

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA KRAJNC

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA DIPEPTIDOV PRI AVTIZMU

CLINICAL MEANING OF DIPEPTIDES DETERMINATION AT AUTISM

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorja prof. dr. Davida Neubauerja, dr. med..

Meritve so opravili na oddelku za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo. V letih 2005-2007 so opravili večje število preiskav vrednosti peptidov v seču pri otrocih z različnimi vedenjskimi težavami, predvsem z avtizmom. Vse te preiskave je opravil laboratorij prof. Karla Reichelta v Oslu na Norveškem (Department of Pediatric Research, Rikshospitalitet, University of Oslo).

Zahvaljujem se mentorju prof.dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem, za strokovno vodstvo, nasvete in pomoč, ter somentorju prof.dr. Davidu Neubauerju, dr. med., za vse izvide in pomoč.

Hvala tudi staršem za moralno in finančno pomoč pri študiju, ter vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorja prof. dr. Davida Neubauerja, dr. med..

Ljubljana, december 2010

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Član diplomske komisije: asist. dr. Simon Žakelj

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	AVTIZEM	1
1.1.1	SIMPTOMI.....	2
1.2	SOOBOLEVNOST, RAZVOJNE IN DUŠEVNE MOTNJE	7
1.2.1	INCIDENCA	8
1.3	VZROKI	9
1.3.1	CANDIDA ALBICANS.....	9
1.3.2	CELIKALIJA IN AVTIZEM.....	10
1.3.3	TEŽKE KOVINE	10
1.4	METABOLIZEM PROTEINOV, PEPTIDOV IN AMINOKISLIN	11
1.4.1	METABOLIZEM AMINOKISLIN	12
1.4.2	METABOLIZEM PROTEINOV	12
1.4.3	PRESNOVNE MOTNJE AMINOKISLIN	13
1.5	PEPTIDI.....	14
1.6	DIPEPTIDI	15
1.6.1	Gliadorphin.....	15
1.6.2	Kazeomorfin	15
1.6.3	Gluten	16
1.7	METODE DOLOČANJA PEPTIDOV	16
1.7.1	TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC).....	16
1.7.2	IONSKO- IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA (IEC)	17
1.7.3	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA (PAGE).....	18
1.7.4	KAPILARNA ELEKTROFOREZA (CE)	18

1.8	DIAGNOSTIKA	19
1.8.1	OPIS NEKATERIH DIAGNOSTIČNIH PRIPOMOČKOV	20
1.9	ZDRAVLJENJE	23
2	NAMEN DELA	24
3	EKSPERIMENTALEN DEL	25
3.1	OPIS METODE	25
4	REZULTATI.....	28
4.1	OPIS SKUPINE PACIENTOV	28
4.2	Primerjava 1: AVTIZEM IN EPILEPSIJA.....	32
4.3	Primerjava 2: AVTIZEM IN ASPERGERJEV SINDROM.....	34
4.4	Primerjava 3: AVTIZEM IN UMSKA MANJRAZVITOST	36
4.5	Primerjava 4: EPILEPSIJA IN ASPERGERJEV SINDROM.....	38
4.6	Primerjava 5: EPILEPSIJA IN UMSKA MANJRAZVITOST	40
4.7	Primerjava 6: ASPERGERJEV SINDROM IN UMSKA MANJRAZVITOST ..	42
4.8	Primerjava 7: AVTIZEM IN PONOVDNE ANALIZE	44
5	RAZPRAVA.....	47
6	SKLEP	50
7	LITERATURA	51
8	PRILOGE.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Motnje v socialnem funkcioniranju	3
Slika 2: Komunikacija in govorni razvoj.....	4
Slika 3: Odnos do predmetov in igra avtističnih otrok	5
Slika 4: Odpor do sprememb - vztrajnost v istosti	6
Slika 5: Intelektualno delovanje in spoznavanje zmogljivosti	6
Slika 6: Zaznavanje avtističnih otrok	7
Slika 7: Nastanek dipeptida	11
Slika 8: Frekvenca razredov glutena 1 (normalni)	29
Slika 9: Frekvenca razredov glutena 1 (povišani)	29
Slika 10: Frekvenca razredov glutena 2 (normalni)	30
Slika 11: Frekvenca razredov glutena 2 (povišan)	30
Slika 12: Frekvenca razredov glutena 3 (normalni)	31
Slika 13: Frekvenca razredov glutena 3 (povišan)	31

POVZETEK

Avtizem je razvojna motnja, ki se kaže na področju socialne komunikacije, težave s socialno interakcijo ter težave na področju razmišljanja.

Gre za cel spekter avtističnih motenj, ki jih imenujemo SAM. Sama motenost ni izražena vedno enako in se z razvojem spreminja. Spekter simptomov je lahko blag ali izredno hud. Inteligenca lahko zajema vse stopnje, od duševne manj razvitosti do izredno visoke inteligentnosti. Povsem neprizadete ali celo izredno razvite pa lahko ostanejo zmožnosti in izurjenosti, kot so spomin, glasbena nadarjenost, nadarjenost za slikanje in branje ter za matematične procese.

Vzroki za avtizem so različni, vendar v 80% do 90% pri otrocih ostanejo nepojasneni. Vzroki naj bi bili genetski dejavniki, metabolne motnje, infekcije pred in po rojstvu, biokemični faktorji (serotonin, dopamin, norepinefrin, možganski opiodi), težke kovine ter peptidi. Vendar nobeden od teh možnih vzrokov ni zanesljivo povezan z nastankom avtizma.

Zato je bilo veliko preiskav, ki so jih predlagali v diagnostiki avtizma, vendar nobena ni bila specifična. V eksperimentalnem delu diplomske naloge so določali dipeptide v urinu otrok z znaki avtističnih motenj. V okviru raziskovalne naloge »Biokemični dejavniki pri nastanku avtizma« smo razvili metodo za določanje peptidov v urinu, in sicer na Inštitutu Jožef Štefan. Polovico vzorcev pa je bilo zamrznjenih in poslanih z DHL pošto v laboratorij v Oslo, kjer je bila opravljena analiza na peptide. V obeh laboratorijih je bila analiza izvedena s pomočjo HPLC (tekočinske kromatografije visoke ločljivosti).

V raziskavi smo hoteli ugotoviti razlike v deležih povišanih glutenov v različnih preučevanih skupinah.

Sodelovalo je 79 otrok z diagnozami: avtizem, epilepsija, aspergerjev sindrom, pervazivne razvojne motnje, umska prizadetost. Vključenih je bilo pa tudi 9 otrok, ki so se preiskave udeležili dvakrat, zaradi morebitnega napredka zdravljenja.

Ugotovili smo kakšne so razlike v deležih povišanih glutenov. Uporabili smo Fisherjev test natančnosti, vendar med nobeno od skupin nismo našli statistično značilnih razlik.

Upamo, da se bo ta preiskava še razvijala, ter da jo bodo izvajali tudi v Sloveniji. Saj vidimo, da ima gluten oziroma dieta velik vpliv pri otrocih s SAM.

SUMMARY

Autism is a developmental disorder, which is shown in social communication, difficulties in social interaction and difficulties in the area of flexibility of thinking.

There is a whole specter of autistics disorders, called SAM. This means that the disorder is not always expressed in the same way and it is changing through the development. The specter of symptoms can be mild or extremely serious. Intelligence can be of all levels, from mentally less developed up to extraordinary high. The capabilities and skills, such as memory, musical talent, talent in painting and reading or mathematical processes can be completely unaffected or even extraordinarily developed.

The causes are different, but in 80 to 90 percent of children's cases, they remain unexplained. They might be genetic factors, metabolic disorders, infections before and after birth, biochemical factors (serotonin, dopamine, norepinephrine, brain opioids), heavy metals. However, none of these possible causes is connected to autism emergence for certain.

Therefore, there have been a lot of studies, suggested in autism diagnostics, but none of them was specific. In the experimental part of the diploma work dipeptides in the urine of children with signs of autistic disturbances were determined. In the research project »Biochemical markers in autism« we evaluated a method for peptide determination in a laboratory of Josef Stefan Institute. Urine samples were analyzed in Ljubljana and sent with DHL postal service to laboratory in Oslo, where peptides analysis was performed. In both a high-voltage liquid chromatography analysis was performed.

With the research we intend to found out the differences in the increased gluten portions in various studied groups.

79 children with following diagnosis cooperated: autism, epilepsy, Asperger's syndrome, pervasive developmental disorders, and mental disorder. Due to eventual progress of treatment 9 children, who participated twice, were included in the research. The differences in the increased gluten portions were determined. We have used Fisher test of accuracy however, none of statistically significant differences in any of groups were found. We are hoping that this research will continue to develop and will be carrying out also in Slovenia. As we see, gluten and respectively diet have profound influence on children with SAM.

SEZNAM OKRAJŠAV

SAM- spekter avtističnih motenj

IQ- inteligenčni kvocient

MKB 10- mednarodna statistična klasifikacija bolezni in sorodnih zdravstvenih problemov

Ac-CoA- acetilkoencim A

GSH- glutation

DNA- deoksiribonukleinska kislina

HPLC- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

IEC- ionsko izmenjevalna kromatografija

PAGE- poliakrilamidna gelska elektroforeza

TEMED- N,N,N',N'- tetrametiletildiamin

UPLC-MS- tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti sklopljena z masno spektroskopijo

1 UVOD

1.1 AVTIZEM

Sam pojem avtizem izvira iz grške besede »autos«, kar pomeni sam, lasten ter vase zaprt. Otroci so enaki kot drugi, ampak le po zunanosti. Avtizem je razvojna motnja, ki se kaže predvsem na nivoju komunikacije; verbalne in neverbalne, v socialnih veščinah, obnašanju in pri učenju.

Razvojna motenost in spekter avtističnih motenj (SAM) pomeni, da motenost ni izražena vedno enako.

Pri avtizmu otrok ne more vzpostaviti normalnih družbenih odnosov, obnaša se kompulzivno, (prisilno nevrotski pojav, ki sili bolnika v izvajanje dejanj, ritualov in ceremonialov, ki so zanj samega nesmiselni) in ritualistično (pomeni obsesivno nesmiselno navado), ponavadi ni normalno inteligenten, vendar je lahko izredno talentiran na določenih področjih.

Velikokrat so taki otroci avtoagresivni, en primer je npr. udarjanje z glavo ob zid. V strokovnih krogih danes govorijo o »avtističnem spektru«, ki sega od talentiranih, morda nekoliko čudaških (po mnenju družbe) članov družb, prek srednje težkih prizadetosti do totalne dosmrtno prizadetosti, pri kateri nikoli ne pride do stika z zunanjim svetom.

Avtistična razvojna motnja se torej z razvojem spreminja. Sodi med tako imenovane pervazivne razvojne motnje, kar pomeni, da so to razvojne motnje, pri katerih se otroci obnašajo nasprotno družbenim normam. Pravkar zapisano pomeni, da svoje občutke izražajo na drugačen način, kot običajni ljudje. Ponavadi se znaki pokažejo v prvih letih življenja, vedno pred starostjo treh let. Z zgodnjimi vedenjskimi in govornimi terapijami se da motnjo omejiti tako, da je oboleli zmožen čim bolj samostojno živeti.

Pri 5 do 12% oseb z avtizmom se bolezen pojavi z neko drugo znano genetsko, presnovno ali nevrološko motnjo. 30% avtistov ima epilepsijo. Pogosteje imajo še cerebralno paralizo, Downov sindrom, fenilketonurijo, tuberozno sklerozo, mentalno subnormalnost, Rettov sindrom, sindrom fragilnega X kromosoma in fetalni alkoholni sindrom. Posebne oblike avtizma, kot sta Aspergerjev ali Rettov sindrom, se pojavijo šele pozneje, ko se prizadeti otroci naučijo govoriti. Po novih spoznanjih pa gre v teh primerih za lažje oblike bolezni, ki preprosto ostanejo dlje časa neodkrite. Tako kot razumemo avtizem danes, ta ni ozdravljiv (6).

1.1.1 SIMPTOMI

Le redki avtistični otroci imajo vse značilne lastnosti avtizma. Simptomi so lahko blagi, ali pa gre za hudo duševno prizadetost; odvisno od posameznika.



Otrokom se pridruži k igri le ob pomoči odraslega



Enosmerno komunicira



Ne igra se z drugimi otroki



Neustrezno smejanje in gibanje



Ni očesnega kontakta

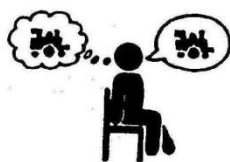
Slika 1: Motnje v socialnem funkcioniranju

Motnje v socialnem funkcioniranju so ena od temeljnih značilnosti avtističnih otrok. Avtistični otroci razvijejo socialne odnose v kasnejšem razvojnem obdobju, ki pa se v vsakem primeru razlikujejo od odnosov med zdravimi vrstniki in odraslimi. Kot dojenčki avtistični otroci ne dvignejo rok, ko se jim mati približa, da bi jih dvignila. Kasneje se ljudem lahko aktivno izogibajo (od njih bežijo, ali jih odrivajo), se obnašajo do ljudi ravnodušno, in gledajo skoznje, kot bi jih ne videli in ne slišali. Avtistični otrok pogosto ne reagira na svoje ime, če ga kdo dvigne, ne položi rok okoli njegovega telesa, ampak »visi«, velikokrat pa stik odklanja.

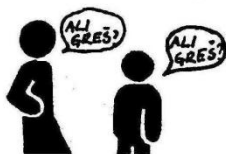
Avtisti ne razumejo čustev drugih, in tudi ne izražajo naravno lastnih čustev. Avtistični otrok nerad vzpostavlja očesni stik, oziroma izvaja tako imenovani »prazni pogled«.



Svoje potrebe izraža tako, da vodi roko odraslega



Nenehno govori o določeni temi



Eholalija - besede ponavlja kot papagaj

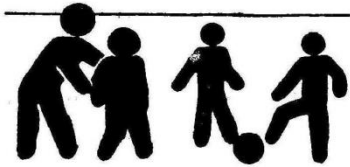


Ni očesnega kontakta

Slika 2: Komunikacija in govorni razvoj

Avtistični otroci govora ne zmorejo uporabljati v komunikativne namene; zamenjujejo zaimke (otrok sebe poimenuje z zaimkom »ti«, »ta« ali »on«); uporabljajo izraze, za katere se zdi, da nimajo smiselne zveze s situacijo; ponavljajo izraze kot papagaji, kar imenujemo eholalija. Svoje želje izražajo tako, da vodijo človeka, ga primejo za roko in tako pokažejo, kaj so želeli.

Pri manjšini otrok z avtizmom se zdi, da gre za regresijo, pri čemer izgubljajo že pridobljene sposobnosti, kot na primer začetek govora. Pri določenih otrocih z avtizmom se govor nikoli ne razvije.



Otrokom se pridruži k igri le ob pomoči odraslega



Ne igra se z drugimi otroki



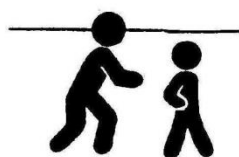
Vrti ali kotali predmete



Pomanjkanje kreativne igre

Slika 3: Odnos do predmetov in igra avtističnih otrok

Mnogi avtistični otroci kažejo nenavadno močno navezanost na predmete ali pa jih predmeti fascinirajo. Če otroku tak priljubljen predmet odvzamemo, reagira z napadom besa. Značilnost igre avtističnih otrok je, da je igra ponavljajoča in stereotipna manipulacija s predmeti ter da je igra neuporabna; ni simbolne igre.



Do drugih je ravnodušen



Odpor do sprememb

Slika 4: Odpor do sprememb - vztrajnost v istosti

Otrok vztraja v istosti oziroma se upira spremembam. Značilno za otroke z avtizmom je vztrajanje v enakem zaporedju izvajanja opravil in drugih aktivnosti. Kot primer navajam, da je otrok razvil ritual pri hranjenju; preden je sedel, je potrkal po stolu ter se dvakrat zavrtel, preden je pojedel grizljaj.



Nekateri otroci so lahko pri določenih stvareh zelo spretni in zelo hitri, vendar ne pri nalogah, ki vključujejo socialno razumevanje

Slika 5: Intelktualno delovanje in spoznavanje zmogljivosti

V testiranju IQ se bolje odrežejo pri spretnostih (testi motoričnih in prostorskih sposobnosti), kot verbalnih preizkusih. Stopnja motnje je namreč v največji meri odvisna od inteligenčnega kvocienta.



Vrti ali kotali predmete

Slika 6: Zaznavanje avtističnih otrok

Avtisti so možno hiper ali hipoobčutljivi na senzorne dražljaje. Kanner je to izrazil kot paničen strah pred glasnimi zvoki in gibajočimi se predmeti, istočasno pa obsedenost z njimi (7).

1.2 SOOBOLEVNOST, RAZVOJNE IN DUŠEVNE MOTNJE

Motnje avtističnega spektra se lahko pojavljajo skupaj s številnimi drugimi nevrorazvojnimi in psihiatričnimi motnjami. Večina otrok z avtizmom (vsaj 75% le teh) je duševno manj razvitih. Imajo težave s pozornostjo, hitrostjo mentalnega in motoričnega reagiranja, ter težave z učenjem. Zaradi pravkar zapisanega so težave s pisanjem lahko velika ovira pri izkazovanju znanja pri mnogih otrocih z visokimi sposobnostmi. Uporaba računalnika je ena od možnih prilagoditev, ki jim pomaga premostiti težavo.

Pri otrocih z avtizmom obstaja verjetnost za razvoj epilepsije. To je motnja, ki občasno, kadar so električni impulzi v možganih nepravilni, povzroča krče. Do epileptičnega napada pride zaradi previsoke vzdraženosti celic možganske skorje, ki se odzovejo z enakomernimi izbruhi električnih impulzov. Ponavadi se razvije pri otrocih in se velikokrat s starostjo izboljša ali celo izzveni.

Pogost je tudi Tourettov sindrom, ki ga opisujejo kot naglo motnjo v glavi in sicer zelo globoko v podzavesti. Sindrom je prirojen, pojavi pa se v zgodnjem otroštvu (nekje od šestega do osmega leta starosti). Začne se z naglimi gibi različnih delov telesa, oziroma s tihimi glasovnimi "tiki". Skozi leta se sindrom stopnjuje.

Lahko gre za različne besede, ki se ponavljajo znova in znova, ali pa za ponavljajoča se dejanja (zapreš vrata, jih še enkrat odpreš ter ponovno zapreš, nato greš v drugo sobo, vendar se ponovno vrneš ter potisneš kljuko gor in dol). V kasnejših fazah nastopijo hujši problemi, kot so težavno oblačenje, ker te motijo vsi žepi in zadrge na oblačilih; dolgotrajno umivanje zob zato, ker imaš občutek, da si jih nisi temeljito očistil, itd.

Otroci z avtizmom imajo dvakrat več raznih psihiatričnih motenj, kot ostali. Tudi pri tistih z visokimi intelektualnimi potenciali je tveganje za nastanek psihiatričnih motenj večje.

1.2.1 INCIDENCA

Otroški avtizem je po MKB 10 približno tri do štirikrat pogostejši pri dečkih, kot pri deklicah. 75 do 80% otrok s pervazivnimi razvojnimi motnjami je dečkov. Statistika v deželah z dobro diagnostiko navaja podatek, da je na 10000 zdravih otrok tri do pet avtističnih.

Mogoče je, da nekatere od njih obravnavajo pod drugo diagnozo. V zadnjem času poročajo, da so motnje avtističnega spektra v naraščanju (incidenca 15/10000).

Razlogi za to so:

- spremenjeno pojmovanje spektra motenj namesto omejena entiteta;
- spremembe v diagnostičnih metodah in
- novi klasifikacijski sistemi z več diagnostičnimi kriteriji (7).

1.3 VZROKI

Specifičnega vzroka za nastanek ne poznamo. Kljub temu lahko glede na tipične znake avtizma sklepamo, da gre za okvaro centralnega in perifernega živčevja zaradi vplivov različnih dejavnikov, tudi genetskih. Raziskave potekajo na globalni ravni v smeri genskih sprememb, ki pa niso pojasnjene in jih je mogoče z avtizmom povezati le v majhnem odstotku. Vedno oprijemljivejše pa so raziskave v smeri motenih biokemičnih procesov na nivoju celične presnove, ki naj bi bile posledica sodobnega življenja in okolja. Raziskovalci na področju avtizma vedno bolj povezujejo primarne imunske aktivnosti v prebavilih s sistemskimi imunskimi reakcijami. Te naj bi sprožile motnje v organih; še posebno pomembni so možgani.

1.3.1 KANDIDA ALBICANS

Kandida albicans je glivica v organizmu človeka, prisotna je pri 80% populacije. Bolezen povzroča le pri osebah z zmanjšano odpornostjo. Okužba prizadene zlasti usta ali spolovila.

Naredili so raziskave, ki so pokazale, da je kandida zmožna proizvesti toksine, ki povzročijo škodo imunskemu sistemu. V ekstremnih primerih to preide do depresije, shizofrenije, ter v nekaterih primerih do avtizma. Veliko otrok, diagnosticiranih kot avtističnih, so v bistvu žrtve kandidate in njene infekcije. Dr. Rimland verjame, da če bi se ta infekcija uspešno zdravila, bi se tudi simptomi avtizma dramatično izboljšali.

V tipičnem primeru takšnega otroka se otrok zdi normalen (v obdobju prvih 18 do 24 mesecev). Govor se je že začel in otrok pokaže določena zanimanja za družino in okolico. Pojavlja se večje število ušesnih infekcij, ki so zdravljene z antibiotiki, skoraj eno za drugim. Kmalu zatem se začnejo pojavljati spremembe. Razvoj govora se ustavi, sledi nazadovanje. V samo nekaj tednih ali mesecih se otrok ne odziva več in izgubi interes do staršev in okolice.

1.3.2 CELIKALIJA IN AVTIZEM

Je bolezen človeškega ozkega črevesa. Ta ima nalogo prenosa hranilnih snovi iz črevesja v kri (t.i. absorbcija). Poškodovane so resice na sluznici ozkega črevesja, zato je prevzem hranilnih snovi, vitaminov in mineralov močno omejen. Poškodbe resic povzročijo določene beljakovine iz žitnih vrst, kot so pšenica, rž, ječmen. Ta beljakovina se imenuje gluten, zato zdravljenje poteka z brezglutensko prehrano.

Pri SAM se absorbcija lahko izraža v več oblikah: kot nezmožnost vsrkovanja potrebnih hranil ali vsrkovanje toksinov, produktov patoloških bakterij in kvasovk ter delno predelanih beljakovin, predvsem iz pšenice in mlečnih izdelkov.

Celikalija se pojavlja v določenih družinah, torej obstaja neka genetska zasnova. Še danes ne poznamo točnega vzroka za celiakijo, vendar vemo, da ne gre za alergijo, čeprav ima telesna obramba pri odzivanju na gluten svojo vlogo. Atrofijo resic povzroča avtoimunska reakcija. Posledica so driska, bolečine in krči v trebuhu, zmanjšanje telesne mase, slabokrvnost, bolečine v sklepih, odrevenelost nog zaradi okvare živcev, izguba menstruacije ter zaostajanje v telesnem razvoju. Pojavita se tudi razdražljivost in depresija.

Tudi otroci s SAM so razdraženi, depresivni, agresivni in hiperaktivni. Takoj po uvajanju diete brez glutena in kazeina se njihovo obnašanje popolnoma spremeni. Otroci postanejo zelo umirjeni, ter bolj dovzetni za učenje (9).

1.3.3 TEŽKE KOVINE

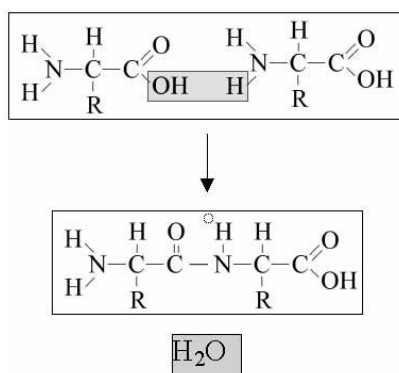
Ena od hipotez govori o povezavi med okoljskimi dejavniki in avtizmom (možen naj bi vpliv toksinov, predvsem pa težkih kovin). Oblika avtizma, ki ima največjo premoč, je regresivni avtizem. Ta vodi do izgube že dosežene stopnje živčne integracije in torej do izgube nevralnih sposobnosti. Najpogostejši vzrok za to obliko je toksičnost težkih kovin (aluminija, živega srebra, svinca, kadmija, arzena, itd.). Pri njih se sočasno pojavijo imunske motnje, disbioza in preobremenitev antioksidacijskih sistemov. Otroški možgani so veliko bolj občutljivi za toksine kot odrasli možgani.

Raziskave kažejo, da utegne avtizem povzročiti nesrečna kombinacija genetske šibkosti in prevelika izpostavljenost težkim kovinam (7).

1.4 METABOLIZEM PROTEINOV, PEPTIDOV IN AMINOKISLIN

ZGRADBA

Aminokislina so sestavljene iz vsaj ene karboksilne skupine (C konec) in vsaj ene amino skupine (N konec). Glede na tako široko definicijo poznamo več sto aminokislin, ki jih najdemo pri rastlinskih in živalskih celicah. Vendar le 20 aminokislin je posebej pomembnih pri sintezi proteinov.



Slika 7: Nastanek dipeptida

Če se amino skupina ene aminokislina združi s karboksilno skupino druge aminokislina, se tvori peptidna vez in nastane dipeptid. Pri tem se odcepi voda. Če se poveže več aminokislin, nastane polipeptid. Protein nastane pri povezavi z več 100 aminokislina. Zgradbo proteinov opisujemo na štirih ravneh.

- *Primarna struktura:* je osnovna struktura, določa jo zaporedje aminokislinskih ostankov v proteinu, ki so povezani s kovalentno peptidno vezjo. Ta struktura je posledica zaporednja nukleotidov v DNA.
- *Sekundarna struktura:* sestavlja jo α - vijačnica in β - struktura. Predstavlja urejene in ponavljajoče se strukturne elemente.

- *Terciarna struktura*: predstavljajo jo elementi sekundarnih struktur, ki se med seboj povežejo in zvijejo.
- *Kvartarna struktura*: gre za povezovanje dveh ali več polipeptidnih verig v funkcionalen protein z več podenotami (1).

1.4.1 METABOLIZEM AMINOKISLIN

Temeljno metabolično načelo je, da se biomolekule v čim manj stopnjah pretvorijo v nek osrednji intermediat.

Aminokislina so v procesih katabolizma produkti proteolize. Nadaljnja razgradnja aminokislin poteka z odstranitvijo α -aminske skupine oziroma z deaminacijo. Ogljikovo ogrodje se pa razgrajuje po običajnih metaboličnih poteh.

Reakcijo deaminacije katalizirajo aminotransferaze. Tako nastane amonijev ion, ki se lahko pretvori v sečnino ali pa sečno kislino, odvisno od življenjskega okolja organizma. α -ketokislina se razgrajujejo različno, odvisno od izhodiščne aminokislina. Končni produkt razgradnje je lahko piruvat, Ac-CoA ali pa kateri izmed intermediatov Krebsovega cikla. Biosinteza aminokislin vključuje aminacijo α -ketokislin prek aminotransferaz. Donor dušika je najpogosteje glutamat, ki se sintetizira ob reakciji amonijevega iona s ketoglutaratom. Nekatere aminokislina so prekurzorji drugih (npr. serin glicina). Glede na to, ali je neko aminokislino naše telo sposobno sintetizirati, jih delimo na esencialne in neesencialne. Aminokislina so v procesih anabolizma pogosto prekurzorji drugih dušik vsebujočih spojin (npr. hormonov, nukleotidov) (1).

1.4.2 METABOLIZEM PROTEINOV

Presnova proteinov se začne v želodcu in konča v tankem črevesu. Pri presnovi proteinov sodeluje veliko encimov, ki jih imenujemo proteaze.

Razgradnja proteinov iz hrane se začne v želodcu z encimsko hidrolizo. Tu potekata mehanska in kemijska prebava. Žlezne celice izločajo encim pepsinogen, ki se ob stiku s HCl pretvori v pepsin, ki cepi peptidne vezi med aromatskimi aminokislinami, fenilalaninom, tirozinom ter triptofanom. Dobimo krajše peptide, ki gredo iz želodca v tanko črevo. Te naprej razgradijo peptidaze. Razgradnja z različnimi encimi daje zmes aminokislin, ki pa se prenesejo preko epiteljskih celic v tankem črevesu v kri. Aminokisliline se razporedijo po celem telesu ter se porabijo za razne biosinteze.

V duodenumu je prebava le še kemijska. Jetra z žolčem izločajo žolčne soli, ki maščobe razpršijo v maščobne kapljice. Le te so nato lažje dostopne lipazam, ki začnejo s prebavo maščob. V dvanajstnik (duodenum) se izločajo tudi encimi trebušne slinavke, lipaze, proteaze, karboanhidraze in nukleaze, ki hrano razgradijo do monomerov. Delujejo le v bazičnem okolju, zato kislo vsebino želodca nevtralizira pankreasna raztopina bikarbonata.

V jejunumu v glavnem poteka kemijska prebava s pankreatičnimi encimi, delno pa se že začne vsrkavanje hranilnih snovi s pomočjo črevesnih resic in epiteljskih celic.

V ileumu prevladuje vsrkavanje hranilnih snovi, ki gredo po portalni veni in limfnih žilah do tkivnih celic, kjer se vključijo v celično presnovo. Iz debelega črevesa telo vsrka predvsem vodo, zato snovi, ki pridejo sem, postanejo poltrde. Najdemo pa tudi veliko bakterij, ki tvorijo normalno črevesno floro (1,8).

1.4.3 PRESNOVNE MOTNJE AMINOKISLIN

Aminokisliline, ki vsebujejo žveplo, so bistvene za vzdrževanje redoks potenciala v celicah. Znano je, da so pomembne za sintezo reduciranega glutationa (GSH), ki je glavni znotrajcelični antioksidant. Raziskave Suha, objavljene v letu 2008, so pri otrocih s SAM pokazale, da gre za motnje v metabolizmu teh aminokislin, zlasti za transmetilacijo in transulfuracijo. Pri tem je motena konverzija metionina v S-adenosilmetionin in tvorba cisteina, kar povzroča znižanje vsebnosti GSH v celicah.

To znižanje lahko vpliva na zmanjšanje antioksidativne aktivnosti in vpliva na imunsko odzivnost, saj se domneva, da je znižanje GSH v levkocitih lahko povezano z aktivnostjo

celic T. Motnje metilacije, znižanje cisteina in znižana sinteza GSH pri SAM je bila ugotovljena tudi v nekaterih drugih raziskavah.

1.5 PEPTIDI

Med pomembnejšimi je hipoteza o presežku opioidnih peptidov, ki naj bi vplivali na prenos impulzov v centralni živčni sistem. Ti peptidi naj bi bili predvsem v beljakovinah gluten (pšenica) in kazein (mleko in mlečni izdelki). Gluten in kazein vsebujeta določene kombinacije aminokislin, katere je telesnemu prebavnemu sistemu zelo težko prebaviti oziroma popolnoma razgraditi na posamezne aminokislino. Tako ostane hrana v obliki verig večih aminokislin, ki jih imenujemo peptidi. Ti peptidi se absorbirajo skozi črevesje v kri, kamor se ne bi smeli. Avtistični otroci imajo namreč bolj prepustna čreva kot zdravi otroci. Zaradi prepustnosti črev veliko peptidov vstopi v krvni obtok, kjer povzročijo škodo. Peptidi gredo iz krvnega obtoka do možganov. Nerazgrajeni gluten in kazein se vežeta na opioidne receptorje v možganih, ter verjetno delujeta podobno kot morfij.

Imena teh peptidov so gluteomorfin in kazeomorfin, kar izhaja iz kombinacij besed gluten ali kazein in morfin (za morfij). Če se ti peptidi ne razgradijo na posamezne aminokislino, potem pridejo vse do možganov, ter povzročijo reakcijo, kot bi jo povzročil morfij. Kot bi pričakovali, ti opioidi seveda vplivajo na obnašanje otroka, na njegove sposobnosti, čustva, bolečino in celo na občutljivost na zvok. Prav tako reagirajo s področjem možganov, ki je povezano z govorom. Prav eden izmed faktorjev avtizma je ta, da so možgani avtističnih otrok upočasnjeni (zadrogirani, metabolično manj aktivni, kar se odraža tudi na govornem področju). Zaradi prepustnosti črev, katere prepustijo skozi peptide, lahko imajo alergije na hrano.

1.6 DIPEPTIDI

Dipeptidi so sestavljeni iz dveh aminokislin, ki sta povezani s peptidno vezjo. Nahajajo se predvsem v prebavnem traktu.

Urinski peptidi so nepopolno razčlenjeni kosi beljakovin. Peptidi iz glutena in kazeina so pomembni, saj reagirajo z opioidnimi receptorji v možganih, s čimer oponašajo učinke drog v obliki opiatov, kot so heroin in morfij. Za te spojine so dokazali, da reagirajo s področjem možganov, kot so časovni mešički, ki so vključeni v govor in zvočne integracije.

Domnevajo, da ljudje z avtizmom zaradi poškodbe črevesne sluznice neprebavljajo dobro žita in mlečnih izdelkov. Ti nepopolno prebavljivi peptidi se nato absorbirajo v telo in se vežejo na receptorje opioidnih peptidov, ter spreminjajo vedenje in druge fiziološke reakcije. Večina ljudi, ki je alergičnih na mleko in pšenico ima tudi težave s peptidi iz mleka in pšenice. Če se beljakovine ne razgradijo v aminokislino, ogrožajo tako možgane in telo.

1.6.1 Gliadorfin

Gliadorfin, znan tudi kot gluteomorfin, je opioidni peptid, ki nastaja med presnovo glikoproteina in komponento glutena. Ponavadi je razčlenjen na aminokislino, ki jih prebavljajo encimi. Sestavljen je iz sedmih aminokislin, ki so skrajšane spodaj. Začne se z začetkom N-terminalnega zaporedja za tirozin in prolin.

1.6.2 Kazeomorfin

Kazomorfin je peptid iz kazeina mlečnih beljakovin. Kazein je ena izmed glavnih beljakovin pri vseh sesalcih.

Ugotavljajo, da vzorci urina ljudi, ki imajo avtizem, celiakijo in shizofrenijo, vsebujejo visoke količine kazemorfin. Sumi se, da lahko ti peptidi povzročajo tudi druge motnje, kot so kronična utrujenost in depresija.

1.6.3 Gluten

Gluten je sestavljen iz dveh beljakovin, imenovanih glutenski epitopi in glutenin. Glutenski epitopi in glutenin obsegata okoli 80% beljakovin iz semen pšenice. Po vsem svetu je gluten pomemben vir prehranskih beljakovin; tako je v živilih pripravljen neposredno iz virov, ki ga vsebujejo, in kot dodatek za živila.

Dipeptidil peptidaza IV (DPP-IV) je serin peptidaza, kateri odstrani N-terminalni dipeptid zaporedno iz polipeptidov, ki imajo nesubstituirani N-terminalni predvideni predzadnji ostanek prolin. Zato je lahko DPP pomanjkljivost pomembna pri razlagi opioidnih peptidov.

1.7 METODE DOLOČANJA PEPTIDOV

Kromatografsko ločevanje peptidov

- Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)
- Ionsko izmenjevalna kromatografija (IEC)
- Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE)
- Kapilarna elektroforeza (CE)
- Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC-MS)

1.7.1 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Aminokislinsko sestavo proteina določamo tako, da ga najprej razgradimo na posamezne aminokislino, ki jih med seboj ločimo in identificiramo.

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti lahko uspešno ločujemo aminokislino na osnovi njihovih različnih kislinsko bazičnih lastnosti. Vzorec mora biti uveden v mobilni fazi, ki potuje skozi stacionarno fazo. Tako omogoča ločevanje zmesi na posamezne

sestavine. Če je sestavina topnejša v mobilni fazi, oziroma če ima manjšo afiniteto do stacionarne faze, bo hitreje potovala ter prej dosegla konec. Proces se nadaljuje, dokler ne doseže popolne ločitve sestavin. Za določitev, zapis ter kvantifikacijo uporabljamo razne detektorje, rekorderje in računalnike.

HPLC spada pod absorpcijsko kromatografijo; tu se snovi iz raztopine z različnimi interakcijami adsorbirajo v stacionarno fazo. Mobilna faza raztaplja adsorbirane snovi ter jih prenese do nezasedene stacionarne faze, kjer se proces ponovi (1, 10).

1.7.2 IONSKO- IZMENJEVALNA KROMATOLOGRAFIJA (IEC)

Proteinska mešanica se porazdeli med dve fizikalno popolnoma različni fazi, mobilno in stacionarno fazo. Ločevanje IEC temelji na razliki v polu in velikosti ionskega naboja. Stacionarna faza je nanešena na nosilec in mimo nje potuje mobilna faza. Stacionarno fazo predstavljajo pozitivno ali negativno nabite molekule, ki ob mimohodu mobilne faze nase reverzibilno adsorbirajo njim nasprotno nabite delce. Do kromatografske separacije pride, ker se komponente mobilne faze različno dolgo zadržujejo na stacionarni fazi.

Poteka v naslednjih stopnjah

- Ekvilibracija
- Adsorbicija
- Spiranje nevezanih snovi
- Spiranje vezanih snovi iz nosilca
- Regeneracija (1, 10).

1.7.3 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA (PAGE)

S to metodo lahko dosežemo zelo veliko ločljivost fragmentov in ločimo celo molekuli, ki se razlikujeta za 1 bp (bazni par). Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Polimerizacija akrilamida steče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je običajno amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin). Če v polimerizacijsko reakcijo vključimo bifunkcionalni reagent N,N'-metilembisakrilamid, se poliakrilamidne verige prečno povežejo in tvorijo gel. Gel vlijemo med dve stekleni plošči, vzorce pa nanašamo z vrha. Prednosti PAGE so stabilne prečne povezave, ostre linije, dobro ločevanje kratkih fragmentov ter občutljivost na obliko.

Pri tehniki PAGE je hitrost potovanja molekul odvisna še od oblike molekul; manjše molekule tako potujejo hitreje. Najprej ločimo antigene s PAGE (ločitev po molekulskih masah), sledi prenos ločenih proteinov iz gela na membrano (nitrocelulozo). Položaj antigena na membrani lahko določimo po vezanju z zanamovanimi protitelesi. Občutljivost je odvisna od izvedbe imunske reakcije (10).

1.7.4 KAPILARNA ELEKTROFOREZA (CE)

Ločitev analitov poteka v stekleni kapilari, napolnjeni z elektroforeznim pufrom, ob priključitvi visoke napetosti. Zaradi razlike v napetosti med anodo in katodo začnejo delci z nabojem potovati. Na njihovo potovanje pa vpliva še dodatni tekočinski tok, ki ga imenujemo elektroosmozni tok. Elektroosmozni tok nastane zaradi negativnega naboja silanolnih skupin ob steni kapilare, ki privlači katione, predvsem oksonijeve ione. Ko priključimo napetost, začnejo hidratirani oziroma solvatirani kationi potovati proti anodi in s seboj »potegnejo« celotno raztopino. Elektroosmozni tok je pomemben pri vrednostih pH nad 3. Zaradi elektroosmoznega toka se molekule gibljejo neodvisno od naboja v isto smer (običajno proti anodi). Najhitreje se zato gibljejo majhni delci s pozitivnim nabojem, sledijo jim veliki delci s pozitivnim nabojem, nato nevtralni delci, ki potujejo s hitrostjo elektroosmoznega toka in nazadnje še delci z negativnim nabojem.

Najpomembnejše prednosti kapilarne elektroforeze pred drugimi analiznimi metodami so širok spekter vzorcev, ki jih lahko analiziramo, majhna poraba vzorcev in pufrov, hiter čas analize in avtomatizacija.

Glavna omejitev kapilarne elektroforeze je nizka meja detekcije, saj zaradi majhnega premera kapilare in posledično nizkega volumskega pretoka ne moremo uporabljati klasičnih detektorjev, primernih za HPLC (10).

1.8 DIAGNOSTIKA

Za začetek razreševanja težav otrok s sindromom avtizma je vsekakor najpomembnejša čim zgodnejša diagnostika, ki lahko bistveno prispeva k izboljšanju otrokovih možnosti pri socializaciji ter vzgoji in izobraževanju.

Diagnoza avtističnega sindroma se postavi po natančnem, daljšem kliničnem opazovanju izkušenega tima strokovnjakov, ob dobri diagnostiki ter upoštevanju vseh možnih etioloških dejavnikov. Postavljanje diagnoze ni preprosta stvar, ker gre ponavadi za zahtevno in drago diagnostiko; samo prepoznavanje odstopanj v socialnem in čustvenem odzivanju je pogosto trd oreh tudi za strokovnjake.

Starši najprej prijavijo otroka v diagnostični proces. Po prejetju prijave jim v najkrajšem času pošljejo vprašalnike. Vprašalnike starši izpolnijo in jih vrnejo na njihov naslov (na Valjahunovo v Ljubljani). Po prejetju vprašalnikov jim sporočijo termin obiska. Najprej opravijo pogovor s starši, naslednji obisk pa je namenjen opazovanju otroka.

Pri njihovem delu uporabljajo diagnostične pripomočke 3di, ADOS, ADI-R, DISCD, SIPT, PEP-3 (so razloženi v nadaljevanju) in druge; strokovnjaki, ki jih izvajajo, pa so za uporabo le teh visoko usposobljeni in imajo pridobljene ustrezne licence za njihovo uporabo.

1.8.1 OPIS NEKATERIH DIAGNOSTIČNIH PRIPOMOČKOV

3di – Developmental, Dimensional and Diagnostic interview je unikatno sestavljen standardiziran intervju s starši/skrbniki, katerega podlaga je računalniški program. V svoji sestavi ni niti visoko strukturiran niti polstrukturiran intervju, vendar pa so v njem upoštevane prednosti obeh pristopov. Ker je podlaga za intervju računalniški program, so vprašanja razdeljena po področjih funkcioniranja in prilagajanja in ne po strogo diagnostičnih področjih. Omogoča zelo dobro diferencialno diagnostiko.

DISCD (Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders) je diagnostični pripomoček za detekcijo motenj avtističnega spektra. Omogoča postavitev diagnoze v skladu z več diagnostičnimi kriteriji. Intervju zajema vsa glavna življenjska področja posameznika od rojstva do trenutne starosti; izvaja se s starši posameznika. Predvidoma intervju traja 3 do 4 ure. Priporočljivo je, da s seboj prinesete vso razpoložljivo dokumentacijo o posameznikovih težavah (izvidi, odločbe, zapiski, opažanja, šolska poročila).

ADI-R (The Autism Diagnostic Interview-Revised) je diagnostični inštrument za ocenjevanje avtizma pri otrocih in odraslih in je namenjen njihovim skrbnikom. ADI-R zagotavlja diagnostični algoritem za avtizem. Usmerjen je na ugotavljanje vedenja, in sicer na treh glavnih področjih:

- kvalitete medsebojne socialne interakcije,
- komunikacije in jezika in
- omejenega, ponavljajočega in stereotipnega vedenja ter interesov.

Vsebuje 93 vprašanj, izmed katerih se jih večina nanaša na trenutno stanje. Hkrati so vprašanja namenjena tudi pridobitvi informacij o otroku ali odraslem, ko je bil ta star med 4 in 5 let, saj je v tem obdobju značilno avtistično vedenje najbolj izrazito. Na podlagi podatkov o tem starostnem obdobju lahko postavimo diagnozo avtizem.

ADI-R je primeren za otroke in odrasle, ki imajo mentalno starost 18 mesecev ali več. Intervju traja približno 90 minut oziroma nekoliko več časa, kadar ga izvajamo s skrbniki starejših otrok in odraslih.

ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) je široko uporabljan, standardiziran, zanesljiv in veljaven pripomoček za diagnosticiranje avtizma. Sestavljen je iz polstrukturiranih nalog, ki omogočajo opazovanje socialnega vedenja in komunikacije povezanih z motnjami avtističnega spektra. Uporablja se lahko tako pri otrocih od enega leta starosti dalje, kakor tudi pri odraslih. Sama izvedba predvidoma traja od 35 do 40 minut. Na podlagi ADOS-a ocenimo, če posameznikovo socialno vedenje in komunikacija dosegata kriterije za motnje avtističnega spektra in znotraj teh ožje kriterije za avtizem.

SCQ (The Social Communication Questionnaire) test, ki temelji na poročilu staršev in se nanaša na simptomatologijo, ki je povezana z motnjami avtističnega spektra (SAM). Na vprašanja se odgovarja z da/ ne in traja približno 10 minut. Tudi SCQ temelji na merjenju neobičajnega vedenja.

SRS (Social Responsiveness Scale) vprašalnik, ki pokriva različne dimenzije medosebnega vedenja, komunikacije in ponavljajoča/stereotipna vedenja, ki so značilne za motnje avtističnega spektra (MAS). Vprašalnik je narejen in se uporablja tako, da zazna širok obseg simptomov ne glede na težavnost. Rezultati nam razkrijejo avtistično motnjo, Aspergerjev sindrom, Pervazivno razvojno motnjo (nedoločeno in shizoidno osebnostno motnjo v otroštvu). SRS je pomemben pripomoček tudi pri načrtovanju individualiziranega programa za otroke v procesu izobraževanja.

SIPT (Sensory Integration and Praxis Tests) je ocenjevalni instrument, ki nam pomaga razumeti težave, ki jih ima otrok pri učenju in vedenju. Ocenjuje posamezne senzorne sisteme, kot so: vestibularni, propioceptivni, kinestetični, taktilni in vizualni sistem. SIPT je bil standardiziran za otroke med 4. in 8. letom starosti. Ocena SIPT-a ne pokaže vzrokov za težave pri učenju in vedenju, a pokaže, na katerem senzornem sistemu ima otrok težave. Še več podatkov dobimo, če to oceno združimo s kliničnim opazovanjem. Sestavljen je iz 17-ih podtestov, ki jih otrok izvede v individualnem kontaktu s terapevtom.

Zaradi kompleksnosti se izvede test vsaj v dveh seansah (2 x 1,5 ure). Podteste lahko razdelimo v štiri glavne skupine: oblike in prostor, vizo-motorična koordinacija in sposobnost sestavljanja elementov v celoto, taktilna diskriminacija, praxis (sposobnost, ki nam pomaga pri uspešni uporabi rok, celotnega telesa pri spretnostnih nalogah, kot so igra, uporaba orodij,..), vestibularno in proprioceptivno procesiranje.

PEP 3 (The Psychoeducational Profile / third edition) je test, sestavljen posebej za otroke z motnjami avtističnega spektra. Z njim se ocenjuje učno močna in šibka področja. S testom dobimo informacije o razvojnih stopnjah različnih spretnosti ter informacije o stopnji funkcioniranja za posamezne spretnosti. Rezultati so nam v pomoč pri načrtovanju izobraževalnega programa. Primeren je za otroke, stare od 2 do 7 let pa tudi za nekoliko starejše.

Poleg vseh teh testov pa opravijo še laboratorijske preiskave, in sicer:

- genetske preiskave,
- analize blata,
- analize organskih kislin,
- analize las in
- določanje peptidov v urinu

1.9 ZDRAVLJENJE

Za avtizem ni zdravila, vendar medicina ponuja uporabo antipsihotikov, kot je Risperdal in Ritalin, ki pa je psihostimulans. Najpogosteje se predpisujejo tudi selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina (SSRI), ki potencialno zmanjšujejo anksioznost ter obsesivno-kompulzivno motnjo.

Zdravimo lahko le spremljajoča stanja, kot so prebavne težave, zastrupljenost s težkimi kovinami, težave z imunskim sistemom, hiperaktivnost.

Raziskave so pokazale, da 70% avtistov ne prenaša glutena in kazeina, zato je priporočljiva dieta brez glutena in kazeina. Prav tako k prehrani dodamo probiotike, minerale, vitamine.

Vendar pa tako kot ne obstaja le en znak, ki bi določil, da ima otrok avtizem, prav tako ne obstaja le ena uspešna metoda. Otroci se naučijo živeti v mejah njihove motnje, vendar pa za to potrebujejo posebej za njih izdelan, individualiziran načrt obravnave.

Ob primerni obravnavi, podpori, terapijah in učenju lahko otrok z avtizmom napreduje in se uči. Lahko se zgodi tudi, da se nekateri znaki avtizma celo omilijo. Pomaga, če otroka naučimo nekaterih veščin in vzorcev, da si zna sam pomagati v določenih situacijah.

2 *NAMEN DELA*

Pri nekaterih osebah s SAM so našli povečane vrednosti (opioidnih) peptidov v urinu, morda pa bolj homogeno skupino predstavljajo otroci, ki imajo SAM, vendar nimajo hude umske prizadetosti oz. tisti z blago umsko prizadetostjo.

Namen te retrospektivne analize vzorcev seča za preiskavo na peptide je ugotoviti morebitno povezanost med vzorci urina in stanjem SAM, zlasti povezanost med tistimi brez hude umske prizadetosti in drugimi vedenjskimi odkloni (na primer huda hiperkinetičnost) ter ugotoviti, ali obstajajo morda kakšne povezave. Urinski vzorci so bili poslani z DHL pošto v laboratorij v Oslo, kjer je bila opravljena analiza.

V nalogi smo hoteli ugotoviti ali obstajajo razlike v deležih povišanih glutenov v različnih skupinah. Skupine so bile sestavljene po diagnozah. In sicer: 44 otrok z avtizmom, 7 otrok z epilepsijo, 4 otroki z aspergerjevim sindromom, 7 otrok z pervazivno razvojno motnjo, 8 otrok z umsko prizadetostjo ter 9 otrok, ki so dvakrat šli na analizo.

Da bi hipotezo dokazali, je bila opravljena analiza HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti).

Statistično pričakujemo, povezavo med preiskovanimi gluteni in skupinami otrok.

Zavedamo pa se, da so skupine majhne in bi za zanesljivo potrditev rezultatov potrebovali v vsaki skupini večje število otrok.

Naše delo upam, da bo vzpodbudilo strokovnjake, k razvijanju in izpopolnjevanju metode, da bo nekoč lahko vsak otrok s SAM deležen te preiskave tudi v Sloveniji. Verjamem, da lahko z dieto tem otrokom pomagamo lažje živeti.

3 EKSPERIMENTALEN DEL

Eden izmed možnih vzrokov avtizma je lahko patofiziološki metabolizem peptidov. Posledica takega metabolizma so povečane vsebnosti opioidnih peptidov v organizmu, kar se lahko odraža tudi v povečani koncentraciji teh peptidov v urinu.

Vzorci urina so bili zamrznjeni in poslanih z DHL pošto v laboratorij v Oslo, tam je bila opravljena analiza na peptide s HPLC (tekočinska kromatografije visoke ločljivosti).

3.1 OPIS METODE

Analizna metoda za določanje koncentracij peptidov v urinu obsega posamezne postopke, kot so:

- čiščenje vzorca,
- izolacija peptidov z ekstrakcijo na trdnem adsorbentu (SPE, solid phase extraction) z adsorbentom Oasis HLB (Waters, Milford, USA),
- separacija,
- identifikacija in kvantifikacija standardnih opioidnih peptidov so izvedli z UPLC-MS metodo (Ultra performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) in z
- ionizacijo molekul iz raztopin z razprševanjem v električnem polju.

Optimizirali so pogoje absorpcije in desorpcije na HLB koloni (Waters Oasis HLB ekstrakcijska kolona, dimenzije, način uporabe....) pri čemer so dosegli 75 do 85%-ni izkoristek za standardne opioidne peptide. Izkoristek ekstrakcije iz vodnih raztopin oziroma iz urina z dodanimi standardi je bil praktično enak pri koncentraciji 50 ng oziroma 10 ng na 2.5 mL vode ali urina.

Z ekstrakcijo na trdno fazo so vzorec 10 krat skoncentrirali z nanašanjem 2.5 mL vzorca na SPE kolono in s spiranjem z 0,25 mL zmesi acetonitrila (90%) in vode (10%).

Za UPLC z reverzno fazo so uporabili topili:

A (voda, 0.1% mravljinčno kislino (FA) in

B (acetonitril z 0.1% FA) z gradientno elucijo 95% A do 30% v 10 minutah.

Za kromatografsko ločbo so uporabili UPLC kolono ACQUITY BEH C18 2.1x30 mm z 1.7 μ m nosilcem stacionarne faze (Waters, Milford, USA). Optimizacijo ESI parametrov za posamezen peptid so določili z uvajanjem raztopine standardov s pomočjo mehanske brizgalke.

Meja detekcije (LOD) za posamezen peptid po celotnem analitskem postopku (2.5 mL vzorca urina, SPE absorpcija, desorpcija z 0.25 mL eluenta sestave 90% acetonitrila in 10% vode, 10 μ L injecirane raztopine na UPLC kolono) je 1ng/mL vzorca.

Rezultati:

Z metodo kapilarne tekočinske kromatografije in masne spektrometrije z nano elektro spray ionizacijo (cap UPLC-nano MS) jim je uspelo identificirati peptide znatno višjih molekularnih mas (1200 do 4000 Da), kot so opioidni peptidi, vendar ti peptidi nastanejo pri (ne)specifičnih encimskih razgradnjah visokomolekularnih proteinov (albumin, tansferin).

Baza podatkov:

Ko smo dobili izvide smo podatke vnesli v Excel. Po ambulantnih kartonih smo poiskali še diagnoze in spremljajoče diagnoze otrok, ter jih tudi vpisali. Sledila je statistična obdelava podatkov.

Otroke smo razvrstili v skupine po vrednostih glutena:

- vsi trije gluteni v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 1, ostala dva v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 2, ostala dva v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 3, ostala dva v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 1 in 2, gluten 3 v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 1 in 3, gluten 2 v referenčnih vrednostih
- povišan gluten 2 in 3, gluten 1 v referenčnih vrednostih
- povišani vsi trije gluteni

Tem skupinam smo naredili statistično obdelavo podatkov za gluten.

Naslednja je bila razvrstitev otrok po diagnozah. Avtistov je bilo 44 otrok, 7 otrok z epilepsijo, 4 otroki z aspergerjevim sindromom, 7 otrok z pervazivno razvojno motnjo, 8 otrok z umsko prizadetostjo ter 9 otrok, ki so dvakrat šli na analizo. Vsem tem skupinam smo naredili statistično obdelavo podatkov za gluten.

Prav tako smo tudi tabelarično prikazali frekvence glutenov.

Zaradi majhnih skupin smo se odločili, da uporabimo Fisherjev test natančnosti.

4 REZULTATI

4.1 OPIS SKUPINE PACIENTOV

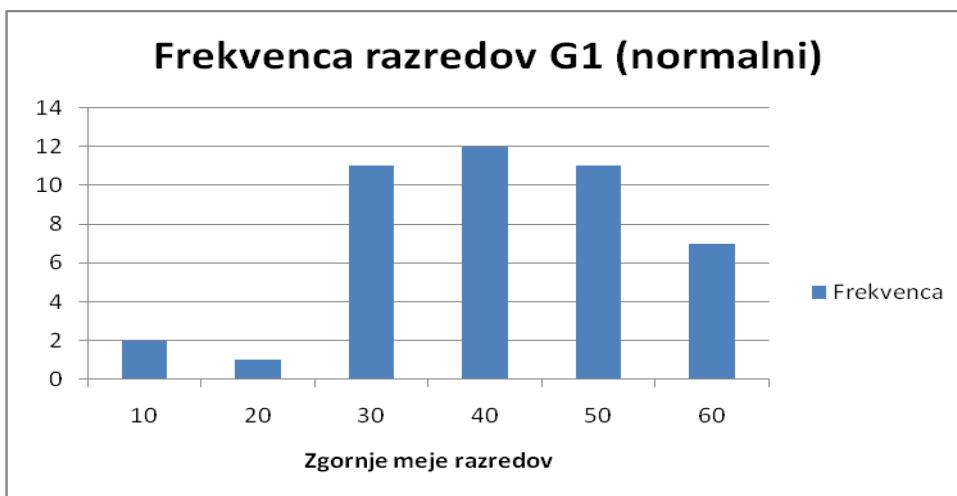
Analizo urina smo naredili 79-im otrokom, od tega jih je 9 šlo dvakrat na odvzem. Zaradi morebitnega napredka pri zdravljenju.

V skupini je 69 (87,34%) dečkov ter 10 (12,65%) deklic. Povprečna starost otrok je 12 let. Vsakemu vzorcu smo določali gluten 1, 2 in 3. Povprečje glutena 1 smo dobili 83,82 nanomola/kreatinin (maksimalno je 70 nanomola/kreatinin) ter standardno deviacijo 55,61%; glutena 2; 26 nanomola/kreatinin (maksimalno 30 nanomola/kreatinin) ter standardno deviacijo 22,08%; glutena 3 12,82 (maksimalno 15 nanomola/kreatinin) in standardno deviacijo 8,69%.

Skupine so bile sestavljene po diagnozah, in sicer: 44 otrok z avtizmom, 7 otrok z epilepsijo, 4 otroki z aspergerjevim sindromom, 7 otrok z pervazivno razvojno motnjo, 8 otrok z umsko prizadetostjo ter 9 otrok, ki so dvakrat opravili analizo.

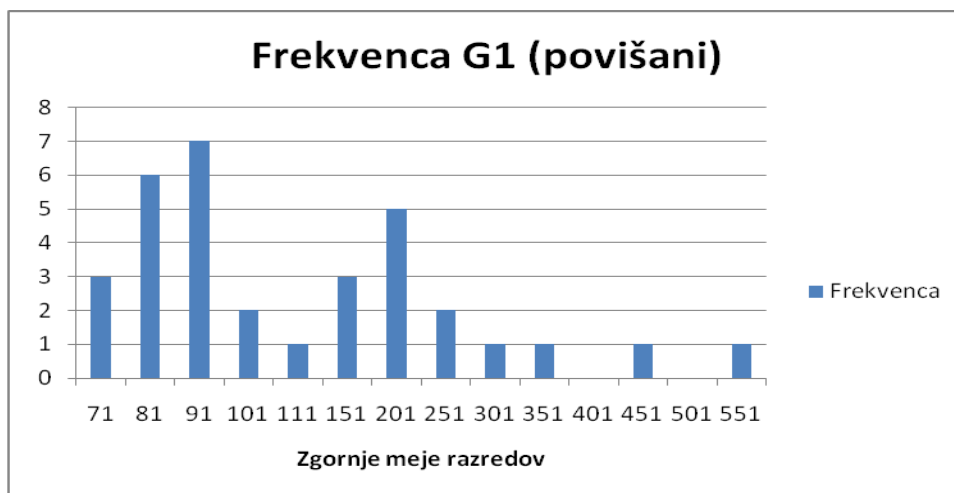
Vsi podatki so izvzeti iz tabel in se nahajajo v prilogah. V prilogi 1 je celotna skupina pacientov, v prilogi 2 pa so pacienti že razporejeni po diagnozah ter imajo izračunane deleže povišanih glutenov.

V spodnjih grafih smo prikazali frekvence razredov glutenov 1, 2 in 3, kateri so bili v referenčnih vrednostih (normalni). Prav tako, smo prikazali tudi frekvence glutenov 1, 2, in 3, kateri so bili povišani. Meje razredov so koncentracije v nanomolih/kreatinina.



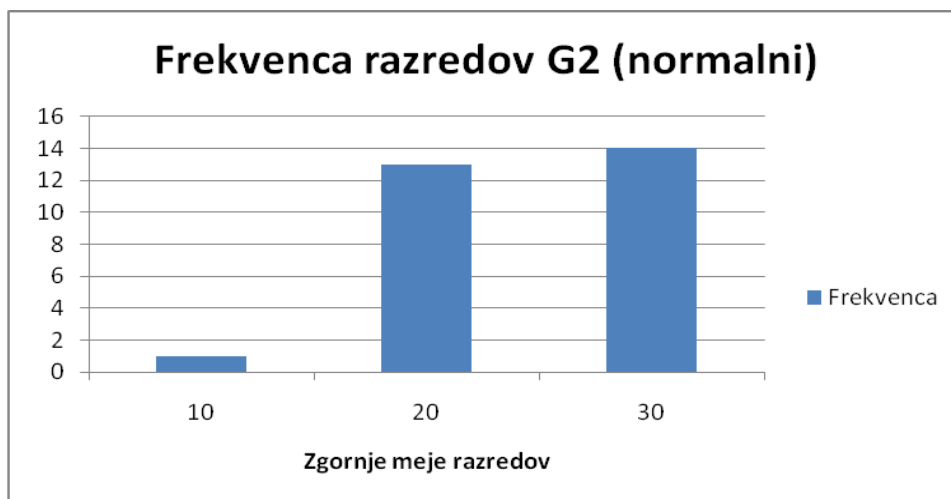
Slika 8: Frekvenca razredov glutena 1 (normalni)

Na grafu vidimo, da smo meje razredov razdelili po 10 in sicer do 60. Normalen gluten 1 je imelo 37 otrok. Največ otrok, ki so imeli gluten 1 v mejah normale so imeli vrednosti 30 nanomolov/kreatinin (11 otrok), 40 nanomolov/kreatinin (12 otrok) in 50 nanomolov/kreatinin (11 otrok). Pod 20 nanomolov/kreatinin so imeli samo trije otroci.



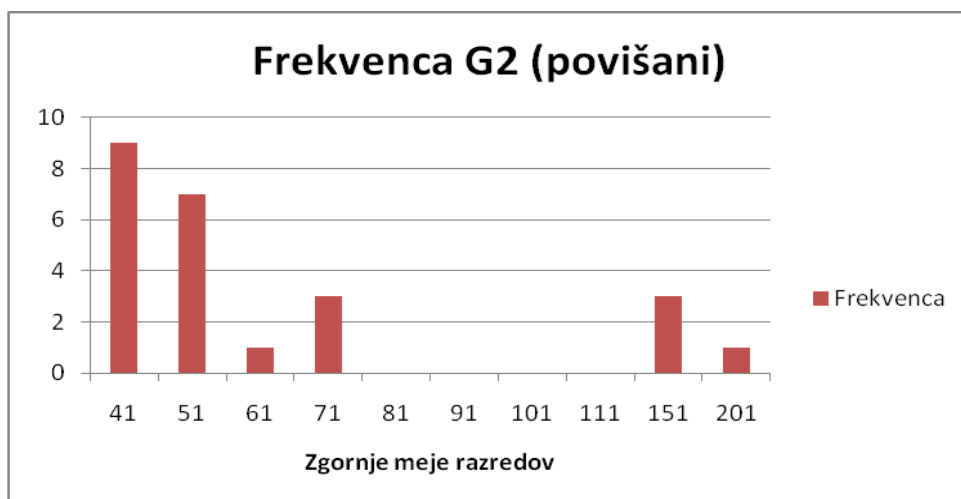
Slika 9: Frekvenca razredov glutena 1 (povišani)

Mejo razredov smo razdelili v območju od 71- 551, in sicer na 14 razredov. Povišan gluten 1 je imelo 33 otrok. Največ otrok je bilo v razredu od 91 (7 otrok), do 81 (6 otrok) in do 201 (5 otrok). Ostali razredi so imeli še manj otrok.



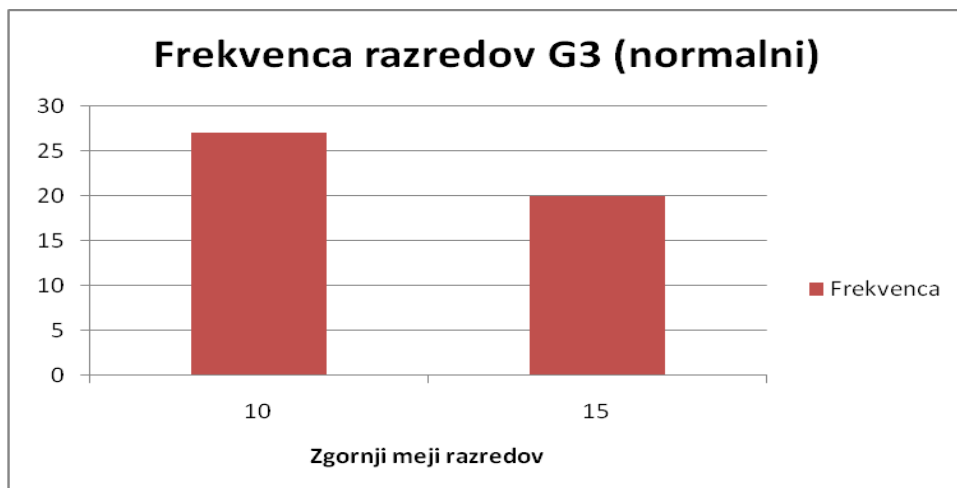
Slika 10: Frekvenca razredov glutena 2 (normalni)

Meje razredov smo razdelili tudi po 10, in sicer do 30, kar predstavlja maksimum glutena 2. Gluten 2 normalni je imelo 28 otrok. Največ otrok je imelo vrednosti do 30 nanomolov/kreatinin (14 otrok), do 20 nanomolov/kreatinin (13 otrok), do 10 nanomolov/kreatinin pa je imel samo eden.



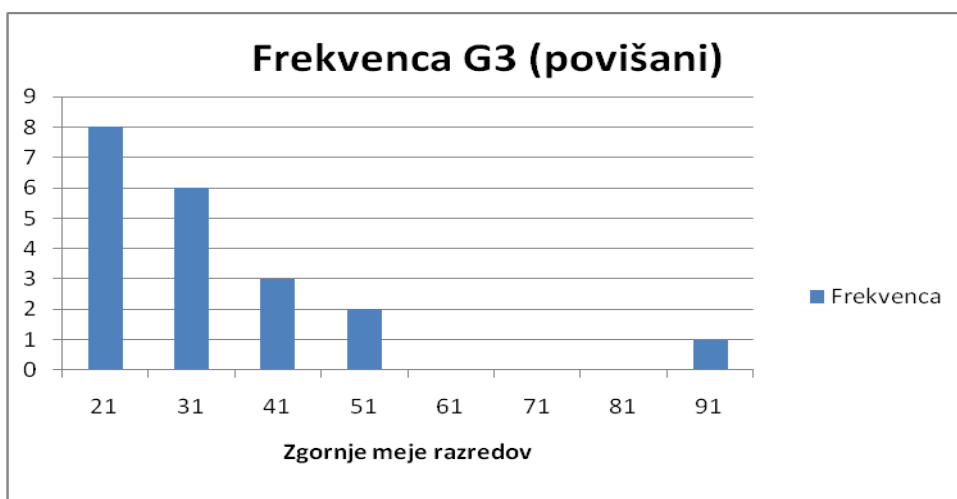
Slika 11: Frekvenca razredov glutena 2 (povišan)

Mejo razredov smo razdelili v območju od 41- 201, in sicer na 10 razredov. Gluten 2 povišan je imelo 24 otrok. Največ otrok je bilo v razredu do 41 nanomolov/kreatinin (9 otrok) ter do 51 nanomolov/kreatinin (7 otrok). V razredih od 81- 111 pa ni bilo niti enega otroka.



Slika 12: Frekvenca razredov glutena 3 (normalni)

Meje razredov smo tukaj razdelili na 10 in 15, saj 15 predstavlja maksimum normalnih vrednosti. gluten 3 normalni je imelo kar 47 otrok. Največ otrok je imelo vrednosti do 10 nanomolov/kreatinin (27 otrok), vrednosti do 15 nanomolov/kreatinin je imelo 20 otrok.



Slika 13: Frekvenca razredov glutena 3 (povišan)

Mejo razredov smo razdelili v območju od 21- 91, in sicer na 8 razredov. Gluten 3 povišan je imelo 20 otrok. Največ otrok je bilo v razredu do 21 nanomolov/kreatinin (8 otrok) ter do 31 nanomolov/kreatinin (6 otrok). V razredih 61, 71 in 81 ni bilo nobenega otroka.

Naredili smo tudi statistično primerjavo z Fisherjevim ekasktnim testom za male populacije. Primerjali smo glutene med skupinami, in prišli do rezultatov, ki so prikazani spodaj.

4.2 Primerjava 1: AVTIZEM IN EPILEPSIJA

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z avtizmom in otroci z epilepsijo enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z avtizmom in otroki z epilepsijo in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z avtizmom in otroci z epilepsijo – Gluten 1

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Epilepsija	
gluten 1	Normalen	Število	23	6	29
		% v mejah skupine bolezni	52.3%	85.7%	56.9%
	Povišan	Število	21	1	22
		% v mejah skupine bolezni	47.7%	14.3%	43.1%
Skupaj	Število	44	7	51	
	% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%	

n=51 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig.(1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,124

Otroci z avtizmom in otroci z epilepsijo – Gluten 2

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Epilepsija	
gluten 2	Normalen	Število	32	5	37
		% v mejah skupine bolezni	72.7%	71.4%	72.5%
	Povišan	Število	12	2	14
		% v mejah skupinae bolezni	27.3%	28.6%	27.5%
Skupaj	Število		44	7	51
	% v mejah skupine bolezni		100.0%	100.0%	100.0%

n=51 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=1,000

B) Otroci z avtizmom in otroci z epilepsijo – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Epilepsija	
gluten 3	Normalen	Število	31	6	37
		% v mejah skupine bolezni	70.5%	85.7%	72.5%
	Povišan	Število	13	1	14
		% v mejah skupin bolezni	29.5%	14.3%	27.5%
Skupaj	Število		44	7	51
	% v mejah skupine bolezni		100.0%	100.0%	100.0%

n=51 Veljavnih primerov	Natančen Sig.(2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,657

4.3 Primerjava 2: AVTIZEM IN ASPERGERJEV SINDROM

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z avtizmom in otroci z aspergerjevim sindromom enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z avtizmom in otroki z aspergerjevim sindromom in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z avtizmom in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 1

			skupina bolezní		Skupaj
			Avtizem	Aspergerjev sindrom	
gluten 1	Normalen	Število	23	4	27
		% v mejah skupine bolezní	52.3%	100.0%	56.3%
	Povišan	Število	21	0	21
		% v mejah skupine bolezní	47.7%	.0%	43.8%
Skupaj		število	44	4	48
		% v mejah skupine bolezní	100.0%	100.0%	100.0%

n=48 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,121

B) Otroci z avtizmom in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 2

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Aspergerjev sindrom	
gluten 2	Normalen	Število	32	4	36
		% v mejah skupine bolezni	72.7%	100.0%	75.0%
	Povišan	Število	12	0	12
		% v mejah skupine bolezni	27.3%	.0%	25.0%
Skupaj		Število	44	4	48
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=48 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,560

C) Otroci z avtizmom in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Aspergerjev sindrom	
gluten 3	Normalen	Število	31	4	35
		% v mejah skupine bolezni	70.5%	100.0%	72.9%
	Povišan	Število	13	0	13
		% v mejah skupine bolezni	29.5%	.0%	27.1%
Skupaj		Število	44	4	48
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=48 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,563

4.4 Primerjava 3: AVTIZEM IN UMSKA PRIZADETOST

S testom želimo preveriti ali imajo otroci z avtizmom in otroci z umsko prizadetostjo enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z avtizmom in otroki z umsko prizadetostjo in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z avtizmom in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 1

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Umska prizadetost	
gluten 1	Normalen	Število	23	7	30
		% v mejah skupine bolezni	52.3%	87.5%	57.7%
	Povišan	Število	21	1	22
		% v mejah skupine bolezni	47.7%	12.5%	42.3%
Skupaj	Število		44	8	52
	% v mejah skupine bolezni		100.0%	100.0%	100.0%

n=52 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,118

B) Otroci z avtizmom in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 2

			skupina bolezní		Skupaj
			Avtizem	Umska prizadetost	
gluten 2	Normalen	Število	32	4	36
		% v mejah skupine bolezní	72.7%	57.1%	70.6%
	Povišan	Število	12	3	15
		% v mejah skupine bolezní	27.3%	42.9%	29.4%
Skupaj		Število	44	7	51
		% v mejah skupine bolezní	100.0%	100.0%	100.0%

n=51 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,406

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 2 in je izključen pri izračunu.

c) Otroci z avtizmom in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 3

			skupina bolezní		Skupaj
			Avtizem	Umska prizadetostjo	
gluten 3	Normalen	Število	31	4	35
		% v mejah skupine bolezní	70.5%	57.1%	68.6%
	Povišan	Število	13	3	16
		% v mejah skupine bolezní	29.5%	42.9%	31.4%
Skupaj		Število	44	7	51
		% v mejah skupine bolezní	100.0%	100.0%	100.0%

n=51 Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,664

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 3 in je izključen pri izračunu.

4.5 Primerjava 4: EPILEPSIJA IN ASPERGERJEV SINDROM

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z epilepsijo in otroci z aspergerjevim sindromom enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z epilepsijo in otroki z aspergerjevim sindromom in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z epilepsijo in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 1

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Aspergerjev sindrom	
gluten 1	Normalen	Število	6	4	10
		% v mejah skupine bolezni	85.7%	100.0%	90.9%
	Povišan	Število	1	0	1
		% v mejah skupine bolezni	14.3%	.0%	9.1%
Skupaj		Število	7	4	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=11 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
Fisherjev eksaktni test	p=1,000	p=0,636

B) Otroci z epilepsijo in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 2

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Aspergerjev sindrom	
gluten 2	Normalen	Število	5	4	9
		% v mejah skupine bolezni	71.4%	100.0%	81.8%
	Povišan	Število	2	0	2
		% v mejah skupine bolezni	28.6%	.0%	18.2%
Račun		Število	7	4	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=11 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,491

C) Otroci z epilepsijo in otroci z aspergerjevim sindromom – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Aspergerjev sindrom	
gluten 3	Normalen	Število	6	4	10
		% v mejah skupine bolezni	85.7%	100.0%	90.9%
	Povišan	Število	1	0	1
		% v mejah skupine bolezni	14.3%	.0%	9.1%
Skupaj		Število	7	4	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=11 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=1,000

4.6 Primerjava 5: EPILEPSIJA IN UMSKA PRIZADETOST

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z epilepsijo in otroci z umsko prizadetostjo enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z epilepsijo in otroki z umsko manjrazvitostjo in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z epilepsijo in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 1

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Umska prizadetost	
gluten 1	Normalen	Število	6	7	13
		% v mejah skupine bolezni	85.7%	87.5%	86.7%
	Povišan	Število	1	1	2
		% v mejah skupine bolezni	14.3%	12.5%	13.3%
Skupaj	Število		7	8	15
	% v mejah skupine bolezni		100.0%	100.0%	100.0%

n=15 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
Fisherjev eksaktni test	p=1,000	p=0,733

B) Otroci z epilepsijo in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 2

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Umska prizadetost	
gluten 2	Normalen	Število	5	4	9
		% v mejah skupine bolezni	71.4%	57.1%	64.3%
	Povišan	Število	2	3	5
		% v mejah skupine bolezni	28.6%	42.9%	35.7%
Skupaj		Število	7	7	14
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=14 Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=1,000

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 2 in je izključen pri izračunu.

C) Otroci z epilepsijo in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Epilepsija	Umska prizadetost	
gluten 3	Normalen	Število	6	4	10
		% v mejah skupine bolezni	85.7%	57.1%	71.4%
	Povišan	Število	1	3	4
		% v mejah skupine bolezni	14.3%	42.9%	28.6%
Skupaj		Število	7	7	14
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=14 Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,559

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 3 in je izključen pri izračunu.

4.7 Primerjava 6: ASPERGERJEV SINDROM IN UMSKA PRIZADETOST

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z aspergerjevim sindromom in otroci z umsko prizadetostjo enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza).

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z aspergerjevim sindromom in otroki z umsko manjrazvitostjo in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z aspergerjevim in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 1

			skupina bolezni		Skupaj
			Aspergerjev sindrom	Umska prizadetost	
gluten 1	Normalen	Število	4	7	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	87.5%	91.7%
	Povišan	Število	0	1	1
		% v mejah skupine bolezni	.0%	12.5%	8.3%
Skupaj		Število	4	8	12
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=12 Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
Fisherjev eksaktni test	p=1,000	p=0,667

B) Otroci z aspergerjevim sindromom in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 2

			skupina bolezni		Skupaj
			Aspergerjev sindrom	Umska prizadetost	
gluten 2	Normalen	Število	4	4	8
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	57.1%	72.7%
	Povišan	Število	0	3	3
		% v mejah skupine bolezni	.0%	42.9%	27.3%
Skupaj		Število	4	7	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=11 Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,236

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 2 in je izključen pri izračunu.

C) Otroci z aspergerjevim sindromom in otroci z umsko prizadetostjo – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Aspergerjev sindrom	Umska prizadetost	
gluten 3	Normalen	Število	4	4	8
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	57.1%	72.7%
	Povišan	Število	0	3	3
		% v mejah skupine bolezni	.0%	42.9%	27.3%
Skupaj		Število	4	7	11
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n=11 Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,236

*Eden anketiranec nima vrednosti za gluten 3 in je izključen pri izračunu

4.8 Primerjava 7: AVTIZEM IN PONOVDNE ANALIZE

S testom želimo preveriti, ali imajo otroci z avtizmom in otroci, ki so prišli na ponovno analizo, enako verjetnost, da imajo povišan gluten 1, oziroma gluten 2, oziroma gluten 3 (ničelna hipoteza). Za ponovno analizo so se odločili, saj jih zanima kakšne so vrednosti glutena po dieti.

Rezultati Fisherjevega eksaktnega testa (enostranskega, kot tudi dvostranskega) za vse tri glutene so pokazali, da ni statistične značilnosti ($p < 0,05$), oz. da lahko rečemo, da ne obstaja statistično značilna povezava med otroki z avtizmom in otroki, ki so prišli na ponovljeno analizo, in nivojem glutena 1, 2 ali 3 (normalen/povišan).

A) Otroci z avtizmom in otroci, ki so prišli na ponovljeno analizo – Gluten 1

			skupina bolezn		Skupaj
			Avtizem	Skupina s ponovno analizo	
gluten 1	Normalen	Število	23	5	28
		% v mejah skupine bolezn	52.3%	55.6%	52.8%
	Povisen	Število	21	4	25
		% v mejah skupine bolezn	47.7%	44.4%	47.2%
Skupaj	Število		44	9	53
	% v mejah skupine bolezn		100.0%	100.0%	100.0%

n53= Veljavnih primerov	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
Fisherjev eksaktni test	p=1,000	p=0,575

B) Otroci z avtizmom in otroci, ki so prišli na ponovljeno analizo – Gluten 2

			skupina bolezní		Skupaj
			Avtizem	Skupina s ponovno analizo	
gluten 2	Normalen	Število	32	4	36
		% v mejah skupine bolezní	72.7%	57.1%	70.6%
	Povisen	Število	12	3	15
		% v mejah skupine bolezní	27.3%	42.9%	29.4%
Skupaj		Število	44	7	51
		% v mejah skupine bolezní	100.0%	100.0%	100.0%

n51= Veljavnih primerov*	Natančen Sig. (2-stranski)	Natančen Sig. (1-stranski)
	Fisherjev eksaktni test	p=0,406

*Dva anketiranca nimata vrednosti za gluten 2 in sta izključena pri izračunu.

C) Otroci z avtizmom in otroci, ki so prišli na ponovno analizo – Gluten 3

			skupina bolezni		Skupaj
			Avtizem	Skupina s ponovno analizo	
gluten 3	Normalen	Število	31	6	37
		% v mejah skupine bolezni	70.5%	85.7%	72.5%
	Povisen	Število	13	1	14
		% v mejah skupine bolezni	29.5%	14.3%	27.5%
Skupaj		Število	44	7	51
		% v mejah skupine bolezni	100.0%	100.0%	100.0%

n51= Veljavnih primerov*	Natančen	Natančen
	Sig. (2-stranski)	Sig. (1-stranski)
Fisherjev eksaktni test	p=0,657	p=0,370

*Dva anketiranca nimata vrednosti za gluten 3 in sta izključena pri izračunu.

5 RAZPRAVA

V diplomskem delu so pri otrocih s sumom na avtizem določali peptide v urinu. Že v Oslu so opredelili na podlagi pikov fenotipe glutenov. Ter jih razvrstili v gluten 1, 2 in 3.

V preglednico smo jih razvrstili po diagnozah in tako izračunali deleže povišanih glutenov v skupinah.

V preglednici z diagnozo **avtizem** je bilo 44 otrok, od tega kar 41 dečkov in samo 3 deklice. Povišan gluten 1 je imelo 21 otrok, to je skoraj polovica avtistov. Delež povišanega glutena 1 je bil 47,7%. Povišan gluten 2 je imelo 12 otrok, delež povišanega glutena 2 je torej znašal 27,2%. Povišan gluten 3 je imelo 13 otrok in delež povišanega glutena 3 je bil 29,5%. V tej skupini je bilo tudi 16 otrok, ki niso imeli povišanega nobenega glutena, zato lahko sklepamo, da so morda na brez glutenski dieti, saj namreč vemo, da avtistom dieta pomaga.

Sledijo otroci z **epilepsijo in z parcialno epilepsijo**; v tej skupini je bilo 7 otrok in sicer 4 dečki in 3 deklice. Povišan gluten 1 je imel 1 otrok, delež povišanega glutena je bil 14,2%. Povišan gluten 2 sta imela 2 otroka, delež povišanega glutena je znašal 28,5%. Povišan gluten 3 je imel 1 otrok, delež povišanega glutena je bil 14,2%. Tudi v tej skupini vidimo, da 5 otrok ni imelo povišanega nobenega glutena. Vendar pri dveh otrocih, ki sta imela glutene normalne, zaznamo avtističen pik. Pri enem otroku je nizka raven zaradi zdravljenja.

Pri otrocih z **aspergerjevim sindromom** so bili 4 dečki, in nobeden ni imel povišanega nobenega glutena. Vendar smo pri enem dečku opazili avtističen spekter, pri drugem pa mešani profil avtizma.

Otrok z **pervazivno razvojno motnjo** je bilo 7, od tega je bilo 6 dečkov in 1 deklica. Povišan gluten 1 so imeli 4 otroci, delež povišanega glutena je znašal 57,1%.

Povišan gluten 2 so imeli 3 otroci, delež povišanega glutena pa je bil 42,8%. Povišan gluten 3 je imel 1 otrok, delež povišanega glutena je znašal 14,2%.

Dva otroka sta imela avtističen vrh. Od tega so 3 imeli vrednosti v mejah normale. Od teh je eden na dieti, eden ima mešani profil ter zadnji ima avtističen spekter.

Sledijo otroci, ki imajo motnje v *razvoju govora, učne težave in umsko prizadetostjo*. V tej skupini je bilo 8 otrok, od tega 6 dečkov in 2 deklici. Povišan gluten 1 je imel 1 otrok, delež povišanega glutena znaša 12,5%. Povišan gluten 2 sta imela 2 otroka, delež povišanega glutena je 25%. Povišan gluten 3 so imeli 3 otroci, delež povišanega glutena pa znaša 37,5%. Od teh otrok so štirje, ki so imeli vrednosti v mejah normale. Kar dva izmed njih lahko sta na terapiji, ter zato lahko imata lažno znižane vrednosti.

V zadnjo skupino smo dali otroke, ki so *ponovno šli na analizo*. Bilo je 9 otrok, od tega 8 dečkov in 1 deklica. Povišan gluten 1 so imeli 4 otroci, delež povišanega glutena je 44,4%. Povišan gluten 2 so imeli 3 otroci, delež povišanega glutena vsebuje 33,3%. Povišan gluten 3 je imel 1 otrok, delež povišanega glutena znaša 11,1%.

Kar štirje otroci so imeli gluten v mejah normale. Vendar je potrebno upoštevati, da so ti otroci šli ponovno na testiranje in so v tem času lahko bili na dieti ali na kakšnih drugih terapijah z zdravili. Od tega jih ima 6 potrjen avtizem.

- **Gluten 1 (normalni)** kaže, da je 48 otrok imelo gluten 1 v mejah normale. Največ jih je imelo vrednosti od 30-50. Le trije pa so imeli vrednosti tja do 20.
- **Gluten 2 (normalni)** je imelo 28 otrok. Vidimo, da je samo eden imel vrednosti do 10. Ostalih 27 pa se enakomerno porazdeli v območja 20 in 30.
- **Gluten 3 (normalni)** je imelo 47 otrok. Vrednosti so razdeljene do 15. V območju do 10 jih je bilo 27 in do 15 jih je bilo 20.
- **Gluten 1 (povišani)** je imelo 31 otrok. Največ jih je imelo zvišane vrednosti v območju 81, 91 in tudi 201. Še večje vrednosti je imelo le nekaj otrok.

- **Gluten 2 (povišan)** je imelo 24 otrok. Največ jih je bilo v prvih dveh razredih od 41 in 51, saj je bilo kar 16 otrok tam. V razredih 81, 91, 101 in 111 ni bilo niti enega otroka.
- **Gluten 3 (povišan)** je imelo 20 otrok. Največ otrok je bilo v razredu do 21, kar 8. Tudi v razredu do 31 jih je bilo 6. Nato število otrok v razredih pada.

Sledi razporeditev otrok, ki so imeli:

vse tri glutene normalno je imelo 34 otrok, od tega 27 dečkov in 7 deklic. Povprečje *glutena 1* so imeli 38,6 nanomolov/kreatini; *glutena 2*; 8,7 nanomolov/kreatinin ter *glutena 3*; 5,8 nanomolov/kreatinin.

Povišan gluten 1 in ostala dva normalna je imelo 11 otrok, od tega je 9 dečkov in 2 deklici. Povprečje *glutena 1* so imeli 87,4 nanomolov/kreatinin. Povprečje vrednosti *glutena 2* so imeli 13,6 nanomolov/kreatini ter *glutena 3*; 8,6 nanomolov/kreatinin.

Povišan gluten 2 in ostala dva normalna je imelo 7 otrok, vsi so bili dečki. Povprečna vrednost *glutena 1* je 40,4 nanomolov/kreatinin; *glutena 2*; 40,8 nanomolov/kreatinin ter *glutena 3*; 8,2 nanomolov/kreatinin.

Povišan gluten 3 in ostala dva normalna so imeli 4 otroci, vsi dečki. Povprečna vrednost *glutena 1* je bila 39,7 nanomolov/kreatinin; *glutena 2*; 40,8 nanomolov/kreatinin in *glutena 3*; 22,7 nanomolov/kreatinin.

Povišana gluten 1 in 2 ter normalen 3 je imelo 7 otrok, od tega 6 dečkov in 1 deklica. Povprečna vrednost *glutena 1* je bila 138,57 nanomolov/kreatinin in *glutena 2*; 64,57 nanomolov/kreatinin ter *glutena 3*; 9,28 nanomolov/kreatinin.

Povišana gluten 1 in 3 ter normalen 2 je imelo 6 dečkov. Povprečna vrednost *glutena 1* je bila 174,5 nanomolov/kreatinin in *glutena 2*; 16,5 nanomolov/kreatinin; *gluten 3* je bil 38,5 nanomolov/kreatinin.

Povišana gluten 2 in 3 ter normalen 1 so imeli 3 dečki. Povprečna vrednost *glutena 1* je bila 45,66 nanomolov/kreatinin; *glutena 2*; 105,3 nanomolov/kreatinin ter *glutena 3*; 30,67 nanomolov/kreatinin.

Povišane vse tri glutene je imelo 7 dečkov. Povprečna vrednost *glutena 1* je bila 250 nanomolov/kreatinin; *glutena 2*; 59,71 nanomolov/kreatinin ter *glutena 3*; 25,86 nanomolov/kreatinin.

6 SKLEP

1. V naši raziskavi smo ugotovili razlike v deležih povišanih glutenov v različnih preučevanih skupinah, in sicer še najbolj očitno za gluten 1, saj je imelo 47,7% otrok z avtizmom povečane vrednosti in 51,7% otrok z nerazvrščeno peravzivno razvojno motnjo, medtem ko je bil ta odstotek v drugih dveh skupinah precej nižji, in sicer 14,2% v skupini otrok z epilepsijo in 12,5% v skupini otrok z razvojnimi zaostanki in umsko manjrazvitostjo. Kaksen je delež pri otrocih, ki se noramno razvijajo ne vemo, kajti normalnim otrokom te preiskve nismo delali, saj to ni bila raziskava z zdravimi kontrolami ali dvojno slepa.

2. Zaradi majhnih skupin smo uporabili Fisherjev test natančnosti (Fisherjev eksaktni test), vendar med nobeno od navedenih skupin nismo našli statistično značilnih razlik ($p < 0,05$). Še najvišja je bila za vrednosti gluten 1 med skupino otrok z avtizmom in skupino otrok z razvojnimi zaostanki in umsko prizadetostjo ($p = 0,06$) in med skupino otrok z avtizmom in skupino otrok z epilepsijo ($p = 0,1$).

3. Naši rezultati sicer podpirajo rezultate podobne študije (H Cass, P Gringras, J March, I McKendrick, A E O'Hare, L Owen, C Pollin. Absence of urinary opioid peptides in children with autism *Arch Dis Child* 2008;93:745-750), vendar kljub temu menimo, da bi za bolj zanesljivo in dokončno potrditev negativnega izida potrebovali v vsaki izmed skupin večje število otrok.

7 LITERATURA

1. Boyer R: Temelji Biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 70-91
2. Smith T: Zdravstveni vodnik za vso družino. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1986: 287-290
3. Lanbein K: Veliki zdravstveni vodnik 1. / Lanbein & Skalnik: Modita, Kranj, 2007
4. Berkow R: Veliki zdravstveni priročnik: za domačo uporabo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2005
5. Jurišić B: Avtizem. Zavod Republike Slovenije za šolstvo in šport, Ljubljana, 1992
6. Breclj– Kobe M: Avtistični sindrom kot razvojna motnja. V: Križišnik, C. Avtistični sindrom kot razvojna motnja. Izbrana poglavja iz pediatrije, Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Ljubljana 1994
7. Patterson D: Avtizem, kako najti pot iz tega blodnjaka. Modrijan, Ljubljana 2009: 11-42
8. Mindell E: Vitaminska biblija. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000: 136-157
9. Hiller A: Raznolika dieta pri celikaliji. IN OBS MEDICUS, d.o.o. Ptuj, 2003: 9-28
10. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2008: 298-326
11. Cass H, Gringras P, March J, McKendrick I. Absence of urinary opioid peptides in children with autism *Arch Dis Child* 2008;93: 745-750

8 PRILOGE

Priloga 1: Celotna skupina pacientov

Priloga 2: Otroci razvrščeni po diagnozah

Priloga 1. Vsi podatki za gluten so podani v nanomolih/kreatinin.

SPOL	STAROST	DATUM ODVZEMA	GLUTEN 1	GLUTEN 2	GLUTEN 3	Opombe	DIAGNOZA (mbk)	SPREMLJAJOČE DIAGNOZE
m	28.12.1999	7.10.2008	147 p	41 p	6 n	avtističen pik 58 p	perverzivna razvojna motnja- neopredeljena (F 84,9)	kompleksni tiki
m	24.10.2000	25.9.2008	100 p	25 n	12 n	avtističen pik 82 p	avtizem(F 84,0)	umska manj razvitost, kardiorespiratorni zastoj ob bronhoskop. Pri dihalni stiski v 7t, nedonošenost (32GS)
m	13.1.2000	29.11.2007	93 p	60 p	11 n	avtističen pik 47 p	avtizem(F 84,0)	epilepsija-neopred., duševna manjrazvitost, sepsa v neonat.obd.
ž	29.2.2000	29.11.2007	29 n	13 n	8 n	avtističen pik 48 p	epilepsija(G 40.9)	težka duševna manjrazvitost, alternantna hemiplegija, anitifosfolipidni sindrom
m	5.4.2002	8.11.2007	109 p	29 n	9 n	avtističen pik 60 p	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	3.7.2004	8.11.2007	81 p	16 n	4 n	avtističen pik 24 n	avtizem(F 84,0)	simptomatska epilepsija, fokalna kortikalna displazija desno frontalno, razvojni zaostanek
m	26.4.2002	3.11.2007	254 p	18 n	86 p	avtističen pik 39 p	avtizem(F 84,0)	žariščna epilepsija, hipermetropija
m	24.3.2004	11.10.2007	16 n	14 n	1 n	avtistični sindrom	duchennova mišična distrofija (G 71,0)	
ž	10.12.2001	8.3.2007	65 n	28 n	15 n	nevroleptiki in antidepresivi	avtizem(F 84,0)	pancitopenija-v obravnavi
m	20.12.1989	24.9.2007	61 n	7 n	5 n	kazein prisoten	epilepsija (G 84,0)	desintegrativna motnja (F 84,3), adipositas
m	9.9.2000	27.9.2007	45 n	14 n	1 n	mešani profil avizma	aspergerjev sindrom (F 84,5)	disleksija, sum na hipoplazijo hipofize, laktozna intol.

m	29.12.2001	6.9.2007	88 p	23 n	50 p	prevladuje gluten	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, hemiparaza D (blaga), mikrokranija
ž	20.4.2005	13.9.2007	59 n	30 n	13 n	regresiven avtizem, kazein in gluten odvisen	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	14.1.2005	23.7.2007	46 n	44 p	12 n	avtizem in gluten mešani profil	avtizem(F 84,0)	globalni razvojni zaostanek, sum na metab.obolenje
m	28.6.2002	5.6.2007	48 n	25 n	10 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	sindrom delecije 22q13, zmerna duševna manjrazvitost
m	17.8.1999	5.6.2007	71 p	42 p	17 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	epilepsija-neopredeljeno
ž	8.8.2003	5.6.2007	156 p	34 p	14 n	gluten in kazein	epileptična encefalopatija (G 93,6)	
m	11.6.1990	12.12.2006	42 n	25 n	14 n		učne težave (F 81,3)	motnja vedenja in čustvovanja
m	3.5.2003	28.4.2007	66 n	32 p	14 n	patološki urin	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, alergija na penicilin
m	13.1.2000	30.4.2007	178 p	167 p	41 p	gluten in kazein		
m	12.5.2005	28.4.2007	83 p	71 p	11n	avtističen pik, gluten	avtizem(F 84,0)	zmerni razvojni zaostanek, nedonošenost(29 GS)
m	7.6.1995	9.5.2007	24 n	15 n	8 n		avtizem(F 84,0)	lažja motnja v duševnem razvoju, vročinski krči v otroštvu
m	25.2.2003	28.4.2007	5 n	36 p	0 n	avtističen spekter	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost, nedonošenost (29 GS)

m	18.5.1999	2.3.2007	53 n	50 p	22 p	gluten in kazein	parcialna epilepsija s sek. Generalizacijo (G 40,1)	globalni razvojni zaostanek, strukturna aberacija kromosoma 1(46XY+P1), motnje spanja, senzorinevralna naglušnost, nizka rast, displastični znaki, obojestr. Retenca testisov
m	23.7.1993	12.2.2007	35 n	19 n	8 n		aspergerjev sindrom (F 84,5)	reaktivna čustvena motnja
m	20.12.1996	5.3.2007	89 p	62 p	25 p	gluten prisoten, patološki urin	avtizem(F 84,0)	motnje v duševnem razvoju
m	4.3.2003	5.3.2007	47 n	20 n	19 p	gluten prisoten, patološki urin	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	1.6.2001	12.2.2007	22 n	14 n	35 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, tiki
m	11.5.2003	12.2.2007	49 n	46 p	11 n		avtizem(F 84,0)	
m	8.12.2001	23.1.2007	26 n	42 p	10 n	gluten, avtističen vzorec	ekspresivna jezikovna motnja (F 80,1)	
m	29.10.2001	8.12.2004	77 p	70 p	8 n	gluten	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
ž	7.6.2003	7.3.2006	75 p	0 n	0 n	avtističen spekter	perverzivna razvojna motnja P(F 84,9), ni bilo ambulant. Vodenja	alergija na ribe in jajce
m	27.9.2002	9.11.2006	149 p	0 n	34 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	sy down, blaga zaznavna okvara sluha, pulmonal.stenoza, nedonošenost (34 GS)
m	26.7.2000	22.6.2006	242 p	37 p	18 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	
m	21.10.2000	23.5.2006	433 p	33 p	29 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	11.10.1979	24.5.2006	75 p	22 n	12 n	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	epilepsija, huda umska manjrazvitost

m	3.4.2001	24.5.2006	87 p	28 n	14 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	cerebralna paraliza-ataksična oblika, mioklono astatična epilepsija
m	28.2.2001	10.5.2006	544 p	45 p	29 p		razvojni zaostanek (R 62,0)	razvojna motnja koordinacije, učna manj uspešnost
m	25.5.2001	10.5.2006	86 p	30 n	25 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	intoleranca na laktozo in fruktozo
m	19.9.2001	12.5.2006	193 p	32 p	22 p	gluten in kazein	pervazivna razvojna motnja (F 84,0)	motnja v govornem razvoju (F 80,9)
m	3.3.2000	10.5.2006	306 p	28 n	19 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	
m	10.1.1997	14.2.2006	34 n			večinoma gluten	motnja pozornosti in hiperaktivnosti (F 90)	blaga umska manjrazvitost
m	22.9.1982	28.9.2005	38 n	0 n	5 n	normalni urin	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
ž	16.7.1996	27.1.2006	23 n	0 n	8 n	zdravljenje zmanjšuje raven peptidov	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
m	8.8.1998	12.7.2005	60 n	0 n	20 n	gluten prisoten		pervazivna razvojna motnja P(F 84,9)
m	4.1.1997	13.7.2005	72 p	0 n	12 n	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	motnja v duševnem razvoju
m	27.9.2002	10.8.2005	10 n	0 n	12 n	mora biti učinek zdravlil	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	22.2.1995	15.11.2005	27 n	11 n	0 n	normalni urin	aspergerjev sindrom (F 84,5)	
ž	5.11.1992	12.11.2005	39 n	0 n	6 n		sum na pervazivno razvojno motnjo (F 84,9)	umska manjrazvitost
m	15.6.1993	12.11.2005	36 n	0 n	0 n		avtizem(F 84,0)	
m	3.4.1997	11.11.2005	61 n	0 n	0 n	avtističen spekter	aspergerjev sindrom (F 84,5)	

m	31.10.1997	29.11.2005	25 n	0 n	0 n	normalni urin	avtizem(F 84,0)	adipoznost
m	9.8.1990	29.9.2005	26 n	0 n	6 n	nizka raven zaradi zdravljenja	epilepsija (G 40,9)	duševna manjrazvitost, kongenitalna hipotiroza
ž	6.9.1999	29.9.2005	54 n	29 n	0 n	blizu normalnega urina, 2 vrhova kazeina se povečata	parcialna epilepsija-simptomatska (G 40,1)	intrauterina okužba s CMV, huda levkopatija, blagi razvojni zaostanek, vedenjske motnje
m	5.6.2001	29.9.2005	33 n	0 n	9 n	normalen urin, težave	avtizem(F 84,0)	alergija na jajce in lešnik
m	29.3.2003	23.9.2005	164 p	0 n	17 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	zmerni razvojni zaostanek, prevodna naglušnost
m	11.3.2000	23.9.2005	52 n	0 n	11 n	kazein	avtizem(F 84,0)	
m	17.5.2001	23.9.2005	72 p	0 n	11 n	gluten prisoten, negotova diagnoza	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	11.3.1998	13.4.2005	60 n	0 n	11 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	16.10.1975	20.4.2005	50 n	0 n	0 n	mešani profil	pervazivna razvojna motnja? (F 84,9), ni bilo oddelčnega in ambulantnega vodenja	
m	12.2.1993	13.4.2005	35 n	0 n	4 n	povečanje privzema serotonina	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
m	2.8.1994	20.4.2005	24 n	0 n	10 n	dieta ali zdravljenje		sindrom fragilnega x kromosoma, umska manjrazvitost, obesitas
m	5.5.1978	9.3.2005	34 n	0 n	6 n		avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost, nizka rast

m	24.7.2001	15.2.2005	30 n	0 n	17 p	zdravilo lahko povzroča zmanjšanje	motnja v razvoju govora (F 80,1)	
ž	28.5.2001	1.6.2005	48 n	23 n	10 n	blizu normalnega urina, zaradi zdravl	motnja v razvoju govora (F 80,1)	
m	7.1.1996	8.2.2005	82 p	0 n	10 n	gluten prevladuje, ni običajen avtističen vzorec	avtizem(F 84,0)	umska in gibalna manjrazvitost
m	9.9.1999	28.11.2006	45 n	17 n	12 n	avtističen spekter	epilepsija (G 84,0)	trisomija 22, globalni razvojni zaostanek, celikalija, cianotična srčna hiba
m	24.3.2002	29.11.2006	50 n	151 p	20 p	prevladuje gluten, mešani profil	avtizem(F 84,0)	
m	3.11.2001	29.11.2006	32 n	16 n	8 n	motijo zdravila	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost, prazna sella turcica
m	6.11.1998	14.2.2006	34 n	115 p	50 p	gluten prevladuje, ni običajen avtističen vzorec	selektivni mutizem (F 94)	
m	28.12.1999	27.4.2006	234 p	37 p	13 n	gluten in kazein	pervazivna razvojna motnja neopredeljena (F 84,9)	
m	28.12.1999	28.9.2005	123 p			gluten prevladuje		
m	29.12.2001	16.2.2007	41 n	13 n	7 n	normalen urin		
ž	20.4.2005	23.1.2007	86 p	30 n	12 n	gluten prevladuje		
m	29.10.2001	28.11.2006	38 n	50 p	11 n	avtističen spekter		
m	3.3.2000	12.4.2005	180 p	139 p	2 n	gluten in kazein		

m	22.2.1995	28.11.2005	26 n			normalni urin, morda zaradi zdravil		
m	15.6.1993	5.10.2005	37 n	0 n	6 n	normalen urin, zdravljenje?		
m	3.4.1997	4.10.2005	53 n	36 p	0 n			

Priloga 2

SPOL	STAROST	DATUM ODVZEMA	GLUTEN 1	GLUTEN 2	GLUTEN 3	Opombe	DIAGNOZA (mbk)	SPREMLJAJOČE DIAGNOZE
m	24.10.2000	25.9.2008	100 p	25 n	12 n	avtističen pik 82 p	avtizem(F 84,0)	umska manj razvitost, kardiorespiratorni zastoj ob bronhoskop. Pri dihalni stiski v 7t, nedonošenost (32GS)
m	13.1.2000	29.11.2007	93 p	60 p	11 n	avtističen pik 47p	avtizem(F 84,0)	epilepsija-neopred., duševna manjrazvitost, sepsa v neonat.obd.
m	5.4.2002	8.11.2007	109 p	29 n	9 n	avtističen pik 60 p	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	3.7.2004	8.11.2007	81 p	16 n	4 n	avtističen pik 24 n	avtizem(F 84,0)	simptomatska epilepsija, fokalna kortikalna displazija desno frontalno, razvojni zaostanek
m	26.4.2002	3.11.2007	254 p	18 n	86 p	avtističen pik 39 p	avtizem(F 84,0)	žariščna epilepsija, hipermetropija
ž	10.12.2001	8.3.2007	65 n	28 n	15 n	nevroleptiki in antidepresivi	avtizem(F 84,0)	pancitopenija-v obravnavi
m	29.12.2001	6.9.2007	88 p	23 n	50 p	prevladuje gluten	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, hemiparaza D (blaga), mikrokranija
ž	20.4.2005	13.9.2007	59 n	30 n	13 n	regresiven avtizem, kazein in gluten odvisen	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	14.1.2005	23.7.2007	46 n	44 p	12 n	avtizem in gluten mešani profil	avtizem(F 84,0)	globalni razvojni zaostanek, sum na metab.obolenje
m	28.6.2002	5.6.2007	48 n	25 n	10 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	sindrom delecije 22q13, zmerna duševna manjrazvitost
m	17.8.1999	5.6.2007	71 p	42 p	17 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	epilepsija-neopredeljeno
m	3.5.2003	28.4.2007	66 n	32 p	14 n	patološki urin	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, alergija na penicilin

m	12.5.2005	28.4.2007	83 p	71 p	11n	avtističen pik, gluten	avtizem(F 84,0)	zmerni razvojni zaostanek, nedonošenost(29 GS)
m	7.6.1995	9.5.2007	24 n	15 n	8 n		avtizem(F 84,0)	lažja motnja v duševnem razvoju, vročinski krči v otroštvu
m	25.2.2003	28.4.2007	5 n	36 p	0 n	avtističen spekter	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost, nedonošenost (29 GS)
m	20.12.1996	5.3.2007	89 p	62 p	25 p	gluten prisoten, patološki urin	avtizem(F 84,0)	motnje v duševnem razvoju
m	4.3.2003	5.3.2007	47 n	20 n	19 p	gluten prisoten, patološki urin	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	1.6.2001	12.2.2007	22 n	14 n	35 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek, tiki
m	11.5.2003	12.2.2007	49 n	46 p	11 n		avtizem(F 84,0)	
m	29.10.2001	8.12.2004	77 p	70 p	8 n	gluten	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
m	26.7.2000	22.6.2006	242 p	37 p	18 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	
m	21.10.2000	23.5.2006	433 p	33 p	29 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	11.10.1979	24.5.2006	75 p	22 n	12 n	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	epilepsija, huda umska manjrazvitost
m	3.4.2001	24.5.2006	87 p	28 n	14 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	cerebralna paraliza-ataksična oblika, mioklonična astatična epilepsija
m	25.5.2001	10.5.2006	86 p	30 n	25 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	intoleranca na laktozo in fruktozo
m	3.3.2000	10.5.2006	306 p	28 n	19 p	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	
m	22.9.1982	28.9.2005	38 n	0 n	5 n	normalni urin	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
ž	16.7.1996	27.1.2006	23 n	0 n	8 n	zdravljenje zmanjšuje raven peptidov	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
m	8.8.1998	12.7.2005	60 n	0 n	20 n	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	pervazivna razvojna motnja P(F 84,9)
m	4.1.1997	13.7.2005	72 p	0 n	12 n	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	motnja v duševnem razvoju
m	27.9.2002	10.8.2005	10 n	0 n	12 n	mora biti učinkovito zdravilo	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek

m	15.6.1993	12.11.2005	36 n	0 n	0 n		avtizem(F 84,0)	
m	31.10.1997	29.11.2005	25 n	0 n	0 n	normalni urin	avtizem(F 84,0)	adipoznost
m	5.6.2001	29.9.2005	33 n	0 n	9 n	normalen urin, težave..	avtizem(F 84,0)	alergija na jajce in lešnik
m	29.3.2003	23.9.2005	164 p	0 n	17 p	gluten prisoten	avtizem(F 84,0)	zmerni razvojni zaostanek, prevodna naglušnost
m	11.3.2000	23.9.2005	52 n	0 n	11 n	kazein	avtizem(F 84,0)	
m	17.5.2001	23.9.2005	72 p	0 n	11 n	gluten prisoten, negotova diagnoza	avtizem(F 84,0)	razvojni zaostanek
m	11.3.1998	13.4.2005	60 n	0 n	11 n	gluten in kazein	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost
m	12.2.1993	13.4.2005	35 n	0 n	4 n	povečanje privzema serotonina	avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost
m	5.5.1978	9.3.2005	34 n	0 n	6 n		avtizem(F 84,0)	umska manjrazvitost, nizka rast
m	7.1.1996	8.2.2005	82 p	0 n	10 n	gluten prevladuje, ni običajen avtističen vzorec	avtizem(F 84,0)	umska in gibalna manjrazvitost
m	24.3.2002	29.11.2006	50 n	151 p	20 p	prevladuje gluten, mešani profil	avtizem(F 84,0)	
m	3.11.2001	29.11.2006	32 n	16 n	8 n	motijo zdravila	avtizem(F 84,0)	duševna manjrazvitost, prazna sella turcika
m	27.9.2002	9.11.2006	148 p	0 n	34 p			
povišanih pri G1: 21			47,7272	27,27273	29,54545			
povišanih pri G2: 12								
povišanih pri G3: 13								

ž	29.2.2000	29.11.2007	29 n	13 n	8 n	avtističen pik 48p	epilepsija(G 40,9)	težka duševna manjrazvitost, alternantna hemiplegija, anitifosfolipidni sindrom
m	9.9.1999	28.11.2006	45 n	17 n	12 n	avtističen spekter	epilepsija (G 84,0)	trisomija 22, globalni razvojni zaostanek, celikalija, cianotična srčna hiba
m	20.12.1989	24.9.2007	61 n	7 n	5 n	kazein prisoten	epilepsija (G 84,0)	desintegrativna motnja (F 84,3), adipositas
m	9.8.1990	29.9.2005	26 n	0 n	6 n	nizka raven zaradi zdravljenja	epilepsija (G 40,9)	duševna manjrazvitost, kongenitalna hipotiroza
ž	8.8.2003	5.6.2007	156 p	34 p	14 n	gluten in kazein	epileptična encefalopatija (G 93,6)	
m	18.5.1999	2.3.2007	53 n	50 p	22 p	gluten in kazein	parcialna epilepsija s sek. Generalizacijo (G 40,1)	globalni razvojni zaostanek, strukturna aberacija kromosoma 1(46XY+P1), motnje spanja, senzorinevralna naglušnost, nizka rast, displastični znaki, obojestr. Retenca testisov
ž	6.9.1999	29.9.2005	54 n	29 n	0 n	blizu normalnega urina, 2 vrhova kazeina se povečata	parcialna epilepsija-simptomatska (G 40,1)	intrauterina okužba s CMV, huda levkopatija, blagi razvojni zaostanek, vedenjske motnje
povišanih pri G1: 1			14,285714	28,57143	14,28571			
povišanih pri G2: 2								
povišanih pri G3: 1								

m	9.9.2000	27.9.2007	45 n	14 n	1 n	mešani profil avizma	aspergerjev sindrom (F 84,5)	disleksija, sum na hipoplazijo hipofize, laktozna intol.
m	23.7.1993	12.2.2007	35 n	19 n	8 n		aspergerjev sindrom (F 84,5)	reaktivna čustvena motnja
m	22.2.1995	15.11.2005	27 n	11 n	0 n	normalni urin	aspergerjev sindrom (F 84,5)	
m	3.4.1997	11.11.2005	61 n	0n	0 n	avtističen spekter	aspergerjev sindrom (F 84,5)	
povišanih pri G1: 0				0	0	0		
povišanih pri G2: 0								
povišanih pri G3: 0								
m	28.12.1999	7.10.2008	147 p	41 p	6 n	avtističen pik 58 p	pervazivna razvojna motnja- neopredeljena (F 84,9)	kompleksni tiki
ž	7.6.2003	7.3.2006	75 p	0 n	0 n	avtističen spekter	pervazivna razvojna motnja P(F 84,9), ni bilo ambulant. Vodenja	alergija na ribe in jajce
m	19.9.2001	12.5.2006	193 p	32 p	22 p	gluten in kazein	pervazivna razvojna motnja (F 84,0)	motnja v govornem razvoju (F 80,9)

m	28.12.1999	27.4.2006	234 p	37 p	13 n	gluten in kazein	pervazivna razvojna motnja neopredeljena (F 84,9)	
m	16.10.1975	20.4.2005	50 n	0 n	0 n	mešani profil	pervazivna razvojna motnja? (F 84,9), ni bilo oddelčnega in ambulantnega vodenja	
m	2.8.1994	20.4.2005	24 n	0 n	10 n	dieta ali zdravljenje	pervazivna razvojna motnja (F 84,9)	sindrom fragilnega x kromosoma, umska manjrazvitost, obesitas
m	24.3.2004	11.10.2007	16 n	14 n	1 n	avtistični sindrom	duchennova mišična distrofija (G71,0)	
povišanih pri G1: 4			57,142857	42,85714	14,28571			
povišanih pri G2: 3								
povišanih pri G3: 1								
m	8.12.2001	23.1.2007	26 n	42 p	10 n	gluten, avtističen vzorec	ekspresivna jezikovna motnja (F 80,1)	
m	10.1.1997	14.2.2006	34 n			večinoma gluten	motnja pozornosti in hiperaktivnosti (F 90)	blaga umskamanjrazvitost

m	28.2.2001	10.5.2006	544 p	45 p	29 p		razvojni zaostanek (R 62,0)	razvojna motnja koordinacije, učna manjšepešnost
m	24.7.2001	15.2.2005	30 n	0 n	17 p	zdravilo lahko povzroča zmanjšanje	motnja v razvoju govora (F 80,1)	
ž	28.5.2001	1.6.2005	48 n	23 n	10 n	blizu normalnega urina, zaradi zdravil	motnja v razvoju govora (F 80,1)	
m	11.6.1990	12.12.2006	42 n	25 n	14 n		učne težave (F 81,3)	motnja vedenja in čustvovanja
m	6.11.1998	14.2.2006	34 n	115 p	50 p	gluten prevladuje, ni običajen avtističen vzorec	selektivni mutizem (F 94)	
ž	5.11.1992	12.11.2005	39 n	0 n	6 n		sum na pervazivno razvojno motnjo (F 84,9)	umska manjrazvitost
povišanih pri G1: 1				12,5	25	37,5		
povišanih pri G2: 2								
povišanih pri G3: 3								
m	28.12.1999	28.9.2005	123 p			gluten prevladuje		
m	29.12.2001	16.2.2007	41 n	13 n	7 n	normalen urin		
ž	20.4.2005	23.1.2007	86 p	30 n	12 n	gluten prevladuje		
m	29.10.2001	28.11.2006	38 n	50 p	11 n	avtističen spekter		
m	3.3.2000	12.4.2005	180 p	139 p	2 n	gluten in kazein		

m	22.2.1995	28.11.2005	26 n			normalni urin, morda zaradi zdravil		
m	15.6.1993	5.10.2005	37 n	0 n	6 n	normalen urin, zdravljenje?		
m	13.1.2000	30.4.2007	178 p	167 p	41 p			
m	3.4.1997	11.11.2005	61 n	0 n	0 n			
povišanih pri G1: 4			44,44444	33,33333	11,11111			
povišanih pri G2: 3								
povišanih pri G3: 1								