52.
7. Cheng T.O. Selenium deficiency and cardiomyopathy. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2002;95:219-20.
 8. Bleys J., Navas-Acien A., Guallar E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. *Ann Intern Med*. 2007;147(4):271-2.
 9. Witte K.K., Clark A.L., Cleland J.G. Chronic heart failure and micronutrients. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(7):1765-74.
 10. de Berranger E., Colinet S., L. Michaud et al. Severe selenium deficiency secondary to chylous loss. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2006;30(2):173-4.
 11. Masumoto K., Nagata K., Higashi M. et al. Clinical features of selenium deficiency in infants receiving long-term nutritional support. *Nutrition* 2007;23:782-7.
 12. Bergquist A.G.C., Chee C.M., Lutchka L. et al. Selenium deficiency with cardiomyopathy: A complication of the ketogenic diet. *Epilepsia* 2003;44:618-20.
 13. Hensrud DD, Heimbarger D.C., Chen J. et al. Antioxidant status, erythrocyte fatty-acids and mortality from cardiovascular disease and Keshan disease in China. *Europ J Clin Nutr* 1994;48(7):455-64.
 14. Shuquiu S. Chronic exposure to cereal mycotoxin likely citreoviridin may be a trigger for Keshan disease mainly through oxidative stress mechanisms. *Medical Hypothesis* 2010;74(5):841-2.
 15. Bank I., m., Shemie S.D., Rosenblatt B. et al. Sudden Cardiac Death in Association With ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 2008;39(6):429-31.

Dijete i cink

Ivo Barić

Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Uvod

Cink ima važnu ulogu u staničnom rastu, diferencijaciji i metabolizmu. On je esencijalni element u tragu neophodan za normalnu funkciju bar 300 enzima i ima ključnu ulogu u metabolizmu nukleinskih kiselina, prijenosu signala u stanici, apoptozi, metabolizmu lipida i imunskim i moždanim funkcijama. Nije stoga neočekivano da se njegov manjak očituje na vrlo različite načine i može zahvatiti brojne organe i organske sustave. U praksi, i nutritivni i nasljedni manjak očituju se sličnim simptomima i znacima. U početku su to dermatitis, koji u tipičnim slučajevima zahvaća prvenstveno okrajine i perioralno, a u dojenčadi i male djece i anogenitalno područje, te proljev, alopecija, gubitak apetita. Prolongirani manjak dovodi do malapsorpcije, usporenja rasta, emocionalne nestabilnosti, razdražljivosti, depresije, imunodeficijencije koja može biti razlogom teških infekcija, i u težim odnosno zapuštenim slučajevima može dovesti do smrti.

Nema pouzdane metode za procjenu količine cinka u tijelu. Serumska koncentracija često nije dobar pokazatelj pa u slučaju kliničke sumnje treba provjeriti pojedinačne funkcije ovisne o cinku, npr. aktivnost alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze. Koncentracija cinka u plazmi može biti u normalnom rasponu čak i u teškom tjelesnom deficitu. Važno je napomenuti da ona ovisi o brojnim čimbenicima među kojima su neki vrlo česti, kao stres ili infekcija. Hemoliza u uzorku dovodi do lažnog povišenja cinka u plazmi. Referentni raspon u plazmi nije u svim izvorima jednak. U starije djece nešto je viši nego u mlađe. Približno je 10,7 – 22,9 $\mu\text{mol/L}$ (0,70-1,5 mg/L), a koncentracija niža od 7 $\mu\text{mol/L}$ (0,46 mg/L) upućuje na manjak.

Javnozdravstveno značenje manjka cinka

Koliko je cink važan, a manjak cinka opasan odlično pokazuje niz dobro smišljenih studija na velikom broju bolesnika, uključujući meta-analize. Tako se pokazalo da dnevno dodavanje cinka dječjoj prehrani značajno smanjuje incidenciju teških i dugotrajnih proljeva, s posljedičnim smanjenjem morbiditeta i mortaliteta. Kao pokazatelj značajnosti baš cinka za taj učinak služe studije koje su pokazale da je cink u monoterapiji u tome jednako djelotvoran kao i njegova kombinacija s drugim vitaminima i mikronutrijentima. U jednoj recentnoj studiji pokazalo se da dodavanje cinka dječjoj prehrani u zemljama u razvoju smanjuje mortalitet od proljeva i pneumonija. U tim populacijama cink smanjuje i broj djece sa zastojem u rastu. Jedna meta-analiza pokazala je da preventivno davanje cinka smanjuje incidenciju proljeva za približno 20% (u djece starije od godinu dana za 27%), incidenciju akutnih infekcija donjih dišnih putova za oko 15%, smrtnost u djece iznad godinu dana za 18%, te ubrzava linearni rast i prirast u težini. Sve to nalaže da se razmotri primjenu programa sustavnog obogaćivanja prehrane cinkom kojima bi se spriječio njegov manjak i smanjio morbiditet i mortalitet. Pokazalo se i da dodavanje cinka trudnicama smanjuje učestalost preranog rađanja za 14%.

U Hrvatskoj gdje uglavnom ne postoji problem nedovoljne ili neprikladne prehrane taj se problem zanemaruje, što ponekad može imati štetne posljedice po zdravlje djece, posebno u ugroženim skupinama, npr. onima s malapsorpcijom ili onima na duljoj parenteralnoj prehrani.

Uzroci manjka cinka

Manjak cinka nastaje zbog nedovoljnog unosa (manjak hrane, hrana siromašna cinkom, anoreksija, nadekvatna parenteralna prehrana), zbog nedovoljne apsorpcije (velike količine bakra i željeza u hrani ometaju apsorpciju, povećana količina fitata koji vežu cink, nasljedni poremećaj transporta u crijevnoj sluznici) ili povećanih gubitaka cinka. Najčešći uzroci povećanih gubitaka su otvorene rane, gastrointestinalni gubici, eksudacija u opečenih. Ciroza jetre uzrokuje gubitak cinka pojačanim izlučivanjem bubregom. Među ostalim stanjima udruženim s niskim cinkom u serumu su ulcerozni kolitis, Crohnova bolest, celijakija, crijevne anastomoze i fistule, kao i maligne bolesti.

Nasljedni poremećaji prometa cinka

Osim u daljnjem tekstu spomenutih poremećaja povezanih s hipercinkemijom i bolesti zbog manjka izazvanog neadekvatnom prehranom poznati su i poremećaji njegovog prometa koji dovode do manjka cinka. *Acrodermatitis enteropathica* opisan je još 1902. godine. Radi se o autosomno recesivnoj bolesti uzrokovanoj mutacijama u genu *SLC39A4 (hZIP4)* koji kodira transmembranski protein (dio obitelji cink-željezo transporter-like proteina (ZIP) koja služi apsorpciji cinka), jako eksprimiran u enterocitima dvanaesnika i jejunuma. Nedostatna funkcija tog proteina dovodi do smanjene sposobnosti apsorpcije cinka iz hrane. Manjak liganda nužnog za transport cinka može dodatno doprinijeti malapsorpciji cinka. Klinički, opaža se tipičan dermatitis oko usta i na akrama (slika 1), alopecija, proljev, razdražljivost, nenapredovanje. U djece na prsima simptomi se tipično pojavljuju pri odbijanju od prsa, a u djece na adaptiranom mlijeku obično ranije jer je bolja bioraspoloživost cinka iz majčinog mlijeka. Bolest se liječi davanjem cinka u obliku sulfata ili glukonata u dozi od 10 mg/kg/dan, a doza održavanja je 1-2 mg/kg/dan.

Manjak prijenosnika cinka u mliječnoj žlijezdi očituje se simptomima kao i akrodermatitis enteropatika, ali isključivo u djece na prsima. Simptomi i znakovi bolesti mogu se pojaviti i ranije, prije odbijanja od prsa, ili poslije (ovisno o prematuritetu, veličini, itd), i mogu nestati nakon odbijanja od prsa. Biokemijske pretrage otkrivaju niski cink u serumu djeteta i mlijeku majke, uz normalan cink u serumu majke. Liječenje je cinkom dok se ne povuku simptomi, a nakon što dijete prestane sisati više nije potrebno. Iako su u jednoj takvoj obitelji u majke nađene mutacije jednog gena (ZnT2) koji kodira jedan od prijenosnika cinka u mliječnoj žlijezdi, u ostalima je genska osnova bolesti ostala nepoznata pa je očito da postoji njezina genetska heterogenost. To nije neočekivano s obzirom da su dosad opisana najmanje 24 prijenosnika cinka od kojih mnogi imaju ekspresiju u mliječnoj žlijezdi. Ova bolest treba nas podsjetiti na postojanje skupine bolesti kojima prehrana majčinim mlijekom doprinosi odnosno rizike te prehrane.

Patološka stanja povezana s hipercinkemijom

Tradicionalno se pedijatra uči da misleći na cink prvenstveno misli na njegov manjak. No, postoje stanje u kojima je on značajno povišen, od bezazlenih do po život opasnih. Još je 1976. godine



Slika 1. Tipične kožne promjene u dojenčeta s akrodermatitisom enteropatika

opisana hipercinkemija u više članova obitelji bez ikakvih kliničkih problema u kojoj je hipercinkemija bila uzrokovana pojačanim vezanjem cinka za albumin. Klinički puno značajnije je opažanje neuroloških poteškoća, prvenstveno mijeloneuropatije (demijelinizacija središnjeg živčanog sustava), u bolesnika koji su imali pridruženi manjak bakra. Poznato je da se cink i bakar “natječu” za resorpciju u crijevnoj sluznici pa nije sasvim jasno jesu li spomenuti simptomi koji se pripisuju manjku bakra rezultat primarnog manjka bakra pri čemu je hipercinkemija sekundarni fenomen ili postoji primarno povećana resorpcija cinka pa dolazi do manjka bakra s kliničkim posljedicama. Čini se da bar u nekih bolesnika kao primarni poremećaj postoji pojačana apsorpcija cinka, a postoje i bolesnici u kojih se bolest razvila zbog dugotrajnog nekontroliranog uzimanja prevelikih količina cinka (npr. zbog želje da se spriječe prehlade).

Poseban i za pedijatra zanimljiv entitet je *hipercinkemija s hiperkalprotektinemijom* jer dijelom podsjeća na autoinflamatorne i autoimunsne bolesti. Kalprotektin (kompleks S100A8/A9 ili MRP8/14) je glavni protein koji veže kalcij i cink u fagocitima, u citosolu neutrofila, monocita i keratinocita. Nije sasvim jasno zašto dolazi do poremećaja u metabolizmu kalprotektina i njegove povećane koncentracije. No, zbog toga dolazi do sekvestracije cinka čija je koncentracija u plazmi 4-10 puta povišena. Kalprotektin je povišen u koncentracijama u plazmi od 1,4 do 6,5 g/L (referentni raspon <1 mg/L). Klinički, svi bolesnici su imali recidivirajuće infekcije, hepatosple-

nomegaliju, mikrocitnu anemiju i pokazatelje sistemske upale. Neki su imali neutropeniju, neki artritis. Tri bolesnika imala su upale kože, a tri su u dojenačkoj dobi jako zaostajala u rastu. Čini se da u nekih povoljan učinak pokazuje ciklosporin.

Zaključak

Prema brojnim studijama i nakupljenom kliničkom iskustvu nedvojbeno je da je cink nužan za održanje zdravlja, a pravovremeno opažanje simptoma i znakova njegovog manjka od velike je važnosti za ishod bolesti. Zato ga treba mjeriti kad god postoje simptomi koji mu se mogu pripisati ili stanja za koja se zna da mogu izazvati njegov manjak. Posebno je to važno jer je liječenje jednostavno i učinkovito. U interpretaciji nalaza serumske koncentracije važno je znati da ona ne odražava uvijek stanje u organizmu kao da je i podložna brojnim i vrlo različitim utjecajima koji tu interpretaciju mogu otežati.

Literatura

1. Smith JC, Zeller JA, Brown ED, Ong SC. Elevated plasma zinc: a heritable anomaly. *Science* 1976;193:496-499
2. Hedera P, Fink JK, Bockenstedt PL, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin: further support for existence of a new zinc overload syndrome. *Arch Neurol* 2003;60:1303-6.
3. Kumar N, Ahlskog JE. Myelopolyneuropathy Due to Copper Deficiency or Zinc Excess? *Arch Neurol* 2004;61:604-605.
4. Prodan CI, Holland NR, Wisdom PJ, Burstein SA, Bottomley SS. CNS demyelination associated with copper deficiency and hyperzincemia *Neurology*. 2002;59:1453-6
5. Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkötter C, Golden BE, Richmond P, Klein N, Kovar IZ, Beattie JH, Wolska-Kusnierz B, Saito Y, Roth J. Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet*. 2002;360(9347):1742-5
6. Bhandari N, Bahl R, Taneja S, Strand T, Mølbak K, Ulvik RJ, Sommerfelt H, Bhan MK. Substantial reduction in severe diarrheal morbidity by daily zinc supplementation in young north Indian children. *Pediatrics*. 2002 Jun;109(6):e86
7. Dutta P, Mitra U, Dutta S, Naik TN, Rajendran K, Chatterjee MK. Zinc, Vitamin A, and Micronutrient Supplementation in Children with Diarrhea: A Randomized Controlled Clinical Trial of Combination Therapy versus Monotherapy *J Pediatr*. 2011;159:633-7
8. Yakoob MY, Theodoratou E, Jabeen A, Imdad A, Eisele TP, Ferguson J, Jhass A, Rudan I, Campbell H, Black RE, Bhutta ZA. Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. *BMC Public Health*. 2011;11 (Suppl 3):S23
9. Imdad A, Bhutta ZA. Effect of preventive zinc supplementation on linear growth in children under 5 years of age in developing countries: a meta-analysis of studies for input to the lives saved tool *BMC Public Health*. 2011;11 (Suppl 3):S22.
10. Brown KH, Pearson JM, Baker SK, Hess SY. Preventive zinc supplementation among infants, pre-schoolers, and older prepubertal children. (results of a series of meta-analyses). *Food Nutr Bull*. 2009;30 (Suppl 1):S12-40
11. Hess SY, King JC. Effects of maternal zinc supplementation on pregnancy and lactation outcomes. *Food Nutr Bull* 2009;30 (Suppl 1):S60-78
12. Ackladn ML, Michalczyk A. Zinc deficiency and its inherited disorders- a review. *Genes Nutr* 2006;1:41-50
13. Hambidge KM, Krebs NF. Zinc deficiency: A special challenge. *J Nutr* 2007;1101-1105.

14. Kellehrer SL, Seo YA, Lopez V. Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr* 2009;4:83-94.
15. Mandić Z, Mandić ML, Grgić J, et al. Cooper and zinc content in human milk in Croatia. *Eur J Epidemiol* 1997;13:185-188.

Zahvaljujemo sponzorima:

Genzyme Europe B.V.

G-M Pharma d.o.o.

Elektromedicina d.o.o.

ELEKTROMEDICINA

M E D I C I N S K A O P R E M A



Elektromedicina d.o.o.
Zagreb, Ksaver 197,
tel/fax: 01/ 46 77 432,
e-mail: elektromedicina@zg.t-com.hr
www.elektromedicina.hr



Ostavite simptome alergije na kravljje mlijeko iza sebe **zauvijek**

Neocate osigurava brzo i učinkovito **povlačenje simptoma** - čak i kod najkompleksnijih **alergija na kravljje mlijeko** poboljšanje je vidljivo za **3-14 dana** zahvaljujući svom sastavu (**100% aminokiseline**)^{1,2}

Klinički dokazano - **ranim uvođenjem** Neocata prekida se začarani krug gubitka nutrijenata i potiče ponovni **rast i razvoj**.^{3,4,5,6}

Reference: 1. De Boissieu D et al. J Pediatr 1997; 131:744-747. 2. Vanderaaf JA et al. J Pediatr 1997; 131:741-744. 3. Isolauri E et al. Elimination diets in cows milk allergy risk for impaired growth in young children. J Pediatr 1998;132: 1004- 9. 4. Isolauri E et al. Efficacy and safety of hydrolysed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. J Pediatr 1995; 127:550-557. 5. Agostoni C et al. Growth Pattern of Breastfed and Nonbreastfed Infants With Atopic Dermatitis in the First Year of Life. Pediatrics 2000; 106:873. 6. Niggemann B et al. Prospective, controlled, multicenter study on the effect of an amino-acid based formula in infants with cow's milk allergy/ intolerance and atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol 2001;12: 78-82.

www.neocate.com
www.actagainstallergy.com



Sadrži LCP (DHA i ARA)

NUTRICIA
Advanced Medical Nutrition



Uvoznik i distributer za Hrvatsku:
G-M Pharma Zagreb d.o.o.
HR-10020 Zagreb, Velika cesta 74
Tel: +385 (0) 1 6234-053
Fax: +385 (0) 1 6260-667

www.g-m-pharma.hr

Neocate

razlika je vidljiva za 3 do 14 dana

NutriniDrink Multi Fibre

Nutritivno kompletna visokokalorična tekuća hrana za djecu obogaćena mješavinom vlakana MF6

- 1,5 kcal/ml
- za djecu iznad 1 godine
- omogućuje brži oporavak od bolesti i ozljeda
- potiče rast i razvoj djece
- nutritivno kompletna, sadrži optimalnu količinu energije, bjelancevina, vitamina i minerala

MF6™ - mješavina vlakana sa najviše kliničkih studija u pedijatrijskoj prehrani

NETOPIVA VLAKNA

1. Celuloza
2. Netopivi škrob
3. Sojini polisaharidi



TOPIVA VLAKNA

4. Fruktooligosaharidi
5. Inulin
6. Guma arabica

MF6™ - mješavina 6 različitih vlakana - odgovara unosu vlakana pravilnom prehranom

- reduciraju zatvor i upotrebu laksativa (netopiva vlakna)
- povoljno utječu na crijevnu floru (topiva vlakna - efekt probiotika)

UKUSAN - UČINKOVIT



BANANA

ČOKOLADA

VANILIJA

JAGODA



Uvoznik i distributer za Hrvatsku:

G-M Pharma Zagreb d.o.o., Velika cesta 74, 10020 Zagreb

Tel: +385 (0)1 6234-053, Tel: + 385 (0)1 6234 868

Fax: +385 (0)1 6260-667, www.g-m-pharma.hr

NUTRICIA
Advanced Medical Nutrition

Koju biste dijagnozu Vi postavili?



Jeste li pomislili na Mukopolisaharidozu tipa I?

SAŽETAK OPISA SVOJSTAVA LIJEKA

NAZIV LIJEKA Aldurazyme® 100 U/ml koncentrat otopine za infuziju. **KVALITATIVNI I KVANTITATIVNI SASTAV** 1 ml sadrži 100 U (cca. 0,58 mg) laronidaze. 1 bočica od 5 ml sadrži 500 U laronidaze. *Jedinica djelovanja (U) se definira kao hidroliza jednog mikromola supstrata (4-MU) po minuti. Laronidaza je rekombinantni oblik humane α -L-iduronidaze i dobiva se rekombinantnom DNK tehnologijom iz stanične kulture jainika kineskog hrčka (CHO). Za pomoćne tvari vidi točku 6.1. **Terapijske indikacije** Aldurazyme se upotrebljava za dugoročno nadoknađivanje enzima kod bolesnika s potvrđenom dijagnozom mukopolisaharidoze I (MPS I); nedostatak α -L-iduronidaze, za liječenje ne-neuroloških manifestacija bolesti (vidi točku 5.1). **Doziranje i način davanja** Terapiju Aldurazymom treba nadzirati liječnik s iskustvom u liječenju bolesnika s MPS I ili drugim nasljednim metaboličkim bolestima. Terapija Aldurazymom se mora odvijati u primjerenim kliničkim uvjetima, gdje je odmah dostupna oprema za reanimaciju u hitnim slučajevima. Preporučeni režim doziranja Aldurazyma je 100 U/kg tjelesne mase, jednom tjedno intravenoznom infuzijom. Početna se brzina istjecanja infuzije od 2 U/kg/h može postupno povećavati svakih petnaest minuta, ako bolesnik to podnosi, na najviše 43 U/kg/h. Ukupna količina danog lijeka treba isteci za otprilike 3-4 sata. Neškodljivost i učinkovitost Aldurazyma u bolesnika starijih od 65 godina nisu ustanovljeni i ne može se preporučiti nikakav režim doziranja za te bolesnike. Neškodljivost i učinkovitost Aldurazyma kod bolesnika s bubrežnom ili jetrenom insuficijencijom nisu utvrđeni i ne može se preporučiti nikakav režim doziranja za te bolesnike. **Kontraindikacije** teška preosjetljivost (npr. anafilaktička reakcija) na aktivni sastojak, ili bilo koju pomoćnu tvar. **Upozorenje zdravstvenim radnicima** Proučite zadnji odobreni sažetak opisa svojstava lijeka i uputu o lijeku. **Posebna upozorenja i mjere opreza** Bolesnici koji se liječe Aldurazymom mogu razviti reakcije na primjenu infuzije, koje se definiraju kao štetni događaji koji se javlja za vrijeme ili na kraju dana dobivanja infuzije. Neke od tih reakcija mogu biti teške. Bolesnike koji se liječe Aldurazymom se mora pažljivo pratiti i svaki slučaj reakcije na primjenu infuzije, zakašnjele reakcije ili imunološke reakcije, se mora zabilježiti. Status antitijela se mora redovito pratiti i bilježiti. Kod bolesnika s prijašnjim poremećajem gornjih dišnih putova su se javljale teške reakcije na primjenu infuzije, te se stoga ti bolesnici moraju nastaviti pažljivo pratiti, a smiju primati Aldurazyme samo u odgovarajućim kliničkim uvjetima, gdje je u hitnim slučajevima odmah dostupna oprema za reanimaciju. **Način i mjesto izdavanja** Na recept, u ljekarni. **NAZIV I ADRESA PODNOSITELJA ZAHTEVA** Medical Intertrade d.o.o. Dr. Franje Tuđmana 3, 10431 Sveta Nedelja, Hrvatska **Broj i datum rješenja o odobrenju za stavljanje lijeka u promet** UP/I-530-09/06-01/168, UP/I-530-09/06-01/169, UP/I-530-09/06-01/170, 26. listopada 2006. **Datum revizije teksta** Srpanj 2007.

Za više informacija molimo pročitati zadnji odobreni Sažetak opisa svojstava lijeka Aldurazyme® i Uputu o lijeku Aldurazyme®

ALD-CRO-001-2011

- Progresivna, po život opasna
- Nedovoljno prepoznata
- Može se liječiti



ALDURAZYME®
(LARONIDASE)



genzyme
A SANOFI COMPANY

Genzyme Adriatic d.o.o.
Hektorovičeva 2/VI, Grand Center, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prepoznajte Pompeovu bolest

glikogenoza tip II

bolest nakupljanja glikogena tip II

manjak alfa-glukozidaze (kisele maltaze)

KARDIOMEGALIJA • MAKROGLOSIJA • HIPOTONIJA • UČESTALE RESPIRATORNE INFEKCIJE

Pompeova bolest je progresivna, po život opasna neuromišićna bolest koju uzrokuje nedostatak lizosomskog enzima, kisele- α -glukozidaze^{1,2}.



Bolest se očituje kao brzo napredujuća, u kom slučaju je obično fatalni ishod do konca prve godine života i kao progresivna bolest, koja dovodi do značajnog morbiditeta i često preuranjene smrtnosti¹.

SPEKTAR TEŽINE POMPEOVE BOLESTI ¹	
brzo napredujuća bolest uz obično fatalni ishod do konca prve godine života	progresivna bolest
- Izražena i brzo napredujuća mišićna slabost - Hipotonija - Sindrom mlohavosti djeteta - Zaostajanje glave pri podizanju tijela - Usporen motorički razvoj - Progresivno slabljenje/zatajivanje disanja - Preuranjena smrtnost uslijed kardiorespiratornog zatajivanja	- Progresivna proksimalna mišićna slabost - osobito trupa i donjih udova - Bol u mišićima - Progresivno slabljenje/zatajivanje disanja - Teškoće često dovode do potrebe za mehaničkom ventilacijom i uporabom invalidskih kolica

Prepoznavanje Pompeove bolesti može predstavljati veliki izazov jer znaci i simptomi mogu biti jednaki kao kod drugih bolesti².

Dijagnoza Pompeove bolesti potvrđuje se određivanjem izostanka/smanjenja aktivnosti enzima kisele- α -glukozidaze².

Za više informacija:

Genzyme Adriatic d.o.o.

Hektorovičeva 2, Grand Center

10 000 Zagreb, Hrvatska

Tel: + 385 (0) 1 6386 250

Fax: + 385 (0) 1 6386 254

Reference:

- Hirschhorn R, Reuser AJJ. Glycogen storage disease type II: acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw Hill; 2001: 3389-3420.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. Genet Med 2006; 8:267-288.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU - MEDICINSKI FAKULTET

MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb

Nasljedne metaboličke bolesti 2011.

Glavna tema:

Djeca, metali i nove bolesti

Izdavač

MEDICINSKA NAKLADA, 10000 Zagreb, Cankarova 13

Za izdavača

Anđa Raić, prof.

Urednik

Prof.dr.sc. Ivo Barić, dr.med.

Oblikovanje naslovnice

Andrea Knapić

Tehnički urednik

Mario Čuk, dr.med.

Oblikovanje priručnika, slog i prijelom

Elektromedicina d.o.o.

Naklada 130 primjeraka

Tisak

MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb, listopad 2011.
