

Profil aminokwasowy osocza krwi chłopców z autyzmem

The amino acid profile in blood plasma of young boys with autism

Jolanta Bugajska¹, Joanna Berska¹, Tomasz Wojtyto¹,
Mirosław Bik-Multanowski², Krystyna Sztefko¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej,
Instytut Pediatrii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

² Zakład Genetyki Medycznej,
Instytut Pediatrii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Summary

The aim of the study: It has been suggested that some amino acids are involved in the pathogenesis of autistic disorders. The aim of the study was to evaluate the plasma amino acids profile in young males with autism.

Method: Total of 27 autistic boys (aged 2–10 years, the study group) without any metabolic disorders and 13 healthy boys (aged 2–9 years, control group) were included in the study. In all subjects fasting blood plasma free amino acids (both exogenous and endogenous) were quantitatively measured by high performance liquid chromatography with UV-VIS detection.

Results: The mean plasma concentration values of citrulline, α -aminobutyric acid, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan and ornithine were significantly lower in boys with autism as compared to the control group ($p < 0.03$, $p < 0.04$, $p < 0.02$, $p < 0.02$, $p < 0.05$, $p < 0.02$, $p < 0.05$, respectively). The areas under the Receiver Operating Characteristic curves for these amino acids ranged from 0.637 to 0.726. None of the amino acids measured differentiate autistic children from healthy children. The sum of exogenous amino acids was lower in the study group than in the control group but this difference was not statistically significant.

Conclusions: Lower levels of exogenous amino acids confirm the possible role of these amino acids in autism. Determination of exogenous amino acids in plasma, however, cannot be used as a diagnostic test but it can still support autistic patients care.

Słowa kluczowe: autyzm, aminokwasy, chłopcy

Key words: autism, amino acids, boys

Wstęp

Spektrum zaburzeń autystycznych (*Autism Spectrum Disorders* – ASD) obejmuje autyzm dziecięcy, zespół Aspergera i całościowe nieokreślone zaburzenia rozwojowe. ASD jest zaburzeniem o podłożu neurobiologicznym, które cechuje się nieprawidłowościami w zakresie komunikowania się z otoczeniem i interakcji społecznych oraz występowaniem stereotypowych wzorców zachowań [1, 2]. Średnia częstość występowania zaburzeń autystycznych na świecie wynosi 12,7/10 000, przy czym chłopcy chorują 2–2,6 raza częściej niż dziewczynki [3]. Szacuje się, że w Polsce jest obecnie ok. 30 000 chorych na autyzm [1, 4].

Geneza autyzmu jest niejasna. W literaturze przedmiotu opisuje się kilka hipotez dotyczących przyczyn zaburzeń autystycznych, począwszy od różnorodnych teorii psychoanalitycznych i psychospołecznych, poprzez przyczyny genetyczne, aż do hipotez o wczesnym uszkodzeniu pewnych regionów mózgu [4–6]. Sugeruje się również udział neuroprzebieżników takich jak serotonina, dopamina, noradrenalina oraz acetylocholina w patofizjologii zaburzeń autystycznych [1]. Serotonina bierze także udział w regulacji innych szlaków przekazywania, w tym GABA-ergicznego i glutaminergicznego [1, 7–15]. Zaburzenia transmisji serotoninerdycznej są jednym z powodów manifestowania się charakterystycznych dla autyzmu zaburzeń, takich jak zachowania rytualne, kłopoty w komunikacji werbalnej i niewerbalnej. U pacjentów z autyzmem obserwuje się również podwyższoną aktywność układu dopaminergicznego, co może być przyczyną nadpobudliwości, agresji (w tym autoagresji) i nasilenia zachowań stereotypowych [8, 14].

U osób z zaburzeniami autystycznymi stwierdza się nieprawidłowy profil aminokwasowy osocza krwi. Najczęściej analizuje się stężenia kwasu glutaminowego i kwasu γ -aminomasłowego (GABA) [16–24], są one samodzielnymi neuroprzebieżnikami. Kwas glutaminowy ma działanie pobudzające, natomiast kwas γ -aminomasłowy hamujące w centralnym systemie nerwowym (OUN) [25]. Uważa się, że w przebiegu choroby występuje zahamowanie przekazywania mediowanego przez GABA, co może być rezultatem nadmiernego pobudzenia układu glutaminergicznego [14]. Pojawiły się również hipotezy o szkodliwym działaniu kwasu glutaminowego na rozwój neuronów. Wydaje się, że gwałtowny wzrost aktywności glutaminergicznej przed 3. rokiem życia dziecka może wiązać się z wystąpieniem objawów autyzmu w tym czasie [14]. W wielu przeprowadzonych badaniach wykazano wyższe stężenia kwasu glutaminowego u pacjentów z zaburzeniami autystycznymi w stosunku do grupy kontrolnej [16–21].

Na podstawie danych zawartych w literaturze przedmiotu można przypuszczać, że niektóre aminokwasy biorą udział w patogenezie zaburzeń autystycznych. Jednak opublikowane badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, które aminokwasy odgrywają rolę w etiologii autyzmu. Spowodowane to może być różną metodologią badań, trudnościami w interpretacji wyników i ich rozbieżnościami uniemożliwiającymi wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. W piśmiennictwie z tego zakresu brak jest też doniesień dotyczących stężeń aminokwasów w osoczu u pacjentów z autyzmem w populacji polskiej.

Cel

Celem pracy była ocena stężenia aminokwasów w osoczu krwi u chłopców z autyzmem.

Material

Badaniem objęto 27 chłopców z autyzmem w wieku 2–10 lat (średnia wieku $4,37 \pm 2,19$ lat), u których wykluczono choroby metaboliczne (grupa badana) oraz 13 zdrowych chłopców w wieku 2–9 lat (średnia wieku $5,00 \pm 2,74$ lat, grupa kontrolna). Pacjenci z autyzmem byli konsultowani w Poradni Chorób Metabolicznych oraz Poradni Genetycznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie w celu wykluczenia ewentualnych zaburzeń metabolicznych lub wad genetycznych, których objawy kliniczne mogą być podobne do obserwowanych u dzieci z autyzmem.

Metoda

Wszystkim dzieciom pobrano krew żylną na czczo do probówek zawierających heparynę litową, krew wirowano 10 min przy 1200 g, a surowicę zamrażano w -70°C do chwili wykonywania oznaczeń. Ilościowe oznaczenie wolnych aminokwasów w osoczu krwi wykonano metodą Pico-Tag (Waters, USA). Jako standard wewnętrzny zastosowano sulfotlenek metioniny o stężeniu 0,8 mM w 0,1 M HCl (Sigma-Aldrich, Niemcy). Przeprowadzono następujące etapy analityczne: 1) odbiałczenie osocza metodą ultrafiltracji (filtr Microcon, Millipore, Irlandia); 2) upochodnienie wolnych aminokwasów do fenyloizotiocyanianowych pochodnych; 3) oznaczenie analitów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC-UV/VIS), 4) identyfikacja poszczególnych aminokwasów i obliczenie ich stężenia. Rozdział analitów przeprowadzono w odwróconym układzie faz na kolumnie chromatograficznej C18 Pico-Tag (Waters, Irlandia), a absorbancję mierzono przy długości fali 254 nm. Do zbierania i opracowania danych zastosowano program Empower (Waters). Oznaczono stężenia następujących aminokwasów: kwasu asparaginowego (Asp), kwasu glutaminowego (Glu), hydroksyproliny (Hypro), seryny (Ser), asparaginy (Asn), glicyny (Gly), glutaminy (Gln), tauryny (Tau), histydyny (His), cytruliny (Cit), treoniny (Thr), alaniny (Ala), arginy (Arg), proliny (Pro), kwasu α -aminomasłowego (Aab), tyrozyny (Tyr), waliny (Val), metioniny (Met), izoleucyny (Ile), leucyny (Leu), fenyloalaniny (Phe), tryptofanu (Trp), ornityny (Orn) oraz lizyny (Lys). Laboratorium, w którym przeprowadzone zostały oznaczenia, uczestniczy w międzynarodowym programie kontroli jakości ERNDIM – amino acids (European Research Network for Inherited Disorders of Metabolism, MCA Lab, Holandia).

Analiza statystyczna

Stężenia aminokwasów podano w $\mu\text{mol/l}$. Do oceny statystycznej wykorzystano średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe. Obliczono sumę stężeń: Tyr, Phe, Val, Leu i Ile (CAA1), sumę stężeń: Trp, Phe, Val, Leu, Ile (CAA2), stosunek: Trp/CAA1,

stosunek: Tyr/CAA2. Dla citruliny, kwasu α -aminomasłowego, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, ornityny, tryptofanu wykreślono krzywe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) i obliczono pole powierzchni pod krzywą (*Area Under Curve* – AUC).

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu Statistica wersja 10 (StatSoft) oraz Microsoft Office Excel 2003. Oceniano rozkład zmiennych ciągłych pod kątem jego zgodności z rozkładem normalnym, stosując test Shapiro–Wilka. Do porównania średnich stężeń aminokwasów pomiędzy grupą badaną i kontrolną posłużył test t-Studenta. Do określenia zależności pomiędzy stężeniami aminokwasów a wiekiem pacjentów wykorzystano współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie znamienne.

Wyniki

Zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej nie wykazano zależności pomiędzy wiekiem dzieci a stężeniem analizowanych aminokwasów. W tabeli 1 przedstawiono średnie wartości stężeń aminokwasów (\pm SD) w osoczu krwi uzyskane u chłopców z zaburzeniami autystycznymi i w grupie kontrolnej. Średnie stężenie: citruliny, kwasu α -aminomasłowego, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, tryptofanu oraz ornityny było istotnie statystycznie niższe w grupie chłopców z autyzmem w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: $p < 0,03$; $p < 0,04$; $p < 0,02$; $p < 0,02$; $p < 0,05$; $p < 0,02$, $p < 0,05$). Średnie stężenia pozostałych aminokwasów nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Suma aminokwasów egzogennych była niższa w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Średnia wartość CAA2 u chłopców z autyzmem była istotnie statystycznie niższa w porównaniu z wartością uzyskaną w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). Natomiast nie wykazano różnic w wartościach CAA1, TRP*100/CAA1 i TYR*100/CAA2 pomiędzy analizowanymi grupami.

Tabela 1. Średnie stężenia aminokwasów w osoczu krwi (\pm SD) w grupie kontrolnej oraz w grupie badanej

Aminokwas	Grupa kontrolna n = 13	Grupa badana n = 27	p
	średnia \pm SD [μ mol/l]		
Izoleucyna	70,6 \pm 20,4	56,2 \pm 16,1	0,02
Leucyna	128 \pm 30,0	106 \pm 25,2	0,02
Lizyna	156 \pm 28,7	134,7 \pm 42,9	0,11
Metionina	25,5 \pm 9,24	23,8 \pm 7,66	0,54
Fenyloalanina	56,8 \pm 8,92	50,1 \pm 9,94	0,05
Treonina	110 \pm 28,7	112 \pm 26,9	0,82
Tryptofan	66,0 \pm 13,4	54,0 \pm 14,6	0,02
Walina	247 \pm 50,9	221 \pm 58,4	0,19
Σ_1	836,7 \pm 149,2	744,9 \pm 146,1	0,09

dalszy ciąg tabeli na następnej stronie

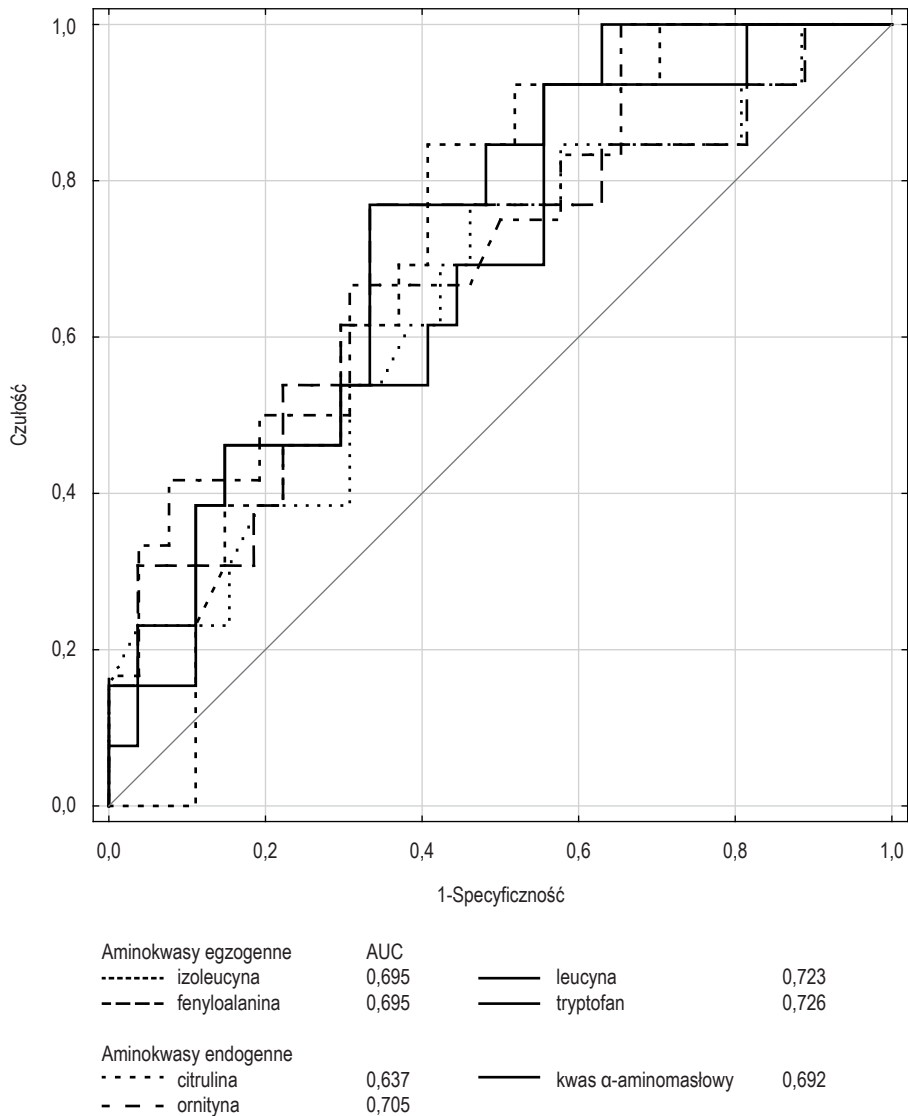
Arginina	77,7±26,8	85,2±23,5	0,37
Histydyna	86,0±12,4	75,7±19,7	0,09
Tyrozyna	64,9±16,3	57,1±11,5	0,11
Σ_2	230,7±46,1	217,6±39,1	0,39
Kwas asparaginowy	7,00±5,75	5,13±2,54	0,19
Kwas glutaminowy	48,4±17,9	60,8±24,0	0,11
Hydroksypolina	22,6±9,11	19,8±6,13	0,25
Seryna	150±27,3	136±26,5	0,12
Asparagina	69,3±14,0	68,1±15,4	0,81
Glicyna	231±53,2	253±54,9	0,25
Glutamina	622±109	632±103	0,78
Tauryna	41,1±9,69	39,1±6,57	0,46
Citrulina	26,7±10,1	21,2±5,40	0,03
Alanina	358±132	440±140	0,08
Prolina	198±66,3	229±88,1	0,26
Kwas α -aminomasłowy	24,2±7,31	19,6±5,98	0,04
Ornityna	59,5±9,29	50,8±14,3	0,05
CAA1	556±115	483±100	0,06
CAA2	555±108	480±102	0,05
TRP*100/CAA1	11,8±2,92	11,3±2,62	0,61
TYR*100/CAA2	11,8±2,13	12,2±2,43	0,65

Σ_1 – suma stężeń: Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val Σ_2 – suma stężeń: Arg, His, Tyr CAA1 – suma stężeń: Tyr, Phe, Val, Leu, Ile CAA2 – suma stężeń: Trp, Phe, Val, Leu, Ile

Dla citruliny, kwasu α -aminomasłowego, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, ornityny i tryptofanu wykreślono krzywe ROC (ryc. 1). Żaden z oznaczonych aminokwasów nie różnicował zdrowych dzieci od dzieci z autyzmem. Pola powierzchni pod krzywymi (AUC) dla wymienionych aminokwasów nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy sobą. Najwyższe AUC otrzymano dla Trp i Leu.

Omówienie wyników

Wartości referencyjne dla aminokwasów w osoczu krwi są zależne od wieku i płci. U zdrowych dzieci wyróżnia się następujące zakresy wiekowe: poniżej 11. roku życia, od 11. do 16. roku życia oraz powyżej 16. roku życia z podziałem na płeć [26, 27]. W literaturze przedmiotu można znaleźć również informacje dotyczące stężeń aminokwasów w osoczu krwi u pacjentów z zaburzeniami autystycznymi. Natomiast stężenia aminokwasów analizowano w innych przedziałach wiekowych: 3–12 lat



Rycina 1. Krzywe ROC dla cytruliny, kwasu α -aminomasłowego, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, ornityny i tryptofanu

[21], 12–18 lat [15]. Croonenberghs i wsp. [15] stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy stężeniem tryptofanu w surowicy a wiekiem w grupie, w skład której wchodziłi zarówno pacjenci z ASD, jak i pacjenci z grupy kontrolnej ($r = 0,48, p < 0,01$). Tirouvanziam i wsp. [21] wykazali ujemną korelację pomiędzy kwasem glutaminowym oraz kwasem asparaginowym a wiekiem dzieci w grupie kontrolnej oraz dodatnią

korelację izoleucyny i lizyny z wiekiem w grupie dzieci z autyzmem. W opisywanym tutaj projekcie, w którym badano dzieci w wieku 2–10 lat, nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami aminokwasów w osoczu krwi a wiekiem dzieci, tak w grupie dzieci z zaburzeniami autystycznymi, jak i w grupie kontrolnej.

Niektóre aminokwasy niezbędne do prawidłowego rozwoju człowieka nie są syntetyzowane w organizmie i muszą być dostarczane z pożywieniem (aminokwasy egzogenne: izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, treonina, tryptofan, walina) [25]. Arginina, histydyna, tyrozyna mogą być syntetyzowane z aminokwasów egzogennych, jednak przy nieodpowiedniej diecie ich ilość może być niewystarczająca [25, 28]. Często zaburzeniom autystycznym towarzyszy dysfunkcja układu pokarmowego, dlatego u pacjentów stosuje się leczenie farmakologicznie, psychologiczne oraz dietetyczne [7, 29].

Aminokwasy, będące podstawowym składnikiem budulcowym białek, są obecne we wszystkich tkankach i płynach organizmu, biorą też udział w wielu procesach metabolicznych, m.in. w pozyskiwaniu energii, detoksyfikacji, neurotransmisji. Pomiar stężenia aminokwasów jest zatem wskaźnikiem aktywności metabolicznej różnych tkanek organizmu [30]. Dysfunkcja układu pokarmowego u pacjentów z autyzmem wiąże się często z nieprawidłowym wchłanianiem i metabolizmem białek. Niejednokrotnie chorzy pozostają na bezglutenowej czy bezkazeinowej diecie [31, 32], co może dodatkowo przyczyniać się do obniżenia stężenia aminokwasów egzogennych w organizmie [33]. Istotnym elementem terapii jest poprawa stanu odżywienia pacjenta, w czym może być pomocne monitorowanie stężenia aminokwasów w osoczu krwi.

U osób z ASD badano profil aminokwasów egzogennych w osoczu krwi. Naushad i wsp. [20] wykazali obniżone stężenia Trp, Met, His i Phe w grupie dzieci z autyzmem w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast nie zaobserwowali różnic w stężeniach Tyr, Ile, Leu i Val pomiędzy badanymi grupami. Croonenberghs i wsp. [15] badali markery przekąźnictwa serotonergicznego i noradrenergicznego, a także stężenia egzogennych aminokwasów. Wykazali oni istotne obniżenie stężenia Trp, Phe, Ile oraz Leu w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną oraz brak istotnych różnic w przypadku Tyr i Val. Tirouvanziam i wsp. [21], analizując stężenia aminokwasów w osoczu, wykazali istotny niedobór aminokwasów egzogennych: Thr, Tyr i Leu u dzieci z ASD, oraz prawidłowy poziom dla Phe, Trp, His, Met, Ile, Lys, Val, Arg. W prezentowanej pracy wykazano istotnie statystycznie obniżone stężenia Ile, Leu, Phe, Trp u chłopców z autyzmem względem grupy kontrolnej oraz brak istotnych statystycznie różnic dla Lys, Met, Thr, Val, Arg, His, Tyr. Tryptofan jest prekursorem serotoniny. Jego obniżone stężenie może być przyczyną niewystarczającej syntezy serotoniny w OUN. Serotonina może brać udział w patomechanizmie zaburzeń spektrum autyzmu. Tryptofan i krążące we krwi obojętne aminokwasy: Phe, Val, Leu, Ile docierają do mózgu za pomocą tego samego systemu transportowego. Podwyższone stężenia wymienionych aminokwasów mogą powodować, że do mózgu dociera zmniejszona ilość tryptofanu [34]. Naushad i wsp. [20], Tu i wsp. [19] oraz Croonenberghs i wsp. [15] wykazali istotnie statystycznie niższe stężenia tryptofanu w osoczu krwi u pacjentów z autyzmem w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne wyniki uzyskano w prezentowanej pracy. Obserwacje te różnią się od wyników uzyskanych przez

Aldred i wsp. [18] oraz Shimmurę i wsp. [16], którzy nie wykazali różnic w stężeniu tryptofanu w osoczu krwi pomiędzy dziećmi z autyzmem a grupą kontrolną.

Croonenberghs i wsp. [15] zaobserwowali nie tylko obniżone stężenia tryptofanu, ale też obniżone wartości CAA1 i CAA2 w grupie dzieci autystycznych w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast nie wykazali oni różnic w wartościach Trp/CAA1 oraz Tyr/CAA2 pomiędzy badanymi grupami. Podobne wyniki uzyskano w opisywanym projekcie: stwierdzono niższe średnie wartości CAA1 i CAA2 u chłopców z autyzmem w porównaniu z grupą kontrolną i nie wykazano różnic w wartościach Trp/CAA1 i Tyr/CAA2 pomiędzy badanymi grupami. Natomiast Naushad i wsp. [20] uzyskali znamienne statystycznie niższy stosunek Trp/CAA1 w grupie dzieci z autyzmem w porównaniu z grupą kontrolną, a dla Tyr/CAA2 nie wykazali różnic pomiędzy badanymi grupami. Różnice te mogą być spowodowane odmiennymi nawykami dietetycznymi.

Do najważniejszych neurotransmiterów pobudzających w OUN należy kwas glutaminowy. Przechodzi on łatwo przez barierę krew–mózg. Z piśmiennictwa wynika, że wyższe stężenie kwasu glutaminowego stwierdza się nie tylko w osoczu [16–20], ale także w niektórych regionach mózgu pacjentów z autyzmem [35]. Sugeruje się, że stan hiperglutaminergiczny jest przyczyną autyzmu [36]. W niniejszej pracy otrzymano wyższe stężenia kwasu glutaminowego w osoczu krwi dzieci z zaburzeniami autystycznymi w porównaniu z grupą kontrolną. Różnice te nie były jednak statystycznie znamienne, co mogło być spowodowane zbyt małą liczebnością grupy badanej.

Tirouvanziam i wsp. [21] uzyskali obniżone średnie stężenie citruliny u pacjentów z autyzmem względem grupy kontrolnej, co zostało potwierdzone w obecnej pracy. W literaturze przedmiotu brak jest informacji na temat stężenia kwasu α -aminomasłowego oraz ornityny w osoczu krwi pacjentów z autyzmem. W opisywanym projekcie otrzymano istotnie statystycznie niższe średnie stężenia kwasu α -aminomasłowego oraz ornityny w grupie chłopców z autyzmem względem grupy kontrolnej. Trudno jednoznacznie wyjaśnić te różnice, mogą być one spowodowane zmienionym metabolizmem aminokwasów.

W dostępnej literaturze z tego zakresu można znaleźć tylko nieliczne doniesienia dotyczące wartości diagnostycznej oznaczania stężenia aminokwasów w osoczu krwi w wykrywaniu zaburzeń autystycznych. Tirouvanziam i wsp. [21] wykazali wysoką wartość diagnostyczną dla treoniny oraz glutaminy (odpowiednio: AUC = 0,8; AUC = 0,87). Brak jest natomiast doniesień o wartości diagnostycznej citruliny, kwasu α -aminomasłowego, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, ornityny i tryptofanu u pacjentów z ASD. Otrzymane w niniejszej pracy AUC dla Cit, Aab, Ile, Phe, Leu, Orn, Trp i CAA2 u chłopców z autyzmem potwierdzałyby niewielką przydatność tych oznaczeń w diagnostyce ASD. Jakkolwiek oznaczenie profilu aminokwasów w osoczu krwi może być pomocne w leczeniu dietetycznym pacjentów z autyzmem.

Wnioski

1. Niski poziom aminokwasów egzogennych u dzieci z autyzmem potwierdza udział tych aminokwasów w zaburzeniach autystycznych.
2. Oznaczanie profilu aminokwasów egzogennych w osoczu krwi nie może być stosowane do diagnostyki autyzmu, ale może być przydatne w opiece nad pacjentem.

Piśmiennictwo

1. Gerhant A, Olajossy M, Olajossy-Hilkesberger L. *Neuroanatomical, genetic and neurochemical aspects of infantile autism*. Psychiatr. Pol. 2013; 47(6): 1101–1111.
2. Craske G, Bogels S, Friedman M, Hollander E, Fernandez RPR. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5TM)*. American Psychiatric Pub.; 2013.
3. Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC i wsp. *Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample*. Am. J. Psychiatr. 2011; 168(9): 904–912.
4. Popielarska A, Popielarska M. *Psychiatria wieku rozwojowego*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2000.
5. Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE. *Genetics of autism: Overview and new directions*. J. Autism Dev. Disord. 1998; 28(5): 351–368.
6. Kiejna A, Małyszczak K, Mazurek J. *Psychiatria. Wybrane zagadnienia*. Wrocław: Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; 2009.
7. Shattock P, Whiteley P, Todd L, Zawada G. *Autyzm jako zaburzenie metaboliczne: wskazówki dotyczące interwencji dietetycznej*. Kraków: Krajowe Towarzystwo Autyzmu; 2009.
8. Pietras T, Witusik A, Gałęcki P. *Autyzm – epidemiologia, diagnoza i terapia*. Wrocław: Contin; 2010.
9. Kolevzon A, Newcorn JH, Kryzak L, Chaplin W, Watner D, Hollander E i wsp. *Relationship between whole blood serotonin and repetitive behaviors in autism*. Psychiatr. Res. 2010; 175(3): 274–276.
10. Yang CJ, Tan HP, Du YJ. *The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development*. Neuroscience 2014; 267: 1–10.
11. Chandana SR, Behen ME, Juhász C, Muzik O, Rothermel RD, Mangner TJ i wsp. *Significance of abnormalities in developmental trajectory and asymmetry of cortical serotonin synthesis in autism*. Int. J. Dev. Neurosci. 2005; 23: 171–182.
12. Lesch KP, Waider J. *Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders*. Neuron. 2012; 76(1): 175–191.
13. Whitaker-Azmitia PM. *Serotonin and brain development: role in human developmental diseases*. Brain Res. Bull. 2001; 56(5): 479–485.
14. Lam KSL, Aman MG, Arnold LE. *Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature*. Res. Dev. Disabil. 2006; 27(3): 254–289.
15. Croonenberghs J, Delmeire L, Verkerk R, Lin AH, Meskal A, Neels H i wsp. *Peripheral markers of serotonergic and noradrenergic function in post-pubertal, caucasian males with autistic disorder*. Neuropsychopharmacology 2000; 22(3): 275–283.
16. Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Ohno K, Matsuzaki H i wsp. *Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high-functioning autism*. PLoS One 2011; 6(10): 2–7.
17. Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ i wsp. *Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism*. Prog. Neuro.-Psychoph. 2006; 30(8): 1472–1477.
18. Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH. *Plasma amino acid levels in children with autism and their families*. J. Autism Dev. Disord. 2003; 33(1): 93–97.
19. Tu W-J, Chen H, He J. *Application of LC-MS/MS analysis of plasma amino acids profiles in children with autism*. J. Clin. Biochem. Nutr. 2012; 51(3): 248–249.
20. Naushad SM, Jain JMN, Prasad CK, Naik U, Akella RRD. *Autistic children exhibit distinct plasma amino acid profile*. Indian J. Biochem. Bioph. 2013; 50(5): 474–478.

21. Tirouvanziam R, Obukhanych TV, Laval J, Aronov PA, Libove R, Banerjee AG i wsp. *Distinct plasma profile of polar neutral amino acids, leucine, and glutamate in children with Autism Spectrum Disorders*. J. Autism Dev. Disord. 2012; 42(5): 827–836.
22. Alabdali A, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. *Association of social and cognitive impairment and biomarkers in autism spectrum disorders*. J. Neuroinflamm. 2014; 11: 4.
23. El-Ansary AK, Bacha A, Al-Ayahdi LY. *Relationship between chronic lead toxicity and plasma neurotransmitters in autistic patients from Saudi Arabia*. Clin. Biochem. 2011; 44(13): 1116–1120.
24. Dhossche D, Applegate H, Abraham A, Maertens P, Bland L, Bencsath A i wsp. *Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism*. Med. Sci. Monitor. 2002; 8(8): PR1-6.
25. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biochemia Harpera* (wyd. 3). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1994.
26. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Springer Science & Business Media; 1996.
27. Gregory DM, Sovetts D, Clow CL, Scriver CR. *Plasma free amino acid values in normal children and adolescents*. Metabolism 1986; 35(10): 967–969.
28. Stryer L. *Biochemia*. Warszawa: PWN; 2003.
29. Kawicka A, Regulaska-Ilow B. *How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism. A review*. Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 2013; 64(1): 1–12.
30. Evans C, Dunstan RH, Rothkirch T, Roberts TK, Reichelt KL, Cosford R i wsp. *Altered amino acid excretion in children with autism*. Nutr. Neurosci. 2008; 11(1): 9–17.
31. Lange KW, Hauser J, Reissmann A. *Gluten-free and casein-free diets in the therapy of autism*. Curr. Opin. Clin. Nutr. 2015; 18(6): 572–575.
32. Erickson CA, Stigler KA, Corkins MR, Posey DJ, Fitzgerald JF, McDougle CJ. *Gastrointestinal factors in autistic disorder: a critical review*. J. Autism Dev. Disord. 2005; 35(6): 713–727.
33. Arnold GL, Hyman SL, Mooney RA, Kirby RS. *Plasma amino acids profiles in children with autism: potential risk of nutritional deficiencies*. J. Autism Dev. Disord. 2003; 33(4): 449–454.
34. Maes M, Wauters A, Verkerk R, Demedts P, Neels H, Van Gastel A i wsp. *Lower serum L-tryptophan availability in depression as a marker of a more generalized disorder in protein metabolism*. Neuropsychopharmacology 1996; 15(3): 243–251.
35. Page LA, Daly E, Schmitz N, Simmons A, Toal F, Deeley Q i wsp. *In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism*. Am. J. Psychiat. 2006; 163(12): 2189–2192.
36. Fatemi SH. *The hyperglutamatergic hypothesis of autism*. Prog. Neuro.-Psychoph. 2008; 32: 911.

Adres: Jolanta Bugajska
Zakład Biochemii Klinicznej
Instytut Pediatrii UJ CM
30-663 Kraków, ul. Wielicka 265

Otrzymano: 16.02.2016
Zrecenzowano: 15.08.2016
Otrzymano po poprawie: 2.09.2016
Przyjęto do druku: 4.09.2016