

# Wartość badań chromatograficznych we wczesnym rozpoznaniu zaburzeń rozwojowych u dzieci na przykładzie autyzmu\*\*

\*Joanna Kałużna-Czaplińska, Ewa Socha, Jacek Rynkowski

Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej  
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Jacek Rynkowski

## THE VALUE OF CHROMATOGRAPHIC RESEARCH IN EARLY DIAGNOSIS OF DEVELOPMENTAL DISORDERS IN CHILDREN AS AN EXAMPLE OF AUTISM

### Summary

One of the applications of metabolomic study is the determination of biomarkers of disease and assessment of effectiveness of research in therapy. In medical diagnostics of different diseases organics acids are used as biomarkers. They can be determined in tissue and body fluids. Because the collection of urine is very simple and non-invasive it is most often used in research. The metabolic profile can become very a valuable tool in the screening of autism biomarkers. Autism appears during the first 3 years of life. Patients with autistic symptoms show social and communicative deficits and delays, intentional disturbances, and stereotypical and repetitive behaviors. The diagnosis of autism is founded on psychological and medical history. There are no biomedical tests which allow early detection of disease before the appearance of the first symptoms. Chromatographic techniques, especially coupled with mass spectrometry, can be useful in the individual diagnosis and treatment of autism. The personal research on the basis of levels of organic acids is a new way of medical intervention in autism.

Key words: chromatographic techniques, autism, metabolic profiles, biomarker, neurotransmitters

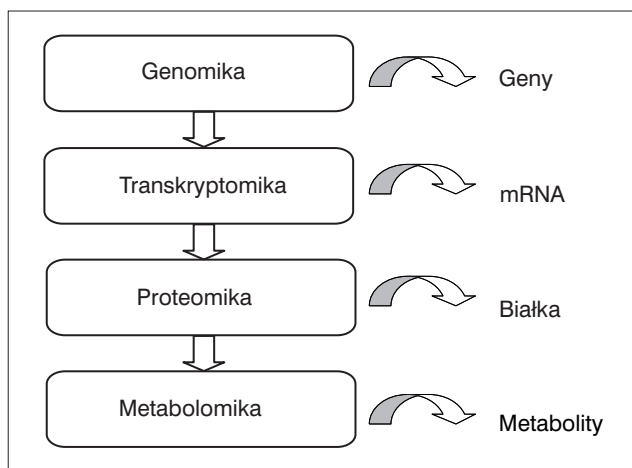
Wartość to cecha właściwa dla danej osoby lub rzeczy, mówiąca o jej walorach materialnych, mentalnych, artystycznych cennych dla ludzi. Wartość prowadzonych badań naukowych można również rozważać i oceniać w aspekcie przydatności wyników badań do zastosowań praktycznych, służących ochronie człowieka, a także stworzeniu efektywnej terapii, diety dla organizmu dotkniętego zaburzeniem, chorobą.

Człowiek to nie tylko doskonały układ komórek, tkanek i narządów powiązanych ze sobą ścisłymi zależnościami fizyko-chemicznymi wraz z niezmiernie skomplikowaną i subtelną sferą psychiczną, ale także jednostka biologiczna. A tak pojmowany organizm ludzki stanowi tylko element biosfery i jest ściśle powiązany z otaczającym go środowiskiem. Pomiędzy środowiskiem a organizmem człowieka istnieje dynamiczna równowaga. Każdy organizm musi zaadaptować się do zmieniających się nieustannie warunków środowiska zewnętrznego, jednocześnie utrzymywać stałość swojego środowiska wewnętrznego. Zarówno poszczególne komórki naszego organizmu, jak i całe układy oraz narządy uczestniczą w utrzymywaniu homeostazy. Homeostaza jest niezbędnym warunkiem zdrowia (prawidłowego funkcjonowania) organizmu, a co za tym idzie, choroby u swego podłoża mają zaburzenia mechanizmów utrzymywania homeostazy. W wiekach XX i XXI naukowcy, aby poszukiwać coraz to lepszych odpowiedzi na nurtujące pytania związane z zaburzeniami i chorobami, zaczęli opracowywać strategie i układać coś, co możemy nazwać dziś piramidą (kaskadą życia). W świecie naukowym używany jest nowy termin technologie „omics” (1). Nowe technologie i bioinformatyczne narzędzia oferują ogromne możliwości badań między innymi nad zależnością pomiędzy odżywianiem i metabolizmem (ryc. 1).

Genomica zajmuje się badaniem genomów, czyli kompletnej informacji genetycznej danego organizmu. Można śmiało powiedzieć, że jest kontynuacją genetyki molekularnej. Ważnym krokiem w badaniach nad chorobami i zaburzeniami był projekt *Human Genom Project* rozpoczęty w 1990 roku przez Departament Energii USA i Narodowy Instytut Zdrowia. W kwietniu 2003 roku opublikowano dokument stwierdzający zakończenie sekwencjonowania 99% genomu z trafnością 99,9%. Dało to początek badaniom, których istotą rzeczy jest

Genomica zajmuje się badaniem genomów, czyli kompletnej informacji genetycznej danego organizmu. Można śmiało powiedzieć, że jest kontynuacją genetyki molekularnej. Ważnym krokiem w badaniach nad chorobami i zaburzeniami był projekt *Human Genom Project* rozpoczęty w 1990 roku przez Departament Energii USA i Narodowy Instytut Zdrowia. W kwietniu 2003 roku opublikowano dokument stwierdzający zakończenie sekwencjonowania 99% genomu z trafnością 99,9%. Dało to początek badaniom, których istotą rzeczy jest

\*\*Grant „Badania chromatograficzne we wczesnej diagnozie zaburzeń rozwojowych u dzieci” Nr NN 204 31 62 34 MNiSW.  
Kierownik grantu: dr Joanna Kałużna-Czaplińska.



Ryc. 1. „Kaskada życia”.

poznanie białek, które są kodowane przez geny. To białka są podstawą funkcjonowania naszego organizmu, bez nich nie mogą zachodzić procesy fizjologiczne. Nic zatem dziwnego, że w 2000 roku rozpoczęto kolejny Projekt Poznania Ludzkiego Proteomu. Zaczęła również rozwijać się nowa gałąź biologii molekularnej, proteomika – nauka zajmująca się badaniem organizacji, składu oraz budowy ogółu białek organizmu (tzw. proteomu). Proteomika szczególnie przydatna jest w wykrywaniu i leczeniu nowotworów. Jeszcze głębsze i bardziej szczegółowe poznanie organizmów (przede wszystkim człowieka) daje metabolomika.

Metabolomika, a więc opisanie ludzkiego metabolomu (zestaw wszystkich metabolitów) będzie jeszcze trudniejszym wyzwaniem niż opisanie genomu i proteomu, ponieważ jest to zestaw milionów związków z różnych klas, m.in.: peptydów, lipidów, aminokwasów. Ale dzięki badaniom metabolomicznym i innym z kaskady „omics” możliwe jest określenie fenotypu (1, 2). Badania metaboliczne wskazują, że ciągle zmiany są regulowane nie tylko przez ekspresję genu, ale także mogą być wynikiem narażenia środowiskowego (stresu środowiskowego) i dlatego badania metabolitów mają poważne znaczenie w przypadku wielu zaburzeń, a ponadto w porównaniu do proteomiki eksperymenty są zdecydowanie tańsze.

W płynach ustrojowych, np. moczu mogą pojawić się określone związki chemiczne lub ich metabolity określane jako biomarkery. Biomarkery są wskaźnikami zmian, jakie mogą zachodzić w układach biologicznych w wyniku oddziaływania różnych czynników szkodliwych o bardzo zróżnicowanej budowie i pochodzeniu. Najlepsze zdefiniowanie pojęcia „biomarker” podaje światowa organizacja zdrowia (*World Health Organization* – WHO). Według tej definicji biomarkerem jest każdy pomiar interakcji zachodzącej w systemach biologicznych z potencjalnymi zagrożeniami, mogącymi mieć charakter chemiczny, fizyczny lub biologiczny (3). Biomarkery stanowią konkretne ogniwa tzw. sekwencji wydarzeń zapoczątkowanej np. ekspozycją na czynniki szkodliwe, a zakończonej skutkiem zdrowotnym, czyli konkretną

chorobą. Istnieje przekonanie, że każda choroba ma biochemiczne uzasadnienie, biochemiczny wskaźnik.

Badania biomonitoringowe przeprowadzone przez WHO w roku 2003 (4) wykazały, że niezależnie od tego, gdzie żyjemy, jesteśmy narażeni na kontakt z różnymi zanieczyszczeniami. Niektóre z nich mogą mieć negatywny wpływ na mózg i cały układ nerwowy, zwłaszcza małych dzieci. Kontakt z neurotoksynami rozpowszechnionymi w środowisku jest najbardziej prawdopodobną przyczyną licznych i różnorodnych przypadków zaburzeń i upośledzeń umysłowych, które obecnie klasyfikowane są jako powstające „z przyczyn nieznanych”. Badania wskazują, że neurotoksyny mogą być podstawową przyczyną coraz częstszych wśród dzieci problemów z nauką, z zachowaniem oraz problemów behawioralnych. W 2004 roku Komisja Europejska wyraziła zaniepokojenie i ostrzegła, że występowanie nieprawidłowości rozwojowych, takich jak trudności z nauką, opóźnienie intelektualne i zespół nadpobudliwości psychoruchowej z zaburzeniami uwagi, czy autyzm są na tyle powszechne, by stanowić już znaczny problem w dziedzinie zdrowia publicznego (5).

Autyzm jest szerzącym się zaburzeniem rozwojowym. Staje się on poważnym problemem społecznym. W ciągu ostatnich 20 lat liczba zachorowań wzrosła prawie dziesięciokrotnie. Autyzm jest schorzeniem, które w ostatnich latach pojawia się u dzieci coraz częściej i istnieją obawy, że może być częściowo powiązany także z ekspozycją na związki chemiczne (6, 7). Osoby autystyczne nie są zdolne do formowania relacji międzyludzkich i normalnego zachowania w życiu codziennym. „Autyzm” jest terminem często używanym dla przypadków poważniejszych, podczas gdy spektrum zaburzeń autystycznych (*autism spectrum disorders* – ASD) obejmuje również „łagodniejsze” formy autyzmu, takie jak np. zespół Aspergera. Nie istnieją klasyczne testy medyczne, które pozwalałyby zdiagnozować autyzm. Diagnozy najczęściej opierają się na obserwacji zachowań u dzieci i wywiadu z rodzicami. Jednak najnowsze badania wskazują, że istnieje sposób na medyczną interwencję w autyzm i szansa na podjęcie się zadania „wyprowadzanie dzieci z tej choroby”, choć wielu lekarzy neurologów i psychiatrów patrzy na to bardzo sceptycznie. Badania nad identycznymi bliźniętami potwierdzają istnienie komponentu genetycznego i z całą pewnością w niektórych rodzinach występują predyspozycje do autyzmu (8). Niedawne odkrycia wskazują jednak, że spektrum tych zaburzeń może być powodowane przez interakcje pomiędzy genami a środowiskiem. Jest zatem możliwe, że do pojawienia się autyzmu konieczne jest zarówno posiadanie podatnych genów, jak i wystąpienie „jakiegoś” środowiskowego bodźca działającego na te geny. Wzrost częstości występowania tego schorzenia z pewnością potwierdza sugestię o istnieniu składnika środowiskowego.

Liczne badania sugerują, że z upływem lat częstotliwość przypadków autyzmu wzrasta, choć niektórzy analitycy zastrzegają, że za część owego wzrostu odpowiadać może zwiększona rozpoznawalność tego zaburzenia połączona z innymi czynnikami (np. rodzaj

kryterium diagnostycznego). Niemniej jednak rzeczywistość wydaje się, że spektrum zaburzeń autystycznych pojawia się częściej, niż niegdyś sądzono i może występować u około 9 dzieci na 1000, czyli w przybliżeniu 1 przypadek na 110 urodzeń (9). Częstość występowania samego autyzmu w Polsce jest niższa i ocenia się ją na 16,8 na 10 000 lub 1 na 600 dzieci (10).

Dzieci z autyzmem najczęściej trafiają pod opiekę kliniczną pomiędzy drugim a trzecim rokiem życia i do tego momentu jest słabo poznany ich rozwój neurologiczny. Najczęstsze objawy autyzmu to: nadpobudliwość, agresja i autoagresja, izolacja społeczna, zaburzenia mowy, wykonywanie powtarzających się czynności (11, 12).

O przyczynach powstawania autyzmu wiemy ciągle bardzo niewiele, najprawdopodobniej jest ich kilka: genetyczne, metaboliczne, środowiskowe – ekspozycja na substancje toksyczne (13).

#### BADANIE METABOLITÓW MOCZU OCENIA CZTERY KRYTYCZNE OBSZARY METABOLIZMU

Ostatnie dane wskazują, że autyzm jest zaburzeniem systemu nerwowego i systemu immunologicznego wpływającym na wiele szlaków metabolicznych. Miernikiem umożliwiającym ocenę zagrożenia człowieka związaną z obecnością czynników szkodliwych w środowisku jest analiza jego tkanek, płynów ustrojowych. Produkty przemiany materii, substancje organiczne, płyny i substancje toksyczne usuwane są przez nerki wraz z moczem. Dlatego mocz może zawierać setki różnych istotnych substancji. Na skład moczu wpływ ma wiele czynników takich jak dieta, przyjmowanie płynów, wysiłek fizyczny oraz czynność nerek.

Ze względu na to, że analiza próbek płynów ustrojowych nie jest łatwym zadaniem (najczęściej wykonuje się badania: krwi i moczu), wymaga odpowiedniej merytorycznej wiedzy z zakresu przygotowania próbek biologicznych do badań oraz czułej, specjalistycznej aparatury, często z wykorzystaniem technik chromatograficznych (14, 15).

#### PROFILE KWASÓW ORGANICZNYCH W MOCZU – WSTĘP DO BADAŃ NAD ZABURZENIAMI NEUROLOGICZNYMI

Analiza metabolitów w próbkach charakteryzujących się złożonym składem matrycy wymaga zastosowania aparatury przystosowanej do rozdzielenia mieszanin substancji (chromatografy, aparaty do elektroforezy) z detektorami umożliwiającymi identyfikację związków. Optymalna metoda analizy substancji w badanej mieszaninie powinna charakteryzować się selektywnością, specyficznością, odpowiednim zakresem dynamicznym detektora (ocena ilościowa w dużym zakresie różnicowania stężeń), wysoką wydajnością, możliwie niskim kosztem przygotowania próbki i wykonania analizy (16). W badaniach metabolicznych szeroko wykorzystywane są techniki łączone, w tym chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS), chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS), a także elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas (CE-MS) (17, 18).

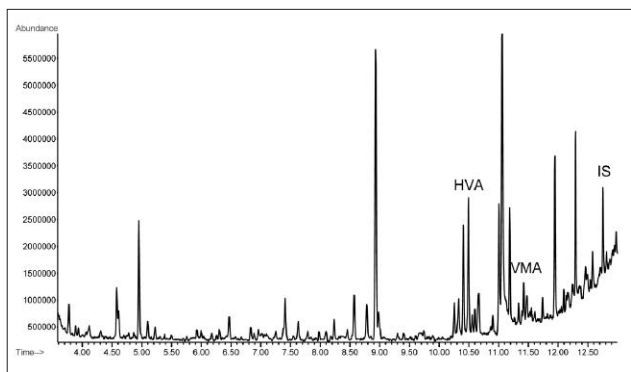
Analiza kwasów organicznych zawartych w płynach ustrojowych z zastosowaniem technik chromatograficznych dostarcza wielu informacji na temat procesów metabolicznych organizmu oraz sprawności tych procesów (19). Nieprawidłowe poziomy kwasów organicznych w moczu mogą wskazywać zaburzenia metabolizmu (np. zaburzenia metabolizmu tłuszczów, zaburzenia metabolizmu węglowodanów, zaburzenia produkcji energii, stan detoksykacji, zaburzenia biocenozy jelitowej) (20, 21) lub zaburzenia pracy neuroprzebieżników (22).

Jednymi z kluczowych neuroprzebieżników w organizmie człowieka są dopamina, adrenalina i noradrenalina. Dopamina pobudza zakończenia nerwów i odgrywa ważną rolę w procesach związanych z motywacją, koncentracją uwagi i psychomotoryką (23). Noradrenalina i adrenalina wydzielane są w sytuacjach stresowych, wprowadzają organizm w stan podwyższonej gotowości i działają przeciwbólowo, ich niedobór może powodować niedocenianie zagrożenia, nadmiar zaś powoduje ciągłe pobudzenie organizmu (24, 25). Pochodną dopaminy jest kwas homowanilinowy (HVA), pochodnymi noradrenaliny – normetanefryna i kwas wanilinomigdałowy (VMA), a pochodną adrenaliny – metanefryna i kwas wanilino-migdałowy (VMA). Nieprawidłowe poziomy zarówno katecholamin, jak i ich metabolitów w moczu obserwuje się między innymi w przypadku choroby Parkinsona, schizofrenii, depresji, zaburzeniach snu, nadpobudliwości psychoruchowej u dzieci. Kwas homowanilinowy i kwas wanilinomigdałowy może więc odegrać kluczową rolę w badaniach zaburzeń katecholamin u autystyków.

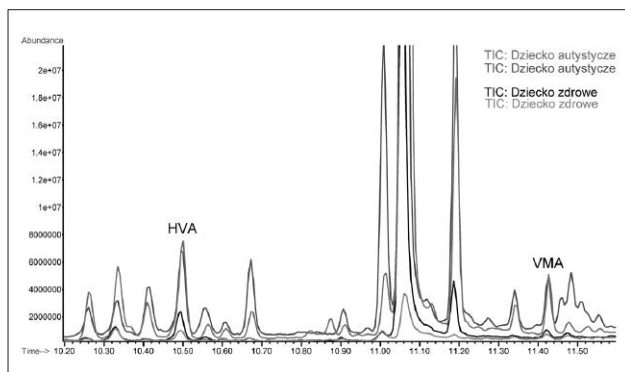
Monitoring kwasów organicznych w moczu autystyków jest prowadzony na Politechnice Łódzkiej od ponad dwóch lat. Materiałem badawczym jest mocz dzieci autystycznych w przedziale wiekowym 5-8 lat. próbki moczu pozyskiwane są dzięki współpracy Politechniki Łódzkiej z placówką terapeutyczną Navicula-Centrum, mieszczącą się w Łodzi. Wszystkie autystyczne dzieci zdiagnozowane zostały zgodnie z kryteriami Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*).

Chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas jest obok chromatografii cieczowej połączoną ze spektrometrią mas najczęściej stosowaną techniką w badaniach profili metabolicznych w płynach ustrojowych. Analiza profili kwasów organicznych w moczu z zastosowaniem GC-MS jest szybka, trwa 13 min (ryc. 2), wymaga jednak żmudnego i wieloetapowego przygotowania próbki (zmiana pH, wysalanie, ekstrakcja, derywatywacja).

Rycina 3 dla czytelności obrazu przedstawia jedynie cztery nałożone na siebie chromatogramy, ale nałożenie dwudziestu chromatogramów daje możliwość wstępnego oszacowania różnic w profilach metabolicznych u dzieci autystycznych i zdrowych. Dzięki wykonaniu profili, możliwe było przejście do kolejnego etapu pracy – opracowania ilościowej analizy poziomów kwasów organicznych, które zostały wybrane jako występujące w moczu autystyków w nieprawidłowych poziomach. Analiza wy-



Ryc. 2. Przykładowy chromatogram *Total Ion Chromatogram* (TIC) rozdziału analitów w próbce moczu autystyka wykonany z zastosowaniem techniki GC-MS (HVA – kwas homowanilinowy, VMA – kwas wanilinomigdałowy, IS – kwas heptadekanowy). Badania prowadzone w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Politechnice Łódzkiej.



Ryc. 3. Powiększenie fragmentu nałożonych na siebie chromatogramów *Total Ion Chromatogram* (TIC) rozdziału analitów w próbkach moczu. Badania prowadzone w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Politechnice Łódzkiej.

ników wykazała statystycznie istotne różnice w stężeniach kwasów HVA i VMA w moczu dzieci autystycznych i zdrowych ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U test). Poziomy kwasów HVA i VMA były wyższe w moczu dzieci autystycznych (odpowiednio  $28,8 \pm 15,5 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  kreatyniny i  $22,2 \pm 13,0 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  kreatyniny) w porównaniu do dzieci zdrowych ( $4,6 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  kreatyniny dla HVA i  $3,8 \pm 0,6 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  kreatyniny dla VMA) (26).

Wykonanie profili kwasowych w moczu autystyków pozwoliło zidentyfikować możliwe przyczyny obserwowanych u autystyków deficytów i opóźnień komunikacyjnych, problemów z koncentracją, stereotypowych i powtarzających się zachowań, które wiązane są z zaburzeniami w funkcjonowaniu dopaminy (27).

Istnieją dowody na to, że funkcjonowanie centralnego układu dopaminergicznego może być zakłócone przez rtęć (Hg). Dzieci, które były zatrute rtęcią pochodzącą ze świetlówek miały wysokie stężenie kwasu homowanilinowego w moczu (28). Wynikiem prenatalnych badań narażenia na rtęć (testy na zwierzętach) były zaburzenia centralnego układu dopaminergicznego, objawiające się zmianami w aktywności motorycznej u osobników płci męskiej, ale nie u osobników płci żeńskiej (29). Objawami zatrucia rtęcią są między innymi: zmiany nastroju, pobudzenie, drażliwość, napady agresji, zachowania obsesyjno-kompulsywne, zaburzenia w prawidłowej pracy układu pokarmowego, zwiększenie podatności na wirusy. Te same objawy są powszechnie znane jako dolegliwości występujące u dzieci autystycznych (30, 31, 32).

Ilościowa analiza HVA w moczu dzieci autystycznych z wykorzystaniem techniki GC-MS pozwoliła na dokonanie korelacji pomiędzy poziomem tego kwasu a poziomem rtęci. Badania przedstawiają jednak brak zależności między poziomami kwasu homowanilinowego i rtęci w moczu badanych dzieci autystycznych,  $r = 0,0316$  (33).

Badania nad markerami zaburzeń neurologicznych, możliwość indywidualnego wywiadu z rodzicami i terapeutami placówki Navicula-Centrum, a także współpraca ze specjalistami z zakresu neurologii współpracującymi z placówką Navicula-Centrum pozwalają spojrzeć na autyzm jako zaburzenie wieloczynnikowe. W grupie objętej badaniami są zarówno przypadki głębokiego autyzmu, jak i lżejsze przypadki. Pozwala to znaleźć zależności między wynikami badań a zachowaniem konkretnego dziecka. Na podstawie uzyskanych wyników próbujemy wskazać zależność między nieprawidłowymi wartościami metabolitów obecnych w moczu autystyków (np. HVA i VMA) a zachowaniem dziecka. Ze względu na obserwowany pozytywny wpływ suplementacji magnezem i witaminą B6 w leczeniu zaburzeń neurologicznych, dalszy etap poznania roli katecholamin w patogenezie autyzmu będzie obejmował monitoring poziomów HVA i VMA w moczu dzieci autystycznych po suplementacji magnezem oraz witaminami C i B6.

#### WARTOŚCIOWE PROGNOZY NA PRZYSZŁOŚĆ DZIĘKI WYNIKOM BADAŃ UZYSKANYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

Techniki chromatograficzne, szczególnie techniki łączone ze spektrometrią mas (GC-MS, LC-MS) znajdują szerokie zastosowanie w analizie klinicznej. Ich dalszy rozwój niesie nadzieję na jeszcze lepsze możliwości ich wykorzystania w poszukiwaniu nowych markerów zaburzeń metabolicznych i neurologicznych.

Priorytetem w badaniach autyzmu powinno stać się poszukiwanie „wczesnych” biomarkerów autyzmu i tu kluczową rolę mogą odegrać właśnie techniki chromatograficzne. Szybka identyfikacja dzieci wysokiego ryzyka dałaby możliwość monitorowania neurologicznych zmian zapowiadających początek behawioralnych symptomów autyzmu, ale też umożliwiłaby wczesne podjęcie prób przeciwdziałania tym objawom.

## Piśmiennictwo

1. Bilello JA: The agony and ecstasy of "OMIC" technologies in drug development. *Curr Mol Med* 2005; 5 (1): 39-52. 2. Griffin JL: Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359 (1446): 857-871. 3. Trull AK, Demers LM, Holt DW et al.: Biomarkers of disease. Cambridge University, United Kingdom 2002. 4. WHO (Europe) (Ed.), 2005. Children's health and environment. Developing action plans. <http://www.euro.who.int/document/E86888.pdf>. 5. O'Reilly SB: Continuous medical education (CME): Do we need CME for paediatric environmental medicine in Europe? *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 531-534. 6. Lidsky TI, Schneider JS: Autism and Autistic Symptoms Associated with Childhood Lead Poisoning. *The Journal of Applied Research* 2005; 5 (1): 80-87. 7. Lathe R: Environmental Factors and Limbic Vulnerability in Childhood Autism. *Am J Biochem Biotechnol* 2008; 4 (2): 183-197. 8. Bölte S, Poustka F: Genetic, Environmental and Immunologic Factors in the Etiology of Autism Spectrum Disorders. *Neuroembryology* 2003; 2: 175-179. 9. Centers for Disease Control and Prevention: Prevalence of Autism Spectrum Disorders – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2009; 58 (SS10): 1-20. 10. Pietras T, Witusik A, Galecki P: Autyzm – epidemiologia, diagnoza i terapia. CONTINUO, Wrocław 2010. 11. Yatesa K, Couteura AL: Diagnosing autism. *Paediatrics and Child Health* 2009; 19 (2): 55-59. 12. Juneja M, Mukherjee SB, Sharma S: A descriptive hospital based study of children with autism. *Indian Pediatr* 2005; 42 (5): 453-458. 13. Hughes JR: Update on autism: a review of 1300 reports published in 2008. *Epilepsy Behav* 2009; (4): 569-589. 14. Polkowska Ż, Kozłowska K, Namieśnik J: Płyiny biologiczne jako źródło informacji o narażeniu człowieka na środowiskowe czynniki chemiczne. Namieśnik J, Chrzanowski W, Szpinek P: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. CCEAM, Gdańsk 2003, 578-598. 15. Koek MM, Bakels F, Engel W et al.: Metabolic profiling of ultrasmall sample volumes with GC/MS: from microliter to nanoliter samples. *Anal Chem* 2010; 82 (1): 156-162. 16. Muth D, Kachlicki P, Stobiecki M: Spektrometria mas – możliwości wykorzystania w badaniach metabolomu roślinnego. *Biotechnologia* 2007; 1 (76): 156-175. 17. Kałużna-Czaplińska J, Grys W, Rynkowski J: Techniki łączone oparte na spektrometrii mas we współczesnych badaniach klinicznych. *Medycyna Rodzinna* 2009; 1: 15-21. 18. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD: Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26 (1): 51-78. 19. Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S: Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. *Tohoku J Exp Med* 1999; 188 (4): 317-334. 20. Suh JW, Lee SH, Chung BC: GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography. *Clin Chem* 1997; 43 (12): 2256-2261. 21. Kumps A, Duez P, Mardens Y: Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin Chem* 2002; 48 (5): 708-717. 22. Hyland K: Disorders of Neurotransmitter Metabolism. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM: *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Chapman and Hall, Germany 1996, 107-122. 23. Previc FH: Prenatal influences on brain dopamine and their relevance to the rising incidence of autism. *Med Hypotheses* 2007; 68: 46-60. 24. Newport DJ, Nemeroff ChB: Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *Current Opinion in Neurobiology* 2000; 10: 211-218. 25. Fukuda M, Hata A, Niwa SI et al.: Plasma vanillylmandelic acid level as an index of psychological stress response in normal subjects. *Psychiatry Res* 1996; 63: 7-16. 26. Kałużna-Czaplińska J, Socha E, Rynkowski J: Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in urine of autistic children by gas chromatography/mass spectrometry. *Med Sci Monit* 2010; 16 (9): 445-450. 27. Hughes DM, Cunningham MM, Libretto SE: Risperidone in children and adolescents with autistic disorder and aggressive behavior. *The British Journal of Developmental Disabilities* 2002; 48 (2): 113-122. 28. Stier PA, Gordon RA: Psychiatric aspects of mercury poisoning. *Medical Update for Psychiatrists* 1998; 3: 144-147. 29. Durczok A, Szkilnik R, Brus R et al.: Effect of organic mercury exposure during early stage of ontogenic development on the central dopaminergic system in adult rats. *Pol J Environ Stud* 2002; 11: 307-314. 30. Bernard S, Enayati A, Redwood L: Autism: a novel form of Mercury poisoning. *Med Hypotheses* 2001; 56: 462-471. 31. Kałużna-Czaplińska J, Grys W, Rynkowski J: Neurotoxic factors in the child's environment as a reason for developmental disorders in autism. *Nowa Pediatria* 2008; 3: 50-57. 32. Collins RA: Biomedical intervention and prospects for recovery from autism. *Biomedical Scientist* 2006; 50 (11): 954-979. 33. Kałużna-Czaplińska J, Socha E, Michalska M et al.: Urinary level of homovanillic acid and mercury in autistic children. *Toxicol Environ Chem* 2010; 1: 1-8.

nadesłano: 17.03.2011

zaakceptowano do druku: 30.05.2011

Adres do korespondencji:

\*Joanna Kałużna-Czaplińska

Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej

Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

tel.: 503 973 571, (42) 631 31 10

e-mail: jkaluzna@p.lodz.pl