

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Vanja Mandić Maravić

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA
GLUTATION S-TRANSFERAZE I IZLOŽENOSTI
PRENATALNIM FAKTORIMA OKOLINE KOD
OSOBA SA POREMEĆAJIMA AUTISTIČNOG
SPEKTRA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Vanja Mandić Maravić

**CORRELATION OF GLUTATHIONE S-
TRANSFERASE GENE POLYMORPHISMS AND
EXPOSURE TO PRENATAL ENVIRONMENTAL
FACTORS IN PERSONS WITH AUTISM
SPECTRUM DISORDERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI

Doc. dr Milica Pejović-Milovačević

Katedra za psihijatriju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prod. dr Tatjana Pekmezović

Katedra za epidemiologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marija Plješa-Ercegovac

Katedra za medicinsku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Akademik Dušica Lečić-Toševski, profesor u penziji, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. Dr Darija Kisić Tepavčević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. Dr Karmen Stankov, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Zahvaljujem se svom Mentoru, Doc. dr Milici Pejović Milovančević, koja me je svojim velikim znanjem i energijom privukla detinjstvu u psihijatriji, upoznala sa temom poremećaja autističnog spektra i omogućila da kao psihijatar za odrasle dobijem čast da se pridružim i svetu dečije psihijatrije. Takođe, hvala na velikoj podršci, u profesionalnom i životnom smislu, na mogućnosti da sve prepreke prevaziđemo smehom, i najpre, hvala na prijateljstvu sa kvalitetom sestrinstva.

Mentoru prof. dr Tatjani Pekmezović se posebno zahvaljujem, jer mi je kao veliki učitelj omogućila da savladam zagonetke metodologije još tokom doktorskih studija, a tokom izrade disertacije bila uvek dostupna, i pružila mi neizmernu pomoć tokom obrade i interpretacije podataka.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa Instituta za medicinsku biohemiju, pre svega mentoru prof. dr Mariji Plješi-Ercegovac, na velikoj pomoći, na strpljenju i vremenu koje je posvetila ovoj doktorskoj tezi. Pored profesionalne pomoći, bila je uvek tu i kao čovek, i trudila se da me umiri u situacijama u kojima su stvari delovale nerešivo.

Zahvaljujem se Akademiku prof. dr Dušici Lečić-Toševski, na tome što me je primila u porodicu Instituta za mentalno zdravlje, gde sam mogla da rastem i razvijam se uz njenu podršku.

Veliko hvala mojim „psihozama” koje su me pratile i podržavale od prvih koraka u psihijatriji.

Hvala mojim roditeljima od kojih sam od malena naučila kako se lekarski posao obavlja časno.

Hvala mojoj sestri Gorani, od koje stalno učim i koju se trudim da pratim.

Hvala mojoj porodici, na podršci i ljubavi, kao i vremenu utkanom u ovu disertaciju, uzetom od njih. Hvala mom Danilu i Draganu.

SAŽETAK

Uvod: poremećaji spektra autizma (PSA) su grupa kompleksnih psihijatrijskih poremećaja, za koje je pretpostavljeno da nastaju kao posledica interakcije gena i okoline. Jedan od mehanizama koji bi mogao da objasni i genetsku i komponentu okoline u okviru ove grupe poremećaja je oksidativni stres. Cilj ovog istraživanja je da se ispita potencijalna uloga čestih polimorfizama gena za glutation transferaze A1, M1, T1 i P1 u razvoju poremećaja spektra autizma. Pored toga, ispitivana je interakcija gena i okoline specifična za oksidativni stres u povećanju rizika za razvoj PSA, i to u odnosu na česte pre- i perinatalne faktore rizika i GST polimorfizme.

Metodologija: ova studija slučajeva i kontrola uključivala je 113 pacijenata sa poremećajem spektra autizma koji su lečeni hospitalno ili ambulantno u okviru Klinike za decu i omladinu Instituta za mentalno zdravlje, u periodu od oktobra 2009. do decembra 2011., i 114 kontrola koje su uparene po polu i uzrastu. Kontrolnu grupu činili su deca, adolescenti i mlađi odrasli koji se leče na Odeljenju za urologiju, kao i Odeljenju za ortopediju Univerzitetske dečije klinike u Beogradu, u periodu od oktobra 2011. do juna 2012. godine. Dijagnoza PSA je postavljena na osnovu ICD-10 kriterijuma, i potvrđena na osnovu Revidiranog dijagnostičkog intervjua za autizam (Autism Diagnostic Interview – Revised (ADI-R)). Vekslerova skraćena skala inteligencije (*Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence - WASI*) korišćena je za određivanje intelektualnog funkcionisanja kod verbalnih pacijenata, dok je Vineland skala adaptivnog ponašanja (*Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition - Vineland-II*) korišćena kod neverbalnih pacijenata. U grupi pacijenata i kontrola primenjen je upitnik izloženosti faktorima rizika tokom trudnoće. Takođe, u obe grupe utvrđeni su genotipovi *GSTAI*, *GSTMI*, *GSTPI* i *GSTTI*, i ispitan je njihov individualni i zajednički efekat.

Rezultati: Prilikom ispitivanja polno-specifičnih karakteristika dela uzorka studijske grupe (onaj deo uzorka kojem je mereno adaptivno funkcinisanje – Vineland II), utvrđeno je da se kod dečaka značajno češće postavlja dijagnoza tipičnog autizma (F84.0). Nisu pronađene razlike između dečaka i devojčica sa PSA u težini kliničke slike (ADI-R), kao ni u merama adaptivnog funkcionisanja (Vineland II). Pokazana je polno specifična promena simptoma sa uzrastom. Polno-specifična linearna regresija pokazala je da simptomi imaju drugačiji profil predikcije adaptivnog ponašanja. Individualni efekat GST genotipova pokazan je za *GSTMI* aktivni genotip, koji smanjuje rizik za autizam (OR=0.554, 95%CI: 0.313–0.983, p=0.044), kao i za *GSTAI* CC genotip koji povećava rizik za PSA (OR=4.132, 95%CI: 1.219–14.012, p=0.023); ova značajnost gubila se kada su genotip-genotip interakcije dodate u model logističke regresije. Kombinacija *GSTMI* aktivnog i *GSTTI* aktivnog genotipa smanjuje rizik za PSA (OR=0.126, 95%CI: 0.029–0.547, p=0.006), kao i kombinacija *GSTTI* aktivnog i *GSTPI* llelle (OR=0.170, 95%CI: 0.029–0.992, p=0.049). Povećan rizik za PSA opserviran je za kombinaciju *GSTMI* aktivnog i *GSTPI* llelle (OR=11.088, 95%CI: 1.745–70.456, p=0.011). Utvrđeno je da je prisustvo perinatalnih komplikacija uopšte, nedonesenosti, neonatalne žutice, kao i respiratornog distres sindroma bilo značajno češće u studijskoj nego u kontrolnoj grupi. Među faktorima rizika koji su delovali tokom trudnoće značajnost za razvoj PSA pokazana je za uzimanje lekova u trudnoći, uzimanje tokolitika tokom trudnoće, infekciju majke tokom trudnoće, kao i preeklampsiju. Utvrđeno je da kombinovani efekat genotipova *GSTMI*, *GSTAI* i *GSTPI* sa izloženošću tokoliticima u trudnoći značajno povećava rizik za PSA, što je potvrđeno i za udruženi efekat sva četiri varijantna ispitivana genotipa i postojanje neonatalne žutice. Efekat pušenja majke tokom trudnoće nije pokazan kao značajan, individualno, niti u interakciji sa specifičnim GST genotipovima. Prilikom ispitivanja povezanosti genotipova i karakteristika kliničke slike u okviru studijske grupe, značajni

nalazi dobijeni su za *GSTP1* genotip - nosioci *GSTP1 IleIle* genotipa imali su značajno viši ukupni IQ skor u odnosu na nosioce *ValVal* genotipa, dok su nosioci makar jednog *Val* alela imali su značajno veći rizik za zakasneli razvoj govora u odnosu na nosioce *IleIle* genotipa.

Zaključak: Rezultati ove studije pokazali su razliku u obrascu translacije kliničkih simptoma u adaptivno funkcionisanje između dečaka i devojčica sa PSA. Takođe, na osnovu prezentovanih rezultata moguće je pretpostaviti da jedan deo etiologije složenog psihijatrijskog poremećaja kakav je autizam čini interakcija gena i okoline u čijoj se osnovi, u oba smera nalazi oksidativni stres. Ukoliko se ovi nalazi potvrde na većim uzorcima, definisanje lične vulnerabilnosti u okviru puta oksidativnog stresa moglo bi imati veliki značaj u ranom otkrivanju, pa i prevenciji razvoja poremećaja autističnog spektra.

KLJUČNE REČI: glutation S-transferaze, poremećaji spektra autizma, perinatalne komplikacije, polimorfizmi, rizik.

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: epidemiologija, psihijatrija

ABSTRACT

Background: autism spectrum disorders (ASD) are a group of complex psychiatric disorders, with supposed gene environment interaction in their etiology. One of the mechanisms that could explain both the genetic and environmental component is oxidative stress. The aim of this research was to explore the potential role of common GSTA1, M1, T1 and P1 gene polymorphisms in ASD. In addition to that, we have explored the oxidative stress specific gene environment interaction, regarding common pre- and perinatal risk factors and GST polymorphisms.

Methods: this case control study included 113 cases diagnosed with ASD, treated at the Clinic for children and adolescents at the Institute of Mental health, during the period from October 2009 to December 2011, and 114 age and sex matched controls. The control group consisted of children, adolescents and young adults treated at the Department of urology and Orthopedics at the University Childrens Clinic in Belgrade, during the period from October 2011 to June 2012. The diagnosis of ASD was made based on ICD-10 Criteria, and confirmed based on Autism Diagnostic Interview – Revised (ADI-R). The Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence - (WASI) was used to assess the intellectual functioning in verbal cases, while the Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition (Vineland-II) was used in nonverbal cases. The questionnaire regarding exposure to risk factors during pregnancy was administered in both groups. Also, we explored the *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1* genotypes, as well as their individual and combined effect.

Results: exploring the sex-specific characteristics of the case group showed that boys were significantly more often diagnosed with typical autism (F84.0). There were no sex differences in the severity of symptoms (ADI-R), neither in adaptive functioning (Vineland II). A sex-specific development of symptoms with age was confirmed. Also, the results showed that there are sex-specific profiles of prediction of adaptive functioning by clinical symptoms. Individual effect of

GST genotypes was shown for *GSTM1 active* genotype decreasing the risk of ASD (OR=0.554, 95%CI: 0.313–0.983, p=0.044), and for *GSTAI CC* genotype, increasing susceptibility to ASD (OR=4.132, 95%CI: 1.219–14.012, p=0.023); the significance was lost when genotype-genotype interactions were added into the logistic regression model. The combination of *GSTM1 active* and *GSTT1 active* genotype decreased the risk of ASD (OR=0.126, 95%CI: 0.029–0.547, p=0.006), as well as combination of *GSTT1 active* and *GSTP1 IleIle* (OR=0.170, 95%CI: 0.029–0.992, p=0.049). Increased risk of ASD was observed if combination of *GSTM1 active* and *GSTP1 IleIle* was present (OR=11.088, 95%CI: 1.745–70.456, p=0.011). The results of this study showed that any perinatal complication, prematurity, neonatal jaundice and respiratory distress syndrome were found significantly more in cases than in controls. The risk factors during pregnancy related to the higher risk for ASD were also taking any medication during pregnancy, taking tocolitics during pregnancy, infection during pregnancy, as well as preeclampsia. It was determined that the combined effect of *GSTM1*, *GSTAI* and *GSTP1* genotypes and the exposure to tocolitics during pregnancy increases the risk for ASD significantly, which was confirmed for the combined effect of all the four genotypes and neonatal jaundice, as well. The effect of tobacco smoking during pregnancy was not significant for the risk of ASD, neither individually, nor in interaction with specific GST genotypes. When we explored the correlation of genotypes and clinical characteristics in the case group, the significant findings were found regarding *GSTP1* genotype - *GSTP1 IleIle* carriers had significantly higher IQ scores in comparison to *ValVal* genotype carriers, while the carriers of at least one *Val* allele had a significantly higher risk for language development delay in comparison to the carriers of *IleIle* genotype.

Conclusions: The results of this study showed a sex-specific pattern of translation of the clinical symptoms into adaptive functioning. Also, based on the presented results, it is possible to assume

that one part of the ASD etiology, as a complex disorder, might in fact be an oxidative stress-specific gene environment interaction. If these results are confirmed on larger samples, it might be possible to define individual vulnerability to oxidative stress, which might be of great importance in early detection and prevention of ASD development.

KEY WORDS: glutathion S-transferase, autism spectrum disorders, perinatal complications, polymorphisms, risk.

Scientific area: medicine

Area o expertise: epidemiology, psychiatry

SADRŽAJ:

1.UVOD.....	1
1.1. POREMEĆAJI IZ SPEKTRA AUTIZMA.....	1
1.1.1. Istorijat.....	1
1.1.2. Klasifikacija.....	4
1.1.3.Epidemiologija.....	7
1.2. POREMEĆAJI IZ SPEKTRA AUTIZMA KAO KOMPLEKSNI GENETSKI POREMEĆAJI.....	11
1.2.1. Genetska osnova.....	11
1.2.2. Prenatalni, perinatalni i neonatalni faktori sredine i poremećaji autističnog spektra.....	14
1.2.2.1. Izloženost faktorima okoline.....	15
1.2.2.2. Prenatalne i perinatalne komplikacije.....	17
1.2.2.3. Interakcija gen – sredina.....	25
1.2.3. Oksidativni stres i poremećaji autističnog spektra.....	25
1.2.3.1. Glutation S-transferaze.....	27
1.2.3.2. Klasifikacija glutacion S-transferaza.....	28
1.2.3.3. Uloge glutacion S-transferaza.....	28
1.2.4. Polimorfizmi glutacion S-transferaza.....	30
1.3. POLIMORFIZMI GST I POREMEĆAJI IZ SPEKTRA AUTIZMA.....	33
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJAL I METODE.....	37

3.1.	UZORAK.....	37
3.2.	INSTRUMENTI MERENJA.....	38
	3.2.1. Studijska grupa – skale procene psihičkog funkcionisanja.....	38
	3.2.2. Kontrolna grupa.....	42
3.3.	PROCEDURA.....	43
3.4.	UZIMANJE I PRIPREMA UZORAKA.....	44
3.5.	STATISTIČKA ANALIZA.....	45
4.	REZULTATI.....	47
4.1.	SOCIODEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE UZORKA.....	47
4.2.	KLINIČKE KARAKTERISTIČKE STUDIJSKE GRUPE.....	47
4.3.	RAZLIKE U ODNOSU NA POL U STUDIJSKOJ GRUPI – DIJAGNOZA, KLINIČKA SLIKA I ADAPTIVNO FUNKCIONISANJE.....	49
	4.3.1. Polno-specifične karakteristike studijske grupe (godine, dijagnoza, kliničke karakteristike).....	49
	4.3.2. Polno-specifične korelacije: starost, klinička slika i adaptivno funkcionisanje.....	51
	4.3.3. Polno-specifični linearni regresioni model adaptivnog funkcionisanja...52	
4.4.	POVEZANOST GENOTIPOVA <i>GSTM1</i>, <i>GSTAI</i>, <i>GSTT1</i> I <i>GSTP1</i> I RAZVOJA PSA.....	55
	4.4.1. Povezanost pojedinačnih genotipova GST i PSA.....	55
	4.4.2. Povezanost kombinovanih genotipova GST i PSA.....	56

4.5. POVEZANOST PERINATALNIH KOMPLIKACIJA I RAZVOJA POREMEĆAJA AUTISTIČNOG SPEKTRA.....	57
4.6. POVEZANOST IZLOŽENOSTI FAKTORIMA OKOLINE U TRUDNOĆI I RIZIKA ZA RAZVOJ POREMEĆAJA AUTISTIČNOG SPEKTRA.....	59
4.7. POVEZANOST FAMILIJALNIH FAKTORA I RIZIKA ZA RAZVOJ PSA (PARENTALNA STAROST I OBRAZOVANJE, REDOSLED ROĐENJA DETETA, RAZMAK IZMEĐU TRUDNOĆA).....	60
4.8. INTERAKCIJA GENA (POLIMORFIZMI GST) I OKOLINE (PERINATALNI FAKTORI) – MODEL OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU AUTIZMA.....	62
4.9. POVEZANOST GENOTIPOVA GST SA KARAKTERISTIKAMA KLINIČKE SLIKE.....	66
4.9.1. Povezanost genotipova i karakteristika kliničke slike.....	66
4.9.2. Genotipovi i epilepsija u studijskoj grupi.....	79
5. DIKSUSIJA.....	81
6. ZAKLJUČCI.....	110
7. LITERATURA.....	112

1. UVOD

1.1.POREMEĆAJI IZ SPEKTRA AUTIZMA

Poremećaji iz spektra autizma (PSA) predstavljaju grupu poremećaja čije su glavne kliničke karakteristike kvalitativno oštećenje socijalnih interakcija, poremećaj verbalne i neverbalne komunikacije, kao i sužena interesovanja i repetitivne aktivnosti. PSA se takođe karakterišu ranim nastankom, usporenim razvojem ključnih psiholoških funkcija, varijacijom simptoma sa godinama, kao i hroničnim tokom sa različitim nivoom oštećenja funkcionalnosti (Van Engeland i Buitelaar, 2008).

1.1.1. Istorijat

Leo Kaner je 1943. godine prvi opisao sindrom "ranog infantilnog autizma" kod jedanaestoro dece starosti od 2 do 8 godina koja su imala jedinstvene i do tada neopisane obrasce ponašanja - socijalnu suzdržanost, opsesivnost, stereotipiju i eholaliju (Kanner, 1943). Kaner je iskoristio Blojlerov termin "autizam" da bi opisao nedostatak povezanosti sa drugima, što je dosta dugo izazivalo konfuziju, i dovelo do pretpostavke da je autizam oblik shizofrenije (Volkmar i sar., 2012). Nakon njegovog prvobitnog opisa, tokom srednjih decenija dvadesetog veka, pažnja se dugo nije poklanjala autizmu.

U prvom izdanju Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje (*Diagnostic and statistic manual for mental disorders - DSM – I*), autizam je bio klasifikovan kao dečiji tip shizofrenije (tip shizofrenije koji se javlja u detinjstvu). Uprkos tome što je autizam prvobitno viđen kao psihotični poremećaj, nekoliko grupa istraživača je do sedamdesetih godina dvadesetog veka definisalo prvi set dijagnostičkih kriterijuma (Ritvo i Freeman, 1978; Rutter i Hersov, 1977; Van Engeland i Buitelaar, 2008).

U DSM-III (*American Psychiatric Association, 1980*) prvi put je upotrebljen termin Pervazivni razvojni poremećaji (*Pervasive developmental disorders – PDD*). Ovaj termin korišćen je da opiše poremećaje razvoja višestrukih osnovnih psiholoških funkcija kao što su pažnja, percepcija, testiranje realiteta i motorni razvoj. Termin PDD je upotrebljen jer ističe da su u isto vreme obuhvaćena mnoga, osnovna područja psihološkog razvoja. U DSM-III klasifikaciji, pod terminom PDD uključen je, po prvi put, termin "infantilni autizam" – sa početkom pre 30. meseca života, kao i Pervazivni razvojni poremećaj sa početkom u detinjstvu (sa početkom posle 30. meseca života). DSM – III klasifikacija je značajna jer je autizam ovde vrlo jasno diferenciran od shizofrenije u detinjstvu, što je urađeno prvi put u klasifikacionom sistemu. Takođe, upravo je izostanak psihotičnih simptoma kao što su sumanute ideje i halucinacije postao jedan od šest dijagnostičkih kriterijuma (Van Engeland i Buitelaar, 2008). Definicija autizma u DSM-III klasifikaciji bila je previše sužena, što je promenjeno u izdanju DSM-III-R (Wing, 1981). Ipak, nakon proširenja dijagnostičkih kriterijuma, pokazalo se da postoji povećana sklonost ka uključivanju osoba sa intelektualnim deficitom (kod kojih često postoje stereotipna ponašanja) u dijagnostičku kategoriju autizma, dok je mogućnost prepoznavanja osoba koje imaju autizam, a više kognitivne potencijale bila smanjena (Volkmar, 2012).

DSM-IV klasifikacija izdata je 1994. godine (*American Psychiatric Association, 1994*). U dijagnostikovanju PSA, i u DSM-IV i u ICD-10 (WHO, 1992) usvojen je eksplicitni kategorijalni pristup. I pored toga što se sistemi donekle razlikuju, definicije su praktično iste, zasnovane na velikom međunarodnom istraživanju (Volkmar, 1994). Ovo istraživanje obezbedilo je dovoljno podataka za uključivanje nekoliko poremećaja novih za ove dve klasifikacije – Aspergerov sindrom, Retov sindrom, Dezintegrativni poremećaj detinjstva, kao i PDD – nespecificovan (Volkmar, 2012).

Asperger je 1944. godine napisao prvi rad (na nemačkom jeziku) o poremećaju koji će kasnije dobiti njegovo ime (rad je tek 1991. godine preveden na engleski) (Asperger, 1944). Istakao je kliničku sliku četvero dece sa normalnim IQ koji su bili socijalno čudni, naivni, neadekvatni, koristili su tačna gramatička pravila i imali bogate rečnike izražavanja, lošu neverbalnu komunikaciju, ograničena, specifična interesovanja i lošu motornu koordinaciju (Van Engeland i Buitelaar, 2008). Ipak, s obzirom da nije napisan na engleskom jeziku, ovaj rad je bio gotovo neprimećen sve dok nije opisan u jednoj publikaciji na engleskom jeziku (Wing, 1981). Aspergerov sindrom je uključen tek u DSM-IV (*American Psychiatric Association, 1994*) i ICD-10 (*World Health Organization, 1992*).

1.1.2. Klasifikacija

U Desetoj međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10, 1992) koristi se termin "pervazivni razvojni poremećaji" koji podrazumeva autizam, atipični autizam, Retov sindrom, drugi dezintegrativni poremećaj detinjstva, Aspergerov sindrom, hiperaktivni poremećaj sa mentalnom retardacijom, druge pervazivne razvojne poremećaje i pervazivni razvojni poremećaj, nespecificovan. Ovi poremećaji se međusobno razlikuju prema težini simptoma, nivou intelektualnog oštećenja, brzini razvoja govora, kao i komorbiditetu (Hus i sar., 2007).

U DSM-V (*American Psychiatric Association, 2013*) uneto je nekoliko značajnih promena u definisanju poremećaja autističnog spektra. Pre svega, višekategorijalni model je zamenjen time da postoji samo jedna dijagnostička kategorija – poremećaj autističnog spektra. Druga velika promena je to što je model tri domena zamenjen modelom dva domena, gde je poremećaj socijalnog reciprociteta i komunikacije sveden u jedan (odnosno poremećaj komunikacije sveden pod domen socijalnih oštećenja) (Tabela 1). Takođe, proširen je kontekst vremena javljanja poremećaja. Naznačeno je da simptomi treba da postoje od ranog detinjstva, čak iako su prepoznati kasnije. U DSM V klasifikaciji dodati su i novi simptomi kao što su senzorna interesovanja i averzije (Huerta i sar., 2012).

Tabela 1. Dijagnostički kriterijumi poremećaja autističnog spektra

<p>A. Perzistentni deficiti u socijalnoj komunikaciji i socijalnoj interakciji, u više konteksta, koji se manifestuju kroz sledeće, trenutno ili anamestički:</p>	<p>1. Deficiti u socijalno-emocionalnom reciprocitetu, od nivoa abnormalnog socijalnog pristupa i nemogućnosti recipročne konverzacije do smanjene mogućnosti deljenja interesovanja, emocija ili afekta, kao i do nemogućnosti da se započnu ili da se odgovori na socijalne interakcije</p> <p>2. Deficit u korišćenju neverbalne komunikacije za socijalnu interakciju, od nivoa slabo integrisane verbalne i neverbalne komunikacije, do abnormalnosti u uspostavljanju kontakta očima, govora tela, ili deficita u razumevanju i korišćenju gestova, kao i do potpunog nedostatka facijalnih ekspresija i neverbalne komunikacije</p> <p>3. Deficiti u stvaranju, održavanju i razumevanju prijateljstava, od nivoa teškoća u prilagođavanju ponašanja različitim društvenim konektima, do teškoća u deljenju imaginativne igre ili druženja, kao i do odsustva interesovanja za vršnjake</p>
<p>B. Ograničeni, repetitivni obrasci ponašanja, interesovanja ili aktivnosti, što se manifestuje kroz barem dva od sledećih kriterijuma, trenutno ili prema anamnestičkim podacima:</p>	<p>1. Stereotipni ili repetitivni motorni pokreti, korišćenje predmeta ili govor (na primer jednostavne motorne stereotipije, ređanje igračkaka ili prevrtanje objekata, eholalija, idiosinkratske fraze)</p> <p>2. Insitiranje na istom, nefleksibilnost u sklonosti rutinama, ritualni obrasci verbalnog ili neverbalnog ponašanja (na primer jako uznemirenje na male promene, teškoće u promenama, rigidni obrasci mišljenja, ritualno pozdravljanje, potreba da idu istim putem ili jedu istu hranu svakog dana)</p> <p>3. Visoko ograničena, fiksirana interesovanja koja su abnormalna po intenzitetu ili fokusu (na primer jaka vezanost za, ili preokupacija neobičnim predmetima, vrlo skučena ili perseverativna interesovanja)</p> <p>4. Hiper ili hiporeaktivnost na senzorne nadražaje ili neobična interesovanja za senzorne aspekte okoline (na primer vidljiv izostanak reagovanja na temperaturu, neadekvatni odgovori na specifične zvučne ili dodirne nadražaje, preterano mirisanje ili dodirivanje objekata, vizuelna fascinacija svetlošću ili pokretom.</p>
<p>C. Simptomi moraju biti prisutni u ranom razvojnom periodu (ali ne moraju biti potpuno manifestne dok socijalni zahtevi ne prevaziđu ograničene kapacitete, ili mogu biti maskirani naučenim strategijama u kasnijem životu.</p>	
<p>D. Simptomi izazivaju klinički značajno ograničenje u socijalnom, radnom, ili drugim okruženjima značajnim za trenutno funkcionisanje</p>	
<p>E. Ova oštećenja ne mogu biti objašnjena intelektualnim deficitom ili globalnim zastojem u razvoju. Duševna zaostalost i poremećaj autističnog spektra su čest komorbiditet, da bi se napravila komorbidna dijagnoza ova dva poremećaja, socijalna komunikacija mora biti ispod očekivane za opšti razvojni nivo</p>	
<p>Naznaka: osobe sa jasno postavljenom DSM-IV dijagnozom autističnog poremećaja, Aspergerovog poremećaja ili nespecificovanog pervazivnog razvojnog poremećaja dijagnostikuju se kao poremećaj autističnog spektra.</p>	

Pored izmena u dijagnostičkim kriterijumima, DSM-V klasifikacija unela je mogućnost određivanja težine autističnog poremećaja, koja je podeljena na tri nivoa (Tabela 2).

Tabela 2. Težina poremećaja autističnog spektra

Težina poremećaja	Socijalna komunikacija	Ograničeno i repetitivno ponašanje
Nivo 3 "Zahteva vrlo značajnu pomoć i podršku"	Teški deficiti veština verbalne i neverbalne socijalne komunikacije koji dovode do značajnog poremećaja funkcionalnosti, vrlo ograničenog započinjanja socijalnih interakcija, minimalni odgovor na socijalne kontakte drugih. Na primer, osoba koja govori nekoliko reči, ili ima nerazumljiv govor, koja retko započinje interakcije, i koja kada ih započne, to radi na neobičan način i u cilju zadovoljenja potreba, ili odgovara samo na potpuno direktno socijalno prilaženje.	Nefleksibilnost ponašanja, izrazito oslabljena sposobnost prilagođavanja na promenu, ili drugo ograničeno/repetitivno ponašanje koje značajno utiče na funkcionalnost u svim oblastima. Velike teškoće u promeni aktivnosti ili fokusa.
Nivo 2 "Zahteva značajnu pomoć i podršku"	Značajni deficiti u veštinama verbalne i neverbalne socijalne komunikacije; socijalni poremećaji prisutni i pored podrške; ograničeno započinjanje socijalnih interakcija; smanjeni ili abnormalni odgovori na socijalno prilaženje drugih. Na primer, osoba koja izgovara jednostavne rečenice, čija interakcija je ograničena na uska, posebna interesovanja, i koja ima značajno "čudnu" neverbalnu komunikaciju.	Nefleksibilnost ponašanja, oslabljena sposobnost prilagođavanja na promenu, ili druga ograničena/repetitivna ponašanja dešavaju se dovoljno često da budu očigledna prosečnom posmatraču, kao i da onemogućavaju funkcionisanje u različitim kontekstima. Postoji izražen distress ili teškoća u promeni fokusa ili aktivnosti.
Nivo 1 "Zahteva podršku"	Bez adekvatne podrške, deficiti u socijalnoj komunikaciji prouzrokuju značajnu nesposobnost (impairments). Postoje poteškoće u započinjanju socijalnih interakcija, i postoje jasni primeri atipičnih ili neuspešnih odgovora na socijalno prilaženje drugih. Smanjeno interesovanje za socijalne interakcije takođe može biti manifestno. Na primer, osoba koja ima sposobnost da izgovara pune rečenice i koja se uključuje u komunikaciju, ali ne uspeva da uspostavi adekvatan reciprocitet u komunikaciji sa drugima, i čiji su pokušaji da uspostavi prijateljstvo čudni i najčešće neuspešni.	Nefleksibilnost u ponašanju izaziva značajno ometanje funkcionisanja u jednom ili više konteksta. Teškoće u promeni aktivnosti. Problemi u organizaciji i planiranju onemogućavaju uspostavljanje samostalnosti.

Jedanaesta međunarodna klasifikacija bolesti (MKB 11) takođe će kao dijagnostičku kategoriju uspostaviti naziv "spektar autističnih poremećaja", odnosno više neće uključivati naziv pervazivni razvojni poremećaj (ICD 11 Beta draft), niti će pratiti do sada postojeće dijagnostičke kategorije.

1.1.3. Epidemiologija

Studija koja je uključila 27.749 dece rođene između 1987. i 1998. godine ukazuje na to da je prevalencija PSA 6.5 na 1000 (Fombonne i sar., 2003), što je konzistentno sa procenama prevalencije iz SAD i Velike Britanije tokom proteklih godina (Bertrand i sar., 2001; Yeargin-Allsopp i sar., 2003; Williams i sar., 2008). Centar za kontrolu i prevenciju bolesti SAD 2012. godine procenjivao je da 1 od 88 dece u SAD, odnosno 1 od 54 dečaka, a 1 u 252 devojčice ima autizam (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2012). Ipak, najnoviji rezultati ukazuju na to da oko 1 u 68, ili 1,5% dece starosti osam godina ima neki od poremećaja autističnog spektra – 23,6 na 1000 dečaka i 5,3 na 1000 devojčica (Christensen i sar., 2016).

Dok su prve epidemiološke studije autizma pokazivale prevalenciju od oko 4 na 10.000 (Lotter, 1966), skorašnje studije su pokazale mnogo više vrednosti. Nalazi među studijama se značajno razlikuju, zbog razlika u skriningu i proceni, veličini uzorka, kao i geografskoj lokaciji. Uopšteno, postoji tendencija da prevalencija PSA raste u skorašnjim kohortama, kao i da se dijagnoza postavlja ranije (Fombonne i sar., 2003). U studiji rađenoj 2010. godine (Burstyn i sar., 2010) pronađeno je četverostruko do petostruko povećanje u godišnjoj incidenciji u skorašnjim kohortama među trogodišnjacima - od 0,52 na 1000 u 1998., do 2,32 na 1000 u 2004., za oba pola. Takođe, analize iz 2008. godine pokazuju da je prevalencija autizma povećana za 23% od 2006

(Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Najnoviji rezultati pokazuju prevalenciju od 169 na 10000 (Baio i sar., 2018).

Povećanje prevalencije je u najvećoj meri posledica dva faktora – skorašnje studije su obuhvatale cele populacije, a i tokom godina, dijagnostički koncept PSA značajno se proširio (Rutter, 2005). Proširenje kriterijuma za autizam i bolje prepoznavanje autizma moglo bi donekle da objasni povećanje prevalencije, ali ni pravo povišenje incidencije ne može biti isključeno (Hertz-Picciotto i Delwiche, 2009). Pojedine studije su jasno pokazale da je povećanje prevalencije povezano sa promenom dijagnostičkih kriterijuma – "ne postoji epidemija autizma, već epidemija bavljenja autizmom" (Fisch, 2012). Studija koja je detaljno ispitivala uticaj promene načina registrovanja autizma obavljena je u Danskoj (Hansen i sar., 2015). Danski nacionalni registri zdravlja promenili su dijagnostičke kriterijume 1994. godine, kao i način prijave ambulantnih kontakata u registar, 1995. godine. Studija je uključila 677,915 dece koja su praćena od rođenja (deca rođena u periodu od 1980-1991. godine) do 2011. godine. Pokazano je da 33% povećanja prevalence PSA može biti objašnjeno na osnovu promene dijagnostičkih kriterijuma, 42% na osnovu uključivanja i ambulantnih kontakata sa zdravstvenim ustanovama, odnosno da se čak 60% povećanja prevalencije može objasniti na osnovu kombinacije ove dve promene u načinu registrovanja PSA (Hansen i sar., 2015).

Ono što takođe može objasniti ovakvo povećanje prevalence je svakako teorija koja se tiče interakcije gena i okoline. Naime, genetska teorija pretpostavlja interakciju retkih genetskih varijanti i faktora spoljašnje sredine. Da bismo objasnili povećanje prevalencije, potrebno je razmotriti faktore koji su takođe sve više prisutni ili izraženi u opštoj populaciji tokom proteklih decenija. Studije su se najviše orijentisale na pitanje vazdušnog zagađenja, hemijskih supstanci u hrani, ali i sklonosti da ljudi postaju roditelji u starijem životnom dobu. Efekti izloženosti

vazdušnom zagađenju tokom trudnoće i prve godine života imaju potencijalni efekat na razvoj poremećaja austističnog spektra, kao i na IQ deteta (Volk i sar., 2013; Perera i sar., 2009). Smatra se da efekti vazdušnog zagađenja, odnosno policikličnih aromatičnih ugljovodonika nastaju putem epigenetskih efekata (Tordjman i sar., 2014; Costa i sar., 2017). Određeni broj studija povezuje uticaj vazdušnih zagađivača povezanih sa saobraćajem upravo posredstvom inflamacije i oksidativnog stresa (Gilliland i sar., 2004). Drugi značajan faktor je starost roditelja. Kada je u pitanju starost oca, humane i animalne studije potvrđuju hipotezu da *de novo* mutacije doprinose povezanosti starosti oca i PSA (Kong i sar., 2012; Sandin i sar., 2016). Ovo se može pripisati promenama u opštoj populaciji – u poslednjim decenijama ruralno stanovništvo sve više migrira u urbane sredine i vreme dobijanja potomstva biva sve kasnije, što se može pripisati promenama u edukaciji, kao i u korišćenju kontracepcije (Kong i sar., 2012).

Epidemiologija – razlike u odnosu na pol

Studije zasnovane na kliničkim i epidemiološkim uzorcima ukazale su na višu incidenciju autizma kod dečaka nego kod devojčica, pri čemu taj odnos obično iznosi 3-4:1 (Baird i sar., 2006; Honda i sar., 2005; Van Engeland i Buitelaar, 2008). Postojanje ovakve razlike u pojavi PSA između polova ispitivano je na dva načina. Prvi način pokušava da objasni ovu razliku na osnovu razlike u biologiji CNS-a kod osoba muškog i ženskog pola – postoje polne razlike u strukturi mozga, amigdale su veće kod dečaka nego kod devojčica, dečaci imaju više neurona u cerebralnom korteksu (Baron-Cohen i sar., 2005). Ovaj pristup pokušava da da odgovor na pitanje da li su dečaci biološki više skloni tome da razviju PSA, ali ne ispituje mogućnost da postoje razlike u ispoljavanju ove grupe poremećaja kod dečaka i devojčica, odnosno mogućnost da su PSA češće detektovani kod dečaka nego kod devojčica (Mandić Maravić i sar., 2015). Drugi pristup se bavi

pitanjem razlike u manifestaciji PSA između polova. Skorašnja studija je pokazala da devojčice imaju manju verovatnoću da dobiju dijagnozu PSA pri jednakom nivou simptoma PSA – ovaj nalaz objašnjava se upravo time da devojčice imaju bolju mogućnost adaptacije, odnosno kompenzacije (Dworzynski i sar., 2012). Postoje autori koji smatraju da dijagnozu PSA dobijaju samo one osobe ženskog pola koje imaju tzv. "mušku" kliničku sliku (Moseley i sar., 2018). Nekoliko studija ispitivalo je PSA fenotip kod dečaka i devojčica, u cilju utvrđivanja da li postoje razlike u kliničkoj slici nakon što se postavi dijagnoza. Rezultati nisu konzistentni. Nekoliko studija potvrdilo je manje repetitivnih, restriktivnih i stereotipnih ponašanja kod devojčica u odnosu na dečake (Mandy i sar., 2012; Frazier i sar., 2014). Studija koja je rađena na deci sa PSA pokazala je da su devojčice imale veće deficite u komunikaciji, a dečaci više repetitivnog i restriktivnog ponašanja u odnosu na devojčice (Hartley i Sikora, 2009). Sa druge strane, pojedine studije nisu pronašle razlike u ispoljavanju takozvane trijade simptoma PSA između dečaka i devojčica (Lai i sar., 2011; Holtmann i sar., 2007; McLennan i sar., 1993; Mandić Maravić i sar., 2015.). Pored toga što rezultati koji se tiču razlike u kliničkoj slici između polova nisu konzistentni, podaci o eventualnim razlikama u adaptivnom ponašanju su vrlo retki i nedovoljni. Adaptivno ponašanje je sposobnost da se izvrše konceptualni, socijalni i praktični zahtevi na svakodnevnom nivou (*American Association on Mental Retardation*, 2002). Ispitivanje razlika po polu u kliničkoj manifestaciji, ali i u nivou funkcionalnosti, kao i njihova interakcija u okviru polova, moglo bi biti značajno u utvrđivanju bioloških mehanizama koji se nalaze u osnovi ovih poremećaja (Rinehart i sar., 2011).

1.2. POREMEĆAJI IZ SPEKTRA AUTIZMA KAO KOMPLEKSNI GENETSKI POREMEĆAJI

Uzroci poremećaja autističnog spektra još nisu u potpunosti poznati. Do nedavno se smatralo da su ovi poremećaji uzrokovani uglavnom genetskim faktorima, ali nova istraživanja pokazuju da faktori sredine mogu biti isto toliko važni. Kao i kod drugih psihijatrijskih oboljenja, radi se o kompleksnim genetskim poremećajima u kojima se pretpostavlja etiološka interakcija gena i okoline. Studije su rađene u domenu genetike, neurohemije, neurofarmakologije, neuroendokrinologije, neuroanatomije, neuroimidžinga i neuroimunologije. I pored toga, još uvek nije jasno definisan nijedan etiološki, biološki ili bihejvioralni marker, kao ni specifični psihopatološki proces. Za sada možemo govoriti o faktorima rizika, a ne o definisanim uzročnim faktorima PSA. Autizam bi se mogao smatrati psihopatološkom organizacijom koja nastaje kao posledica različitih bioloških i/ili psiholoških faktora, uključujući genetske, faktore okoline, kao i interakcije gena i okoline. I kod genetskih faktora se može govoriti o kompleksnoj, poligenskoj prirodi autizma, tako da se velika fenotipska varijabilnost može objasniti ne samo interakcijom gena i okoline, već i interakcijom multiplih gena unutar genoma jedne osobe, odnosno postojanja specifične kombinacije gena kod osoba sa poremećajima autističnog spektra (Tordjman i sar., 2014).

1.2.1. Genetska osnova

Podaci iz nekoliko epidemioloških studija blizanaca pružili su jasne dokaze da su PSA jedni od najheritabilnijih kompleksnih poremećaja (Rutter, 2000). Konkordansa monozigotnih blizanaca iznosi 60-90%, dizigotnih blizanaca približno 10%, a stopa autizma kod braće i sestara iznosi oko 5% (Constantino i sar., 2010; Bailey i sar., 1998; Szatmari i sar., 1998; Tordjman i sar.,

2014). Ovaj podatak ukazuje upravo na zajednički uticaj genetike i faktora okoline na razvoj poremećaja autističnog spektra (Guinchat i sar., 2012). Takođe, uočeno je da se stope konkordanse razlikuju u zavisnosti od dijagnoze, odnosno da su veće ukoliko se koristi širi spektar poremećaja umesto same dijagnoze autizma (Bailey i sar., 1995). Zaista, osobe sa autizmom predstavljaju samo mali deo svih osoba koje pokazuju fenotipsku ekspresiju autizma (van Engeland i Buijtelaar, 2008). Neki od rođaka osoba sa autizmom pokazuju nedostatak interesovanja za druge, ili nedostatak socioemocionalne responsivnosti, dok drugi mogu pokazivati socijalno neadaptabilno (čudno) ponašanje, imati anamnezu usporenog razvoja govora, rigidnost, ograničena interesovanja, opsesivno-kompulsivno ili repetitivno ponašanje (Bailey i sar., 1998; Lainhart, 2002; Piven, i sar., 1997; Starr i sar., 2001). Procenjeno je da se "široki fenotip" može naći u 20-30% rođaka osoba sa autizmom (de Jonge, 2006). Vrlo je jasno da genetski rizik za PSA nije definisan kroz jednostavni Mendelijanski princip. Na osnovu blizanačkih i familijalnih studija procenjeno je da u nastanku PSA učestvuje nekoliko gena u međusobnoj interakciji koja potom stvara specifični klinički fenotip. Studije pretpostavljaju učešće od 3-4 (Pickles i sar., 1995), do čak 15 lokusa (Risch, 1999). Genetske promene u PSA mogu biti velike hromozomske abnormalnosti, varijacije broja kopija (*copy number variations* – CNV), insercije/delecije i polimorfizmi jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphisms* – SNP). Sve ove genetske promene mogu biti nasleđene, ili nastati *de novo* (Koufaris i Sismani, 2015).

Oko 10% osoba sa PSA ima takozvano Mendelijansko stanje ili genetski sindrom. Najčešća stanja su Fragilni X sindrom (1-2% slučajeva PSA ima ovo stanje), tuberozna skleroza (1%) i neurofibromatoza (<1%) (Devlin i Scherer, 2012). Oko 5% slučajeva PSA ima određenu citogenetsku aberaciju koja se uglavnom viđa kod dece sa manifestnim dismorfizmima, posebno velike nebalansirane kariotipske promene. Najčešća citogenetska abnormalnost u autizmu je

duplikacija 15q11-q13, koja se može naći u 1-3% slučajeva PSA, kao deo *Prader-Willi/Angelmanovog* sindroma. Druge aneuploidije su trizomija 21, Turnerov sindrom, 47 XYY, 47 XXY (Devlin i Scherer, 2012). Prijavljeni su i slučajevi paracentrične inverzije X hromozoma (Xp21.2p11.23) (Pejović Milovančević i sar., 2012). Može se reći da u genetici PSA postoji vrlo izražena etiološka i genetska heterogenost, kao i vrlo varijabilna penetrantnost (Vortsman i sar., 2017).

Studije asocijacije celokupnog genoma i geni kandidati

Geni koji predisponiraju osobu za razvoj PSA još nisu jasno definisani. Tome doprinosi potencijalno učešće više gena, od kojih svaki ima umereni efekat na rizik za obolevanje, veliki stepen heterogenosti i nedostatak jasnih patofizioloških dokaza koji bi mogli dati pretpostavku koji su jaki geni kandidati u pitanju. Upravo zbog toga, veliki broj istraživanja koja se bave etiologijom autizma spadaju u takozvane GWAS studije (*Genome Wide Association Studies* - studije asocijacije celokupnog genoma). Mnogobrojne studije rađene su tokom protekle decenije i svaka je ukazala na nekoliko hromozomskih regiona. Iako nijedan region nije bio konstantno replikovano, preklapanje nalaza ovih studija ukazuje na nekoliko regiona koji verovatno sadrže gene specifične za stvaranje predispozicije za autizam (De Rubeis i sar., 2014; Shishido i sar., 2014).

GWAS studije ispituju povezanost određenog poremećaja i genetskih varijanti, u koje spadaju SNP i CNV. Genetske varijante mogu biti nasledene ili nastati *de novo* mutacijama. CNV mogu biti insercije, delecije, kao i ponovljene sekvence, i mogu značajno remetiti funkciju gena (Tordjman i sar., 2014). Pokazano je da česti (*common*) SNPs, delujući aditivno, značajno povećavaju rizik za PSA, uz heritabilnost od oko 60% u "multipleks" porodicama (porodicama u kojima je zabeleženo više slučajeva poremećaja autističnog spektra) (Klei i sar., 2012).

Kada su u pitanju geni kandidati, nekoliko njih je ispitivano na hromozomskim regionima 7q22-q33 ili 15q11-q13, uz dokaze da je varijantni alel gena za serotoniniski transporter na 17q11-q12 češći kod osoba sa autizmom (Tordjman i sar., 2014). Podaci iz *GWAS* studija i animalnih modela pretpostavljaju i potencijalnu ulogu gena za oksitocinski receptor na 3p25-p26 (Schanen, 2006). Većina gena za koje je pokazano da su povezani sa autizmom uključena je u različite fiziološke procese kao što je metabolizam, translacija i sinaptogeneza, što možda sve vodi ka putevima koji kontrolišu specifične neuronske funkcije kao što je sinaptička homeostaza (Tordjman i sar., 2014). Nekoliko stotina gena je do sada povezano sa autizmom, a najvažniji od njih spadaju u takozvane sinaptičke gene, kao što su *SHANK3* i neuroligini (*NLGN3*, *NLGN4X*) koji su važni za kognitivni razvoj (Miles, 2011), potom *RELN* gen koji je značajan za sinaptičku plastičnost (Folsom i Fatemi, 2013; Vijayakumar i Judy, 2016). Teški oblik autizma kod devojčica povezan je sa mutacijama na regulatornom *CTNND2* genu koji značajno utiče na neuronalni razvoj. Ovaj nalaz je značajan i zbog toga što potencijalno objašnjava zašto je autizam kod devojčica, iako ređi, obično težak oblik (Turner i sar., 2015).

1.2.2. Prenatalni, perinatalni i neonatalni faktori sredine i poremećaji autističnog spektra

Još 1956. godine, nekoliko godina nakon definisanja autističnog sindroma, prvi put je rađeno ispitivanje povezanosti komplikacija u trudnoći i autizma (Pasamanick i sar., 1956). Iako velika heritabilnost PSA potencijalno ukazuje da faktori okoline nisu toliko značajni, čini se da to nije tako (Rutter i sar., 2006). Ukoliko povećanje dijagnostikovanja PSA predstavlja i pravo povećanje incidencije ovog poremećaja, pretpostavlja se da postoji delovanje nekog novog faktora okoline, ili povećanje delovanja već postojećeg faktora rizika (Rutter, 2005).

Postoji vrlo širok spektar prenatalnih i perinatalnih faktora koji mogu uticati na rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra. Ovaj veliki broj faktora može se podeliti na izloženost faktorima okoline i postojanje prenatalnih i perinatalnih komplikacija.

1.2.2.1. Izloženost faktorima okoline

Sredinski faktori rizika za PSA su oni negenetski faktori koji mogu uticati na razvoj poremećaja kod osoba koje poseduju genetsku predispoziciju (Koufaris i Sismani, 2015). Hemijski sredinski faktori podrazumevaju faktore koji potiču iz spoljašnjosti i u organizam ulaze putem ingestije, inhalacije, dermalne apsorpcije, injekcije ili placentalnim transportom od majke ka fetusu (Kalkbrenner i sar., 2014).

Razumevanje delovanja faktora okoline, kao i interakcije gen-okolina imalo bi velike implikacije za prevenciju i lečenje ovih poremećaja. Na primer, identifikovanje osoba koje su genetski predisponirane dozvolilo bi strategije usmerene na smanjenje njihove izloženosti faktorima rizika za PSA. Pored toga što je važno definisati koji su faktori rizika u pitanju, važno je definisati i način na koji spoljašnji faktori dovode do razvoja poremećaja kod osetljivih osoba, odnosno ono što se nalazi u mehanizmu interakcije gena i okoline, a što bi omogućilo pronalaženje novih bioloških oblika terapije za ovu grupu poremećaja (Koufaris i Sismani, 2015).

Faktori okoline koji mogu biti povezani sa nastankom autizma su sledeći: izloženost živi i olovu iz sredine, varičela, rubela virus, retinoična kiselina, primena talidomida i valproične kiseline u trudnoći, kao i korišćenje alkohola tokom trudnoće, odnosno uopšteno rečeno, pretpostavljeni faktori su nutritivni, uzimanje lekova tokom trudnoće, pesticidi i infekcije (Koufaris i Sismani, 2015; Chauhan i Chauhan, 2006). Za sada najznačajnija povezanost uzimanja lekova i PSA pokazana je kod primene valproata (Christensen i sar., 2013; Bromley i sar., 2008;

Ornoy i sar., 2015). Povezanost koja se tokom proteklih godina istraživanja pokazala kao potencijalno značajna, a značajna je i sa aspekta vrlo učestalog korišćenja ovih lekova, jeste povezanost primene selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors* – SSRI) u trudnoći i PSA. Ipak, ova povezanost i dalje nije potpuno potvrđena. Pored studija koje su potvrdile da korišćenje SSRI u trudnoći povećava rizik za razvoj PSA (Gidaya i sar., 2014; Harrington i sar., 2014), postoje i studije u kojima ova povezanost nije pronađena (Hviid i sar., 2013; Viktorin i sar., 2017), odnosno koja je postala neznačajna pri kontroli konfauding faktora (Sorensen i sar., 2013).

Skorašnje studije ispitivale su povezanost autizma i sa izloženošću duvanu, zagađivačima vazduha, volatilnim organskim supstancama, metalima i organskim zagađivačima (Kalkbrenner i sar., 2015). Iako nije jasno definisan period osetljivosti na okolinske faktore kada je u pitanju autizam, dokazi iz neuroanatomskih, animalnih i epidemioloških studija ukazuju na prenatalno i rano postnatalno poreklo ovog poremećaja (Herbert i sar., 2005). Dokazi o tome da su kasniji period trudnoće i rani postnatalni period važni za razvoj autizma u kontekstu delovanja sredinskih faktora mogu se naći i u tome što su za autizam dokazane promene u neuronalnoj povezanosti, pa samim tim i promene u signalim putevima, a to su upravo sistemi koji se intenzivno razvijaju baš u ovim periodima (Kalkbrenner i sar., 2015).

Pušenje majke u trudnoći nije ispitivano u puno studija. Studija rađena 2006. godine ukazala je na to da nema povezanosti pušenja u trudnoći i PSA (Maimburg i Vaeth, 2006), dok je studija Hultmana i saradnika (Hultman i sar., 2002) potvrdila da pušenje jeste faktor rizika. Takođe, studija koja je ispitivala uticaj pušenja u trudnoći u kineskoj populaciji nije imala dovoljan broj majki koje su pušile u trudnoći da bi utvrdila povezanost, ali je u ovoj studiji pokazano da čak i takozvano "*second hand*" pušenje može imati uticaj na povećanje rizika za razvoj PSA (Zhang i

sar., 2010). Nalaz o potencijalnom uticaju pasivnog pušenja potvrđen je u kasnijoj studiji Duan i saradnika (Duan i sar., 2014). Najnovija studija rađena na velikom uzorku, ipak, nije dokazala povezanost pušenja majke u trudnoći i autizma (Caramaschi i sar., 2018)

1.2.2.2. Prenatalne i perinatalne komplikacije

Postoji veliki broj studija koji se fokusira na pre i perinatalne događaje kao faktore rizika za razvoj PSA (Mamidala i sar., 2013). Studije karakteriše ispitivanje velikog broja faktora, sa donekle različito definisanim kriterijumima, i sa različitim rezultatima.

A. Prenatalni familijalni faktori/komplikacije

U familijalne faktore ubrajaju se maternalna i paternalna starost, kao i paritet. Maternalna starost definisana je kao faktor rizika (OR=1,80) u studiji Mamidala i saradnika (2013). U studiji Shelton-a i saradnika (2010), u kohorti koja je obuhvatala pet miliona dece, uočeno je da se rizik za autistični poremećaj povećava sa starošću majke, nezavisno od starosti oca, što je potvrđeno i u studiji Durkina i saradnika iz 2008. godine (Shelton i sar., 2010; Durkin i sar., 2008). U još jednoj kohortnoj studiji iz 2007. godine, uočeno je da se rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra povećava značajno za svakih 10 godina starosti majke (Croen i sar., 2007). Sa druge strane, u velikoj kohortnoj studiji rađenoj u Izraelu 2006. godine, pokazano je da se sa starošću majke ne povećava rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra, uz kontrolu starosti oca. Ta ista studija je pokazala da se rizik za razvoj ovih poremećaja povećava 5,75 puta kod očeva starijih od 40 godina, u odnosu na mlađe od 30 godina, i to nakon kontrolisanja godine rođenja, socio-ekonomskog statusa, kao i starosti majke (Reichenberg i sar., 2006). Slični rezultati dobijeni su i u studiji rađenoj u iranskoj populaciji, gde je pokazana značajna povezanost veće starosti oca, ali ne i majke i rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra (Sasanfar i sar., 2010). U još nekoliko studija potvrđeno

je da se rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra povećava sa starošću oca (Burd i sar., 1999; Reichenberg i sar., 2006; Shelton i sar., 2010; Guinchat i sar., 2012; Durkin i sar., 2008; Croen i sar., 2007; Duan i sar., 2014), dok u studiji rađenoj 2013. godine ovo nije potvrđeno (Mamidala i sar., 2013). Sa druge strane, studija Shelton-a i saradnika iz 2010. godine pokazala je da se sa starošću oca rizik za razvoj autizma povećava ukoliko majka ima manje od 30 godina, dok se rizik ne povećava ukoliko je majka starija od 30 godina. Najnovija metaanaliza pokazala je značajno povećanje rizika za razvoj PSA sa starošću majke i oca (Wu i sar., 2017).

Povezanost maternalne starosti i PSA mogla bi se objasniti činjenicom da kod žena sa godinama dolazi do razvoja abnormalnosti u biološkim mehanizmima, kao što su promene hormonskog statusa koje utiču na *in utero* okruženje, potom epigenetske promene, nestabilnost nukleotidnih ponovaka, itd (Anello i sar., 2009). Sinergistički efekat svih ovih faktora mogao bi da utiče na fetalni razvoj mozga i dovede do PSA (Anello i sar., 2009; Durkin i sar., 2008). Takođe, pokazano je da starije majke imaju veći rizik za hipoksiju novorođenčadi (Maramara i sar., 2014).

Teorija koja daje objašnjenje rezultata navedenih studija, u kojima je povezanost sa starošću oca mnogo čvršća i izvesnija nego sa starošću majke, izneta je u radu Goriely i saradnika iz 2013. godine. Naime, razvoj germinativnih ćelija se značajno razlikuje između osoba muškog i ženskog pola, odnosno postoji mnogo više deoba ćelija spermatocita nego oocita (Goriely i sar., 2013). Svaki put kada dolazi do deobe ćelija, ceo genom prolazi kroz proces replikacije, te dolazi do mutacija (Crow, 2000). Hromozomske aberacije, kao na primer Daunov sindrom, mejotskog su porekla i povezane sa maternalnim efektom, dok su tačkaste mutacije, male insercije/delecije, i CNV posledica mitotskih grešaka i uglavnom paternalnog porekla (Hehir-Kwa i sar., 2011). Skorašnja, vrlo važna studija sekvenciranja celokupnog genoma roditelja i potomaka potvrdila je

da se oko 80% *de novo* mutacija pripisuje paternalnom poreklu, kao i da ukupni broj mutacija vrlo čvrsto korelira sa paternalnom starošću (Kong i sar., 2012).

Pronađeno je da postoji povećan rizik za autizam kod dece koja su rođena prva (Dodds i sar., 2011; Zwaigenbaum i sar., 2002; Croen i sar., 2002; Glasson i sar., 2004), četvrta ili posle četvrtog (Zwaigenbaum i sar., 2002). Sa druge strane, u studiji Duan i saradnika iz 2014. godine nije bilo razlike ukoliko je dete rođeno prvo ili posle prvog (Duan i sar., 2014), dok je u skorašnjoj studiji pokazano da su deca koja su rođena prva ili druga imala manji rizik za razvoj PSA (Guisso i sar., 2018). U studiji Dodds-a i saradnika (2011), pronađeno je da su žene koje su imale kratak interval (manje od 18 meseci) između trudnoća, kao i one koje nisu imale prethodnih trudnoća, pod povećanim rizikom da imaju dete sa autizmom (Dodds i sar., 2011). Novija metaanaliza pokazala je da se uprkos heterogenosti postojećih studija može doneti zaključak o tome da su deca žena sa kratkim intervalom između trudnoća (manje od 12 meseci) pod povećanim rizikom za razvoj PSA (OR=1,9). Potencijalno objašnjenje je da, ukoliko je razmak kraći od 12 meseci, žene zapravo ostaju trudne pre obnavljanja zaliha folne kiseline, te se povećava rizik za njenu insuficijenciju u trenutku novog začeća i trudnoće (Conde-Agudelo i sar., 2016).

B. Prenatalni faktori povezani sa trudnoćom

Drugi deo prenatalnih faktora čine faktori koji su delovali tokom trudnoće. Naime, dokazano je da rizik od poremećaja autističnog spektra povećava maternalna hipertenzija (OR 1,8) (Mamidala i sar., 2013), kao i dijabetes majke pre trudnoće (OR 1,65) (Burstyn i sar., 2010).

Povećanje rizika za PSA pokazano je i za infekcije respiratornog trakta majke (OR 1,8) (Mamidala i sar., 2013), a skorašnja metaanaliza potvrdila je da je postojanje bilo koje infekcije

majke u trudnoći takođe povezano sa povišenim rizikom za ASD (Jiang i sar., 2016). Ovo se može objasniti imunološkim odgovorom majke i oslobađanjem citokina, koji potom mogu proći transplacentalnu barijeru i modulirati neuronalnu funkciju, preživljavanje, apoptozu, kao i ekspresiju transmitera u mozgu koji se razvija (Depino, 2006). Citokini takođe utiču na proliferaciju neurona, kao i njihovu diferencijaciju, što se takođe povezuje sa PSA (Ashwood i sar., 2011). Povišeni rizik potvrđen je i za preeklampsiju (OR 1,49), kao i krvarenje u trudnoći pre 20 nedelje (OR 1,34) (Burstyn i sar., 2010, Maramara i sar., 2014). U sistematskom pregledu rađenom 2012. godine, kao glavni faktor rizika povezan sa trudnoćom izdvojeni su krvarenje u trudnoći i preeklampsija (Guinchat i sar., 2012). Preeklampsija je sindrom koji se odlikuje hipertenzijom, edemom i proteinurijom. Smatra se da nastaje zbog plitke placentacije, što dovodi do hipoperfuzije i posledično do redukovanja angiogenih faktora rasta (Walker i sar., 2015). Kada je u pitanju korišćenje lekova u trudnoći, studija Dodds i saradnika (2011) potvrdila je povećani rizik za razvoj PSA kod uzimanja takozvanih propisanih (prescription drugs) lekova. U ovoj studiji u pitanju su bili litijum, antihipertenzivi, antidepresivi, antikoagulantna terapija i hronično korišćenje narkotika (Dodds i sar., 2011).

C. Perinatalni i neonatalni faktori i komplikacije

Perinatalni faktori se, u sklopu istraživanja etiologije autizma, odnose na period tokom samog porođaja. U ove faktore se ubrajaju pre- i postmaturitet, faktori vezani sa porođaj (karlična prezentacija, produženi porođaj, carski rez i najčešće zasebno ispitivan, planirani carski rez), potom aspiracija mekonijuma i fetalni distress.

Za ispitivanje prematuriteta korišćene su različite granice, odnosno broj nedelja gestacije. Izraženi prematuritet – manje od 26 nedelja izdvojen je kao značajan faktor rizika u studiji rađenoj 2010. godine (Johnson i sar., 2010). Druge studije su za kriterijum prematuriteta uzimale kasnije nedelje gestacije – prematuritet sa manje od 37 nedelja dvostruko povećava rizik od poremećaja autističnog spektra (OR=2,11) (Mamidala i sar., 2013), a trostruko u studiji Duan i saradnika (Duan i sar., 2014). U studiji Larssona i saradnika pokazano je da prematuritet sa manje od 35 nedelja gotovo trostruko povećava rizik za razvoj PSA (OR=3,32) (Larsson i sar., 2005). Sa druge strane, prematuritet sa manje od 37 nedelja gestacije nije doveo do povećanja rizika u studiji Burstyn i saradnika, 2010 (Burstyn i sar., 2010).

Kao faktori koji povećavaju rizik za razvoj ove grupe poremećaja potvrđeni su i asfiksija na rođenju (Mamidala i sar., 2013; Duan i sar., 2014), odnosno fetalni distres, koji je u studiji Hultmana i saradnika definisan kao intrauterina hipoksija ili neonatalna asfiksija (Hultman i sar., 2011). Respiratorni distres sindrom je takođe potvrđen kao faktor rizika (OR 2,13, odnosno i 1,48). za PSA (Dodds i sar., 2011; Buchmayer i sar., 2009).

Nekoliko studija potvrdilo je da je težina na rođenju manja od 2500g značajan faktor rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra (Burstyn i sar., 2010; Haglund i Kallen, 2011), dok su rezultati Mamidala i saradnika (2013) u suprotnosti.

Pored toga, i za Apgar skor u prvoj minuti manji od 7 pokazano je povećanje rizika od 1,34 puta za nastanak PSA – (Burstyn i sar., 2010) i 1.6 (Dodds i sar., 2011). U studiji Buchmayer i saradnika iz 2009, rizik za PSA bio je povećan ukoliko je Apgar skor bio manji od 6 (Buchmayer i sar., 2009), dok niski Apgar skor nije potvrđen kao faktor rizika u drugim studijama (Larsson i sar., 2005; Maimburg i sar., 2008).

Intrakranijalna hemoragija tokom porođaja kao faktor rizika za PSA ispitivana je u nekoliko studija. U studiji Dodds-a i saradnika iz 2011. godine (Dodds i sar., 2011) pokazano je dvostruko povećanje rizika, dok je u studiji Buchmayer i sar., ukupni rizik za PSA u slučaju intrakranijalne hemoragije, cerebralnog edema i konvulzija bio trostruko povećan (Buchmayer i sar., 2009). U studiji Duan i saradnika (2014), događaj definisan kao intrapartalna kranio-cerebralna povreda nije pokazao značajno povećanje rizika za poremećaje autističnog spektra (Duan i sar., 2014).

Neonatalna žutica/hiperbilirubinemija je dokazani faktor rizika u velikom broju studija u kojima je pokazano više od trostrukog povećanja rizika za razvoj PSA (Mamidala i sar., 2013; Maimburg i sar., 2008; Zhang i sar., 2010; Maimburg i sar., 2010; Meguid i sar., 2018), a u studiji Larsson i saradnika (2005), povećanje rizika iznosilo je 3,57. Takođe, studija Maimburg i saradnika utvrdila je četverostruko povećanje rizika za razvoj autizma kod dece koja su imala hiperbilirubinemiju u neonatalnom periodu (Maimburg i sar., 2008). Sa druge strane, pojedine studije nisu utvrdile povećanje rizika za razvoj PSA kod postojanja neonatalne žutice (Croen i sar., 2005). Neonatalna žutica nastaje zbog akumulisanog bilirubina (najčešće konjugovanog), fiziološki ili patološki, koji nastaje zbog povećane razgradnje fetalnih eritrocita i opšte nezrelosti jetre. Vidljiva žutica viđa se kod 60% neonatusa rođenih u terminu, odnosno 80% prematurusa (Cohen, 2006). Smatra se da bilirubin, ukoliko postoji u povišenoj koncentraciji, može dovesti do oštećenja CNSa, a takođe može dovesti do bilirubinske encefalopatije (Zhang i sar., 2010).

Veliki revijalni rad rađen 2012. godine koji je uzeo u obzir sve studije do 2011. godine koje su se bavile temom perinatalnih faktora rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra, u neonatalne faktore rizika ubraja težinu na rođenju, obim glave, nizak Apgar skor, markere

hipoksije, respiratorni distres sindrom, asistiranu ventilaciju, asfiksiju, potom hiperbilirubinemiju, encefalopatiju, urođene anomalije i neonatalne/kongenitalne infekcije (Guinchat i sar., 2012)

Kao što možemo videti, različite studije su koristile različite kriterijume za pojedine faktore rizika, a dobijeni su nekonzistentni rezultati, što je potvrđeno i u metaanalizi rađenoj 2011. godine (Gardener i sar., 2011), koja je utvrdila veliku heterogenost u rezultatima, donoseći zaključak da su neophodni pokušaji replikacije rezultata metodološki rigoroznijim studijama, za mnoge perinatalne i neonatalne varijable. Neophodno je naglasiti da se ova studija bavila peri- i neonatalnim, ne i prenatalnim faktorima rizika za nastanak autizma. Prema ovoj studiji, mnogi peri- i neonatalni ispitivani faktori pokazali su nekonzistentne rezultate, i efekti ovih faktora nisu pokazali statističku značajnost. Važno je napomenuti i to da uočena povezanost peri- i neonatalnih komplikacija sa autizmom zapravo može odražavati posledice prethodno postojećih prenatalnih komplikacija, odnosno da je teško nesumnjivo potvrditi izolovani efekat pojedinačnih faktora (Tordjman i sar., 2014). Pored toga, nekonzistentnost rezultata može se objasniti činjenicom da ne pojedinačne, već kombinacija nekoliko pre- i perinatalnih faktora i komplikacija može povećavati rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra.

D. Ostali faktori rizika

1. Mesec/godišnje doba rođenja

Interesantno je da je pokazano da se rođenje deteta u martu i avgustu može povezati sa autizmom. Objašnjenje nije još definisano, ali se može pretpostaviti da je u pitanju izloženost virusnim infekcijama, kao i eventualna vitaminska deficijencija, što zapravo predstavlja faktore koje treba ispitati u novim istraživanjima (Gardener i sar., 2011).

2. Povezanost pre, peri i neonatalnih faktora rizika sa težinom kliničke slike

Hipertenzija, preeklampsija i generalizovani edem su bili udruženi sa većim poremećajem komunikacije, a hipertenzija, albuminurija i generalizovani edem sa izraženijim repetitivnim ponašanjem (Wallace i sar., 2008). Udruženost sa hipertenzijom povezanih opstetričkih komplikacija i težine autizma zahteva dalje istraživanje, i postavlja zanimljiva pitanja o potencijalnim uzročnim i modifikujućim faktorima u autizmu (Wallace i sar., 2008).

3. Povezanost sa polom

Težina manja od 2500 g i prematuritet manji od 33 nedelje su bili povezani sa otprilike dvostrukim rizikom za autizam, iako je veličina rizika varirala u odnosu na pol (rizik je bio veći kod devojčica), kao i u odnosu na podgrupu (rizik je bio veći kod dece sa autizmom udruženim sa drugim razvojnim abnormalnostima). Na primer, pronađen je četverostruki rizik kod devojčica rođenih sa malom težinom kod autizma udruženog sa mentalnom retardacijom, dok nije bilo značajno povećanog rizika kod dečaka sa malom težinom i samo sa autizmom (Schendel i Bhasin, 2008).

1.2.2.3. Interakcija gen - sredina

Kao što je već navedeno, PSA su kompleksni psihijatrijski poremećaji u čijoj osnovi se nalazi interakcija genetske predispozicije i delovanja faktora okoline. Jedna od hipoteza o etiologiji PSA u kontekstu interakcije gena i okoline je "hipoteza epifenomena" koja ukazuje na to da genetski faktori povećavaju ne samo rizik za nastanak autizma, već i rizik za razvoj pre, peri i neonatalnih komplikacija (Tordjman i sar., 2014; Glasson i sar., 2004). Druga hipoteza je "hipoteza heterogenosti" prema kojoj se doprinos genetskih, odnosno faktora okoline razlikuje od slučaja do slučaja. Neki autori smatraju da što je veći uticaj genetskih faktora, to će osobe sa poremećajem autističnog spektra imati i izraženije dizmorfične znake i značajnije kognitivno oštećenje (Tordjman i sar., 2014). Takođe, hipoteza koja se iznosi kao značajna je i ona prema kojoj se postojeća genetska predispozicija (nastala zbog hromozomskih ili genskih varijacija) različito ispoljava, u zavisnosti od delovanja faktora okoline (Tordjman i sar., 2014).

Jedan od takvih predloženih mehanizama je i oksidativni stres, koji može povezati genetske i faktore okoline.

1.2.3. Oksidativni stres i poremećaji iz spektra autizma

Podaci iz literature ukazuju na moguću ulogu redoks disbalansa i oksidativnog stresa u etiologiji poremećaja autističnog spektra (Chauan i Chauan 2006; Kern i Jones 2006; James i sar., 2006; Smaga i sar., 2015). Oksidativni stres nastaje kada se poremeti dinamička ravnoteža između stvaranja prooksidanasa i antioksidantnog kapaciteta - u korist prooksidanasa. Celokupna ćelijska redoks homeostaza se definiše kao ravnoteža između stepena oksidacije i redukcije i igra značajnu ulogu u brojnim signalnim kaskadama, kao na primer u onima koje su povezane sa proliferacijom,

inflamatornim odgovorom i apoptozom (Tew i Townsend, 2012; Ursini, 2016). Oksidativni stres je stanje u kojem je ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidantnog kapaciteta pomerena prema prooksidantnom stanju, gde su antioksidantne odbrane prevaziđene i akumuliraju se reaktivne vrste (Sies, 1991).

Deca su osetljivija na oksidativni stres od odraslih, zbog prirodno smanjenog nivoa glutaciona (γ -glutamil cisteinil-glicin, GSH) od rođenja, pa kroz celo detinjstvo (Erden-Inal i sar., 2002). Glutation predstavlja najvažnije unutarćelijsko, neproteinsko tiol jedinjenje i najznačajniji antioksidans u tkivu mozga (Chauhan i Chauhan 2006). Interesantno je da je opsežna analiza polimorfizma 42 gena (308 SNP-a) koji se mogu dovesti u vezu sa metabolizmom GSH pokazala da je metabolički profil GSH kod dece sa autizmom značajno izmenjen (Bowers i sar., 2011). Pored već pomenute uloge glavnog unutarćelijskog antioksidansa tj. "redoks" pufera, GSH ima značajnu ulogu i u procesima detoksikacije. Naime, odgovarajući redoks odnos GSH/GSSG (oksidovani, glutacion disulfid, GSSG) je neophodan za normalni imunski odgovor, proces detoksikacije, kao i zaštitu enzima i ćelijskih membrana od oksidativnog oštećenja.

Povezanost autizma i oksidativnog stresa pokazana je u nekoliko skorašnjih studija. U nekim istraživanjima merene su koncentracije redukovano glutaciona GSH i oksidovanog glutacion disulfida GSSG, odnosno određivan je njihov odnos koji direktno ukazuje na antioksidantni kapacitet ćelije. Kada je reč o autizmu, postoje podaci o sniženom nivou totalnog glutaciona u plazmi (tGSH), povišenom nivou oksidovanog glutaciona (GSSG) i niskom odnosu tGSH prema GSSG. Skorašnja meta analiza 29 studija pokazala je niži nivo glutaciona i glutacion peroksidaze (GPX), odnosno viši nivo oksidovanog glutaciona u poremećajima autističnog spektra (James i sar., 2009; Frustaci i sar., 2012).

Ovi nalazi ukazuju na značajno smanjenje antioksidantnog i detoksikacionog kapaciteta, kao i prisustvo oksidativnog stresa kod obolelih od autizma. Smanjenje kapaciteta za detoksikaciju je posebno značajno, zbog činjenice da neki faktori okoline koji indukuju oksidativni stres postoje u većoj koncentraciji u krvi fetusa nego majki i akumuliraju se u placenti (Chauhan i Chauhan, 2006).

Ćelijski mehanizmi detoksikacije mogu da se podele na tri faze: fazu I (oksidacija, redukcija i hidroliza); fazu II (konjugacija) i fazu III (ekskrecija) (Omiecinski i sar., 2011). Prvu liniju odbrane od slobodnih radikala predstavljaju enzimi superoksid dizmutaza, katalaza i glutacion peroksidaza, dok su pomoćni, takođe veoma značajni enzimi glutacion reduktaza i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (Chauhan i Chauhan, 2006).

Još jedna veoma značajna familija antioksidantnih enzima su glutacion S-transferaze (GST), koje katalizuju reakcije konjugacije elektrofilnih metabolita endogenog ili egzogenog porekla sa glutationom (GSH), čime se smanjuje njihova reaktivnost prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima (Habig i sar., 1974), kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi. GST čine glavnu superfamiliju enzima faze II detoksikacije (Frova, 2006).

1.2.3.1. Glutacion S-transferaze

Glutacion S-transferaze igraju vrlo važnu ulogu u antioksidantnim mehanizmima odbrane time što vrše detoksikaciju elektrofilnih ksenobiotika i inaktivaciju velikog broja endogenih bioprodukata oksidativnog stresa. Takođe, štite ćeliju od štetnih elektrofila koji nastaju tokom oksidativnog oštećenja membrane (Hayes i McLellan, 1999).

1.2.3.2.Klasifikacija

Humane GST se dele u tri glavne familije: citosolne, mitohondrijalne i mikrozomalne - povezane sa membranom (MAPEG – *Membrane - Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) (Polimanti i sar., 2013).

Citosolne GST sisara su dimeri sa subjedinicama dužine 199-244 aminokiselina. Na osnovu sličnosti sekvenci aminokiselina, prepoznato je sedam klasa citosolnih GST. Ovih sedam klasa imenovano je kao Alfa, Mu, Pi, Sigma, Teta, Omega i Zeta (Hayes i sar., 1995; Armstrong i sar., 1997; Hayes i McLellan, 1999; Sheehan i sar., 2001). Klasifikacija se zasniva na postojanju više od 60% zajedničke strukture u okviru klase, odnosno prema sličnosti sekvenci (Tew i Townsend, 2012). Svaka citosolna klasa se sastoji od nekoliko članova i nalazi se u specifičnom hromozomalnom klasteru (Polimanti i sar., 2013).

1.2.3.3.Uloge glutathion S-transferaza

Citosolne GST uključene su u veliki broj katalitičkih procesa, kao što je detoksikacija reaktivnih elektrofila, biosinteza leukotrijena, prostangladina, testosterona i progesterona, i razgradnja tiroksina (Polimanti i sar., 2013). GST mogu biti indukovane u uslovima oksidativnog stresa. GSTA, GSTP, GSTM i GSTT klase su značajne u procesima detoksikacije velikog broja produkata, kao što su organski epoksidi, hidroperoksidi i nezasićeni aldehidi, koji nastaju kao posledica oštećenja DNK i lipida. Redukcija ovih molekula katalizovana posredstvom GST sprečava daljnje oksidativno oštećenje u ćelijama (Hurst i sar., 1998). Pored toga što katalizuju konjugacione, redukcione i izomerizacione reakcije, citosolni GST se takođe vezuju, kovalentno i nekovalentno, za hidrofobne nesupstratne ligande (Hayes i sar., 1995). Ova vrsta aktivnosti

doprinosi unutarćelijskom transportu, sekvestraciji i dispoziciji ksenobiotika i hormona, kao što su bilirubin, hem, steroidi i tiroidni hormoni (Hayes i sar., 1995).

Način delovanja

U nativnom obliku, citosolne glutation S-transferaze mogu biti homodimeri ili heterodimeri, mikrozomalne glutation S-transferaze su trimerni proteini, a mikrozomalna frakcija jetre poseduje i tetramere. Svaka subjedinica GST se sastoji iz dva domena: manjeg, N-terminalnog domena i većeg, C-terminalnog domena. Na svakoj subjedinici GST postoji aktivno mesto, koje je smešteno u udubljenju između dva domena. Aktivno mesto se sastoji od dva funkcionalna regiona, G-mesta i H-mesta. G-mesto, koje služi za vezivanje glutationa, vrlo je specifično prema glutationu i slično je kod svih izoenzima GST. H-mesto ili hidrofobno mesto služi za vezivanje elektrofilnog supstrata. Ono nije usko specifično prema određenom elektrofilnom supstratu i veoma se razlikuje kod različitih subjedinica GST. Još jedan važan podatak jeste da subjedinice GST ispoljavaju nezavisnu katalitičku aktivnost (Tew i Townsend, 2012).

Supstrati

U egzogene supstrate za solubilne GST spadaju lekovi, industrijski intermedijati, pesticidi, herbicidi, okolinski zagađivači i karcinogeni (Hamilton i sar., 2003; Hayes i sar., 2005). Epoksidi se takođe detoksifikuju putem GST. Jedan od njih je antibiotik fosfomicin, ali tu spadaju i karcinogeni iz okoline, kao što je aflatoksin B1, 1-nitropiren, 4-nitrokinolin, potom policiklični aromatični ugljovodonici (PAH). PAH grupa jedinjenja je ubikvitarna, nalazi se u dimu cigareta i izduvnim gasovima automobila, zbog čega predstavlja opšte prisutnu pretnju zdravlju. Druga

grupa karcinogena su heterociklični amini koji nastaju u procesu kuvanja hrane bogate proteinima (Coles i sar., 2001; Hayes i sar., 2005).

1.2.4. Polimorfizmi glutation S-transferaza

GST pokazuju značajnu genetsku varijabilnost u ekspresiji, što vodi značajnim interindividualnim i interetničkim razlikama u efikasnosti (Polimanti i sar., 2011; Koufaris i Sismani, 2015). Posebno, ispitivanje etničkih razlika u genskim varijantama povezanim sa značajnim promenama u kodirajućim proteinima, koje se nazivaju "gubitak funkcije" (*Loss-of-Function*, LoF), može doprineti našem razumevanju genetske predispozicije za razvoj poremećaja, na nivou populacija (Polimanti i sar., 2013).

U genima za GST identifikovane su brojne genske varijante, i neki od ovih polimorfizama mogu da se klasifikuju kao LoF, jer su povezani sa potpunim gubitkom katalitičke sposobnosti (Fuciarelli i sar., 2009; Josephy, 2010). Nekoliko studija ispitivalo je da li su LoF varijante GST značajno povezane sa rizikom za oboljevanje, ističući pozitivne ishode u različitim vrstama karcinoma (Di Pietro i sar., 2010), kao i u drugim čestim oboljenjima, kao što su neurološka (Piacentini i sar., 2012; Polimanti i sar., 2013). Ove studije pokazuju veliku interetničku raznolikost prisutnu u frekvencijama alela pojedinih LoF varijanti GST gena, i moguće je primetiti da etnička pripadnost značajno utiče na povezanost GST i oboljenja (Ben Salah i sar., 2012; Polimanti i sar., 2013).

Kod sve četiri najvažnije citosolne klase glutation S-transferaza, alfa (GSTA), mi (GSTM), pi (GSTP) i teta (GSTT), prisutan je genski polimorfizam, što za posledicu može imati izmenjen kapacitet određenog tkiva za detoksikaciju i zaštitu od oksidativnog stresa (Hayes i Strange, 2000).

Samim tim, osobe koje nemaju eksprimiran neki od GST izoenzima izložene su većem riziku za obolevanje od raznih oboljenja, uključujući i psihijatrijske poremećaje.

GSTA - pripadnici GSTA klase su kodirani od strane 5 različitih gena (*GSTA1-A5*), smeštenih na hromozomu 6 (Coles i sar., 2001). Smatra se da najveći klinički značaj ima polimorfna ekspresija *GSTA1*. Naime, protein *GSTA1* katališe detoksikaciju kancerogenih metabolita životne sredine i duvanskog dima. Genetski polimorfizam *GSTA1*, C-69T, obuhvata tri povezane supstitucije baza (SNP) u promotorskom regionu na poziciji 567, 69 i 52 (T, C i G), u kome se na ovim pozicijama nalaze G, T i A, što ima za posledicu velike kvantitativne razlike u ekspresiji i aktivnosti enzima. *GSTA1* gen kodira GST izoformu koja je u najvećoj meri eksprimovana u jetri, i ovaj enzim igra ključnu ulogu u detoksikaciji mnogih toksičnih supstanci (Coles i Kadlubar, 2005; Polimanti i sar., 2013). *GSTA1* C-69T alel je povezan sa značajnim smanjenjem ekspresije enzima, i različite studije su prepostavile da ova LoF varijanta može biti povezana sa hepatičnim i nehepatičnim oboljenjima (Polimanti i sar., 2013).

GSTM - jedan od gena za M klasu GST je *GSTM1* i nalazi se na kratkom kraku prvog hromozoma. Ljudski *GSTM1* gen sastoji se od osam egzona lociranih na 1p13.3, i najčešći polimorfizam *GSTM1* je delecija celog gena (*null* ili *nulti* genotip) koji rezultuje nedostatkom funkcionalne aktivnosti enzima (Allocati i sar., 2003; Leiers i sar., 2003). Unutar ove klase javlja se delecioni polimorfizam usled koga ne dolazi do sinteze *GSTM1* aktivnog enzima, čime se gubi njegova uloga u detoksikaciji (Pearson i sar., 1993). Interesantno je da su među pripadnicima bele i žute rase, 50% osoba homozigoti za *nulti* alel. Frekvencija *GSTM1* i *GSTT1 nultog* genotipa se razlikuje među populacijama (Rahbar i sar., 2015). *GSTM1 nulti* – 17-35% kod Brazilaca afričkog porekla (Hiragi i sar., 2007), značajno češći kod pripadnika bele rase u odnosu na osobe afričko-američkog porekla u SAD (53,5% vs. 27,6%, $P < 0,001$) (Chen i sar., 1996), u studiji u Jamajci

frekvenca *GSTM1* bila je 26,2% (Taioli i sar., 2011), a kod dece, na istom geografskom području ta frekvenca iznosila je 26,0% (Rahbar i sar., 2014; Rahbar i sar., 2015).

GSTP - gen koji kodira *GSTP1* je smešten na hromozomu 11. Najvažniji supstrat za ovu klasu GST su diol-epoksidi policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji su prisutni u duvanskom dimu. Do sada su opisana 2 SNP-a u okviru *GSTP1* gena, od kojih najviše pažnje istraživača privlači prvi tip SNP koji u osnovi ima zamenu A (adenina) u G (guanin) na 313bp na kodonu 105 (*GSTP1 A1578G, Ile105Val*). Ova zamena za posledicu ima zamenu amino kiseline izoleucina u valin. Smatra se da *GSTP1Ile105Val* ima do pet puta jaču enzimsku aktivnost prema policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (Kellen i sar., 2007). Za *GSTP1Ile105Val* polimorfizam postoje tri učestala genotipa (*Ile/Val, Ile/Ile, Val/Val*). U skorašnjoj studiji frekvenca *Ile* bila je 51% u populaciji Jamajke (Rahbar i sar., 2014).

GSTT - gen za *GSTT1* se nalazi na dugom kraku hromozoma 22. Oko 20 do 30% populacije poseduje *GSTT1 nulti* genotip pa samim tim nema funkcionalni enzim. *GSTT1 nulti* genotip imao je frekvencu od 22-44% kod Brazilaca afričkog porekla (Hiragi i sar., 2007), bio je značajno češći kod osoba afričko-američkog porekla nego kod pripadnika bele rase (24,1% vs. 15,0%, $P = 0,019$) (Chen i sar., 1996). *GSTT1 nulti* genotip češće se javlja u azijskoj populaciji (Polimanti i sar., 2013). U studiji rađenoj na području Jamajke, frekvenca *GSTT1 nultog* genotipa bila je 35.2% (Taioli i sar., 2011), dok je u populaciji dece sa istog geografskog područja frekvenca *nultog* genotipa iznosila 22,0% (Rahbar i sar., 2014). Nosioци *GSTT1 nultog* genotipa imaju smanjenu metaboličku aktivnost prema derivatima etana koji su prisutni u duvanskom dimu (Landi, 2000). Međutim, u nekim tkivima *GSTT1* mogu biti uključene u reakcije bioaktivacije određenih jedinjenja poput trihloretilena, hlorofenola i pesticida i na taj način dovesti do nastanka još toksičnijih metabolita. Zajedno sa CNV *GSTM1*, delecioni polimorfizam *GSTT1* je najviše

ispitivani GST polimorfizam i prikupljena je značajna količina podataka koja ga povezuje sa više oboljenja, kao i sa povećanom osetljivošću na različite toksične supstance (Polimanti i sar., 2013).

Gen-gen interakcija

LoF varijante pokazane su u studiji Polimanti i saradnika (2013) u kojoj je uočeno da imaju visoki *linkage disequilibrium* (LD), što znači da ulaze u interakciju sa drugim funkcionalnim varijantama. U ovoj studiji nisu pokazane interakcije između -69C/T GSTA1 polimorfizma i drugih varijanti sa uticajem na funkciju. Generalno, interakcije varijantnih alela su jače u populacijama sa afričkim, nego u populacijama sa azijskim ili evropskim poreklom (Polimanti i sar., 2013). Ovi podaci mogu objasniti kontradiktorne rezultate koji su do sada dobijeni u ispitivanju povezanosti genskih polimorfizama sa pojedinim oboljenjima. Takođe, oni mogu biti korisni za interpretaciju rezultata, kao i dizajn budućih genetskih studija povezanosti.

1.3. POLIMORFIZMI GST I POREMEĆAJI AUTISTIČNOG SPEKTRA

Do sada je uloga polimorfizama GST u poremećajima autističnog spektra ispitivana u svega nekoliko studija. Naime, pokazano je da su nosioci *GSTM1 nultog* genotipa u povećanom riziku za nastanak autizma (Buyske i sar., 2006). Takođe, pronađen je granično povišen rizik za nastanak autizma kod osoba sa *GSTM1 nultim genotipom* (OR = 1,37; 95% CI, 0,98–1,96), dok je u kombinaciji sa polimorfizmom gena za nosač redukovanih folata taj rizik bio 3,78 (95% CI, 1,80–7,95) (James i sar., 2006). Studija koja je koristila dizajn studije "trio" – majka deteta sa PSA i njeni roditelji - pokazala je da je haplotip koji se sastoji od dva polimorfizma u GSTP1 genu (*Ile105Val* and *Ala114Val*) značajno više prenošen (eng. *overtransmitted*) majkama (OR = 2,67; 95% CI, 1,39–5,13)], u poređenju sa druga dva haplotipa (Williams i sar., 2007).

Skorašnja studija Rahbar i saradnika iz 2015. godine je studija slučajeva i kontrola u kojoj su ispitivani polimorfizmi GSTP1, GSTT1 i GSTM1 kao faktori rizika za PSA. U ovoj studiji nije pokazana značajna povezanost PSA statusa i GSTP1, GSTT1 i GSTM1 genotipa, ali je pokazano da postoji značajna interakcija GSTP1 i GSTT1 u odnosu sa PSA (Rahbar i sar., 2015). Naime, od dece koja su heterozigoti za *GSTP1 Ile105Val* polimorfizam, rizik za PSA je bio značajno viši kod one koja su imali GSTT1 *nulli* genotip, nego one sa drugim genotipovima (*Matched Odds Ratio*, MOR = 2,97, 95% CI:1,09 – 8,01, p = 0,03)]. Nasuprot ovim rezultatima, Bowers i saradnici (2011) nisu pokazali značaj polimorfne ekspresije GST kao nezavisnog faktora rizika za nastanak autizma (Bowers i sar., 2011).

Prema našem saznanju, jedine studije koje su ispitivale interakciju polimorfizama gena za GST i faktora okoline jesu studije Rahbar i saradnika iz 2014. i 2015., odnosno 2016. godine. (Rahbar i sar., 2014; Rahbar i sar., 2015; Rahbar i sar., 2016). U prvoj studiji autori su ispitivali interakciju genotipa GSTM1, GSTT1 i GSTP1 i koncentracije arsena u krvi dece sa PSA i sa normalnim razvojem. Druga studija ispitivala je interakciju ovih genotipova i koncentracije mangana u krvi. U obe studije rezultati su ukazivali na potencijalni značaj GSTP1 polimorfizama. U prvoj studiji (Rahbar i sar., 2014) pokazano je da su nosioci referentnog *IleIle* genotipa imali značajno više koncentracije arsena u odnosu na nosioce *IleVal* i *ValVal* genotipa. Ova povezanost bila je izražena u grupi dece sa normalnim razvojem, dok je u grupi dece sa PSA pokazivala isti trend, ali bez statističke značajnosti. U drugoj studiji (Rahbar i sar., 2015) pokazano je da kod nosilaca *IleIle* genotipa postoji 6 puta veći rizik za razvoj PSA ukoliko je koncentracija mangana viša od 12µg/l u odnosu na decu kod kojih je koncentracija mangana bila niža od pomenute granične vrednosti (Rahbar i sar., 2015). Studija ove grupe autora koja je objavljena 2016. godine primarno se bavila određivanjem koncentracije aluminijuma u krvi dece sa PSA i zdravih kontrola,

sekundarno je bilo određivanje veze između GST genotipa i koncentracije aluminijuma, a kao glavni rezultat navedena je mogućnost da je PSA status modifikator odnosa između *GSTP1* genotipa i koncentracije aluminijuma (Rahbar i sar., 2016). Bez obzira što je poznato da je ispitivanjem polimorfizama gena čiji su produkti uključeni u antioksidantnu odbranu organizma moguće identifikovati osobe koje su osetljive na sredinske faktore rizika, interesantno je da u literaturi nema podataka o udruženom efektu genskog polimorfizma GST sa prenatalnim i perinatalnim faktorima rizika na nastanak poremećaja autističnog spektra. Takođe, dosadašnja istraživanja koja su se ticala GST nisu ispitivala mogući značaj polimorfizma GSTA1 u riziku za nastanak poremećaja autističnog spektra.

Zbog svega navedenog, veoma je važno izvesti sveobuhvatno istraživanje u kome bi se određivalo prisustvo genskih varijanti glutation transferaza A1, M1, P1 i T1 i njihov mogući uticaj na podložnost za nastanak autizma. Pored toga, neophodno je ispitati i udruženi efekat polimorfne ekspresije GST i izloženosti pretpostavljenim faktorima rizika za nastanak PSA.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Ispitati da li postoji uticaj genskog polimorfizma *GSTA1 C69T* (rs3957357), *GSTM1*, *GSTP1 Ile105Val* (rs1695) i *GSTT1* na rizik za nastanak poremećaja autističnog spektra
- Ispitati korelaciju genskih varijanti GST sa težinom kliničke slike, kognitivnim sposobnostima i adaptivnim ponašanjem kod pacijenata sa poremećajima autističnog spektra
- Utvrditi izloženost rizičnim faktorima okoline u uzorku pacijenata u odnosu na zdrave kontrole.
- Ispitati jačinu povezanosti između poznatih sredinskih faktora rizika i genotipa GST, kao i njihov zajednički doprinos u nastanku poremećaja autističnog spektra.

3. MATERIJAL I METODE

Studija je dizajnirana kao studija slučajeva i kontrola. Istraživanje je sprovedeno od oktobra 2009. do juna 2015. godine, u Institutu za mentalno zdravlje, Univerzitetskoj dečijoj klinici u Beogradu, Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju i Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Takođe, istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Instituta za mentalno zdravlje i Univerzitetske dečje klinike u Beogradu.

3.1.Uzorak

Uzorak je činilo ukupno 227 ispitanika, 113 pacijenata sa poremećajima autističnog spektra (studijska grupa – S) i 114 zdravih kontrola (kontrolna grupa – K). Studijsku grupu činilo je 113 pacijenata sa poremećajima autističnog spektra koji su hospitalizovani na Kliničkom odeljenju za decu i adolescente Instituta za mentalno zdravlje (IMZ) sa dijagnozom iz spektra autističnih poremećaja, prema MKB-10 kriterijumima, u periodu od oktobra 2009. do decembra 2011, kao i pacijenti ambulantno lečeni u Dispanzeru za decu i odrasle IMZ, sa dijagnozom iz spektra autističnih poremećaja, prema MKB-10 kriterijumima, u periodu od oktobra 2009. do decembra 2011. Kriterijumi za uključivanje u studijsku grupu su bili starost 2-35 godina; potvrđena dijagnoza iz spektra autističnih poremećaja. Kriterijumi za isključivanje iz studijske grupe: starost preko 35 godina.

Kontrolnu grupu (K) činili su deca, adolescenti i mlađi odrasli koji se leče na Odeljenju za urologiju, kao i Odeljenju za ortopediju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, u periodu od oktobra 2011. do juna 2012. godine. Kontrole su uparene po polu i uzrastu, kao i geografskom

poreklu. Urološke dijagnoze ovih pacijenata su: kriptorhizam, kurvatura penisa, fimozis, hidronefroza, hidrokela, ingvinalna hernija, vezikoureteralni refluks. Kod kontrola sa Odeljenja za ortopediju, dijagnoza je bila prelom podlaktice. Među kontrolama nalazile su se i zdrave kontrole, uparene po polu i uzrastu, odabrane po principu pogodnog uzorka.

Kriterijumi za uključivanje u kontrolnu grupu bili su: starost 2-35 godina. Kriterijumi za isključivanje iz kontrolne grupe bili su: pozitivna porodična anamneza o psihijatrijskim ili neurološkim oboljenjima; podaci u ličnoj anamnezi o ranim razvojnim psihijatrijskim poremećajima i neurološkim oboljenjima; nemogućnost dobijanja podataka o hereditetu, ili karakteristikama ranog razvoja.

3.2. Instrumenti merenja

3.2.1. Studijska grupa – skale procene psihičkog funkcionisanja:

1. Revidirani dijagnostički intervju za autizam (*Autism Diagnostic Interview-Revised ADI-R*) (Le Couteur i sar., 2003) - ADI-R je klinički dijagnostički instrument koji služi za procenu autizma kod dece i odraslih. Ovaj instrument obezbeđuje dijagnostički algoritam za autizam, primenljiv je na ICD-10 i na DSM-IV. Instrument se orijentiše na funkcionisanje i ponašanje u tri glavne oblasti: Socijalni reciprocitet, Komunikacija i Restriktivna i repetitivna interesovanja i ponašanja. ADI-R se može primeniti kod odraslih i kod dece, od 18 meseci starosti nadalje.

ADI-R je standardizovani, semi-strukturisani klinički intervju koji se primenjuje kod roditelja/negovatelja dece i odraslih. Intervju sadrži 93 ajtema i orijentiše se na ponašanje u tri domena: Socijalni reciprocitet (na primer podela emocija, nuđenje ili traženje utehe, socijalni

osmeh, odgovor na prilaženje druge dece); Komunikacija i jezik (na primer stereotipno zamuckivanje, pogrešno korišćenje zamenica, socijalna upotreba jezika); Restriktivna i repetitivna interesovanja i ponašanja (na primer neobična preokupacija predmetima, manirizmi prstiju ili ruku, neobična senzorna interesovanja). Instrument uključuje i druge ajteme koji su neophodni za planiranje lečenja, kao što je samopovređivanje i hiperaktivnost. Odgovori se ocenjuju od strane kliničara, a na osnovu opisa detetovog ponašanja i funkcionisanja od strane roditelja/negovatelja. Pitanja su organizovanja po specifičnoj grupi simptoma. Na primer, oblast "komunikacija" podeljena je na "pokazivanje prstom u cilju izražavanja interesovanja", "klimanje glavom", "rukovanje". Sva pitanja se odnose na trenutno ponašanje, sa izuzetkom nekoliko njih koji su vezani baš za specifični razvojni period odnosno starost. U tim slučajevima data je jasna starosna restrikcija. Na primer, ajtemi koji ispituju igranje u grupi kodiraju se samo za period od četvrte do desete godine, dok su pitanja o recipročnom prijateljstvu kodirana samo za decu stariju od pet godina. Pored toga što se pitanje odnosi na trenutno ponašanje, svako pitanje se orijentiše i na period kada je to ponašanje bilo verovatno najizraženije, i to se generalno odnosi na uzrast od 4-5 godina.

Intervju započinje uvodnim pitanjem i pitanjima koja se odnose na rani razvoj deteta. Sledeće 41 pitanje pokriva verbalnu i neverbalnu komunikaciju. Pitanje od 50-66 ispituje socijalni razvoj i igru. Narednih 13 pitanja se odnose na interesovanje i ponašanje. Poslednjih 14 pitanja se odnose na "uopšteno ponašanje" koje uključuje pitanja o veštinama pamćenja, motornim veštinama, hiperaktivnosti.

Zbirom specifičnih pitanja koja se odnose na Socijalni reciprocitet, Komunikaciju i Restriktivno i repetitivno ponašanje dobijaju se kvantifikovani domeni. Zbir za Komunikaciju računa se odvojeno za decu koja imaju, odnosno nemaju razvijen govor. Povišeni skorovi ukazuju

na probleme u datoj oblasti. Skorovi se određuju procenom kliničara, a na osnovu opisa roditelja/negovatelja. Za svaki ajtem, kliničar određuje skor koji može biti od 0 do 3. Skor 0 se daje kada "specifično ponašanje nije prisutno", skor 1 se daje kada je "prisutan poremećaj specifičnog ponašanja, ali nije dovoljno izražen da bi se skorovao sa 2". Skor 2 pokazuje "definitivno abnormalno ponašanje", dok je skor 3 rezervisan za "vrlo izražen poremećaj" specifičnog oblika ponašanja. Takođe, postoji i skor 7 (postoji poremećeno ponašanje u toj oblasti, ali ne i specifičnom ponašanju), potom 8 (nije primenljivo) i 9 (nije poznato, ili nije ispitano). U izračunavanju krajnjeg algoritma za svaku od tri oblasti, na osnovu posebnog algoritma, sabiraju se skorovi na najznačajnijim pitanjima za datu oblast. Skorovi na ajtemu 0, 1, 2 se boduju istim vrednostima, skor 3 se računa kao 2, a skorovi 7,8, i 9 kao 0. Dijagnoza autizma postavlja se onda kada skorovi sva tri domena dostižu ili prelaze za sva tri domena predviđene "cut-off" vrednosti, pod uslovom da je početak poremećaja evidentan pre 36 meseci starosti. Ovaj princip primenjuje se za sve, sem tri verzije koje imaju manje modifikacije: 1) "life-time" verzija koja zapravo predstavlja dijagnostički skor; 2) verzija zasnovana na sadašnjem ponašanju; i 3) verzija koja se koristi kod dece mlađe od 4 godine. Cut-off skor za komunikaciju i jezik iznosi 8 za verbalne subjekte, odnosno 7 za neverbalne. Za sve subjekte, cut-off skor za domen socijalne interakcije je 10, dok je cut-off za ograničeno i repetitivno ponašanje – 3.

Instrument u ovom istraživanju primenjen je od strane iskusnih kliničara koji su prošli obuku za primenu ovog dijagnostičkog intervjua. Prosečno vreme primene ovog intervjua iznosilo je 90 minuta.

2. Vekslerova skraćena skala inteligencije (*Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence - WASI*) (Wechsler, 2013).

WASI test obuhvata tri tradicionalna IQ skora – verbalni, manipulativni i totalni. WASI se sastoji od četiri subtesta: Rečnik, Sastavljanje kocaka, Sličnosti i Kompletiranje matrice. Zadavanje sva četiri subtesta je način brze procene verbalnog, neverbalnog i opšteg intelektualnog funkcionisanja ispitanika, za približno 30 minuta. Test se zadaje individualno i predviđen je za upotrebu kod ispitanika uzrasta od 6 do 89 godina. Test zadaju specijalisti kliničke psihologije. Ovaj test inteligencije koristio se kod verbalnih pacijenata.

3. Vineland skala adaptivnog ponašanja (*Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition - Vineland-II*) (Sparrow i sar., 2005)

Ova skala meri lične i socijalne veštine individue od rođenja do odraslog doba. Pitanja se postavljaju roditeljima ili staratelju, a odnose se na opis adaptivnog ponašanja pacijenta. Skala procenjuje adaptivno ponašanje u četiri domena: Komunikacija, Veštine svakodnevnog života, Socijalizacija i Motorne veštine. Obezbeđuje i kombinovani skor koji sumira sposobnosti ispitanika u sva četiri domena. U zavisnosti od sposobnosti ispitanika primena skale traje do 60 minuta. Skala adaptivnog ponašanja koristila se kod neverbalnih pacijenata.

4. Upitnik o pre i perinatalnoj izloženosti faktorima sredine

Upitnik je napravljen za potrebe ovog istraživanja i sastoji se od tri dela. Prvi deo odnosi se na osnovna sociodemografska pitanja i pitanja vezana za navike majke u periodu pre i tokom

trudnoće (pušenje, konzumiranje alkohola, izloženost hemijskim supstancama, uzimanje lekova i infektivna oboljenja tokom trudnoće). Sledeći deo odnosi se na sociodemografske podatke o ocu deteta, kao i njegove navike tokom trudnoće majke (pitanja može da popunjava majka). Poslednji deo sadrži pitanja vezana za biološke faktore rizika kod deteta - perinatalne i postnatalne komplikacije, i to: nedonesenost (manje od 36 nedelja gestacije), niska težina na rođenju (manje od 2500g), prenesenost (preko 42 nedelje gestacije), perinatalna asfiksija, Apgar skor ispod 5, intrakranijalna hemoragija, hiperbilirubinemija, sindrom respiratornog distresa, hipoglikemija, neonatalne konvulzije, sistemske neonatalne infekcije (sepsa, meningoencefalitis), dijabetes majke, preeklampsija majke, konvulzije majke tokom trudnoće, infekcije majke u trudnoći (toksoplazmoza, rubeola, citomegalovirus, AIDS). Upitnik ispituje postojanje faktora rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra koji su do sada ispitivani ili potvrđeni u literaturi.

3.2.2. Kontrolna grupa

1. Skrining upitnik za kontrole

Ovim upitnikom dobijaju se osnovni podaci o ispitaniku kontrolne grupe (pol i godine starosti). Pored toga, upitnik se sastoji od pitanja koja ispituju postojanje neurološkog ili psihijatrijskog oboljenja kod deteta, kao i u porodici. Dobijen pozitivan odgovor na makar jedno od isključujućih pitanja (pa i postojanja oboljenja ovog spektra u porodici) označava da ispitanik nije podoban za uključivanje u grupu zdravih kontrola, odnosno ne preduzimaju se dalji koraci istraživanja.

2. Upitnik o izloženosti – opisan u prethodnom pasusu (instrumenti kliničke procene u grupi slučajeva).

3.3.Procedura

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Kodeksom dobre naučne prakse Medicinskog fakulteta u Beogradu. Pre početka istraživanja roditelji ispitanika, kao i sami ispitanici u potpunosti su upoznati sa predmetom istraživanja. Za ispitanike studijske grupe pisani pristanak za učešće u studiji davali su roditelji/staratelji. Ukoliko je ispitanik kontrolne grupe bio maloletan, roditelji/staratelji su dali pisani pristanak za učešće u studiji, a ukoliko je ispitanik kontrolne grupe bio punoletan, sam je davao pristanak za učešće u studiji.

Po obavljenom skriningu, kod ispitanika koji ispunjavaju kriterijume za uključivanje u studijsku ili kontrolnu grupu, pristupljeno je uzorkovanju krvi. Ispitanicima studijske grupe krv je vađena nakon potvrđivanja dijagnoze iz grupe poremećaja autističnog spektra (prema kompetnoj dijagnostičkoj proceni od strane specijaliste dečje psihijatrije), u Institutu za mentalno zdravlje. Ispitanicima kontrolne grupe krv je vađena nakon obavljanja intervjua i potvrđivanja da nije ispunjen nijedan od isključujućih kriterijuma. Intervju i uključivanje u istraživanje obavljao je lekar specijalista urologije/ortopedije, koji nije i urolog/ortoped koji obavlja operaciju/pregled, a u cilju nepristrasnosti i isključivanja bilo kojeg oblika pritiska za učešće u studiji. Uzorkovanje krvi kod ispitanika studijske i kontrolne grupe vršeno je uvek prilikom uzimanja krvi za uobičajene neophodne analize (osnovne laboratorijske analize).

3.4. Uzimanje i priprema uzoraka

Za analizu polimorfizama GST od svih ispitanika su uzeti uzorci pune krvi (3 ml) sa EDTA kao antikoagulantom, u Institutu za mentalno zdravlje i na Univerzitetnoj dečijoj klinici u Beogradu i transportovani do Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je izolovana iz 400 μ l venepunktirane krvi korišćenjem QIAamp DNA mini kit-a (*Qiagen, Chatsworth CA, USA*), potom alikvotirana i čuvana na -20°C do izvođenja PCR (*engl. polymerase chain reaction*) analize.

DNK izolacija i određivanje polimorfizama

Ukupna DNK izolovana je iz 200 μ l pune periferne krvi, pri čemu je korišćen *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Chatsworth CA, USA)* u skladu sa protokolom proizvođača. Genotipiziranje je vršeno dvostruko slepo za status slučaj/kontrola, a takođe su uključeni i dvostruko slepi uzorci za kvalitet kontrole (jedan za svaki uzorak), u cilju validacije procedura genotipiziranja. Konkordansa za analizirane dvostruko slepe uzorke je bila 100%. Sve analize su uključivale pozitivne i negativne kontrole. Svi korišćeni prajmeri su sintetisani i kupljeni od *Metabion International AG (Planegg, Germany)* (Coric i sar., 2016).

Određivanje GSTM1 i GSTT1 polimorfizama

Za ispitivanje prisustva amplifikovanih PCR produkata GSTM1: 215 bp, GSTT1: 481 bp, kao i *house-keeping* gena CYP1A1: 312 bp (korišćenog kao unutrašnja kontrola u cilju razlikovanja *nultog* genotipa od greške u analizi), korišćen je metod Abdel-Rahman i saradnika (2016). Važno je napomenuti da ovaj metod ne pravi razliku između heterozigotnog i homozigotnog genotipa, te na taj način detektuje samo prisustvo (samo jedan alel prisutan, homozigot ili heterozigot, koji se naziva *GSTM1-aktivni* i *GSTT1-aktivni* genotip) ili odsustvo

(kompletna delecija oba alela, homozigot, koji se naziva *GSTM1-nulti* i *GSTT1-nulti* genotip) određenog genotipa. PCR produkti su vizualizovani na *Chemidoc* (*Biorad, Hercules, CA, USA*).

Određivanje *GSTAI* C69T (rs3957357) polimorfizma

Određivanje SNP *GSTAI**C69T(rs3957357) polimorfizma vršeno je po metodi Ping i saradnika (2006). Fragment veličine 400 bp je amplifikovan i inkubiran na 37°C sa enzimom *EaRI* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). Digestirani produkti (*GSTAI*-CC: 400bp, *GSTAI*-CT: 400bp + 308 bp + 92bp and *GSTAI*-TT: 308bp+92 bp) vizualizovani su na *Chemidoc* (*Biorad, Hercules, CA, USA*).

Određivanje *GSTP1* Ile105Val (rs1695) polimorfizma

Polimorfizam *GSTP1* Ile105Val je određivan uz upotrebu *Applied Biosystems TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* eseja (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA, Assay ID: C_3237198_20*). Reakciona mešavina sačinjena od PCR MasterMixa (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) i fluorescentno obeležene probe nanosena je uz pomoć *EppMotion* robota (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) dok su se PCR amplifikacija i očitavanje fluorescence izvodili metodom *real time* PCR-a (*Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*)). Koncentracija i čistoća DNK su određene spektrofotometrijski, korišćenjem *GeneQuantpro* (*Biochrom, Cambridge, England*). Prisustvo *GSTP1IleIle* genotipa se naziva *GSTP1-wild* tip, tok se prisustvo *GSTP1Ile/Val* ili *GSTP1Val/Val* genotipa naziva *GSTP1-varijantni genotip*.

3.5.Statistička analiza

Statistička analiza je uključivala, pored deskriptivne statistike, primenu χ^2 testa za procenu da li se odgovarajući genotipovi nalaze u Hardy-Weinbergovom ekvilibrijumu i determinisanje

značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih genotipova između pripadnika studijske i kontrolne grupe.

Od statističkih testova korišćeni su neparametrijski i parametrijski testovi (hi kvadrat i t-test) u zavisnosti od tipa obeležja. Za procenu veličine efekta (polimorfizam, sredinski faktori rizika) korišćena je univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza, odnosno odnos šansi (OR-*odds ratio*) uz 95% interval poverenja. U analizi podataka su, pored mečovanja, metodom stratifikacije kontrolisani potencijalni konfauding faktori.

Za ispitivanje polnih razlika, koristili smo univarijantnu analizu kovarijanse (ANCOVA), uz kontrolu efekata starosti, adaptivnog ponašanja i ADI-R skorova.

Za analizu polno specifičnih veza između starosti, ADI-R skorova i adaptivnog ponašanja (kako ukupnog skora, tako i podskala), koristili smo Pearson-ov koeficijent korelacije. Za ispitivanje nezavisnih efekata starosti i ADI-R skorova na adaptivno ponašanje u okviru svake polne grupe, primenili smo seriju multivarijantnih linearnih regresija. Moderatorske efekte pola analizirali smo putem makroa PROCESS (za SPSS), koji je zasnovan na “ordinary least square” regresiji (sa bootstrapping intervalima poverenja) u okviru metoda analize putanja (Hayes, 2013).

Korišćena su tri modela binarne logističke regresije da bi se ispitali prediktivni efekti na PSA, sa sledećim setovima prediktora: individualni genotipovi; individualni genotipovi i genotip-genotip interakcije; individualni genotipovi, genotip-genotip interakcije, pušenje majke tokom trudnoće i interakcije genotipova i pušenja tokom trudnoće. Kao mera veličine efekta korišćen je OR (sa intervalom poverenja 95%), procentom tačne klasifikacije i Nagelkerke r^2 . Nivo verovatnoće od $\leq 0,05$ smatran je statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Sociodemografske karakteristike uzorka

Studijska i kontrolna grupa nisu se razlikovale po polu ($X^2=0,144$, $p=0,731$), niti po starosti ($t=-1,562$, $p=0,120$). Studijsku grupu činilo je 113 dece sa poremećajem autističnog spektra (92 muškog i 21 ženskog pola), dok su kontrolnu grupu činila su deca i adolescenti lečeni na Odeljenju za urologiju i ortopediju, kao i zdrave kontrole (95 muškog i 19 ženskog pola). Na tabeli 3. prikazana je distribucija ispitanika po polu i uzrastu u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Tabela 3: Distribucija pola i godina ispitanika

Varijabla	Slučajevi (n=113)	Kontrole (n=114)	t	X ²	p
Starost (godine) X±SD	9,36±5,88	10,62±6,33	-1,562	/	0,120
Pol, n (%)					
Muški	92 (81%)	95 (83%)	/	0,144	0,731
Ženski	21 (19%)	19 (17%)			

4.2. Kliničke karakterističke studijske grupe

Tipični autizam dijagnostikovao je kod 76% dece sa PSA u našem uzorku, dok je atipični autizam dijagnostikovao kod njih 24%. Prosečna vrednost ukupnog skora na WASI skali iznosila je 83,26±17,82. Prosečna vrednost skora ukupnog adaptivnog funkcionisanja (Vineland II) iznosila je 55,47±18,87. U tabeli 4. date su prosečne vrednosti skorova i podskorova za WASI, Vineland II i ADI-R.

Tabela 4. Kliničke karakteristike studijske grupe (intelektualno funkcionisanje, adaptivno funkcionisanje, težina kliničke slike)

Varijabla	X±SD	Varijabla	X±SD	Varijabla	X±SD
Intelektualno funkcionisanje		Adaptivno funkcionisanje		Klinička slika (tri domena)	
WASI block design raw score	19,10±15,58	Vineland II	55,47±18,87	ADI-R curr A	16,08±6,12
WASI block design T score	39,16±11,66	Vineland C	49,09±14,71	ADI-R curr Bv	10,77±3,74
WASI matrix reasoning raw score	14,11±10,52	Vineland DLS	60,91±20,07	ADI-R curr B nonv	8,71±3,46
WASI matrix reasoning T score	38,68±13,41	Vineland S	54,51±14,96	ADI-R curr C	4,88±2,53
WASI performance IQ	83,26±17,82	Vineland MS	73,04±17,57	ADI-R Dg A	21,67±6,01
				ADI-R Dg Bv	16,54±4,92
				ADI-R Dg Bnonv	10,94±2,51
				ADI-R Dg C	5,85±2,59
				ADI-R D	3,02±1,08

WASI block design raw score – slaganje kocaka, sirovi skor

WASI block design T score – slaganje kocaka, ponderisane vrednosti

WASI matrix reasoning raw score – matrice, sirovi skor

WASI matrix reasoning T score – matrice, ponderisane vrednosti

WASI performance IQ - ukupni IQ

ADIR-R skor A: domen socijalnog reciprociteta, curr-sadašnji, dg – dijagnostički algoritam

ADI-R skor B: domen komunikacije (v verbalni, nonv neverbalni); curr-sadašnji, dg – dijagnostički algoritam

ADI-R skor C: restriktivno i repetitivno ponašanje, curr-sadašnji, dg – dijagnostički algoritam

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

Od ukupnog uzorka studijske grupe, 83 je u dosadašnjem toku lečenja hospitalizovano, dok 31 do sada nije hospitalno lečeno. 50% dece sa PSA u trenutku ispitivanja bilo je tretirano farmakoterapijom. Na tabeli 5. prikazana je vrsta primenjene farmakoterapije u studijskoj grupi.

Tabela 5. Prikaz farmakoterapije u studijskoj grupi

Lek – generički naziv	Frekvencija (Broj)	Procenat
ne uzima terapiju	57	50%
Hlorpromazin	3	2,2%
Klozapin	6	5,5%
Na-Valproat	9	7,9%
Haloperidol	5	4,4%
Karbamazepin	1	0,9%
levomepromazin	2	1,8%
risperidon depo	2	1,8%
Risperidon	29	25,5%

4.3. Razlike u odnosu na pol u studijskoj grupi – dijagnoza, klinička slika i adaptivno funkcionisanje

S obzirom na značajnu razliku u prevalenci poremećaja autističnog spektra između osoba muškog i ženskog pola, obavili smo polno specifične analize studijske grupe. Za ovu analizu odabrali smo deo studijske grupe kod koje je bilo procenjeno adaptivno funkcionisanje (neverbalni deo studijske grupe), u cilju procene u kojoj meri pol utiče na manifestaciju kliničke slike u svakodnevnom funkcionisanju.

4.3.1. Polno-specifične karakteristike studijske grupe (godine, dijagnoza, kliničke karakteristike)

Da bismo ispitali polne razlike u dijagnozi, podelili smo učesnike studijske grupe u dve podgrupe – one sa tipičnim autizmom i one sa drugim oblicima autizma (bilo koji drugi pervazivni

razvojni poremećaj, prema ICD-10). Naši rezultati su pokazali da se kod dečaka značajno češće postavlja dijagnoza tipičnog autizma (83%) u odnosu na devojčice (56%).

Nije bilo polnih razlika u sadašnjim ADI-R skorovima, bez i sa kontrolom godina (Tabela 6).

Tabela 6. Polno specifične karakterističke uzorka (godine, dijagnoza i kliničke karakteristike – ADI-R)

Karakteristike	Devojčice (n=25)	Dečaci (n=83)	Test	p	ANCOVA (uz kontrolu godina i Vineland II skora)	
					F (pol)	p
	X(SD) ili frekvencije	X(SD) ili frekvencije	t ili X^2 test			
Starost	6,30 (4,46)	6,86 (4,31)	t=-0,570			
Dijagnoza: autizam/drugo	14/11	69/14	$X^2=7,951$	0,005		
PSA						
ADI-R skor A	18,12 (5,34)	19,59 (5,45)	t=1,187	0,238	0,908	0,343
ADI-R skor B	9,20 (3,069)	9,63 (3,11)	t=0,602	0,548	0,701	0,404
ADI-R skor C	4,28 (2,84)	4,51 (2,11)	t=-0,369	0,715	0,015	0,908

ADIR-R skor A: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam

ADI-R skor B: domen komunikacije, sadašnji algoritam

ADI-R skor C: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam

ANCOVA: univarijatna analiza kovarijanse između dečaka i devojčica, sa starošću i Vineland II skorom kao kovarijatama

Prilikom ispitivanja razlike u adaptivnom funkcionisanju, utvrdili smo više skorove kod devojčica, za Vineland C i Vineland DLS, ali bez postizanja statistički značajne razlike ($p=0,062$) (Tabela 7).

Tabela 7. Polno specifične karakteristike studijske grupe (adaptivno funkcionisanje – Vineland II)

Karakteristike	Devojčice (n=25)	Dečaci (n=83)	Test	p	ANCOVA (uz kontrolu godina i ADI-R skora)	
					F (pol)	P
	X(SD) ili frekvencije	X(SD) ili frekvencije	t ili X ² test			
Vineland II skor	61,40 (14,19)	56,53 (15,05)	-1,436	0,154	1,657	0,201
Vineland – C	53,92 (11,71)	48,67 (12,36)	-1,882	0,063	2,648	0,107
Vineland–DLS	70,80 (18,05)	62,71 (18,94)	-1,892	0,061	3,570	0,062
Vineland – S	57,92 (14,52)	56,73 (12,52)	0,400	0,690	0,098	0,754
Vineland – MS	79,00 (15,51)	73,67 (15,29)	1,312	0,193	0,520	0,473

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

ANCOVA: Univarijantna analiza kovarijanse između dečaka i devojčica, sa starošću i ADI-R skorovima kao kovarijatama.

4.3.2. Polno-specifične korelacije: starost, klinička slika i adaptivno funkcionisanje

U bivarijantnoj analizi korelacije među dečacima, starost je bila značajno, inverzno povezana sa svim Vineland skorovima, sa koeficijentima korelacije od -0,354 (p=0,007) za MS skor do -0,779 (p=0,000) za S skor. Takođe, starost je značajno inverzno povezana sa ADI-R A (r=-0,251; p=0,022) i B skorovima (r=-0,545; p=0,000), dok je sa ADI-R C skorovima pokazana pozitivna korelacija (r=0,483; p=0,000). Među dečacima, ADI-R B skor je bio značajno povezan sa ukupnim Vineland II skorom (r=0,347; p=0,001), DLS (r=0,271; p=0,013) i S skorom (r=0,284; p=0,009) u pozitivnom smeru, dok je ADI-R C skor imao značajne inverzne korelacije sa Vineland II ukupnim (r=-0,493; p=0,000), C (r=-0,414; p=0,000), DLS (r=-0,524; p=0,000), i S skorovima (r=-0,569; p=0,000), kao i granično značajnu inverznu korelaciju sa MS skorom (r=-0,245; p=0,066). ADI-R A skor je značajno korelirao samo sa Vineland MS skorom u inverznom

smeru ($r=-0,331$; $p=0,012$). Kod devojčica, starost je bila značajno inverzno povezana sa svim Vineland II skorovima, sa koeficijentima korelacije od $-0,612$ ($p=0,005$) za MS skor, do $-0,801$ ($p=0,000$) za Vineland ukupni skor, dok nije bilo značajnih asocijacija između starosti i ADI-R skorova. Takođe, ADI-R C skor je granično značajno korelirao sa Vineland C skorom, u negativnom smeru ($r=-0,377$; $p=0,063$).

4.3.3. Polno-specifični linearni regresioni model adaptivnog funkcionisanja

U daljoj analizi, sproveli smo polno specifične modele linearne regresije za svaki Vineland skor, sa starošću i ADI-R skorovima kao prediktorima (Tabela 8.) Kod dečaka, Vineland skorovi su bili značajno određeni regresionim modelom, pokrivajući 63,3% varijanse Vineland ukupnog skora, 39,3% varijanse Vineland C skora, 61,4% varijanse Vineland DLS skora, 68,1% varijanse Vineland S skora, i 24,5% varijanse Vineland MS skora. Starost je bila značajan prediktor svih Vineland skorova među dečacima, sa negativnim smerom povezanosti. ADI-R A skor je bio značajan prediktor za Vineland ukupni skor, DLS i MS skorove, takođe u negativnom smeru. ADI-R C skor je takođe bio značajan negativni prediktor za Vineland DLS i S skorove. ADI-R B skor nije bio značajan prediktor ni za jedan Vineland skor kod dečaka. Kod devojčica, Vineland skorovi su takođe značajno bili određeni regresionim modelom, sem MS skora (zbog malog broja devojčica sa MS skorom – nije računat za mlađe od pet godina). Značajni modeli predikcije pokrivali su 66,7% varijanse Vineland ukupnog skora, 58,5% varijanse Vineland C skora, 59,5% varijanse Vineland DLS skora, i 67,7% varijanse Vineland S skora. Među devojčicama, starost je bila značajan prediktor svih Vineland skorova (čak i MS skora koji nije bio značajno pokriven regresionim modelom), u negativnom smeru. ADI-R C skor je bio značajni prediktor Vineland S skora, i granično značajan ($p=0,059$) za Vineland C skor, u oba slučaja u negativnom smeru ADI-R A skor je bio granično značajan prediktor Vineland S skora ($p=0,063$), ali u pozitivnom smeru.

Kao i kod dečaka, ADI-R B skor nije bio značajan prediktor niti jednog Vineland skora kod devojčica.

Tabela 8. Model linearne regresije adaptivnog funkcionisanja kod dečaka i devojčica, sa starošću i i ADI-R skorovima kao prediktorima (prezentovani su samo značajni prediktori za svaku zavisnu varijablu)

Zavisna varijabla	Dečaci			Devojčice		
	Značajni prediktori (Beta)	R ²	F	Značajni prediktori (Beta koeficijent)	R ²	F
Vineland II ukupni skor	Starost (-0,723***) ADI-R skor A (-0,227*)	0,636	34,126***	Starost (-0,750***)	0,667	10,019**
Vineland C	Starost (-0,607***)	0,393	12,611***	Starost (-0,630**) ADI-R skor C (-0,403 [¥])	0,585	7,057**
Vineland DLS	Starost (-0,704***) ADI-R skor A (-0,218*) ADI-R skor C (-0,167*)	0,614	31,013***	Starost (-0,667**)	0,595	7,352**
Vineland S	Age (-0,755***) ADI-R skor C (-0,214**)	0,681	41,642***	Starost (-0,665***) ADI-R skor A (0,433 [¥]) ADI-R skor C (-0,428*)	0,677	10,488** *
Vineland MS	Starost (-0,315*) ADI-R skor A (-0,370*)	0,245	4,229**	Starost (-0,640*)	0,407	2,402

ADIR-R skor A: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam
 ADI-R skor B: domen komunikacije, sadašnji algoritam
 ADI-R skor C: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam
 Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor
 Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije
 Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština
 Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije
 Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština
 *** <0.001; ** <0.01; * <0.05; [¥] ≤0.07.

Na kraju, ispitivali smo moderatorski efekat pola na povezanost svakog od ADI-R skorova sa Vineland skorovima, kontrolišući druge ADI-R skorove i starost kao kovarijate. Utvrđen je značajan moderatorski efekat pola na vezu ADI-R A skora i Vineland DLS (gde je ADI-R A bio značajni negativni prediktor Vineland DLS samo kod dečaka) i Vineland S skora (gde je ADI-R A bio pozitivan značajni prediktor Vineland DLS samo kod devojčica (Tabela 9).

Tabela 9. Značajni moderatorski efekat pola u uticaju ADI-R na Vineland skorove (sa starošću i druga dva ADI-R skora kao kovarijatama)

Značajno moderirane asocijacije (od prediktora ka ishodu)	Interakcija pola sa ADI-R skorom A B (LLCI-ULCI)	Muški kondicionalni efekat B (LLCI-ULCI)	Ženski kondicionalni efekat B (LLCI-ULCI)
ADI-R skor A prema Vineland-DLS skoru	1,232 (0,138-2,326)*	-0,724 (-1,352—0,095)*	0,508 (-0,600 – 1,622)
ADI-R skor A prema Vineland-S skoru	1,042 (0,352-1,732)**	-0,197 (-0,593-0,199)	0,845 (0,142 – 1,547)*

ADI-R skor A: domen Socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland– S skor: Vineland skala socijalizacije

B: nestandardizovani koeficijent

LLCI / ULCI: donja granica 95% interval poverenja / gornja granica 95% interval poverenja

** <0.01; * <0.05.

4.4. Povezanost genotipova *GSTMI*, *GSTAI*, *GSTTI* i *GSTPI* i razvoja PSA

Prilikom ispitivanja povezanosti GST genotipova i poremećaja autističnog spektra, analize smo vršili kako za pojedinačne genotipove, tako i za njihove kombinacije, odnosno kombinacije genotipova dve različite GST.

4.4.1. Povezanost pojedinačnih genotipova GST i PSA

Analiza Hardy-Weinberg ekvilibrijuma pokazala je da nijedan genotip sem *GSTPI* nije odstupao od očekivane distribucije. Binarna logistička regresija korišćena je da ispita moguću predikciju PSA na osnovu individualnih genotipova. Dobijeni rezultati pokazuju da *GSTMI* *aktivni* genotip smanjuje rizik za PSA (OR=0,554, 95% CI: 0,313–0,983, p=0,044) u odnosu na *GSTMI* *nulti* genotip. Izgleda da polimorfizmi *GSTTI* i *GSTPI* genotipova ne doprinose riziku za PSA. Što se tiče *GSTAI* genotipa, nosioci *GSTAI* *CC* genotipa bili su u povećanom riziku za razvoj PSA (OR=4,132, 95% CI: 1,219–14,012, p=0,023) u poređenju sa nosiocima *GSTAI* *CT* i *GSTAI* *TT* genotipova. Procenat tačne klasifikacije bio je 62,5% sa Nagelkerke $r^2=0,079$ (Tabela 10)

Tabela 10. Individualni GST genotipovi kao prediktori razvoja PSA

Prediktor	Wald	Sig.	OR	95% interval poverenja za OR	
				Donja granica	Gornja granica
<i>GSTM1</i>	4,071	0,044	0,554	0,313	0,983
<i>GSTT1</i>	0,536	0,464	1,270	0,670	2,405
<i>GSTAI – CC</i>	5,186	0,023	4,132	1,219	14,012
<i>GSTAI – CT</i>	1,862	0,172	2,340	0,690	7,934
<i>GSTP1 Ile Ile</i>	1,566	0,211	0,628	0,304	1,301
<i>GSTP1 Val Val</i>	0,974	0,324	0,597	0,215	1,662
<i>Constant</i>	1,396	0,239	0,460		

GSTM1 i GSTT1 su binarne varijable (1 aktivni, 0 nulti), dok GSTAI i GSTP1 svaki imaju tri varijante transformisane u dve „dummy” varijable (1 prisutan, 0 nije prisutan). Delecije GSTM1 i GSTT1 su ispitivane u 112 slučajeva i 108 kontrola. GSTAI polimorfizam je ispitivan u 112 slučajeva i 105 kontrola. GSTP1 Ile105Val polimorfizam je analiziran u 11 slučajeva i 108 kontrola.

4.4.2. Povezanost kombinovanih genotipova GST i PSA

Nakon što smo izračunali individualni efekat, ispitali smo i kombinovani efekat bilo koja dva genotipa (Tabela 11). Takođe je korišćena binarna logistička regresija za ispitivanje moguće predikcije PSA na osnovu individualnih genotipova, kao i svih njihovih interakcija. Zanimljivo je da je efekat svih individualnih genotipova bio neznačajan, dok je nekoliko interakcija bilo značajno. Kombinacija *GSTM1* aktivnog i *GSTT1* aktivnog genotipa smanjuje rizik za PSA (OR=0,126, 95%CI: 0,029–0,547, p=0,006), kao i kombinacija *GSTT1* aktivnog i *GSTP1 IleIle* genotipa (OR=0,170, 95%CI: 0,029–0,992, p=0,049). Sa druge strane, povećani rizik za PSA primećen je i u kombinaciji kada je *GSTM1* aktivni i *GSTP1 llelle* genotip prisutan (OR=11,088, 95%CI: 1,745–70,456, p=0,011). Druge interakcije genotipova nisu prešle nivo statističke značajnosti. Procenat tačne klasifikacije je donekle povećan u odnosu na efekat individualnih genotipova (65,7% sa Nagelkerke $r^2=0,202$).

Tabela 11. Interakcije GST genotipova kao prediktori za PSA (uz kontrolu efekta individualnih genotipova)

Prediktor	Wald	Sig.	OR	95% interval poverenja za OR	
				Donja granica	Gornja granica
<i>GSTMI</i>	0,691	0,406	3,889	0,158	96,461
<i>GSTTI</i>	0,701	0,402	3,684	0,174	77,967
<i>GSTAI-CC</i>	0,720	0,396	4,521	0,139	147,557
<i>GSTAI-CT</i>	0,333	0,564	2,809	0,084	93,736
<i>GSTPI-llelle</i>	0,435	0,509	3,478	0,086	141,015
<i>GSTPI-ValVal</i>	0,000	1,000	5,228	0,000	.
<i>GSTMI*GSTTI</i>	7,653	0,006	0,126	0,029	0,547
<i>GSTMI*GSTMAI-CC</i>	0,204	0,652	0,484	0,021	11,286
<i>GSTMI*GSTMAI-CT</i>	0,365	0,546	0,381	0,017	8,734
<i>GSTMI*GSTPI-llelle</i>	6,503	0,011	11,088	1,745	70,456
<i>GSTMI*GSTPI-ValVal</i>	0,066	0,798	1,371	0,123	15,289
<i>GSTTI*GSTAI-CC</i>	0,049	0,825	1,411	0,067	29,733
<i>GSTTI*GSTAI-CT</i>	0,042	0,838	1,378	0,064	29,733
<i>GSTTI*GSTPI-llelle</i>	3,877	0,049	0,170	0,029	0,992
<i>GSTTI*GSTPI-ValVal</i>	0,000	0,999	0,000	0,000	.
<i>GSTAI-CC*GSTPI-llelle</i>	0,416	0,519	0,296	0,007	11,956
<i>GSTAI-CC*GSTPI-ValVal</i>	0,000	0,999	3,263E8	0,000	.
<i>GSTAI-CT*GSTPI-llelle</i>	0,436	0,509	0,287	0,007	11,663
<i>GSTAI-CT*GSTPI-ValVal</i>	0,000	0,999	6,062E8	0,000	.
<i>Constant</i>	0,866	0,352	0,195		

GSTMI i GSTTI su binarne varijable (1 aktivni, 0 nulti), dok GSTAI i GSTPI svaki imaju tri varijante transformisane u dve „dummy” varijable (1 prisutan, 0 nije prisutan).

4.5. Povezanost perinatalnih komplikacija i razvoja poremećaja autističnog spektra

U okviru perinatalnih komplikacija, postojanje perinatalne komplikacije uopšte bilo je značajno češće u grupi slučajeva nego u grupi kontrola (OR=9,415; CI: 4,870-18,203, p=0,000). Prilikom ispitivanja pojedinačnih perinatalnih komplikacija, pokazano je da su u grupi slučajeva značajno češće bile zastupljene nedonesenost (OR=11,42; CI: 2,586-50,455, p=0,001), neonatalna žutica (OR=8,774; CI: 4,11-18,725, p=0,000) i sindrom respiratornog distresa (OR=4,835; CI: 1,018-22,957, p=0,047). Razlika u učestalosti između slučajeva i kontrola nije pokazana kao značajna za nisku težinu na rođenju, perinatalnu asfiksiju, intrakranijalnu hemoragiju, neonatalne

konvulzije, kao i za sistemske neonatalne infekcije, iako su ove komplikacije bile češće zastupljene u grupi slučajeva. Rezultati su prikazani u tabeli 12.

Tabela 12. Povezanost perinatalnih komplikacija i razvoja PSA

Varijabla	Slučajevi	Kontrole	X²	p	OR	p
Perinatalna komplikacija	Da 67(65,0%) Ne 36(35,0%)	Da 17(16,5%) Ne 86(83,5%)	50,254	0,000	9,415; CI: 4,870-18,203	0,000
Prematurus	Da 19(18,4%) Ne 84(81,6%)	Da 2 (1,9%) Ne 101(98,1%)	15,324	0,000	11,42; CI: 2,586-50,455	0,001
Niska težina na rođenju (manje od 2800gr)	Da 11(10,7%) Ne 92(89,3%)	Da 6(5,8%) Ne 97(94,2%)	1,603	0,205	1,933; CI: 0,687-5,440	0,212
Prenesenost (preko 42 nedelje gestacije)	Da 1(1,0%) Ne 102(99,0%)	Da 1 (1,0%) Ne 102 (99,0%)	0,000	1,000	/	/
Perinatalna asfiksija	Da 4 (3,9%) Ne 99(96,1%)	Da 1 (1,0%) Ne 102 (99,0%)	1,845	0,369	4,121; CI: 0,453-37,518	0,209
Intrakranijalna hemoragija	Da 6(5,8%) Ne 97(94,2%)	Da 2(1,90%) Ne 101(98,1%)	2,081	0,279	3,124; CI: 0,615-15,85	0,169
Neonatalna žutica	Da 50 (48,5%) Ne 53 (51,5%)	Da 10 (9,7%) Ne 93 (90,3%)	37,626	0,000	8,774; CI: 4,11-18,725	0,000
Sindrom respiratornog distresa	Da 9 (8,7%) Ne 94 (91,3%)	Da 2 (1,9%) Ne 101 (98,1%)	4,706	0,030	4,835; CI: 1,018-22,957	0,047
Neonatalne konvulzije	Da 3 (2,9%) Ne 100 (97,1%)	Da 0 (0,0%) Ne 103 (100%)	3,044	0,246		
Sistemske neonatalne infekcije	Da 2 (1,9%) Ne 101 (98,1%)	Da 0 (0,0%) Ne 103 (100%)	2,020	0,498		

4.6. Povezanost izloženosti faktorima okoline u trudnoći i rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra

Kada su u pitanju faktori rizika tokom trudnoće, kao značajni izdvojili su se uzimanje medikamenata tokom trudnoće (uopšte OR=2,413; CI: 1,35-4,32, p=0,03), potom uzimanje tokolitika tokom trudnoće (OR=2,47; CI: 1,098-5,55, p=0,029), infekcija tokom trudnoće ($X^2=6,495$, p=0,012) i preeklampsija (p=0,029). Ni u grupi slučajeva ni u grupi kontrola nije prijavljeno da je majka imala sistemske infekcije u trudnoći (toksoplazma, rubeola, CMV, AIDS), kao ni da je majka imala dijabetes. Samo je jedna majka iz kontrolne grupe imala konvulzije tokom trudnoće. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Izloženost sredinskim faktorima u trudnoći i rizik za razvoj PSA

Varijabla	Slučajevi	Kontrole	X ²	P	OR	p
Infekcija tokom trudnoće	Ne 93 (93,9%) Da 6 (6,1%)	Ne 104 (100%) Da (0%)	6,495	0,012		
Korišćenje lekova tokom trudnoće	Ne 54(52,9%) Da 48 (47,1%)	Ne 76 (73,1%) Da 28 (36,8%)	8,968	0,03	OR=2,413; CI: 1,35-4,32	0,03
Tokolitik tokom trudnoće	Da 21 (20,8%) Ne 80 (79,2%)	Da 10 (9,6%) Ne 94 (90,4%)	4,987	0,026	OR=2,467; CI: 1,098-5,546	0,029
Progesteron tokom trudnoće	Da 18 (17,6%) Ne 84 (82,4%)	Da 12 (11,5%) Ne 92 (88,5%)	1,544	0,214		
Anksiolitik tokom trudnoće	Da 4(3,9%) Ne 98 (96,1%)	Da 2 (1,9%) Ne 102 (98,1%)	0,727	0,443		
Antibiotik tokom trudnoće	Da 8 (7,8%) Ne 94 (92,2%)	Da 6 (5,8%) Ne 98 (94,2%)	0,350	0,554		
Hronična bolest tokom trudnoće	Da 11(11,5%) Ne 85 (88,5%)	Da 8 (7,7%) Ne 96 (92,3%)	0,824	0,364		
Preeklampsija	Da 6 (5,8%) Ne 97 (94,2%)	Da 0 (0,0) Ne 103 (100%)	6,180	0,029		

4.7. Povezanost familijalnih faktora i rizika za razvoj PSA (parentalna starost i obrazovanje, redosled rođenja deteta, razmak između trudnoća)

Između grupe slučajeva i kontrola nije bilo razlika u starosti majke ($p=0,465$), niti u stručnoj spremi majke ($p=0,100$). Takođe, ove dve grupe se nisu razlikovale po paritetu, kao ni po razmaku između prethodne i aktuelne trudnoća ($p=0,548$ i $0,296$). Takođe, nije bilo razlika ni u starosti i stručnoj spremi oca ($p=0,159$ i $0,793$) (Tabela 14).

Tabela 14. Osnovne karakteristike dece i njihovih roditelja u grupi slučajeva i kontrola

Varijabla	Slučajevi (n=113)	Kontrole (n=114)	t	X ²	P
Starost deteta (godine) X±SD	9,36±5,88	10,62±6,33	-1,562	/	0,120
Pol deteta n(%)					
Muški	92 (81)	95 (83)	/	0,144	0,731
Ženski	21 (19)	19 (17)			
Starost majke prilikom porodaja	28,45±4,79	27,93±5,42	0,731	/	0,465
Paritet					
<i>Prva trudnoća</i>	45 (46,4)	50 (48,5)	/	2,118	0,548
<i>Druga trudnoća</i>	38 (39,2)	40 (38,8)			
<i>Treća trudnoća</i>	10 (10,3)	12 (11,7)			
<i>Nakon treće trudnoće</i>	4 (4,1)	1 (1)			
Razmak između prethodne i aktuelne trudnoće	3,86±3,12	4,52±3,33	-1,051	/	0,296
Stručna sprema majke					
<i>OŠ</i>	10 (9,9)	5 (4,9)	/	4,602	0,100
<i>SŠ</i>	43 (42,6)	58 (56,3)			
<i>Više od SŠ</i>	48 (47,5)	40 (38,8)			
Starost oca prilikom rođenja deteta	32,93±6,32	31,69±6,12	1,415	/	0,159
Stručna sprema oca					
<i>OŠ</i>	8 (8,1)	8 (7,8)	/	0,464	0,793
<i>SŠ</i>	57 (57,6)	64 (62,1)			
<i>Više od SŠ</i>	34 (34,3)	31 (30,1)			
Pušenje majke u trudnoći					
DA	30 (30,6)	23 (22,3)	/	1,774	0,203
NE	68 (69,4)	80 (77,7)			

4.8. Interakcija gena (polimorfizmi GST) i okoline (perinatalni faktori) – model oksidativnog stresa u razvoju autizma

Da bismo utvrdili postojanje potencijalnog udruženog delovanja pojedinih genotipova GST i perinatalnih okolinskih faktora na razvoj PSA, izvršili smo podelu osoba u studijskoj i kontrolnoj grupi na one koji su nosioci nereferentnog genotipa i koji su izloženi određenom faktoru okoline, odnosno na one koji su nosioci referentnog genotipa i koji nisu bili izloženi datom faktoru. U analizu smo uključili one faktore za koje je pokazan značajan rizik u primarnoj analizi, i to one za koje se može teoretski pretpostaviti povezanost sa oksidativnim stresom - uzimanje tokolitika tokom trudnoće i neonatalnu žuticu. U oba slučaja ispitivali smo razliku povezanosti kod onih osoba koje su pod najvećim rizikom (rizični genotip + izloženost) u odnosu na one pod najmanjim rizikom (protektivni genotip + izostanak izloženosti). Interakcije za ova dva faktora ispitivali smo za sve četiri GST.

Osobe koje su imale *GSTM1 nulti* genotip, a čija majka je uzimala tokolitike u trudnoći imali su 2,47 puta veći rizik za razvoj autizma ($p=0,029$). Nosioци rizičnog *GSTAI CC* genotipa sa istom izloženošću imali su 16 puta veći rizik za razvoj autizma od nosilaca nerizičnog genotipa koji nisu bili izloženi ($p=0,009$). Takođe, nosioci *GSTP1 varijantnog* genotipa koji su bili prenatalno izloženi tokoliticima imali su 3,876 puta veći rizik ($p=0,016$). Kada smo ispitivali interakciju rizičnog genotipa i izloženosti u smislu neonatalne žutice, za sve četiri GST izloženi nosioci rizičnog genotipa imali su veći rizik za razvoj PSA od neizloženih nosilaca nerizičnih genotipa. Za *GSTM1 nulti* genotip rizik je iznosio 15 ($p<0,001$), za *GSTT1nulti* genotip rizik je bio 4,632 ($p=0,015$), za izložene nosioce *GSTAI CC* genotipa rizik je bio 4,443 puta veći ($p=0,006$), dok je za izložene nosioce *GSTP1 varijantnog* genotipa on iznosio 15,898 ($p<0,001$). Rezultati su prikazani na tabeli 15.

Tabela 15. Udruženi efekat genotipova *GST* i izloženosti perinatalnim okolinskim faktorima i rizik za razvoj PSA

<i>GST</i> genotipovi	Slučajevi N	Kontrole N	OR (95%CI) ^e	p- vrednost
Tokolitici				
<i>GSTM1</i> vs tokolitici				
<i>GSTM1</i> -aktivni ^a /NE	33	14	1,00	
<i>GSTM1</i> -nulti ^b /DA	43	2	2,467 (1,098-5,546)	0,029
<i>GSTT1</i> vs tokolitici				
<i>GSTT1</i> -aktivni ^a /NE	56	60	-	-
<i>GSTT1</i> -nulti ^b /DA	3	0	-	-
<i>GSTAI</i> vs tokolitici				
<i>GSTAI</i> CT+TT ^c /NE	36	48	1,00	
<i>GSTAI</i> CC ^d /DA	12	1	16,00 (1,988-128,747)	0,009
<i>GSTP1</i> vs tokolitici				
<i>GSTP1</i> referentni ^e /NE	14	20	1,00	
<i>GSTP1</i> varijantni ^f /DA	19	7	3,876 (1,286-11,686)	0,016
Neonatalna žutica				
<i>GSTM1</i> vs neonatalna žutica				
<i>GSTM1</i> -aktivni/NE	22	45	1,00	
<i>GSTM1</i> -nulti/DA	31	4	15,00 (4,97-50,53)	<0,001
<i>GSTT1</i> vs neonatalna žutica				
<i>GSTT1</i> -aktivni/NE	34	63	1,00	
<i>GSTT1</i> -nulti/DA	10	4	4,632 (1,351-15,884)	0,015
<i>GSTAI</i> vs neonatalna žutica				
<i>GSTAI</i> CT+TT /NE	25	35	1,00	
<i>GSTAI</i> CC /DA	19	6	4,443 (1,549-12,689)	0,006
<i>GSTP1</i> vs neonatalna žutica				
<i>GSTP1</i> referentni /NE	7	19	1,00	
<i>GSTP1</i> varijantni /DA	41	7	15,898 (4,883-51,76)	<0,001

^aAktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan;

^bNulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan;

^cSmanjene aktivnosti, ako je barem jedan T alel prisutan;

^d Aktivni, ako su oba C alela prisutna;

^eReferentni, ako je barem jedan *Ile* alel prisutan;

^fVarijantni, ako su oba *Val* alela prisutna

OR, odnos šansi (*eng. odds ratio*); CI, interval poverenja (*eng. confidence interval*)

Takođe, ispitivan je i efekat pušenja majke tokom trudnoće u odnosu na GST genotip (Tabela 16). Binarnom logističkom regresijom ispitali smo potencijalnu predikciju ASD na odnosu individualnih genotipova, njihovih interakcija, kao i interakcija sa izloženošću pušenju majke tokom trudnoće. Kao i u prethodnim analizama, svi individualni efekti genotipova bili su bez značajnosti, dok su iste interakcije ostale značajne. Kombinacija *GSTM1* aktivnog i *GSTT1* aktivnog genotipa smanjivala je rizik za PSA (OR=0,152, 95%CI: 0,029–0,784, p=0,024), kao i kombinacija *GSTT1* aktivnog i *GSTP1* llike (OR=0,117, 95%CI: 0,015–0,938, p=0,043), dok je kombinacija *GSTM1* aktivnog i *GSTP1* llike povećavala rizik za PSA (OR=27,136, 95%CI: 3,424–215,054, p=0,002). Druge interakcije genotipova nisu prelazile nivo statističke značajnosti. Najznačajniji nalaz je da ni pušenje majke tokom trudnoće samo po sebi, niti njegova interakcije sa genotipovima nije imalo statistički značajan efekat na rizik za razvoj PSA. Procenat tačne klasifikacije bio je sličan kao u prethodnoj analizi koja je uključivala sve efekte sem pušenja tokom trudnoće (66,3% sa Nagelkerke $r^2=0,270$).

Tabela 16. Pušenje tokom trudnoće i interakcije sa GST genotipovima kao prediktori razvoja PSA (uz kontrolu individualnog efekta genotipova i genotip-genotip interakcija)

Prediktor	Wald	Sig.	OR	95% interval poverenja za OR	
				Donja granica	Gornja granica
<i>GSTM1</i>	0,063	0,802	1,646	0,033	81,028
<i>GSTT1</i>	0,000	0,999	6,745E9	0,000	.
<i>GSTAI-CC</i>	0,000	0,999	5,290E9	0,000	.
<i>GSTAI-CT</i>	0,000	0,999	3,300E9	0,000	.
<i>GSTP1-llelle</i>	0,898	0,343	8,549	,101	723,627
<i>GSTP1-ValVal</i>	0,000	1,000	0,000	0,000	.
<i>GSTM1*GSTT1</i>	5,063	0,024	0,152	0,029	0,784
<i>GSTM1*GSTMAI-CC</i>	0,081	0,776	0,580	0,014	24,696
<i>GSTM1*GSTMAI-CT</i>	0,104	0,747	0,541	0,013	22,566
<i>GSTM1*GSTP1-llelle</i>	9,768	0,002	27,136	0,182	215,054
<i>GSTM1*GSTP1-ValVal</i>	0,418	0,518	2,312	0,182	29,365
<i>GSTT1*GSTAI-CC</i>	0,000	0,999	0,000	0,000	.
<i>GSTT1*GSTAI-CT</i>	0,000	0,999	0,000	0,000	.
<i>GSTT1*GSTP1-llelle</i>	4,082	0,043	0,117	0,015	0,938
<i>GSTT1*GSTP1-ValVal</i>	0,000	1,000	0,000	0,000	.
<i>GSTAI-CC*GSTP1-llelle</i>	0,904	0,342	0,126	0,002	9,013
<i>GSTAI-CC*GSTP1-ValVal</i>	0,000	0,999	1,746E27	0,000	.
<i>GSTAI-CT*GSTP1-llelle</i>	1,684	0,194	0,058	0,001	4,298
<i>GSTAI-CT*GSTP1-ValVal</i>	0,000	0,999	1,746E27	0,000	.
<i>Pušač</i>	0,000	0,999	3,284E18	0,000	.
<i>GSTM1*pušač</i>	0,623	0,430	2,015	0,354	11,481
<i>GSTT1*pušač</i>	0,232	0,630	0,659	0,120	3,603
<i>GSTAI-CC*pušač</i>	0,000	0,999	0,000	0,000	.
<i>GSTAI-CT*pušač</i>	0,000	0,999	0,000	0,000	.
<i>GSTP1-llelle*pušač</i>	0,012	0,911	1,143	0,109	12,038
<i>GSTP1-ValVal*pušač</i>	0,262	0,609	2,177	0,111	42,861
<i>Constant</i>	0,000	0,999	0,000		

GSTM1 i GSTT1 su binarne varijable (1 aktivni, 0 nulti), dok GSTAI i GSTP1 svaki imaju tri varijante transformisane u dve „dummy” varijable (1 prisutan, 0 nije prisutan).

4.9. Povezanost genotipova GST sa karakteristikama kliničke slike

U ovoj analizi ispitivali smo povezanost genotipova GST sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja (WASI i Vineland II), sa merom težine kliničke slike (ADI-R), sa vrstom dijagnoze (tipični vs atipični autizam), kao i vrstom razvoja govora. Pored toga, ispitivali smo povezanost genotipova GST sa anamnezom konvulzija tokom života, odnosno postojanja komorbiditeta epilepsije.

4.9.1. Povezanost genotipova i karakteristika kliničke slike

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTAI* genotipa sa merama intelektualnog funkcionisanja (WASI) nisu pokazane statistički značajne korelacije. U ovoj grupi nije bilo nosilaca *TT* genotipa, te su analize rađene između dve grupe (*CC* i *CT* genotip).

U slučaju grupe osoba kod kojih je primenjen VINELAND, bilo je osoba sa sva tri *GSTAI* genotipa. Samo granično statistički značajna povezanost pokazana je između *GSTAI* genotipa i VINELAND podskora za svakodnevne životne veštine ($p=0,056$). Prilikom post hoc analize sa Bonferroni korekcijom, nisu preostale statistički značajne povezanosti između pojedinih genotipova *GSTAI* i skorova adaptivnog funkcionisanja (Tabela 17). Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTAI* genotipa sa skorovima kliničke slike, pokazana je granična značajnost za trenutni skor socijalnog reciprociteta ($p=0,061$). Nakon što je izvršena Bonferronijeva korekcija, marginalna značajnost je perzistirala između *CT* i *TT* genotipa ($p=0,055$), pri čemu su osobe sa *TT* genotipom imale najviše skorove, što znači najteže simptome odnosno kliničku sliku. Granična značajnost ($p=0,053$) pokazana je i za dijagnostički B nonverbal skor, odnosno skor komunikacije. Nakon Bonferronijeve korekcije, nije pokazana statistička značajnost. I pored toga,

postoji trend da najniže skorove odnosno najblažu kliničku sliku imaju *CC* nosioci, dok najviše skorove odnosno najtežu kliničku sliku imaju nosioci *TT* genotipa (Tabela 18).

Tabela 17. Povezanost *GSTAI* genotipa i kliničke slike (intelektualno i adaptivno funkcionisanje)

	Genotip	X	SD	ANOVA	
				F	p
WASI block design raw score	<i>CC</i>	21,00	21,87	1,773	0,201
	<i>CT</i>	9,56	14,34		
WASI block design T score	<i>CC</i>	41,00	13,57	0,512	0,484
	<i>CT</i>	37,11	9,48		
Matrix reasoning raw score	<i>CC</i>	16,50	10,97	1,099	0,309
	<i>CT</i>	11,44	9,94		
Matrix reasoning T score	<i>CC</i>	38,90	13,88	0,005	0,944
	<i>CT</i>	38,44	13,71		
IQ	<i>CC</i>	85,10	20,20	0,214	0,649
	<i>CT</i>	81,22	15,72		
Vineland II	<i>CC</i>	58,51	20,32	1,684	0,192
	<i>CT</i>	50,78	15,16		
	<i>TT</i>	57,00	23,99		
Vineland C	<i>CC</i>	52,82	15,66	2,238	0,113
	<i>CT</i>	45,88	13,28		
	<i>TT</i>	41,25	7,37		
Vineland DLS	<i>CC</i>	65,25	20,56	2,977	0,056*
	<i>CT</i>	56,03	18,21		
	<i>TT</i>	49,00	16,97		
Vineland S	<i>CC</i>	57,65	15,33	2,517	0,087*
	<i>CT</i>	50,62	14,49		
	<i>TT</i>	49,00	7,43		
Vineland MS	<i>CC</i>	72,83	17,18	0,454	0,638
	<i>CT</i>	73,33	19,23		
	<i>TT</i>	56,00			

CT, TT - Smanjene aktivnosti, ako je barem jedan T alel prisutan;

CC - Aktivni, ako su oba C alela prisutna ;

WASI block design raw score – slaganje kocaka, sirovi skor

WASI block design T score – slaganje kocaka, ponderisane vrednosti

WASI matrix reasoning raw score – matrice, sirovi skor

WASI matrix reasoning T score – matrice, ponderisane vrednosti

WASI performance IQ - ukupni IQ

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

Tabela 18. Povezanost *GSTAI* genotipa i karakteristika kliničke slike – ADI-R

	Genotip	X	SD	ANOVA	
				F	P
ADI-R A curr	CC	16,08	5,98	2,866	0,061*
	CT	15,42	6,31		
	TT	23,00	3,92		
ADI-R Bv curr	CC	11,70	4,01	3,046	0,09
	CT	9,53	3,04		
	TT	10,77	3,74		
ADI-R Bnonv curr	CC	8,26	3,52	0,859	0,428
	CT	9,03	3,48		
	TT	10,25	3,09		
ADI-R C curr	CC	4,88	2,79	0,139	0,871
	CT	4,80	2,28		
	TT	5,50	1,00		
ADI-R A dg	CC	21,00	5,86	2,215	0,114
	CT	22,00	6,26		
	TT	27,25	1,50		
ADI-R B v dg	CC	17,00	4,72	0,395	0,534
	CT	15,93	5,28		
ADI-R B nonv dg	CC	10,28	2,57	3,064	0,053*
	CT	11,50	2,33		
	TT	12,50	1,91		
ADI-R C dg	CC	6,17	2,88	1,559	0,215
	CT	5,36	2,25		
	TT	7,00	2,16		
ADI-R D	CC	3,00	0,98	0,061	0,940
	CT	3,08	1,24		
	TT	3,03	0,00		

CT, TT - Smanjene aktivnosti, ako je barem jedan T alel prisutan;

CC - Aktivni, ako su oba C alela prisutna

ADIR-R skor A curr: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam; ADI-R skor Bv curr : domen komunikacije verbalni, sadašnji algoritam; ADI-R skor Bnonv curr: domen komunikacije neverbalni, sadašnji algoritam; ADI-R skor Ccurr: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam; ADI-R skor A dg: domen socijalnog reciprociteta, dijagnostički algoritam; ADI-R skor Bv dg: domen komunikacije verbalni, dijagnostički algoritam; ADI-R skor Bnonv dg: domena komunikacije neverbalni, dijagnostički algoritam; ADI-R skor C dg: restriktivno i repetitivno ponašanje, dijagnostički algoritam; ADIR skor D: dijagnostički skor

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTM1* genotipa sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja, nisu dobijene statistički značajne korelacije. Granična korelacija dobijane je u slučaju skora komunikacije na Vineland-u, i to tako da su osobe sa PSA imale više skorove – bolje adaptivno funkcionisanje ukoliko su imale aktivni *GSTM1* genotip (Tabela 19).

Tabela 19. Povezanost *GSTM1* genotipa i kliničke slike – intelektualno i adaptivno funkcionisanje

	Genotip	X	SD	ANOVA	
				F	P
WASI block design raw score	<i>Aktivni</i> ^a	14,44	23,27	0,057	0,814
	<i>Nulti</i> ^b	16,60	15,69		
WASI block design T score	<i>Aktivni</i>	37,78	13,78	0,229	0,638
	<i>Nulti</i>	40,40	9,98		
Matrix reasoning raw score	<i>Aktivni</i>	10,56	10,92	2,060	0,169
	<i>Nulti</i>	17,30	9,57		
Matrix reasoning T score	<i>Aktivni</i>	35,89	16,07	0,732	0,404
	<i>Nulti</i>	41,20	10,75		
IQ	<i>Aktivni</i>	80,44	21,92	0,413	0,529
	<i>Nulti</i>	85,80	13,90		
Vineland II	<i>Aktivni</i>	58,89	22,01	1,791	0,184
	<i>Nulti</i>	53,38	16,32		
Vineland C	<i>Aktivni</i>	52,54	16,33	3,141	0,080
	<i>Nulti</i>	46,87	14,83		
Vineland DLS	<i>Aktivni</i>	62,63	20,21	0,331	0,566
	<i>Nulti</i>	61,11	20,05		
Vineland S	<i>Aktivni</i>	55,37	14,77	0,127	0,723
	<i>Nulti</i>	54,67	15,39		
Vineland MS	<i>Aktivni</i>	70,29	18,67	0,646	0,426
	<i>Nulti</i>	74,36	17,49		

^aAktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan;

^bNulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan;

WASI block design raw score – slaganje kocaka, sirovi skor

WASI block design T score – slaganje kocaka, ponderisane vrednosti

WASI matrix reasoning raw score – matrice, sirovi skor

WASI matrix reasoning T score – matrice, ponderisane vrednosti

WASI performance IQ - ukupni IQ

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTMI* genotipa sa skorovima težine kliničke slike u okviru tri domena poremećaja autističnog spektra, nije bilo statističke značajnosti (Tabela 20).

Tabela 20. Povezanost *GSTMI* genotipa i karakteristika kliničke slike – ADIR

	Genotip	Mean	SD	ANOVA	
				F	P
ADI-R A current	<i>Aktivni</i> ^a	15,84	6,22	0,094	0,759
	<i>Nulti</i> ^b	16,21	6,18		
ADI-R B v current	<i>Aktivni</i>	11,47	4,52	1,159	0,289
	<i>Nulti</i>	10,11	2,81		
ADIR-R B nonv curr	<i>Aktivni</i>	8,53	3,31	0,66	0,798
	<i>Nulti</i>	8,75	3,62		
ADIR-R C curr	<i>Aktivni</i>	5,27	2,71	1,817	0,180
	<i>Nulti</i>	4,61	2,41		
ADI-R A dg	<i>Aktivni</i>	21,87	5,53	0,115	0,735
	<i>Nulti</i>	21,47	6,37		
ADI-R B v dg	<i>Aktivni</i>	16,24	4,97	0,126	0,725
	<i>Nulti</i>	16,83	5,01		
ADI-R B nonv dg	<i>Aktivni</i>	10,68	2,55	0,282	0,595
	<i>Nulti</i>	11,00	2,52		
ADI-R C dg	<i>Aktivni</i>	6,05	2,60	0,401	0,528
	<i>Nulti</i>	5,71	2,64		
ADI-R D	<i>Aktivni</i>	3,10	1,13	0,286	0,594
	<i>Nulti</i>	2,98	1,03		

^aAktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan;

^bNulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan;

ADIR-R skor A curr: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam

ADI-R skor Bv curr : domen komunikacije verbalni, sadašnji algoritam

ADI-R skor Bnonv curr: domen komunikacije neverbalni, sadašnji algoritam

ADI-R skor Ccurr: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam

ADI-R skor A dg: domen socijalnog reciprociteta, dijagnostički algoritam

ADI-R skor Bv dg: domen komunikacije verbalni, dijagnostički algoritam

ADI-R skor Bnonv dg: domena komunikacije neverbalni, dijagnostički algoritam

ADI-R skor C dg: restriktivno i repetitivno ponašanje, dijagnostički algoritam

ADIR skor D: dijagnostički skor

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTPI* genotipa sa merama intelektualnog funkcionisanja (WASI), dobijene su značajne korelacije za matrix reasoning raw i T skor, kao i za ukupan IQ skor ($p=0,034$, $0,014$ i $0,039$). Na svakom od podskorova WASI skale, uočljiv je trend, u okviru kojeg nosioci *IleIle* genotipa imaju najviši skor, *IleVal* genotipa nešto niži, a *ValVal* genotipa najniži skor. Nakon Bonferronijeve korekcije, u post-hoc analizi, preostale su sledeće značajne razlike: za matrix reasoning raw score ostala je statistička značajnost $0,035$ između *IleIle* i *IleVal* genotipa, pri čemu nosioci *IleIle* genotipa pokazuju više skorove (bolje intelektualno funkcionisanje). Takođe, značajna razlika pokazana je za skor matrix reasoning T, i to između *IleIle* i *IleVal* genotipa ($p=0,028$), kao i između *IleIle* i *ValVal* genotipa ($p=0,026$), gde su takođe nosioci *IleIle* genotipa imali najviše skorove. U slučaju ukupnog IQ skora, pokazana je statistički značajna razlika ($p=0,039$) između *IleIle* i *ValVal* genotipa, u kojoj su nosioci *IleIle* genotipa imali značajno više ukupne skorove intelektualnog funkcionisanja, odnosno *IleIle* genotip se pokazao kao protektivan.

Interesantno je da kod osoba kod kojih je mereno adaptivno funkcionisanje (Vineland II), nije pokazana statistički značajna korelacija genotipa i vrednosti skorova, ni u ukupnom ni u slučaju pojedinačnih podskorova. I ovde je primetan trend da nosioci *IleIle* genotipa imaju najviše skorove, ali bez statističke značajnosti. Osobe sa PSA kojima je mereno adaptivno, a ne intelektualno funkcionisanje su a priori osobe sa nižom funkcionalnošću – ovaj test je meren kod osoba koje nisu razvile govor. Rezultati su prikazani na tabeli 21.

Tabela 21. Povezanost *GSTPI* genotipa i klinička slika – intelektualno i adaptivno funkcionisanje

	Genotip	Mean	SD	ANOVA	
				F	p
WASI block design raw score	<i>IleIle</i>	26,67	20,50	0,757	0,486
	<i>IleVal</i>	15,77	20,23		
	<i>ValVal</i>	5,00	2,83		
WASI block design T score	<i>IleIle</i>	47,00	6,93	2,797	0,093
	<i>IleVal</i>	40,46	11,47		
	<i>ValVal</i>	24,50	3,54		
Matrix reasoning raw score	<i>IleIle</i>	28,33	4,62	4,265	0,034
	<i>IleVal</i>	12,23	8,98		
	<i>ValVal</i>	11,50	12,03		
Matrix reasoning T score	<i>IleIle</i>	57,33	3,06	5,719	0,014
	<i>IleVal</i>	37,31	11,13		
	<i>ValVal</i>	28,50	12,02		
IQ	<i>IleIle</i>	102,67	3,51	4,076	0,039
	<i>IleVal</i>	83,38	16,36		
	<i>ValVal</i>	64,00	12,73		
Vineland II	<i>IleIle</i>	59,75	11,93	0,491	0,614
	<i>IleVal</i>	54,53	20,45		
	<i>ValVal</i>	56,40	15,96		
Vineland C	<i>IleIle</i>	54,25	10,29	1,196	0,308
	<i>IleVal</i>	47,88	15,83		
	<i>ValVal</i>	49,60	11,37		
Vineland DLS	<i>IleIle</i>	66,69	17,34	0,906	0,408
	<i>IleVal</i>	59,50	20,67		
	<i>ValVal</i>	64,60	19,76		
Vineland S	<i>IleIle</i>	61,31	12,13	1,980	0,145
	<i>IleVal</i>	53,29	14,67		
	<i>ValVal</i>	51,60	25,79		
Vineland MS	<i>IleIle</i>	76,22	19,08	0,407	0,688
	<i>IleVal</i>	71,32	10,50		
	<i>ValVal</i>	77,67	17,49		

WASI block design raw score – slaganje kocaka, sirovi skor

WASI block design T score – slaganje kocaka, ponderisane vrednosti

WASI matrix reasoning raw score – matrice, sirovi skor

WASI matrix reasoning T score – matrice, ponderisane vrednosti

WASI performance IQ - ukupni IQ

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTP1* genotipa sa karakteristikama kliničke slike (ADI-R) nije pokazana značajnost ni za jedan skor (Tabela 22).

Tabela 22. Povezanost *GSTP1* genotipa i karakteristike kliničke slike – ADI-R

	Genotip	Mean	SD	ANOVA	
				F	p
ADI-R A curr	<i>IleIle</i>	15,95	6,35	0,638	0,531
	<i>IleVal</i>	16,34	6,18		
	<i>ValVal</i>	13,75	6,29		
ADI-R B v curr	<i>IleIle</i>	9,00	4,08	2,459	0,102
	<i>IleVal</i>	11,42	3,39		
	<i>ValVal</i>	7,67	2,51		
ADI-R B nonv curr	<i>IleIle</i>	9,42	1,93	0,995	0,375
	<i>IleVal</i>	8,68	3,64		
	<i>ValVal</i>	6,80	4,44		
ADI-R C curr	<i>IleIle</i>	4,31	2,63	0,541	0,584
	<i>IleVal</i>	4,99	2,52		
	<i>ValVal</i>	4,75	2,87		
ADI-R A dg	<i>IleIle</i>	20,05	5,34	1,426	0,245
	<i>IleVal</i>	22,11	5,93		
	<i>ValVal</i>	19,50	7,84		
ADI-R B v dg	<i>IleIle</i>	14,57	5,62	0,633	0,538
	<i>IleVal</i>	16,75	4,76		
	<i>ValVal</i>	17,67	5,13		
ADI-R B nonv dg	<i>IleIle</i>	11,00	2,09	0,325	0,723
	<i>IleVal</i>	10,93	2,65		
	<i>ValVal</i>	10,00	2,12		
ADI-R C dg	<i>IleIle</i>	5,23	3,13	1,045	0,355
	<i>IleVal</i>	5,87	2,42		
	<i>ValVal</i>	7,00	3,52		
ADI-R D	<i>IleIle</i>	3,12	1,09	0,405	0,668
	<i>IleVal</i>	3,03	1,09		
	<i>ValVal</i>	2,67	0,82		

ADIR-R skor A curr: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam
 ADI-R skor Bv curr : domen komunikacije verbalni, sadašnji algoritam
 ADI-R skor Bnonv curr: domen komunikacije neverbalni, sadašnji algoritam
 ADI-R skor Ccurr: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam
 ADI-R skor A dg: domen socijalnog reciprociteta, dijagnostički algoritam
 ADI-R skor Bv dg: domen komunikacije verbalni, dijagnostički algoritam
 ADI-R skor Bnonv dg: domena komunikacije neverbalni, dijagnostički algoritam
 ADI-R skor C dg: restriktivno i repetitivno ponašanje, dijagnostički algoritam
 ADIR skor D: dijagnostički skor

Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTT1* genotipa sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja, dobijena je statistički značajna korelacija za WASI skor matrix reasonins raw, odnosno granična korelacija za T score. U oba slučaja, osobe sa PSA koje su imale aktivni genotip imale su značajno niže skorove, što znači lošije funkcionisanje prema toj skali (Tabela 23). Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTT1* genotipa sa skorovima težine kliničke slike u okviru tri domena poremećaja autističnog spektra, nije bilo statističke značajnosti, ni za sadašnji ni za dijagnostički algoritam (Tabela 24).

Tabela 23. Povezanost *GSTT1* genotipa i kliničke slike – intelektualno i adaptivno funkcionisanje

	Genotip	Mean	SD	ANOVA	
				F	p
WASI block design raw score	<i>Aktivni^a</i>	11,67	18,03	3,384	0,083
	<i>Nulti^b</i>	30,25	17,58		
WASI block design T score	<i>Aktivni</i>	37,53	11,39	1,414	0,251
	<i>Nulti</i>	45,25	12,18		
Matrix reasoning raw score	<i>Aktivni</i>	10,73	8,86	11,635	0,003
	<i>Nulti</i>	26,75	5,32		
Matrix reasoning T score	<i>Aktivni</i>	35,87	13,15	3,598	0,075*
	<i>Nulti</i>	49,25	9,14		
IQ	<i>Aktivni</i>	80,07	15,11	2,478	0,134
	<i>Nulti</i>	95,25	17,83		
Vineland II	<i>Aktivni</i>	55,88	19,58	0,056	0,814
	<i>Nulti</i>	54,77	17,08		
Vineland C	<i>Aktivni</i>	49,06	14,58	0,009	0,925
	<i>Nulti</i>	49,41	15,90		
Vineland DLS	<i>Aktivni</i>	60,71	20,12	0,105	0,747
	<i>Nulti</i>	62,32	20,24		
Vineland S	<i>Aktivni</i>	54,94	13,81	0,083	0,774
	<i>Nulti</i>	53,86	18,65		
Vineland MS	<i>Aktivni</i>	74,31	16,71	1,164	0,286
	<i>Nulti</i>	68,36	19,28		

^aAktivan, ukoliko je makar jedan alel prisutan

^bNeaktivan ukoliko nijedan alel nije prisutan

WASI block design raw score – slaganje kocaka, sirovi skor

WASI block design T score – slaganje kocaka, ponderisane vrednosti

WASI matrix reasoning raw score – matrice, sirovi skor

WASI matrix reasoning T score – matrice, ponderisane vrednosti

WASI performance IQ - ukupni IQ

Vineland-II skor: Vineland skala adaptivnog ponašanja, kompozitni skor

Vineland – C skor: Vineland skala komunikacije

Vineland – DLS skor: Vineland skala svakodnevnih životnih veština

Vineland – S skor: Vineland skala socijalizacije

Vineland – MS skor: Vineland skala motornih veština

Tabela 24. Povezanost *GSTT1* genotipa i karakteristika kliničke slike – ADI-R

		Genotip	Mean	SD	ANOVA	
					F	p
ADI-R A current	A	<i>Aktivni^a</i>	15,75	6,17	0,863	0,355
		<i>Nulti^b</i>	17,00	6,19		
ADI-R B v current	B v	<i>Aktivni</i>	10,81	3,67	0,09	0,924
		<i>Nulti</i>	10,67	4,18		
ADIR-R B nonv curr	B	<i>Aktivni</i>	8,53	3,61	0,390	0,534
		<i>Nulti</i>	9,11	3,14		
ADIR-R C curr	C	<i>Aktivni</i>	5,01	2,68	0,970	0,327
		<i>Nulti</i>	4,46	2,08		
ADI-R A dg		<i>Aktivni</i>	21,69	5,95	0,042	0,838
		<i>Nulti</i>	21,43	6,33		
ADI-R B v dg		<i>Aktivni</i>	17,31	3,69	2,550	0,120
		<i>Nulti</i>	14,33	7,29		
ADI-R B nonv dg		<i>Aktivni</i>	10,82	2,48	0,115	0,735
		<i>Nulti</i>	11,05	2,69		
ADI-R C dg		<i>Aktivni</i>	5,87	2,49	0,013	0,910
		<i>Nulti</i>	5,80	3,00		
ADI-R D		<i>Aktivni</i>	2,97	1,15	0,812	0,370
		<i>Nulti</i>	3,19	0,75		

^aAktivan, ukoliko je makar jedan alel prisutan

^bNeaktivan ukoliko nijedan alel nije prisutan

ADIR-R skor A curr: domen socijalnog reciprociteta, sadašnji algoritam

ADI-R skor Bv curr : domen komunikacije verbalni, sadašnji algoritam

ADI-R skor Bnonv curr: domen komunikacije neverbalni, sadašnji algoritam

ADI-R skor Ccurr: restriktivno i repetitivno ponašanje, sadašnji algoritam

ADI-R skor A dg: domen socijalnog reciprociteta, dijagnostički algoritam

ADI-R skor Bv dg: domen komunikacije verbalni, dijagnostički algoritam

ADI-R skor Bnonv dg: domena komunikacije neverbalni, dijagnostički algoritam

ADI-R skor C dg: restriktivno i repetitivno ponašanje, dijagnostički algoritam

ADIR skor D: dijagnostički skor

Prilikom intervjua, postavljano je pitanje koja se vrsta simptoma prva razvila – verbalni koji podrazumevaju problem sa receptivnim ili ekspresivnim govorom, ili neverbalni koji podrazumevaju nedostatak pažnje, hiperaktivnost ili agresivnost. U našem uzorku dece sa PSA nije bilo značajne povezanosti pojedinih genotipova sa vrstom prvih simptoma. Takođe, nije bilo povezanosti sa tipom autizma (tipični vs netipični) (Tabela 25).

Tabela 25. Povezanost *GST* genotipa i karakteristike kliničke slike (vrsta početka i dijagnoza)

Varijabla	Početak autizma – prvi simptomi				Dg - vrsta autizma			
	Verbalni	neverbalni	X ²	P	Tipični	atipični	X ²	p
<i>GSTMI</i>								
<i>Aktivni^a</i>	22(40%)	22(40,7%)			37(43,5%)	8(30,8%)		
<i>Nulti^b</i>	33(60%)	32(59,3%)	0,006	1,00	48(56,5%)	18(69,2%)	1,345	0,246
<i>GSTTI</i>								
<i>Aktivni</i>	41(74,5%)	40(74,1%)			62(72,9%)	21(80,8%)		
<i>Nulti</i>	14(25,5%)	14(25,9%)	0,03	1,00	23(27,1%)	5(19,2%)	0,647	0,421
<i>GSTAI</i>								
<i>CC</i>	32(58,2%)	28(51,9%)			48(56,5%)	14(53,8%)		
<i>CT</i>	19(34,5%)	26(48,1%)	5,347	0,069	33(38,8%)	12(46,2%)	1,512	0,470
<i>TT</i>	4(7,3%)	0(0%)			4(4,7%)	0(0%)		
<i>tGSTAI</i>								
<i>CC</i>	32(58,2%)	28(51,9%)			48(56,5%)	14(53,8%)		
<i>CT+CT</i>	23(41,8%)	26(48,1%)	0,441	0,566	37(43,5%)	12(46,2%)	0,056	0,814
<i>GSTPI</i>								
<i>IleIle</i>	8(14,5%)	11(20,8%)			14(16,7%)	5(19,2%)		
<i>IleVal</i>	44(80%)	38(71,7%)	1,019	0,601	64(76,2%)	19(73,1%)	0,109	0,947
<i>ValVal</i>	3(5,5%)	4(7,5%)			6(7,1%)	2(7,7%)		
<i>GSTPI</i>								
<i>IleIle</i>	8(14,5%)	11(20,8%)			14(16,7%)	5(19,2%)	0,091	0,762
<i>IleVal/ValVal</i>	47(85,5%)	42(79,2%)	0,718	0,455	70(83,3%)	21(80,8%)		

^aAktivan, ukoliko je makar jedan alel prisutan

^bNeaktivan ukoliko nijedan alel nije prisutan

U okviru uzorka osoba sa PSA izvršena je podela razvoja jezika na četiri kategorije. Regresija, ukoliko je kod osobe došlo do postizanja određenog nivoa govora, nakon čega dolazi do gubitka stečenih verbalnih sposobnosti. Plato, u okviru koje osoba razvija govor do određenog

nivoa, nakon čega je izražena stagnacija razvoja. Kašnjenje koje podrazumeva primetnu zakasnelost u razvoju govora, ali sa postepenom progresijom, i razvoj jezika bez kašnjenja, sa stalnom progresijom. Kada je ispitivana korelacija pojedinačnih genotipova sa

razvojem jezika, statistička značajnost pokazana je samo za *GSTPI* genotip, u okviru koje postoji značajno češće kašnjenje u razvoju govora kod nosioca genotipa sa makar jednim *Val* alelom ($p=0,002$). Rezultati su prikazani na tabeli 26.

Tabela 26. Genotipovi i vrsta razvoja jezika

Varijabla	Razvoj jezika					
	Regresija	Plato	Kašnjenje	bez kašnjenja	X ²	P
<i>GSTMI</i>						
<i>Aktivni</i>	16(35,6%)	4(8,9%)	20(44,4%)	5(11,1%)	0,671	0,880
<i>Nulti</i>	19(28,8%)	6(9,1%)	34(51,5%)	7(10,6%)		
<i>GSTTI</i>						
<i>Aktivni</i>	27(32,5%)	6(7,2%)	41(49,4%)	9(10,8%)	1,300	0,729
<i>Nulti</i>	8(28,6%)	4(14,3%)	13(46,4%)	3(10,7%)		
<i>GSTAI</i>						
<i>CC</i>	15(24,2%)	8(12,9%)	33(53,2%)	6(9,7%)	8,645	0,195
<i>CT</i>	19(42,2%)	1(2,2%)	19(42,2%)	6(13,3%)		
<i>TT</i>	1(25%)	1(25%)	2(50%)	0(0%)		
<i>tGSTAI</i>						
<i>CC</i>	15(24,2%)	8(12,9%)	33(53,2%)	6(9,7%)	5,534	0,137
<i>CT+CT</i>	20(40,8%)	2(4,1%)	31(42,9%)	6(12,2%)		
<i>GSTPI</i>						
<i>IleIle</i>	3(15,8%)	6(31,6%)	8(42,1%)	2(10,5%)	17,456	0,08
<i>IleVal</i>	29(34,9%)	3(3,6%)	43(51,8%)	8(9,6%)		
<i>ValVal</i>	2(25%)	1(12,5%)	3(37,5%)	2(25,0%)		
<i>GSTPI</i>						
<i>IleIle</i>	3(15,8%)	6(31,6%)	8(42,1%)	2(10,5%)	14,706	0,002
<i>IleVal/ValVal</i>	31(34,1%)	4(4,4%)	46(50,5%)	10(11%)		

4.9.2. Genotipovi i epilepsija u studijskoj grupi

U grupi slučajeva ispitivana je povezanost GST genotipa i postojanja konvulzija tokom života. Pokazana je značajna povezanost između GSTA1 genotipa i konvulzija, i to tako da su nosioci CT i TT genotipa imali značajno veći rizik za konvulzije u odnosu na nosioce CC genotipa (OR=4,117, p=0,013) (Tabela 27).

Tabela 27. Genotipovi GST i konvulzije tokom života

Varijabla	Konvulzije					
	Da	Ne	X ²	P	OR	p
GSTM1 Aktivni ^a Nulti ^b	9(50%) 9(50%)	36(38,7%) 57(61,3%)	0,798	0,372		
GSTT1 Aktivni Nulti	13(72,2%) 5(27,8%)	70(75,3%) 23(24,7%)	0,074	0,785		
GSTA1 (rs3957357) CC CT TT	5(27,8%) 13(72,2%) 0(0%)	57(61,3%) 32(34,3%) 4(4,3%)	9,126	0,01		
tGSTA1 (rs3957357) CC CT+CT	5(27,8%) 13(72,2%)	57(61,3%) 36(38,7%)	6,869	0,009	4,117; CI: 1,353-12,524	0,013
GSTP1 (rs1695) IleIle IleVal ValVal	0(0%) 17(94,4%) 1(5,6%)	19(20,7%) 66(79,5%) 7(7,6%)	4,833	0,089		
GSTP1 (rs1695) IleIle IleVal+ValVal (varijanta)	8(14,5%) 47(85,5%)	11(20,8%) 42(79,2%)	0,718	0,455		

^aAktivan, ukoliko je makar jedan alel prisutan

^bNeaktivan ukoliko nijedan alel nije prisutan

Prilikom ispitivanja postojanja dijagnoze epilepsije, u grupi slučajeva nije bilo značajnih korelacija između pojedinih genotipova i epilepsije. Granična značajnost postojala je za GSTA1 genotip i to u istom smeru kao i po pitanju konvulzija (Tabela 28).

Tabela 28. Genotipovi GST i dijagnoza epilepsije

Varijabla	Dijagnoza epilepsije			
	Da	Ne	X ²	p
GSTM1 Aktivni ^a Nulti ^b	6(46,2%) 7(53,8%)	38(39,6%) 58(60,4%)	0,205	0,650
GSTT1 Aktivni Nulti	9(69,2%) 4(30,8%)	72(75,0%) 24(25%)	0,200	0,655
GSTAI (rs3957357) CC CT TT	4(30,8%) 9(69,2%) 0(0%)	56(58,3%) 36(37,5%) 4(4,2%)	4,914	0,086
tGSTAI (rs3957357) CC CT+TT (niska aktivnost) ^c	4(30,8%) 9(69,22%)	56(58,3%) 40(41,7%)	3,515	0,061
GSTP1 (rs1695) IleIle IleVal ValVal	0(0%) 12(92,3%) 1(7,7%)	19(20,0%) 69(72,6%) 7(7,4%)	3,192	0,203

^aAktivan, ukoliko je makar jedan alel prisutan

^bNeaktivan ukoliko nijedan alel nije prisutan

5. DISKUSIJA

Ovo istraživanje obuhvatilo je 113 osoba sa dijagnozom poremećaja iz spektra autizma (PSA), koji su činili studijsku grupu, i 114 zdravih osoba koje su činile kontrolnu grupu. Izvršeno je grupno uparivanje studijske i kontrolne grupe po polu i starosti, radi dobijanja homogenog uzorka.

Prilikom ispitivanja polno-specifičnih karakteristika dela uzorka studijske grupe (onaj deo uzorka kojem je mereno adaptivno funkcinisanje – Vineland II), utvrđeno je da se kod dečaka značajno češće postavlja dijagnoza tipičnog autizma (F84.0). Nisu pronađene razlike između dečaka i devojčica sa PSA u težini kliničke slike (ADI-R), kao ni u merama adaptivnog funkcionisanja (Vineland II), iako su devojčice pokazale granično više skorove, odnosno bolje funkcionisanje po podskorovima komunikacije i svakodnevnih životnih veština. Pokazana je polno specifična promena simptoma sa uzrastom. Naime, kod dečaka uočen je obrazac boljeg socijalnog reciprociteta i komunikacije, odnosno pogoršanja RRSB simptoma sa godinama, dok kod devojčica nisu pokazane nikakve promene kroz godine. Naši rezultati mogli bi da idu u prilog hipotezi da pol utiče na način na koji se simptomi manifestuju u svakodnevnom adaptivnom funkcionisanja. Polno-specifična linearna regresija pokazala je da simptomi imaju drugačiji profil predikcije adaptivnog ponašanja. Naime, simptomi su bili prediktori ukupnog adaptivnog ponašanja kod dečaka, ali ne i kod devojčica. Polne razlike su pronađene i za prediktorsku funkciju specifičnih simptoma. Dok je lošiji socijalni reciprocitet bio prediktor lošijeg funkcionisanja kod dečaka (lošije opšte funkcinisanje, svakodnevne životne veštine i motorne veštine), kod devojčica bio je prediktor granično boljeg funkcionisanja (bolja socijalizacija). Na kraju ispitivanja polno specifičnih razlika u studijskoj grupi, moderatorska analiza je pokazala uticaj pola na put od kliničkih simptoma do adaptivnog funkcionisanja, otkrivajući da se u osnovi ovog efekta nalazi

socijalni reciprocitet. U slučaju lošijeg socijalnog reciprociteta, muški pol je bio faktor rizika za lošije svakodnevno funkcionisanje, dok je ženski pol bio faktor povezan sa boljim funkcionisanjem u domenu socijalizacije.

Značajan nalaz ove studije je to da su *GSTM1 nulli* genotip i *GSTAI CC* genotip značajno češće prisutni kod pacijenata sa PSA u odnosu na zdrave kontrole. Prema našim saznanjima, ovo su prvi rezultati u literaturi koji su usmereni na ispitivanje povezanosti individualnog *GSTAI* polimorfizma i PSA. Sa druge strane, izgleda da *GSTM1 aktivni* genotip smanjuje rizik za PSA. Isto tako, kombinovani *GSTM1 aktivni* i *GSTT1 aktivni* genotip, kao i kombinovani *GSTT1 aktivni* i *GSTP1 IleIle* genotip smanjuju PSA rizik. Još jedan interesantan nalaz je i opservirani efekat kombinovanog *GSTM1 aktivnog* i *GSTP1 IleIle* genotipa koji je značajno povezan sa rizikom za razvoj PSA.

Utvrđeno je da je postojanje perinatalnih komplikacija uopšte, nedonesenosti, neonatalne žutice, kao i respiratornog distres sindroma bilo značajno češće u studijskoj nego u kontrolnoj grupi. Za intrakranijalnu hemoragiju, fetalnu asfiksiju, kongenitalne konvulzije, kao i za sistemske infekcije u neonatalnom periodu nije pokazana značajna razlika između grupa. Među faktorima rizika koji su delovali tokom trudnoće značajnost za razvoj PSA pokazana je za uzimanje bilo kakvih lekova u trudnoći, uzimanje tokolitikata tokom trudnoće, infekciju majke tokom trudnoće, kao i preeklampsiju. Naše istraživanje nije pokazalo povezanost između uzimanja progesterona, antibiotika i anksiolitika tokom trudnoće, kao ni između hronične bolesti majke tokom trudnoće i razvoja PSA. Takođe, ni za jedan od tzv. familijalnih faktora nije utvrđena značajnost u razvoju PSA (starost i obrazovanje roditelja, razmak između trudnoća i redosled rođenja deteta).

Utvrđeno je da kombinovani efekat genotipova *GSTM1*, *GSTAI* i *GSTP1* sa izloženošću tokoliticima u trudnoći značajno povećava rizik za PSA, što je potvrđeno i za udruženi efekat sva

četiri varijantna ispitivana genotipa i postojanje neonatalne žutice. Iznenadjujući je rezultat da niti pušenje majke tokom trudnoće samostalno, niti njegova interakcija sa bilo kojim od ispitivanih genotipova, ne pokazuje efekat na rizik za PSA.

U okviru studijske grupe naši rezultati nisu pokazali značajnu povezanost *GSTAI*, kao ni *GSTMI* genotipa sa kliničkom slikom procenjivanom ADI-R-om, kao ni povezanost ovih genotipova sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja. Interesantan je nalaz u kojem je utvrđeno da su nosioci *GSTPI IleIle* genotipa imali značajno viši ukupni IQ skor u odnosu na nosioce *ValVal* genotipa. Na Vineland II skali adaptivnog funkcionisanja nije pokazana statistički značajna razlika, ali je i dalje postojao trend da nosioci *IleIle* genotipa imaju najviše skorove, odnosno najbolje adaptivno funkcionisanje. Takođe, nije bilo značajne povezanosti *GSTPI* genotipa i težine kliničke slike. Nije pokazana značajna povezanost *GSTTI* genotipa i intelektualnog funkcionisanja, sem na jednom podskoru WASI skale, i to tako da su nosioci aktivnog genotipa imali značajno niže skorove. Povezanosti nije bilo ni za *GSTTI* genotip i adaptivno funkcionisanje, kao ni za težinu kliničke slike. Interesantno je da je pokazana povezanost *GSTAI* genotipa i rizika za konvulzije tokom života, i to tako da je *aktivni CC* genotip protektivni faktor, što se je nalaz koji se zadržao granično značajnim i za povezanost *GSTAI* genotipa i dijagnoze epilepsije. Nije utvrđena povezanost između drugih *GST* genotipova i konvulzija i epilepsije. Pokazana je povezanost *GSTPI* genotipa sa tipom razvoja jezika. Naime, nosioci makar jednog *Val* alela imali su značajno veći rizik za zakasneli razvoj govora u odnosu na nosioce *IleIle* genotipa. Nije utvrđena povezanost između pojedinih *GST* genotipova i tipa prvih simptoma (verbalni vs neverbalni), kao ni između genotipova i vrste autizma (tipični vs atipični).

U skladu sa teorijom da kod devojčica češće postoji klinička slika atipičnog autizma u poređenju sa dečacima, rezultati ovog istraživanja su pokazali da su dečaci češće imali dijagnozu

tipičnog autizma (Lai i sar., 2011). Atipična manifestacija može biti jedno od objašnjenja niže prevalencije autizma kod devojčica. Drugim rečima, moguće je da je, posebno u grupama sa visokom funkcionalnošću, autizam nedovoljno dijagnostikovano kod devojčica (Volkmar i sar., 2002). Za trenutne kliničke skorove merene ADIR-om (socijalni reciprocitet, komunikacija i RRSB), nije utvrđena razlika između dečaka i devojčica. Nekoliko studija imalo je slične rezultate – nije bilo polnih razlika na ADI-R skorovima (Holtmann i sar., 2007; Carter i sar., 2007; Pilowsky i sar., 1998). Rezultati drugačiji od ovih dobijeni su u dve studije koje su rađene u uzorku osoba sa visoko funkcionalnim autizmom i kod odraslih osoba sa PSA – obe su pokazale manje izražene RRSB kod žena (Lai i sar., 2011; Mandy i sar., 2012). Objašnjenje drugačijih rezultata može biti u odabiru drugačijeg uzorka – ove studije su rađene u uzorku osoba sa visoko funkcionalnim autizmom, dok je uzorak u ovom istraživanju bio nisko funkcionalan. Može se pretpostaviti da samo žene sa visoko funkcionalnim autizmom imaju manje repetitivnih simptoma u odnosu na muškarce. Studija koja je rađena kod dece sa PSA pokazala je i da su devojčice imale izraženije simptome komunikacije, dok su dečaci imali više RRSB simptoma (Hartley i Sikora, 2009). Ova studija, sa druge strane, izvedena je u uzorku dece do 5 godina, dok je aktuelna studija uključivala mnogo širi raspon godina.

Ispitivanje razlika u adaptivnom funkcionisanju pokazalo je da su devojčice imale više skorove na Vineland DLS skali, iako bez statističke značajnosti. Uzorak devojčica u ovom istraživanju je bio mali, tako da možda možemo pretpostaviti da bi ove razlike dostigle statističku značajnost u većem uzorku. U literaturi nema puno podataka o polnim razlikama u adaptivnom funkcionisanju. Studija koja je ispitala polne razlike u grupama sa visokim i niskim rizikom za autizam pokazala je da su devojčice imale bolje skorove na S i DLS skalama (Zwaigenbaum i sar., 2012), što je delimično u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. U skladu sa studijom Dworsynski

i saradnika, možemo pretpostaviti da devojčice imaju manju verovatnoću da budu dijagnostikovane kao tipični PSA (i verovatno bilo koja PSA dijagnoza) pri istom nivou autističnih simptoma kao dečaci (Dworsynski i sar., 2012). Objašnjenje koje navode ovi autori odnosi se na potencijalno bolju adaptaciju, odnosno kompenzaciju kod devojčica. U ovoj studiji moguće objašnjenje je to što su oba upitnika (i za procenu kliničkih simptoma i za procenu adaptivnog funkcionisanja) za roditelje, što omogućava da devojčica sa određenim nivoom simptoma bude percipirana kao funkcionalnija nego dečak sa sličnom težinom kliničke slike. Nekoliko studija je pokazalo da se skorovi na Vineland II skali smanjuju tokom godina u autističnoj populaciji (Klin i sar., 2007; Mougá i sar., 2014). Takođe je poznato da i ADI-R skorovi različito variraju sa godinama (Gotham i sar., 2009).

Ova studija je takođe ispitivala polno specifične starosne koleracije kliničkih simptoma i adaptivnog funkcionisanja. Ukupno adaptivno funkcionisanje bilo je lošije sa godinama u oba pola, što je u skladu sa prethodnim studijama (Klin i sar., 2007; Mougá i sar., 2014). Čak i nakon izdvajanja efekta kliničkih simptoma u linearnoj regresiji, starost je i dalje bila značajan negativni prediktor za sve Vineland II skorove, kod oba pola. Ipak, prilikom ispitivanja kliničkih simptoma, uočene su polno specifične asocijacije. Dok su dečaci imali obrazac boljeg socijalnog funkcionisanja i komunikacije, kao i lošijeg RRSB skora sa godinama, kod devojčica nije bilo nikakve povezanosti sa starošću, ni za jedan ADI-R skor. Jedno objašnjenje ovakvog rezultata mogao bi biti mali uzorak devojčica, dok sa druge strane ovaj nalaz može da ukazuje da izostanak progressa simptoma kroz vreme kod devojčica. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa rezultatom skorašnje studije među odraslima sa PSA koji pokazuju da kod žena dolazi do većeg progressa u socio-komunikativnoj sposobnosti (Lai i sar., 2011) (mereno putem Autism Diagnostic Observation Schedule – ADOS) (Gotham i sar., 2009).

Klinički simptomi se ne „prevode“ u potpunosti i direktno u nivo funkcionalnosti, što znači da ima prostora za delovanje drugih potencijalnih faktora koji mogu da smanje ili povećaju funkcionalno oštećenje (Kanne i sar., 2011; Saulnier i Klin, 2007). Glavni cilj ovog dela istraživanja bio je upravo da se ispita da li je pol jedan od tih faktora. Prema našem saznanju, studije koje su ispitivale povezanost autističnih simptoma i adaptivnog funkcionisanja nisu uzimale u obzir uticaj pola (Kanne i sar., 2011; Perry i sar., 2009), dok su druge uključivale samo osobe muškog pola (Klin i sar., 2007). Prikazani nalazi bi mogli da idu u prilog hipotezi da pol može da utiče na prevođenje simptoma u svakodnevno adaptivno funkcionisanje. Polno specifične linearne regresije pokazale su donekle različite prediktivne profile simptoma za adaptivno funkcionisanje. Kod dečaka, simptomi su bili prediktivni za ukupno adaptivno funkcionisanje, ali ne i kod devojčica. Takođe, simptomi su bili prediktori više domena adaptivnog funkcionisanja kod dečaka nego kod devojčica. Razlike su pronađene i u slučaju specifičnih simptoma. Dok je loš socijalni reciprocitet bio prediktor lošijeg funkcionisanja kod dečaka (lošije opšte funkcionisanje, svakodnevne životne veštine i motorne veštine), kod devojčica bio je prediktor granično boljeg funkcionisanja (bolje socijalizacije). Analiza moderacije dodatno je potvrdila uticaj pola na translaciju kliničkih simptoma u adaptivno ponašanje, otkrivajući da je suština ovog uticaja socijalni reciprocitet. U slučaju lošijeg socijalnog reciprociteta, muški pol je bio faktor rizika za lošije funkcionisanje u domenu svakodnevnih životnih veština, dok je ženski pol bio povezan za boljim funkcionisajem u domenu socijalizacije. U skorašnjoj studiji, svakodnevne životne veštine su bile značajno slabije kod muškaraca, i to ne samo u uzorku PSA nego i u non-PSA uzorcima sa visokim rizikom, kao i u non-PSA uzorcima sa niskim rizikom (Zwaigenbaum i sar., 2012). Samim tim, naš rezultat potencijalno oslikava polne razlike u opštoj populaciji. Neočekivani nalaz da je

ženski pol faktor kod kojeg je lošiji socijalni reciprocitet povezan sa boljim socijalnim funkcionisanjem takođe bi mogao da se objasni kroz opšte polne razlike.

Skorašnja studija je čak predložila polno-specifične ajteme za skale koje se koriste u skriningu za PSA, sa akcentom na razlike u socijalno-komunikacijskim teškoćama (Kopp i Gillberg, 2011; Maccoby, 1998). „Normalni dečaci” imaju sklonost da se igraju u grupama, zbog čega je teško uključiti se, za razliku od „normalnih devojčica” koje se igraju sa jednom ili dve druge devojčice (Kopp i Gillberg, 2011; Maccoby, 1998). Takođe, „normalne devojčice” su osetljivije i češće pozivaju devojčice za razvojnim teškoćama da im se pridruže (Kopp i Gillberg, 2011). Ukoliko analiziramo ajteme na Vineland S subskali, moguće je da loš socijalni reciprocitet kod devojčica, na primer, vodi boljoj igri uloga ili boljem korišćenju slobodnog vremena (leisure time). Ovaj nalaz bi mogao biti i posledica boljih adaptacionih sposobnosti devojčica, što je mišljenje koje zastupaju Dworzynski i saradnici (Dworsynski i sar., 2012). Važno je naglasiti i to da je najznačajniji nalaz vezan za „tipično žensku snagu” - socijalni reciprocitet. U svakom slučaju, ovakav nalaz nas navodi da se ova klinička karakteristika detaljnije ispituje u budućim istraživanjima polnih razlika u PSA.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je individualni *GSTM1 nulti* i *GSTAI CC* genotip bio češći kod osoba sa PSA, kao i da kombinacije genotipova značajno povećavaju, odnosno smanjuju rizik za PSA.

Tokom godina, mnoge studije su pokušale da rasvetle koji je to genetski faktor okidač za razvoj PSA (Tordjman i sar., 2014), ipak, do sada je samo nekoliko studija procenjivalo moguću povezanost između GST polimorfizama, kao nezavisnih faktora (ili u sadejstvu sa sredinskim faktorima) i sklonosti ka razvoju PSA (James i sar., 2006; Williams i sar., 2007; Rahbar i sar., 2015). Citosolna GST familija katališe konjugaciju elektrofilnih jedinjenja - uključujući produkte oksidativnog stresa, sa glutationom (Hayes i sar., 2005). Polimorfizmi unutar GST klasa rezultuju potpunim gubitkom ili izmenjenom enzimskom aktivnošću, na taj način menjajući kapacitet za detoksikaciju različitih endogenih i egzogenih jedinjenja uključujući oksidante i na taj način doprinoseći razvoju različitih neuroloških i mentalnih poremećaja, uključujući i PSA (Hayes i sar., 2005; Rahbar i sar., 20015; Ercegovac i sar., 2015; Pejović Milovančević i sar., 2016; Weikang i sar., 2016).

Naglasak u dosadašnjim istraživanjima GST polimorfizama u PSA bio je na *GSTM1* i *GSTT1* delecionim polimorfizmima, koji kod nosilaca *GSTM1* i *GSTT1* delecionih polimorfizama rezultuju smanjenom ćelijskom sposobnošću za metabolisanje toksina, zbog potpunog nedostatka aktivnog enzima (Hayes i sar., 2005; Wu and Dong, 2012). Nekoliko studija pronašlo je povišen rizik za razvoj PSA kod nosilaca *GSTM1 nultog* genotipa, samostalno ili u kombinaciji sa drugim genetskim faktorima (Buyske i sar., 2006; James i sar., 2006). Nalaz ove studije u smislu povećane učestalosti *GSTM1 nultog* genotipa kod osoba sa PSA u poređenju sa kontrolama, u skladu je sa studijom Buyske i saradnika (2006), dok studija Rahbar i saradnika (2015) nije potvrdila ove nalaze. Moguće objašnjenje je veličina uzorka ove studije koja je dovela do redukovane statističke

moći za detektovanje statistički značajnih povezanosti (greška tip II), ili je u pitanju genetska varijabilnost između različitih populacija koje su korišćene u ove dve studije, s obzirom na to da je genetska varijabilnost GST do sada jasno utvrđena (Polimanti i sar., 2013). Iako ova značajnost nije pokazana kada su genotip-genotip interakcije i pušenje tokom trudnoće uneti u model, *GSTM1 aktivni genotip* je pokazao značajnu interakciju sa *GSTT1* genotipom, značajno smanjujući rizik za PSA, kao i sa *GSTP1 Ileile* genotipom, sa suprotnim efektom.

Drugi GST delecioni polimorfizam, kao što je navedeno, rezultuje *GSTT1 nultim* genotipom koji može da se posmatra kao rizičan ili protektivan u određenim poremećajima, zahvaljujući njegovoj ulozi u detoksikaciji, ali i u bioaktivaciji. Naime, jasno je utvrđeno da je *GSTT1* enzim uključen u bioaktivaciju, pre nego detoksikaciju nekoliko bifunkcionalnih alkilirajućih agensa, prisutnih u okolnoj sredini (zagađivači) ili kao specifična izloženost kod određenih zanimanja (Thier i sar., 1996). Do sada, moguća asocijacija između *GSTT1* genotipa i PSA ispitivana je u samo jednoj studiji, i u njoj nije uočena povezanost između samostalnog *GSTT1* genotipa i rizika za razvoj PSA (Rahbar i sar., 2015), što je u skladu sa našim rezultatima. Ipak, rezultati ove studije pokazuju da kombinacija *GSTT1 aktivnog* genotipa može delovati protektivno u kombinaciji sa specifičnim GST genotipovima. Naime, prema našim rezultatima, kombinacija *GSTT1 aktivnog* i *GSTM1 aktivnog* genotipa, kao i *GSTT1 aktivnog* sa *GSTP1 Ileile* genotipom, smanjuje rizik za PSA. U skladu sa ovim rezultatima, kombinovani *GSTT1 nulti* i *GSTP1 Ileile* ili *IleVal* genotip prepoznat je kao rizičan za PSA, u populaciji Jamajke (Rahbar i sar., 2015).

Glutation S-transferaza alfa klase koja je eksprimovana u većini tkiva uključujući i mozak (Desmots i sar., 2001) specifična je po takozvanom supstratnom promiskuitetu, što je posledica proteinske fleksibilnosti i dinamike aktivnog mesta enzima (Hou i sar., 2007). Ova klasa takođe

poseduje peroksidaznu aktivnost u odnosu na organske hidroperoksidge i može biti uključena u regulaciju ćelijske redoks homeostaze, te je vrlo zanimljivo da do danas nije bila ispitivana u poremećajima autističnog spektra. Štaviše, Iorio i saradnici (2015) su prikazali rezultate koji podržavaju činjenicu da polimorfizam GSTA1 ima potencijalno značajnu ulogu tokom trudnoće, pošto su prethodne studije ukazale na to da je *GSTA1* genotip povezan sa različitim stanjima povezanim sa trudnoćom (Knapen i sar., 1999; van Runnard Heimel i sar., 2008; Polimanti i sar., 2011). Polimorfizam GSTA1 predstavljen je sa tri povezana SNP, dovodeći do različite ekspresije sa nižom transkripcionom aktivacijom varijante *GSTA1*B (T)* u odnosu na učestaliji *GSTA1*A (C)* alel (Wu and Dong 2012). Rezultati naše studije pokazali su da nosioci *GSTA1 CC* genotipa, sa najvećom ekspresijom GSTA1 enzima, pod povišenim rizikom za razvoj PSA u poređenju sa osobama koje su nosioci *GSTA1 CT* i *TT* genotipa. Moguće objašnjenje uočene asocijacije može biti činjenica da, slično GST teta klasi, alfa klasa takođe učestvuje u bioaktivaciji nekoliko lekova i određenih neurotoksičnih jedinjenja (Zhang i sar., 2010). Ova značajnost se izgubila u daljoj analizi, i za individualni i za kombinovani efekat GSTA1 genotipskog statusa.

Još jedan značajan SNP superfamilije glutation S-transferaza je i GSTP1 polimorfizam, koji je pre nekoliko godina takođe identifikovan kao potencijalni faktor koji doprinosi razvoju PSA. Kao što je napomenuto, rizik za razvoj PSA uočen je kod dece majki sa *GSTP1 Ile/Val* genotipom (Williams i sar., 2007), kao i kod nosilaca *GSTP1 Ile/Ile* genotipa, u zavisnosti od koncentracije mangana u krvi, ili od izloženosti aluminijumu (Rahbar i sar., 2105; Rahbar i sar., 2016). U prikazanoj studiji nije pokazana povezanost individualnog *GSTP1* genotipa sa PSA, dok se čini da, u kombinaciji sa drugim GST polimorfizmima, *GSTP1 Ile/Ile* genotip doprinosi na različite načine riziku za PSA. Izostanak povezanosti individualnog *GSTP1* genotipa sa PSA takođe je pokazan i u studiji Rahbara i saradnika (Rahbar et al, 2015). Ipak, u uzorku Jamajke,

interakcija *GSTP1 IleVal* i *GST1 nultog* genotipa bila je značajna (Rahbar et al, 2015). Takođe je pokazano da *GSTP1 IleIle* genotip ima značajnu interakciju sa nivoom mangana u krvi – pokazano je da ovaj genotip povećava rizik za PSA značajno, kod dece sa visokim nivoom mangana u krvi (Rahbar et al, 2015). Rezultati naše studije pokazuju da je *GSTP1 IleIle* genotip u značajnoj interakciji - sa *GSTT1 aktivnim* genotipom smanjujući rizik za PSA, kao i sa *GSTM1 aktivnim* genotipom, povećavajući rizik. Uloga *GSTP1* genotipova je pokazana u nekoliko kompleksnih poremećaja, i to sa kompleksnim interakcijama (Rahbar et al, 2015). Dalje studije sa fokusom na *GSTP1* genotipove i druge genetske i okolinske faktore mogle bi rasvetliti ulogu ovog enzima u kompleksnim poremećajima kakav je autizam.

U ovom istraživanju pokazano je da postojanje perinatalne komplikacije uopšte (nedonesenost - manje od 36 nedelja gestacije, niska težina na rođenju - manje od 2500g, prenesenost - preko 42. nedelje gestacije, perinatalna asfiksija, Apgar skor ispod 5, intrakranijalna hemoragija, hiperbilirubinemija, sindrom respiratornog distresa, hipoglikemija, neonatalne konvulzije, sistemske neonatalne infekcije (sepsa, meningoencefalitis), dijabetes majke, preeklampsija majke, konvulzije majke tokom trudnoće, infekcije majke u trudnoći (toksoplazmoza, rubeola, citomegalovirus, HIV) značajno povećava rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra (OR=9,415; CI: 4,870-18,203, p=0,000). Studija Mamidala i saradnika iz 2013. takođe je pokazala povećan rizik za celu grupu perinatalnih komplikacija, OR=5,68, dok u drugim studijama nije određivan rizik za celu grupu perinatalnih komplikacija. Od pojedinačnih komplikacija, značajno povećanje rizika za razvoj ove grupe poremećaja pokazano je za nedonesenost (OR=11,42; CI: 2,586-50,455, p=0,001), neonatalnu žuticu (OR=8,774; CI: 4,11-18,725, p=0,000) i sindrom respiratornog distresa (OR=4,835; CI: 1,018-22,957, p=0,047).

U dosadašnjoj literaturi, prematuritet je posmatran uz korišćenje različitih kriterijuma. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa prethodnim studijama (Johnson i sar., 2010; Mamidala i sar., 2013; Duan i sar., 2014; Larsson i sar., 2005). U studijama u kojima je korišćena granica 37. nedelja pokazan dvostruki (Mamidala i sar., 2013) odnosno trostruki (Duan i sar., 2014) rizik. Međutim, ima studija koje ne pokazuju da prematuritet dovodi do povećanja rizika za razvoj poremećaja autističnog spektra, kod kojih je granica takođe bila 37. nedelja (Burstyn i sar., 2010).

Jedan od predloženih mehanizama povezanosti nedonesenosti i PSA uključuje oksidativni stres. Oksidativni stres, s druge strane, se može dovesti u vezu s difuznom povredom bele mase (eng. *diffuse white matter injury* - DWMI), što je potencijalni faktor rizika za PSA. Naime, najčešća vrsta povrede CNS-a kod prevremeno rođene dece je DWMI koja se povezuje sa oslabljenim kognitivnim sposobnostima, kao i sa bihejvioralnim i psihološkim teškoćama (Back i Miller, 2014). Pokazano je da je jedan od mehanizama u osnovi ovog tipa povrede upravo oksidativni stres (van Tilborg i sar., 2016). Revijalni rad koji se bavi mehanizmima u osnovi DWMI povezane sa prematuritetom naglašeno je da su in vitro i animalne studije pokazale da oksidativni stres u kulturi oligodendrocita dovodi ili do apoptoze ili do vrlo usporene mijelinacije i diferencijacije. Dodatno, autori ovog revijalnog rada naglašavaju potencijalnu ulogu genetskih polimorfizama koji određenu decu čini vulnerabilnim na perinatalne komplikacije, naglašavajući da je malo istraživanja rađeno na ovu temu (van Tilborg i sar., 2016).

Kada je neonatalna žutica u pitanju, dosadašnja istraživanja potvrdila su da je ova perinatalna komplikacija faktor rizika za razvoj PSA (Mamidala i sar., 2013; Maimburg i sar., 2008; Zhang i sar., 2010; Maimburg i sar., 2010; Larsson i sar., 2005). Rizici su iznosili 3,58 (Mamidala i sar., 2013), a u studiji Larsson i sar., 2005, povećanje rizika iznosilo je 3,57. Takođe, studija Maimburg i saradnika utvrdila je četvorostruko povećanje rizika za razvoj autizma kod

dece koja su imala hiperbilirubinemiju u neonatalnom periodu (Maimburg i sar., 2008). Sa druge strane, pojedine studije nisu utvrdile povećanje rizika za razvoj PSA kod postojanja neonatalne žutice (Croen i sar., 2005). Rizik koji je dobijen u ovoj studiji veći je nego u prethodnoj literaturi. Kao što je već navedeno, neonatalna žutica nastaje usled nezrelosti jetre i njenih funkcija, kao i povećane razgradnje fetalnih eritrocita, a akumulirani bilirubin koji se nalazi u osnovi ovog kliničkog znaka, potencijalno može dovesti do oštećenja CNS-a (Zhang i sar., 2010). Nedavne studije pokazale su markere povišenog oksidativnog stresa kod dece sa hiperbilirubinemijom, koji su se manifestovali kao smanjenje nivoa paraoksonaze i povišenog nivoa malondialdehida (Basu i sar., 2014; Altuner Torun 2016). Pokazano je i da su vrednosti GSH značajno niže kod neonatusa sa hiperbilirubinemijom, a da se markeri oksidativnog stresa značajno smanjuju nakon fototerapije i normalizacije nivoa bilirubina (Ayyappan i sar., 2015). U ovoj studiji autori razmatraju teoriju da je primarno povišeni oksidativni stres razlog promene eritrocitne membrane i pojave hiperbilirubinemije, što potvrđuju i nalazom povišenih aktivnosti SOD i GPX kod dece sa neonatalnom žuticom.

U studiji rađenoj 2014. godine (Raicevic i sar., 2014), ispitivane su vrednosti markera oksidativnog stresa i bilirubina kod dece koja su tokom porođaja imala izražen fetalni distress. Pokazano je da su deca koja su imala fetalni distress, imala i značajno niži broj eritrocita odnosno značajno viši nivo bilirubina. Kod neonatusa sa fetalnim distressom, takođe je pokazana niža aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). I ovi autori razmatraju činjenicu da je oksidativni stres taj koji dovodi do povišene razgradnje eritrocita. Na taj način, može se smatrati da je hiperbilirubinemija kod neonatusa i marker povišenog oksidativnog stresa (zbog fetalnog distressa usled drugih perinatalnih komplikacija ili primarno snižene aktivnosti antioksidantnih enzima), ali i da posledično, povišene vrednosti bilirubina štetno deluju na CNS neonatusa. U

drugim studijama je takođe pokazan ovaj drugi smer delovanja bilirubina – odnosno da je oksidativni stres medijator neurotoksičnog delovanja bilirubina (Qaisiya i sar., 2014). Viši rizik dobijen u našem istraživanju u odnosu na prethodna se delimično može objasniti i pojmom recall bias-a u okviru kojeg je mogućnost prisećanja perinatalnih komplikacija značajno veća kod roditelja dece sa određenim zdravstvenim poremećajem.

Fiziološki događaj, kakav je prelazak iz fetalne u neonatalnu fazu je generalno veliki stres za fetus. Iako fiziološke, promene značajno povećavaju produkciju slobodnih radikala. Zrela i zdrava novorođenčad prevazilaze ovakve promene u koncentraciji kiseonika, ali problem nastaje onda kada je intrauterini razvoj na neki način izmenjen (Negi i sar., 2015). Jedan od takvih faktora je respiratorni distres sindrom (RDS). RDS takođe predstavlja stanje u čijoj osnovi se nalazi poremećaj ravnoteže između oksidanata i antioksidanata. Takođe, RDS je značajno češći kod prevremeno rođene dece (Negi i sar., 2015), te se na tom primeru može videti kompleksna interakcija različitih perinatalnih komplikacija sa oksidativnim stresom. Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajno povišen rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra kod postojanja RDS kao perinatalne komplikacije - OR=4,835. Ovaj rezultat je u skladu sa nalazima iz prethodnih studija (Dodds i sar., 2011, Glasson i sar., 2004, Buchmayer i sar., 2009). Rizici za razvoj PSA kod respiratornog distres sindroma u studiji rađenoj 2009. i 2011. godine (Dodds i sar., 2011; Buchmayer i sar., 2009), gde su rizici iznosili 1,48 i 2,13. Metaanaliza rađena 2016. godine, koja je obuhvatila 12 studija koje se bave ovim faktorom rizika, (Modabbernia i sar., 2016) takođe je potvrdila respiratorni distres sindrom kao faktor rizika za PSA. Povišeni markeri oksidativnog stresa pronađeni su kod dece sa respiratornim distres sindromom (Dizdar i sar., 2011; Negi i sar., 2015).

Razlika u učestalosti između studijske i kontrolne grupe nije bila značajna za nisku težinu na rođenju, perinatalnu asfiksiju, intrakranijalnu hemoragiju, neonatalne konvulzije, kao i za sistemske neonatalne infekcije, iako su ove komplikacije bile češće zastupljene u grupi slučajeva. Dosadašnje studije pokazale su različite rezultate po pitanju niske težine na rođenju kao perinatalne komplikacije. Nekoliko studija potvrdilo je da je težina na rođenju manja od 2500g značajan faktor rizika za razvoj PSA (Burstyn i sar., 2010; Haglund i Kallen, 2011), dok to nije potvrđeno u studiji Mamidala i sar., 2013. U aktuelnoj studiji kriterijum za nisku težinu na rođenju bio je 2800g, što je donekle viša granica u odnosu na studije koje su pokazale značajnu povezanost sa PSA, a koja je iznosila 2500g, što bi moglo objasniti razliku u nalazima. Konkretno u studiji Burstyn i saradnika iz 2010. godine, na uzorku od 100 pacijenata sa PSA, težina je ispitivana u tri grupe – manje od 2500g, između 2500 i 4500 g i preko 4500g. Za grupu između 2500 i 4500 nije pokazana značajna povezanost sa PSA. Takođe, u studiji Haglund-a i Kallen-a 2011 pokazano je da je niska težina na rođenju povezana sa autizmom, ali ne i sa Aspergerovim sindromom. U ovom istraživanju u analizu su uključene sve dijagnoze iz spektra autističnih poremećaja. Sa druge strane, studija Mamidala i saradnika iz 2013. takođe nije pokazala značajnu povezanost niske težine na rođenju sa PSA.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnost u povezanosti perinatalne asfiksije i PSA. U dosadašnjim studijama uglavnom su dobijeni drugačiji rezultati – neonatalna asfiksija je pokazana kao faktor rizika za PSA u nekoliko studija (Mamidala i sar., 2013; Duan i sar., 2014, Hultman i sar., 2011). U ovom uzorku perinatalna asfiksija je bila izražena kod 3.9% slučajeva, odnosno 1% kontrola, uz OR=4,121, ali razlika u učestalosti ove perinatalne komplikacije nije dostigla značajnost. Informacije o perinatalnim komplikacijama u ovom uzorku dobijene su putem upitnika za roditelje, te je moguće da majke nisu imale detaljne informacije o komplikacijama,

posebno što je pri ispitivanju perinatalne asfiksije veliki problem njeno registrovanje i dijagnostikovanje. Incidenca perinatalne asfiksije iznosi 5-10 na 1000 živorođene dece (McGuire, 2007), te možemo pretpostaviti da bi na većem uzorku ova razlika dostigla značajnost.

Intrakranijalna hemoragija nije se izdvojila kao individualni faktor rizika u našem istraživanju. Ona je bila prisutna u 5,8% slučajeva, odnosno 1,9% kontrola, uz trostruko povećan rizik (OR = 3,124), ali bez statistički značajne razlike. Intrakranijalna hemoragija tokom porođaja kao faktor rizika za PSA ispitivana je u nekoliko studija – u studiji Dodds i saradnika (2011) odnos šansi iznosio je 2,16. U drugoj studiji nije računat izdvojeni rizik intrakranijalne hemoragije, već je ukupni rizik za PSA u slučaju intrakranijalne hemoragije, cerebralnog edema i konvulzija bio trostruko povećan (Buchmayer i sar., 2009). U studiji Duan i sar., događaj definisan kao intrapartalna kraniocerebralna povreda, nije pokazao značajno povećanje rizika za poremećaje autističnog spektra (Duan i sar., 2014), što je u skladu sa našim rezultatom.

Učestalost neonatalnih konvulzija takođe nije bila značajno viša u grupi slučajeva, iako je u njoj učestalost bila 2,9%, dok u grupi kontrola nisu registrovane konvulzije na rođenju. Studija Mamidala i saradnika iz 2013. takođe nije pokazala povezanost konvulzija sa razvojem PSA, dok je zaključak preglednog rada iz 2011. godine (Gardener i sar., 2011) na osnovu rezultata pet dotadašnjih studija bio da ne postoji značajna povezanost ove perinatalne komplikacije i razvoja poremećaja autističnog spektra.

Neonatalne infekcije nastaju u prve četiri nedelje života, uključuju sepsu, meningitis, respiratorne infekcije (virusnog/bakterijskog/fungalnog porekla) (Vergnano i sar., 2016). U prikazanom istraživanju nije pokazan povišen rizik za PSA ni kada su u pitanju sistemske neonatalne infekcije. Do istog zaključka došli su i autori preglednog rada (Gardener i sar., 2011), na osnovu rezultata dve studije. Od 2011. do sada, skorašnja studija (Hadjkacem i sar., 2016)

pokazala je značajnu povezanost respiratornih infekcija nakon rođenja sa poremećajem autističnog spektra. Druge studije su uglavnom bile orijentisane na kongenitalne infekcije (rubella, CMV) (Garofoli i sar., 2017), koje nisu bile prisutne ni u grupi slučajeva niti u grupi kontrola u ovom istraživanju.

Rezultati prikazanog istraživanja pokazuju je da uzimanje medikamenata tokom trudnoće (uopšte), uzimanje tokolitika tokom trudnoće, kao i infekcija majke tokom trudnoće i preeklampsija predstavljaju značajne faktore rizika za razvoj PSA.

Dosadašnja istraživanja o korišćenju lekova u trudnoći su se uglavnom odnosila na psihostabilizatore – valproate za koje je pokazan povećan rizik Christenssen i sar., 2013; Bromley i sar., 2008; Ornoy i sar., 2015, ali i antidepressive, posebno SSRI, koji su takođe u pojedinim studijama pokazani kao faktor rizika za razvoj PSA (Kobayashi i sar., 2016; Moddabernia i sar., 2017). Malo je studija koje su ispitivale primenu drugih lekova u trudnoći i rizik za PSA. Studija Maimburg-a i Vaeth-a iz 2006. godine, takođe je pokazala povišen rizik za razvoj PSA kod korišćenja lekova uopšte. Rizik dobijen u ovoj studiji iznosio je 1,5 (Maimburg i Vaeth, 2006), dok je u ovoj studiji iznosio 2,41. U prikazanoj studiji, lekovi koji su korišćeni od strane majki tokom trudnoće, bili su uglavnom tokolitici, progesteron, antibiotici i anksiolitici. Metaanaliza rađena 2009. godine (Gardener i sar., 2009), ispitala je rezultate prethodnih 15 studija i pokazala da je korišćenje lekova tokom trudnoće povezano sa rizikom za razvoj autizma (ukupan rizik iznosio je 1.46). Takođe, studija Dodds i saradnika potvrdila je povećani rizik za razvoj PSA kod uzimanja takozvanih propisanih (prescription drugs) lekova. U ovoj studiji u pitanju su bili litijum, antihipertenzivi, antidepressivi, antikoagulantna terapija i hronično korišćenje narkotika (RR=2,66) (Dodds i sar., 2011).

Mehanizmi delovanja lekova, odnosno njihovog uticaja na nastanak PSA nisu razjašnjeni. U našem uzorku, prilikom izdvojene analize pokazano je da je uzimanje tokolitika tokom trudnoće značajan faktor rizika za razvoj PSA (OR=2,47), dok značajnost nije dobijena za anksiolitike, progesteron, niti za antibiotike. Tokolitici koji su primenjivani u našem uzorku bili su heksoprenalin i fenoterol, odnosno lekovi koji spadaju u grupu beta-2 adrenergičkih agonista. U dosadašnjim studijama koje su se bavile specifično ovim pitanjem, rezultati su bili različiti. Studija Maimburg-a i Vaeth-a (2006) nije pokazala povišen rizik kod korišćenja tokolitika (Maimburg i Vaeth, 2006). Sa druge strane, skorašnja studija (Gidaya i sar., 2016), utvrdila je povezanost primene beta-adrenergičkih agonista u trudnoći i rizika za razvoj PSA (OR=1,3). U pitanju je studija koja je koristila nacionalne registre i uključila 5200 dece sa PSA, kao i 52.000 kontrola. Rizici su bili podjednako izraženi, bez obzira na to u kom trimestru je lek primenjen. Mehanizam dejstva beta-adrenergičkih agonista koji bi objasnio ovu povezanost nije u potpunosti definisan. Studije koje su se bavile ovom temom, uglavnom su ispitivale terbutalin, beta-agonist koji nije primenjivan u našem uzorku. Studija na životinjama koja je ispitivala mehanizam dejstva terbutalina na CNS u fetalnom periodu pokazala je snažnu aktivaciju i proliferaciju mikroglije, koja, prema ovim autorima, dovodi do značajnih promena u maturaciji i migraciji fetalnih neurona (Zerrate i sar., 2007).

Sa druge strane, studije na životinjama koje su ispitivale efekat produžene primene fenoterola, potvrdile su povećanje produkcije slobodnih radikala, ali su to studije koje su ispitivale kardiomiocite, i u okviru ovih studija efekat fenoterola je bio adekvatan za izazivanje kontrakcije, ne i za oštećenje membrane (Odnoshivkina i sar., 2015). U in vitro studijama, sa druge strane, pokazano je da fenoterol može da bude supstrat za perioksidazu, sa većim afinitetom nego salbutamol, kao i da u slučaju fenoterola dolazi do produkcije reaktivnijih metabolita (Reszka i

sar., 2009), ali je in vivo poznato da je osnovni metabolizam fenoterola konjugacijom, i to u najvećoj meri sulfatima (Gleiter, 1999).

Prikazani rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima infekcije majke u trudnoći kao faktora rizika za PSA (najčešće su u pitanju respiratorne, urinarne infekcije). Naime, velika revijalna studija Jiang i saradnika iz 2016. godine potvrdila da je maternalna infekcija u trudnoći faktor rizika za razvoj PSA. Kada su posmatrane sve prijavljene infekcije, što je rađeno i u našoj studiji, OR je iznosio 1,13. U našoj studiji OR je iznosio 2,41. Ova meta-analiza (Jiang i sar., 2016), uključila je 15 studija, sa ukupno 40.000 slučajeva, te su u njoj rađene dodatne analize po pitanju vrste infekcije, što u našem istraživanju nije rađeno zbog značajno manjeg uzorka, a samim tim i malo pozitivnih odgovora po podgrupama infekcija. Tačni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ove povezanosti nisu u potpunosti jasni. Pretpostavlja se da infektivni organizmi, pored toga što mogu proći placentalnu barijeru, izazivaju aktivaciju imunog sistema majke (Malkova i sar., 2012, Jiang i sar., 2016). Povišeni nivoi specifičnih citokina su u modelima aktivacije imunog sistema majke pokazani u serumu majke, amnionskoj tečnosti, placenti i fetalnom mozgu, i to najčešće IL-6, potom TNF, IL-17, IL-2 i IL-1b (Jiang i sar., 2016). Međutim, određeni autori zastupaju mišljenje da je ono što dovodi do poremećaja u CNS-u fetusa zapravo smanjen prenos kiseonika putem placentе, a ne sam inflamatorni odgovor direktno (Oskvig i sar., 2012). Njihovo istraživanje na animalnim modelima pokazalo je da aktivacija inflamatornog odgovora majke kod fetusa dovodi do pojačane ekspresije gena povezanih sa hipoksijom i oksidativnim stresom.

Takođe, u drugom istraživanju na animalnim modelima pokazano je da po infekciji majke dolazi do pojačane produkcije malonildialdehida, markera oksidativnog stresa u placenti. U istom istraživanju pokazano je i to da se prethodnom primenom N-acetil cisteina smanjuju manifestacije oksidativnog stresa na nivou placentе (Paintlia i sar., 2008). Na taj način može se reći da

inflamatorni odgovor oštećuje placentalni transfer nutrijenata sa majke na fetus, što posledično dovodi do prolazne fetalne hipoksije (Jiang i sar., 2016). Takođe, indirektno, infekcija majke može povećati verovatnoću za druge komplikacije trudnoće i porođaja (Guinchat i sar., 2012).

Kao značajni faktor rizika za razvoj PSA u rezultatima ovog istraživanja izdvojena je i preeklampsija ($p=0,029$). Preeklampsija je sindrom koji se odlikuje hipertenzijom, edemom i proteinurijom, smatra se da nastaje zbog plitke placentacije, što dovodi do hipoperfuzije, i posledično do redukovanja angiogenih faktora rasta. Na taj način povećava se količina placentalnog debrisa u maternalnoj cirkulaciji, što dovodi do značajnog povećanja imunog odgovora, i oštećenja i placentalnog i fetalnog cirkulatornog sistema (Walker i sar., 2015). U prethodnim studijama dobijeni su slični rezultati – relativni rizik je iznosio 1,49 (Burstyn i sar., 2010). Takođe, u sistematskom pregledu rađenom 2012. godine, kao glavni faktor rizika povezan sa trudnoćom, izdvojena je preeklampsija, pored krvarenja u trudnoći (Guinchat i sar., 2012). I novija meta-analiza potvrdila je da je preeklampsija značajan faktor rizika za razvoj PSA. U ovoj meta-analizi, odnos šansi bio je 1,50 (Wang i sar., 2017). Dakle, potencijalni mehanizmi povezanosti preeklampsije i PSA su oslabljeni prenos nutrijenata i kiseonika i povišen oksidativni stres u placenti, kao i hipoksija kod fetusa (Walker i sar., 2015), čiji će efekat zavisiti od primarnog antioksidantnog sistema fetusa. Pored ovog mehanizma, poznato je da žene kod kojih dolazi do razvoja preeklampsije vrlo često dolazi i do prevremenog porođaja, tako da je moguće da kombinacija ova dva faktora rizika povećava verovatnoću razvoja PSA.

Primena progesterona nije značajni faktor rizika za PSA, prema rezultatima naše studije ($p=0,214$). Studija rađena 2013. (Mamidala i sar., 2013) je utvrdila povišen rizik za razvoj autizma kod majki koje su imale bilo kakvu hormonalnu intervenciju (to je uključivalo injekcije progesterona, ali i gonadotropina). Nije rađena odvojena statistička analiza za progesteron. Sa

druge strane, studija iz 2014. godine čak predlaže da je nizak nivo progesterona zapravo faktor rizika za autizam (Whitaker-Azmitia i sar., 2014). Takođe, ni primena antibiotika nije bila povezana sa povećanim rizikom za PSA. Prema našim saznanjima, antibiotici nisu ispitivani kao izolovana grupa lekova, a postoji hipoteza, kao i prikazi slučajeva u kojima je primena antibiotika imala terapijski efekat kod dece sa PSA, i to posebno beta laktamski antibiotici koji svoje efekat ispoljavaju i putem glutamatergičkog sistema (Ghadizaneh i Berk, 2015). U našoj studiji, primena anksiolitika (benzodiazepina) nije značajan faktor rizika za PSA. U prethodnim studijama postojali su vrlo nekonzistentni rezultati, sa značajno različitim ishodnim varijablama koje su merene. Metaanaliza El Marroun i saradnika (2014) ukazala je na nedovoljno uniformno ispitivanje efekta benzodiazepina. Naime, prema ovoj studiji, pojedine studije su pokazivale povezanost primene benzodiazepina i usporenog psihičkog i motornog razvoja, dok u drugima nije dobijen pozitivan rezultat (El Marroun i sar., 2014).

Ni u grupi slučajeva ni u grupi kontrola nije prijavljeno da je majka imala sistemske infekcije u trudnoći (toksoplazma, rubeola, CMV, AIDS), kao ni da je majka imala dijabetes. Samo je jedna majka iz kontrolne grupe imala konvulzije tokom trudnoće.

U uzorku prikazanog istraživanja maternalna starost nije pokazana kao faktor rizika sa PSA, kada je merena kao kontinualna varijabla. Rezultati dosadašnjih studija bili su različiti. Maternalna starost definisana je kao faktor rizika u nekoliko studija (Mamidala i sar., 2013; Shelton i sar., 2010; Durkin i sar., 2008; Croen i sar., 2007). Sa druge strane, pojedinim studijama pokazano je povećanje rizika sa starošću oca, ali ne i majke (Reichenberg i sar., 2006; Sasanfar i sar., 2010). Najnovija metaanaliza koja se bavila prenatalnim i perinatalnim komplikacijama i rizikom za razvoj autizma, pokazala je, na osnovu rezultata 13 studija da je rizik za razvoj PSA kod majke starije od 35 godina iznosio 1,29. Iako rezultat nije bio značajan u našem uzorku, važno je

razumeti mehanizam na koji starost majke utiče na rizik za PSA. Sa jedne strane, smatra se da su u pitanju promene u hormonalnom statusu, potom epigenetske promene (Anello i sar., 2009), dok sa druge strane starost majke predstavlja rizik za druge perinatalne komplikacija kao što je fetalna hipoksija (Maramara i sar., 2014).

Među familijalnim faktorima, izvršena je i procena redosleda rođenja i razmaka između trudnoća kao potencijalnih faktora rizika za PSA, i u oba slučaja povezanost nije pokazana. Redosled rođenja je kategorisan kao prva, druga, treća i posle treće trudnoće, dok je razmak između trudnoća posmatran kao kontinualna varijabla (broj meseci). U prethodnoj literaturi pronađeno je da postoji povećan rizik za autizam kod dece koja su rođena prva (Dodds i sar., 2011; Zwaigenbaum i sar., 2002; Croen i sar., 2002; Glasson i sar., 2004), četvrta ili posle četvrtog (Zwaigenbaum i sar., 2002). Sa druge strane, u studiji Duan i saradnika iz 2014. godine nije bilo razlike ukoliko je dete rođeno prvo ili posle prvog (Duan i sar., 2014), dok je u skorašnjoj metaanalizi utvrđeno da četvrta i posle četvrte trudnoće zapravo predstavljaju protektivni faktor (Wang i sar., 2017).

U studiji Dodds i sar., 2011, pronađeno je da su žene koje su imale kratak interval (manje od 18 meseci) između trudnoća, kao i one koje nisu imale prethodnih trudnoća, pod povećanim rizikom da imaju dete sa autizmom. Novija metaanaliza koja se bavila upravo razmakom između trudnoća i rizikom za autizam, pokazala je da se uprkos heterogenosti postojećih studija može doneti zaključak o tome da su deca žena sa kratkim intervalom između trudnoća (manje od 12 meseci) pod povećanim rizikom za razvoj PSA (OR=1,9). Jedno od mogućih objašnjenja ovog nalaza je hipoteza deficita folne kiseline kod majke. Naime od sredine trudnoće, pa do 4-12 meseci postpartalno, koncentracija folata se značajno smanjuje. Žene koje ostaju trudne pre obnavljanja zaliha folne kiseline imaju povećan rizik za njenu insuficijenciju u trenutku novog začeća i

trudnoće (Conde-Agudelo i sar., 2016; Smits i Essed, 2001). Pokazano je da žene koje su dnevno uzimale folnu kiselinu tri meseca pre i tokom prvog meseca trudnoće, imale manji rizik da imaju dete sa PSA nego žene koje nisu uzimale ovaj suplement. Ovaj nalaz bio je izraženiji u slučaju genetski predisponiranih žena i dece, što ukazuje na to da u osnovi može biti interakcija gena i okoline (Schmidt i sar. 2011; Schmidt i sar., 2012). Prema pojedinim autorima, i folna kiselina može indirektno biti povezana sa oksidativnim stresom – sinteza glutaciona je povezana sa folatnim ciklusom, tako da poremećaj metabolizma folata može dovesti i do poremećaja ćelijskog redox stanja (Sun i sar., 2016). U studiji koja je pratila oksidativni status kod dece sa PSA pre i nakon tromesečne primene folne kiseline pokazano je da dolazi do povećanja nivoa tGSH, povećanja odnosa tGSH/GSSG, kao i smanjenja koncentracije GSSG (Sun i sar., 2016).

Rezultati prikazanog istraživanja takođe nisu pokazali povezanost starosti oca sa PSA. Starost oca je ispitivana kao kontinualna varijabla, ali i kao dihotomna, pri različitim granicama (30, 35 i 40 godina). Ni u jednom slučaju, nije pokazana statistički značajna razlika u starosti oca između grupe slučajeva i kontrola. U svakoj od dihotomizacija, među slučajevima je bilo više starijih očeva od granične vrednosti godina, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost. Rezultati prethodnih studija ipak govore u prilog povezanosti starosti oca sa razvojem PSA. U velikom broju studija potvrđeno je da se rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra povećava sa starošću oca (Reichenberg i sar., 2006; Shelton i sar., 2010; Guinchat i sar., 2012; Durkin i sar., 2008; Croen i sar., 2007; Duan i sar., 2014), dok u studiji rađenoj 2013. godine ovo nije potvrđeno (Mamidala i sar., 2013). Sa druge strane, studija Shelton i sar., 2010. pokazala je da se sa starošću oca rizik za razvoj autizma povećava ukoliko majka ima manje od 30 godina, dok se rizik ne povećava ukoliko je majka starija od 30 godina. Objašnjenje o povezanosti starosti oca i PSA moguće se nalazi u tome da se razvoj germinativnih ćelija začajno razlikuje između osoba muškog

i ženskog pola, odnosno postoji mnogo više deobe ćelija spermatoocita nego oocita (Goriely i sar., 2013). Skorašnja, vrlo važna studija sekvenciranja celokupnog genoma roditelja i potomaka potvrdila je da se oko 80% de novo mutacija pripisuje paternalnom poreklu, kao i da ukupni broj mutacija vrlo čvrsto korelira sa paternalnom starošću (Kong i sar., 2012).

Noviji rad Menezo i saradnika iz 2015. godine predstavio je hipotezu da se povezanost starosti roditelja i PSA može objasniti i efektima oksidativnog stresa (Menezo i sar., 2015). Spermatozoidi starijih muškaraca imaju viši nivo DNK oštećenja, zbog smanjene otpornosti na oksidativni stres, samim tim potomstvo starijih muškaraca ima veću šansu da bude nosilac oboljenja koja nastaju zbog oštećenja DNK. U nedostatku dovoljne količine folne kiseline u oocitu smanjen je kapacitet za recikliranje homocisteina u ranom embrionu. Homocistein je aminokiselina u čijem ciklusu nastaju metionin, značajan za procese metilacije putem S-adenozil metionina sa jedne, i cistein, značajan za sintezu glutationa, sa druge strane. Na taj način, smanjeni nivo folne kiseline koja je neophodna za adekvatno funkcionisanje ovog ciklusa, dovodi do gomilanja homocisteina, smanjene antioksidantne odbrane u oocitu i embrionu, što je povezano sa nizom neuropsihijatrijskih poremećaja (Menezo i sar., 2015).

U prikazanoj studiji nije pokazana povezanost između edukacije majke i oca i razvoja PSA. U dosadašnjim istraživanjima, pokazao je da obrazovanje roditelja koje uključuje četiri i više godine koledža dovodi do povećanog rizika za razvoj PSA (Durkin i sar., 2008; Grether i sar., 2009; Croen i sar., 2007). Najčešće objašnjenje ovakvih nalaza je korelacija obrazovanja i kasnijih godina u kojima se donosi odluka o potomstvu, dok se sa druge strane ovakvi nalazi mogu objasniti češćim obraćanjem za pomoć stručnom licu.

Kao što je već navedeno, samo su tri studije do sada ispitivale udruženo delovanje genotipova GST i okolinskih faktora na rizik za razvoj PSA. Ove studije radila je ista grupa autora (Rahbar i sar., 2014; Rahbar i sar., 2015; Rahbar i sar., 2016). U prvoj je ispitivana interakcija *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1* genotipova i koncentracije arsena u krvi dece sa PSA i grupi dece sa urednim razvojem, gde je pokazano da su nosioci *GSTP1 IleIle* genotipa imali značajno više koncentracije arsena (Rahbar i sar., 2014). U drugoj studiji pokazano je da *GSTP1* genotip ima sinergistički efekat sa visokom koncentracijom mangana u razvoju PSA (Rahbar i sar., 2015). Poslednja studija ove grupe autora ispitivala je povezanost pomenuta tri genotipa i koncentraciju aluminijuma. Utvrđeno je da su nosioci *ValVal* genotipa imali značajno niže koncentracije aluminijuma u odnosu na druge genotipove *GSTP1*, ali da je ova razlika postojala samo u grupi zdravih kontrola, te pretpostavljaju da je PSA status neka vrsta moderatora efekta *GSTP1* genotipa (Rahbar i sar., 2016). U našem uzorku, za *GSTM1* i *GSTAI CC* genotip pokazana je značajna interakcija sa uzimanjem tokolitika u trudnoći i neonatalnom žuticom, pri čemu je rizik u svakoj interakciji bio veći nego kada je ispitivan samostalni efekat ovog genotipa na rizik za razvoj PSA. Iako se u primarnoj analizi razlika u zastupljenosti pojedinih genotipova *GSTP1* i *GSTT1* u studijskoj i kontrolnoj grupi nije pokazala kao značajna, u interakciji sa neonatalnom žuticom svaki od genotipova značajno je povećavao rizik za razvoj PSA u odnosu na osobe sa referentnim genotipovima bez ove vrste izloženosti. Interesantan je negativan nalaz uticaja pušenja majke u trudnoći na rizik za PSA, kao i nedostatak interakcije genotipova i ovog faktora rizika. Ova interakcija je biološki logična, jer je pokazano da je *GSTP1 Val* alel katalitički efikasniji prema benzo-diol-epoksidima koji se mogu naći u duvanskom dimu (Chatterjee i Gupta, 2018). Takođe, glutation S-transferaze su uključene u detoksikaciju i slobodnih radikala i reaktivnih policikličnih metabolita aromatičnih ugljovodonika, koji su prisutni u duvanskom dimu (Wu i Dong, 2012).

Upravo u tom smislu, iznenađujući je negativan rezultat po pitanju uticaja pušenja tokom trudnoće na rizik za PSA, bilo individualno, ili u interakciji sa GST genotipovima. Skorašnja meta analiza je pokazala da pušenje majke u trudnoći nije faktor rizika za PSA, što je u skladu sa našim rezultatima (Tang i sar., 2015). Iako bi potencijalna interakcija pušenja majke u trudnoći i GST genotipova objasnila nedoslednosti u rezultatima studija koje su ispitivale ovu povezanost (Hultamn i sar., 2002; Tang i sar. 2015), prikazana studija nije potvrdila ovu hipotezu. Prema našem saznanju, ovo je prva studija koja ispituje ovu interakciju gena i okoline u poremećajima spektra autizma.

Kao što je već napomenuto, prilikom ispitivanja uticaja izloženosti okolinskim faktorima tokom trudnoće, i perinatalnih komplikacija na razvoj PSA, rezultati su u velikom broju slučajeva bili nekonzistentni. Brojni autori zastupaju mišljenje da je upravo genetska predispozicija ta koja dovodi do različitih rezultata, to jest deluje kao faktor koji menja krajnji ishod (van Tilborg i sar., 2016).

Interesantan nalaz našeg istraživanja bio je da su nosioci *GSTP1 IleIle* genotipa imali značajno viši ukupni IQ skor u odnosu na nosioce *ValVal* genotipa. Na Vineland II skali adaptivnog funkcionisanja nije pokazana statistički značajna razlika, ali je i dalje postojao trend da nosioci *IleIle* genotipa imaju najviše skorove, odnosno najbolje adaptivno funkcionisanje. Takođe, pokazano je da su nosioci makar jednog *Val* alela imali značajno veći rizik za zakasneli razvoj govora u odnosu na nosioce *IleIle* genotipa. Dakle, u sva tri slučaja, *IleIle* genotip bio je na neki način protektivni faktor. Do sada nisu rađena ovakva istraživanja u populaciji osoba sa PSA. Skorašnja studija slučajeva i kontrola koja nije ispitivala genske polimorfizme GST već GST aktivnost, kao i nivo žive i olova u perifernoj krvi dece sa PSA i zdravih kontrola pokazala je značajno veće nivoe olova i žive, zajedno sa smanjenom GST aktivnošću kod osoba sa PSA u

poređenju sa zdravim kontrolama, ali i to da su ovi faktori korelirali sa merama oštećenja socijalne responsivnosti i težine kliničke slike (Alabdali i sar., 2014).

U studiji koja se bavila ispitivanjem interakcije polimorfizama GSTP1, GSTM1 i GSTT1 i prenatalne izloženosti p,p'-DDT-u ([2,2-bis(p-hlorofenil)-1,1,1-trihloroetan]) i njenog uticaja na kognitivne sposobnosti, pokazana je značajna interakcija faktora izloženosti i *GSTP1* genotipa. U pitanju je kohortna studija u kojoj je kod 326-oro dece na rođenju merena koncentracija ovog faktora iz pupčane vrpce, a potom u četvrtoj godini obavljena procena kognitivnog funkcionisanja. Naime, p,p'-DDT koncentracija u pupčanoj vrpci bila je inverzno povezana sa generalnim kognitivnim sposobnostima, memorijom, verbalnim sposobnostima, kao i sa egzekutivnim funkcijama, ali samo kod dece koja su imala makar jedan GSTP1 *Val* alel. GSTP1 polimorfizam i prenatalna izloženost p,p'-DDT pokazali su značajnu interakciju kada su upitanju opšte kognitivne sposobnosti, ($p = 0,05$), egzekutivne funkcije ($p = 0,01$) i radna memorija ($p = 0,02$). U pomenutom radu nisu pokazane značajne asocijacije p,p'-DDT i kognitivnog funkcionisanja u odnosu na GSTM1 i GSTT1 polimorfizme (Morales i sar., 2008). Ovaj nalaz odgovara nalazu iz našeg istraživanja, u kojem su nosioci makar jednog *Val* alela imali lošije rezultate intelektualnog funkcionisanja. Iz svega navedenog, možemo pretpostaviti da je polimorfizam GSTP1, iako nije povezan sa rizikom za PSA, zapravo potencijalno povezan sa rizikom od kongitivnih oštećenja, i to u interakciji sa određenim faktorima koje u ovom istraživanju nismo određivali (na primer izloženost teškim metalima ili drugim potencijalno štetnim faktorima okoline).

Drugi značajan nalaz interakcije genotipova i kliničke slike jeste da je pokazana povezanost *GSTAI* genotipa i rizika za konvulzije tokom života, i to tako da je aktivni *CC* genotip protektivni faktor, što se je nalaz koji se zadržao granično značajnim i za povezanost *GSTAI* genotipa i dijagnoze epilepsije. Nije utvrđena povezanost između drugih *GST* genotipova i

konvulzija, kao ni epilepsije. Skorašnja studija koja je ispitivala povezanost GST polimorfizama i progresivne miokloničke epilepsije (PME) (Ercegovac i sar., 2015), ukazala je na potencijalnu povezanost *GSTT1 nultog* genotipa i rizika za nastanak PME, dok je u ispitivanju kombinovanih genotipova pokazano da je kombinacija *GSTAI aktivni /GSTT1 nulti* genotip u najvećem riziku za razvoj PME, što nije u skladu sa našim rezultatom, gde je ovaj *GSTAI* genotip delovao protektivno. To se delimično može objasniti činjenicom da je u ovom radu ispitivana PME koja predstavlja specifičnu formu epilepsije, retko nasledno oboljenje koje se pored konvulzija karakteriše mioklonusom i progresivnom neurološkom deterioracijom (Ercegovac i sar., 2015), dok je kod nas značajna povezanost pokazana samo za podatak o postojanju konvulzija u okviru kliničke slike PSA. U našem uzorku nije bilo povezanosti genotipova *GSTT1*, *GSTP1* i *GSTM1* i konvulzija. Skorašnja studija rađena u tunižanskoj populaciji pokazala je povezanost *GSTM1 nultog* genotipa i razvoja epilepsije (Chbili i sar., 2014).

Iz svega navedenog može se reći da polimorfna ekspresija glutation S-transferaza može da utiče na individualnu osetljivost za razvoj poremećaja autističnog spektra. Ipak, prisustvo različitih GST genskih varijanti mora biti ispitano zajedno sa drugim genetskim i sredinskim faktorima. Kao što je napomenuto, dosadašnji nekonzistentni rezultati uticaja određenih faktora okoline na rizik za razvoj PSA mogu biti objašnjeni sakrivenim interakcijama gena i okoline, u čijoj osnovi može biti genetska varijacija. Na taj način, činjenica da određeni prenatalni faktor nije čvrsto povezan sa povećanim rizikom za PSA u opštoj populaciji ne isključuje mogućnost da postoji senzitivna genotipom određena subpopulacija.

U ovom istraživanju postoje određena ograničenja. Dizajn slučajeva i kontrola u ovom istraživanju korišćen je za procenu povezanosti individualnih i kombinovanih *GST* genotipova i povećanog rizika za razvoj PSA, te selekciona pristrasnost može uticati na rezultate. Takođe, naša

kontrolna grupa je bolnička, i relativno male veličine, te bi korišćenje populacionih kontrola bilo adekvatniji. Pored toga, eventualni uticaj etničke pripradnosti nije mogao biti ispitan u ovom istraživanju, s obzirom na to da su učesnici bili samo bele rase. Statistička moć (odnosno mogućnost greške tipa II udružene sa malom veličinom efekta) mora da se uzme u obzir pri interpretaciji naših rezultat. U tom smislu, dalje ispitivanje uz korišćenje većih uzoraka neophodno je za bolje razumevanje povezanosti *GST* genskih varijanti, delovanja značajnih faktora okoline i povišenog rizika za PSA.

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ove studije pokazali su razliku u obrascu translacije kliničkih simptoma u adaptivno funkcionisanje između dečaka i devojčica sa PSA, u kojem kod dečaka postoji prediktabilniji efekat kliničkih simptoma na adaptivno ponašanje i svakodnevne životne veštine, kod devojčica je taj efekat prediktabilniji za domen socijalizacije i komunikacije, dok je socijalni reciprocitet suštinska klinička karakteristika koja je pod uticajem pola u kontekstu funkcionalnog ishoda, a gde se devojčice paradoksalno vide kao manje socijalizovane onda kada su zapravo socijalno interaktivnije.

2. Značajan nalaz ove studije je to da su *GSTM1 nulli* genotip i *GSTA1 CC* genotip značajno češće prisutni kod pacijenata sa PSA u odnosu na zdrave kontrole. Kombinovani *GSTM1 aktivni* i *GSTT1 aktivni* genotip, kao i kombinovani *GSTT1 aktivni* i *GSTP1 IleIle* genotip takođe smanjuju ASD rizik, dok kombinovani *GSTM1 aktivni* i *GSTP1 IleIle* genotip značajno povećavaju rizik za razvoj PSA. Ovaj nalaz bi mogao da potvrdi pretpostavku o značaju gen-gen interakcije u genetskim ispitivanjima složenih poremećaja kao što je PSA.

3. Ovo istraživanje pokazalo je da postojanje perinatalnih komplikacija uopšte, nedonesenosti, neonatalne žutice, kao i respiratornog distres sindroma takođe predstavlja faktor rizika za razvoj PSA. Uzimanje bilo kakvih lekova u trudnoći, uzimanje tokolitika tokom trudnoće, infekcija majke tokom trudnoće, kao i preeklampsija takođe predstavljaju značajne faktore rizika za PSA prema rezultatima ovom istraživanju.

4. Kombinovani efekat pojedinih *GST* genotipova i određenih faktora koji deluju u trudnoći (uzimanje tokolitika, neonatalna žutica) značajno povećava rizik za razvoj PSA, što može biti dokaz gen-okolina interakcije u okviru etiologije kompleksnog poremećaja kao što je PSA.

5. Na osnovu prezentovanih rezultata moguće je pretpostaviti jedan deo etiologije složenog psihijatrijskog poremećaja kakav je autizam. Naime, može se pretpostaviti interakcija gena i okoline u čijoj se osnovi, u oba smera nalazi oksidativni stres. U ovom istraživanju polimorfizam GST gena predstavlja element oksidativnog stresa u smislu genetske varijante, dok je većina pre i perinatalnih faktora okoline takođe povezana sa mehanizmima oksidativnog stresa. Ukoliko se ovi nalazi potvrde na većim uzorcima, definisanje lične vulnerabilnosti u okviru puta oksidativnog stresa moglo bi imati veliki značaj u ranom otkrivanju, pa i prevenciji razvoja poremećaja autističnog spektra.

7. LITERATURA

1. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107(2):229-233.
2. Alabdali A, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. A key role for an impaired detoxification mechanism in the etiology and severity of autism spectrum disorders. *Behav Brain Funct* 2014; 10:14. doi: 10.1186/1744-9081-10-14.
3. Allocati N, Favaloro B, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem J* 2003; 373:305–311.
4. Altuner Torun Y, Ertural U, Ergul AB, Karakukcu C, Akin MA. Reduction in serum paraoxonase level in newborns with hyperbilirubinemia as a marker of oxidative stress. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;1-4.
5. American Association on Mental Retardation. *Mental retardation: Definition, classification and systems of supports*. American Association on Mental Retardation, Washington, D.C., USA, 2002.
6. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1980.
7. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
8. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Washington, DC: Author; 2013.

9. Anello A, Reichenberg A, Luo X, Schmeidler J, Hollander E, Smith CJ, et al. Brief report: parental age and the sex ratio in autism. *J Autism Dev Disord* 2009; 39(10):1487-1492.
10. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 1997; 10:2–18.
11. Ashwood P, Corbett BA, Kantor A, Schulman H, Van de Water J, Amaral DG. In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One* 2011; 6(5):e19299. doi: 10.1371/journal.pone.0019299.
12. Asperger H. Die 'Autistischen Psychopathen' im Kindesalter. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1944; 117: 76-136
13. Ayyappan S, Philip S, Bharathy N, Ramesh V, Kumar CN, Swathi S, et al. Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy. *J Pharm Bioallied Sci* 2015; 7(Suppl 1):S16-21. doi: 10.4103/0975-7406.155766
14. Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: a primary cerebral dysmaturation disorder? *Ann Neurol* 2014; (75):469–486.
15. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018 Apr 27; 67(6):1-23.
16. Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T, Meldrum D, et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet* 2006; 368(9531):210-215.
17. Baron-Cohen S, Knickmeyer RC, Belmonte MK. Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science* 2005; 310(5749):819-823.

18. Basu S, De D, Dev Khanna H, Kumar A. Lipid peroxidation, DNA damage and total antioxidant status in neonatal hyperbilirubinemia. *J Perinatol* 2014; 34(7):519-523. doi:10.1038/jp.2014.45.
19. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995; 25(1):63-77.
20. Bailey A, Palferman S, Heavey L, Le Couteur A. Autism: the phenotype in relatives. *J Autism Dev Disord* 1998; 28(5):369-392.
21. Ben Salah G, Kallabi F, Maatoug S, Mkaouar-Rebai E, Fourati A, Fakhfakh F, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferases M1, T1, P1 and A1 genes in the Tunisian population: an intra and interethnic comparative approach. *Gene* 2012; 498(2):317-322.
22. Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P. Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics* 2001; 108(5):1155-1161.
23. Bowers K, Li Q, Bressler J, Avramopoulos D, Newschaffer C, Fallin MD. Glutathione pathway gene variation and risk of autism spectrum disorders. *J Neurodev Disord* 2011; 3(2):132-143.
24. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA, Liverpool, Manchester Neurodevelopment Group. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology* 2008; 71:1923-1924.

25. Buchmayer S, Johansson S, Johansson A, Hultman CM, Sparén P, Cnattingius S. Can association between preterm birth and autism be explained by maternal or neonatal morbidity? *Pediatrics* 2009; 124(5):e817-25.
26. Burd L, Severud R, Kerbeshian J, Klug MG. Prenatal and perinatal risk factors for autism. *J Perinat Med* 1999; 27(6):441-450.
27. Burstyn I, Sithole F, Zwaigenbaum L. Autism spectrum disorders, maternal characteristics and obstetric complications among singletons born in Alberta, Canada. *Chronic Dis Can* 2010; 30(4):125-134.
28. Buyske S, Williams TA, Mars AE, Stenroos ES, Ming SX, Wang R, et al. Analysis of case-parent trios at a locus with a deletion allele: association of GSTM1 with autism. *BMC Genet* 2006;7:8.
29. Carter AS, Black DO, Tewani S, Connolly CE, Kadlec MB, Tager-Flusberg H. Sex differences in toddlers with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2007; 37:86–97.
30. Castejon AM & Spaw JA. Autism and Oxidative Stress Interventions: Impact on Autistic Behavior. *Austin J Pharmacol Ther* 2014; 2(2):1015.
31. Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of Autism Spectrum Disorders — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. 2012; Available at www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6103a1.htm?scid=ss6103alw (accessed 10 August 2013).
32. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett* 2018;433:33-42.

33. Chauhan A & Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology* 2006; 13(3):171-181.
34. Chbili C, B'chir F, Ben Fredj M, Saguem BN, Ben Amor S, Ben Ammou S, et al. Effects of glutathione S-transferase M1 and T1 deletions on epilepsy risk among a Tunisian population. *Epilepsy Res* 2014; 108(7):1168-1173.
35. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6:187–191.
36. Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* 2016; 65(No. SS-3):1-23.
37. Christensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 2013; 309:1696–1703.
38. Cohen SM. Jaundice in the full term born. *Pediatr nur* 2006; 32(3):202-208.
39. Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutat Res* 2001; 482(1-2):3-10.
40. Coles BF & Kadlubar FF. Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods Enzymol* 2005; 401:9-42.

41. Conde-Agudelo A, Rosas-Bermudez A, Norton MH. Birth Spacing and Risk of Autism and Other Neurodevelopmental Disabilities: A Systematic Review. *Pediatrics* 2016; 137(5).
42. Constantino JN, Zhang Y, Frazier T, Abbacchi AM, Law P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am J Psychiatry* 2010; 167:1349-1356.
43. Coric VM, Simic TP, Pekmezovic TD, Basta-Jovanovic GM, Savic Radojevic AR, Radojevic-Skodric SM, et al. Combined GSTM1-Null, GSTT1-Active, GSTA1 Low-Activity and GSTP1-Variant Genotype Is Associated with Increased Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One* 2016; 11(8):e0160570. doi: 10.1371/journal.pone.0160570. eCollection 2016.
44. Costa LG, Chang YC, Cole TB. Developmental Neurotoxicity of Traffic-Related Air Pollution: Focus on Autism. *Curr Environ Health Rep.* 2017 Jun;4(2):156-165.
45. Croen LA, Grether JK, Selvin S. Descriptive epidemiology of autism in a California population: Who is at risk? *J Autism Dev Disord* 2002; 32(3):217–224.
46. Croen LA, Yoshida CK, Odouli R, Newman TB. Neonatal hyperbilirubinemia and risk of autism spectrum disorders. *Pediatrics* 2005; 115(2):e135-8.
47. Croen LA, Najjar DV, Fireman B, Grether JK. Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(4): 334-340.
48. Crow JF. A new study challenges the current belief of a high human male:female mutation ratio. *Trends Genet* 2000; 16(12):525–526.
49. de Jonge MV, Kemner C, van Engeland H. Superior disembedding performance of high-functioning individuals with autism spectrum disorders and their parents: the need for subtle measures. *J Autism Dev Disord* 2006; 36(5):677-683.

50. Depino AM. Maternal infection and the offspring brain. *J Neurosci* 2006; 26(30):7777-7778.
51. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 2014; 515(7526):209-215. doi: 10.1038/nature13772. Epub 2014 Oct 29.
52. Desmots F, Rissel M, Loyer P, Turlin B, Guillouzo A. Immunohistological analysis of glutathione transferase A4 distribution in several human tissues using a specific polyclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(12):1573-1580.
53. Devlin B & Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(3):229-237. doi: 10.1016/j.gde.2012.03.002.
54. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6:153–170.
55. Dizdar EA, Uras N, Oguz S, Erdeve O, Sari FN, Aydemir C, et al. Total antioxidant capacity and total oxidant status after surfactant treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Ann Clin Biochem* 2011; 48:462–467.
56. Dodds L, Fell DB, Shea S, Armson BA, Allen AC, Bryson S. The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *J Autism Dev Disord* 2011; 41(7):891-902. doi: 10.1007/s10803-010-1114-8.
57. Duan G, Yao M, Ma Y, Zhang W. Perinatal and background risk factors for childhood autism in central China. *Psychiatry Res* 2014; 220(1-2):410-417.
58. Durkin MS, Maenner MJ, Newschaffer CJ, Lee LC, Cunniff CM, Daniels JL, et al. Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *Am J Epidemiol* 2008; 168(11):1268-1276.

59. Dworzynski K, Ronald A, Bolton P, Happé F. How different are girls and boys above and below the diagnostic threshold for autism spectrum disorders? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2012; 51:788–797.
60. El Marroun H, White T, Verhulst FC, Tiemeier H. Maternal use of antidepressant or anxiolytic medication during pregnancy and childhood neurodevelopmental outcomes: a systematic review. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2014; 23(10):973-992. doi: 10.1007/s00787-014-0558-3.
61. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002; 20(1):61-66.
62. Ercegovic M, Jovic N, Sokic D, Savic-Radojevic A, Coric V, Radic T, et al. GSTA1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 polymorphisms in progressive myoclonus epilepsy: A Serbian case-control study. *Seizure* 2015; 32:30-36.
63. Fisch GS. Autism and epistemology III: Child development, behavioral stability, and reliability of measurement. *Am J Med Genet A* 2012; 158A(5):969-979. doi: 10.1002/ajmg.a.35269.
64. Fombonne E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord* 2003; 33(4):365-382.
65. Folsom TD & Fatemi SH. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* 2013; 68:122–135.
66. Frazier TW, Georgiades S, Bishop SL, Hardan AY. Behavioral and cognitive characteristics of females and males with autism in the Simons Simplex Collection. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2014; (53)3:329-340.
67. Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 2006; 23(4):149-169.

68. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla Bernardina B, et al. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(10):2128-21241.
69. Fuciarelli M, Caccuri A, De Francesca M, Ferazzoli F, Piacentini S, Porreca F. Modulation of the GSTT1 activity by the GSTM1 phenotype in a sample of Italian farm-workers. *Arch Toxicol* 2009; 83(2):115-120.
70. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2009;195(1):7-14. doi: 10.1192/bjp.bp.108.051672.
71. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics* 2011; 128(2):344-355.
72. Garofoli F, Lombardi G, Orcesi S, Pisoni C, Mazzucchelli I, Angelini M, et al. An Italian Prospective Experience on the Association Between Congenital Cytomegalovirus Infection and Autistic Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 2017; 47(5):1490-1495. doi: 10.1007/s10803-017-3050-3.
73. Ghanizadeh A, Berk M. Beta-lactam antibiotics as a possible novel therapy for managing epilepsy and autism, a case report and review of literature. *Iran J Child Neurol* 2015; 9(1):99-102.
74. Gidaya NB, Lee BK, Burstyn I, Yudell M, Mortensen EL, Newschaffer CJ. In utero exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and risk for autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2014; 44:2558–2567.
75. Gidaya NB, Lee BK, Burstyn I, Michael Y, Newschaffer CJ, Mortensen EL. In utero Exposure to β -2-Adrenergic Receptor Agonist Drugs and Risk for Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics* 2016;137(2):e20151316. doi: 10.1542/peds.2015-1316.

76. Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* 2004; 363(9403):119–125.
77. Glasson EJ, Bower C, Petterson B, de Klerk N, Chaney G, Hallmayer JF. Perinatal factors and the development of autism: a population study. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61(6):618-627.
78. Gleiter CH. Fenoterol: farmacology and clinical use. *Cardiovascular Drug Reviews* 1991; 17(1):87–106.
79. Goriely A, McGrath JJ, Hultman CM, Wilkie AO, Malaspina D. "Selfish spermatogonial selection": a novel mechanism for the association between advanced paternal age and neurodevelopmental disorders. *Am J Psychiatry* 2013; 170(6):599-608.
80. Gotham K, Pickles A, Lord C. Standardizing ADOS scores for a measure of severity in autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2009; 39:693–705.
81. Grether JK, Anderson MC, Croen LA, Smith D, Windham GC. Risk of autism and increasing maternal and paternal age in a large north American population. *Am J Epidemiol.* 2009; 170(9):1118-1126. doi: 10.1093/aje/kwp247.
82. Guinchat V, Thorsen P, Laurent C, Cans C, Bodeau N, Cohen D. Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012; 91(3):287-300.
83. Guisso DR, Saadeh FS, Saab D, El Deek J, Chamseddine S, Abou-El-Hassan H, et al. Association of Autism with Maternal Infections, Perinatal and Other Risk Factors: A Case-Control Study. *J Autism Dev Disord* 2018;48(6):2010-2021.
84. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22):7130-7139.

85. Hadjkacem I, Ayadi H, Turki M, Yaich S, Khemekhem K, Walha A, et al. Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. *J Pediatr (Rio J)* 2016; 92(6):595-601.
86. Haglund NG & Källén KB. Risk factors for autism and Asperger syndrome. Perinatal factors and migration. *Autism* 2011; 15(2):163-183.
87. Hamilton DS, Zhang X, Ding Z, Hubatsch I, Mannervik B, Houk KN, et al. Mechanism of the glutathione transferase-catalyzed conversion of antitumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts. *J Am Chem Soc* 2003; 125(49):15049-15058.
88. Hansen SN, Schendel DE, Parner ET. Explaining the increase in the prevalence of autism spectrum disorders: the proportion attributable to changes in reporting practices. *JAMA Pediatr* 2015; 169(1):56-62.
89. Harrington RA, Lee LC, Crum RM, Zimmerman AW, Hertz-Picciotto I. Prenatal SSRI use and offspring with autism spectrum disorder or developmental delay. *Pediatrics* 2014; 133:e1241–8.
90. Hartley SL & Sikora DM. Sex differences in autism spectrum disorder: an examination of developmental functioning, autistic symptoms, and coexisting behavior problems in toddlers. *J Autism Dev Disord* 2009; 39:1715–1722.
91. Hayes AF. *Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis: A Regression-Based Approach*. Guilford Publications, US; 2013.
92. Hayes JD & Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61:154–166.

93. Hayes JD & Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445–600.
94. Hayes JD & McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31:273–300.
95. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51–88.
96. Hehir-Kwa JY, Rodriguez-Santiago B, Vissers LE, de Leeuw N, Pfundt R, Buitelaar JK, et al. De novo copy number variants associated with intellectual disability have a paternal origin and age bias. *J Med Genet* 2011; 48(11):776–778.
97. Herbert MR. Large brains in autism: the challenge of pervasive abnormality. *Neuroscientist* 2005; 11(5):417-440.
98. Hertz-Picciotto I & Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology* 2009; 20(1):84-90. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181902d15.
99. Hiragi CO, de Oliveira SF, Hatagima A, Ferreira LB, Grisolia CK, Klautau-Guimaraes MN. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants. *Human Biology* 2007; 79:131–140.
100. Holtmann M, Bölte S, Poustka F. Autism spectrum disorders: sex differences in autistic behavior domains and coexisting psychopathology. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49:361–366.
101. Honda H, Shimizu Y, Imai M, Nitto Y. Cumulative incidence of childhood autism: a total population study of better accuracy and precision. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47(1):10-18.

102. Hou L, Honaker MT, Shireman LM, Balogh LM, Roberts AG, Ng KC, et al. Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 2007; 282(32):23264-74.
103. Huerta M, Bishop SL, Duncan A, Hus V, Lord C. Application of DSM-5 criteria for autism spectrum disorder to three samples of children with DSM-IV diagnoses of pervasive developmental disorders. *Am J Psychiatry* 2012; 169(10):1056-1064. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12020276.
104. Hultman CM, Sparen P, Chantingius S. Perinatal riskfactors for infantile autism. *Epidemiology* 2002; 13(4):417-423.
105. Hultman CM, Sandin S, Levine SZ, Lichtenstein P, Reichenberg A. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiatry* 2011; 16(12):1203-1212. doi: 10.1038/mp.2010.121.
106. Hurst RD, Heales SJ, Dobbie MS, Barker JE, Clark JB. Decreased endothelial cell glutathione and increased sensitivity to oxidative stress in an in vitro blood-brain barrier model system. *Brain Res* 1998; 802(1-2):232-240.
107. Hus V, Pickles A, Cook EH Jr, Risi S, Lord C. Using the autism diagnostic interview--revised to increase phenotypic homogeneity in genetic studies of autism. *Biol Psychiatry* 2007; 61(4):438-448.
108. Hviid A, Melbye M, Pasternak B. Use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of autism. *N Engl J Med* 2013; 369:2406-2415.
109. ICD 11 Beta draft. <http://apps.who.int/classifications/icd11/browse/l-m/en>.

110. Iorio A, Spinelli M, Polimanti R, Lorenzi F, Valensise H, Manfellotto D, et al. GSTA1 gene variation associated with gestational hypertension and its involvement in pregnancy-related pathogenic conditions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2015; 194:34-37. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.08.006.
111. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141B(8):947-956
112. James SJ, Rose S, Melnyk S, Jernigan S, Blossom S, Pavliv O, Gaylor DW. Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. *FASEB J* 2009; 23(8):2374-2383.
113. Jiang HY, Xu LL, Shao L, Xia RM, Yu ZH, Ling ZX, et al. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immu* 2016; 58:165-172. doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.005.
114. Johnson S, Hollis C, Kochhar P, Hennessy E, Wolke D, Marlow N. Autism spectrum disorders in extremely preterm children. *J Pediatr* 2010; 156(4):525-531.
115. Joseph PD. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics* 2010; 876940.
116. Kalkbrenner AE, Schmidt RJ, Penlesky AC. Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2014; 44(10):277-318.
117. Kanne SM, Gerber AJ, Quirnbach LM, Sparrow SS, Cicchetti DV, Saulnier CA. The role of adaptive behavior in autism spectrum disorders: implications for functional outcome. *J Autism Dev Disord* 2011; 41:1007–1018.

118. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943; 2:217–250.
119. Kellen E, Hemelt M, Broberg K, Golka K, Kristensen VN, Hung RJ, et al. Pooled analysis and meta-analysis of the glutathione S-transferase P1 Ile 105Val polymorphism and bladder cancer: HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2007; 165(11):1221-1230.
120. Kern JK & Jones AM. Evidence of toxicity, oxidative stress, and neuronal insult in autism. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006;9(6):485-499.
121. Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, Hus V, Lowe JK, Willsey AJ, et al. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism* 2012; 3(1):9. doi: 10.1186/2040-2392-3-9.
122. Klin A, Saulnier CA, Sparrow SS, Cicchetti DV, Volkmar FR, Lord C. Social and communication abilities and disabilities in higher functioning individuals with autism spectrum disorders: the Vineland and the ADOS. *J Autism Dev Disord* 2007; 37:748–759.
123. Knapen MF, van der Wildt B, Sijtsma EG, Peters WH, Roelofs HM, Steegers EA. Glutathione S-transferase Alpha 1-1 and aminotransferases in umbilical cord blood. *Early Hum Dev* 1999; 54(2):129-135.
124. Kobayashi T, Matsuyama T, Takeuchi M, Ito S. Autism spectrum disorder and prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Toxicol* 2016; 65:170-178.
125. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012; 488:471–475.

126. Kopp S & Gillberg C. The Autism Spectrum Screening Questionnaire (ASSQ)-Revised Extended Version (ASSQ-REV): an instrument for better capturing the autism phenotype in girls? A preliminary study involving 191 clinical cases and community controls. *Res Dev Disabil* 2011; 32:2875–2888.
127. Koufaris C & Sismani C. Modulation of the genome and epigenome of individuals susceptible to autism by environmental risk factors. *Int J Mol Sci* 2015; 16(4):8699-86718.
128. Lai MC, Lombardo MV, Pasco G, Ruigrok AN, Wheelwright SJ, Sadek SA, et al. A behavioral comparison of male and female adults with high functioning autism spectrum conditions. *PLoS One* 2011; 6(6):e20835. doi: 10.1371/journal.pone.0020835.
129. Lainhart JE, Ozonoff S, Coon H, Krasny L, Dinh E, Nice J, et al. Autism, regression, and the broader autism phenotype. *Am J Med Genet* 2002; 113(3):231-237.
130. Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000; 463(3):247-283.
131. Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, et al. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol* 2005; 161(10):916-925.
132. Le Couteur A, Lord C, Rutter M. *Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R)*. Western Psychological Services; 2003.
133. Leiers B, Kampkotter A, Grevelding CG, Link CD, Johnson TE, Henkle-Duhrsen K. A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1405–1415.
134. Lotter V. Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social psychiatry* 1966; 1(3):124–135.

135. Maccoby EE. *The two sexes: Growing up apart. Coming together.* MA, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge; 1998.
136. Maimburg RD & Vaeth M. Perinatal risk factors and infantile autism. *Acta Psychiatr Scand* 2006; 114(4):257-264.
137. Maimburg RD, Vaeth M, Schendel DE, Bech BH, Olsen J, Thorsen P. Neonatal jaundice: a risk factor for infantile autism? *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 22(6):562-568.
138. Maimburg RD, Bech BH, Vaeth M, Moller-Madsen B, Olsen J. Neonatal jaundice, autism, and other disorders of psychological development. *Pediatrics* 2010; 126(5):872-878.
139. Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun* 2012; 12:607–616.
140. Mamidala MP, Polinedi A, P T V PK, Rajesh N, Vallamkonda OR, Udani V, et al. Prenatal, perinatal and neonatal risk factors of Autism Spectrum Disorder: a comprehensive epidemiological assessment from India. *Res Dev Disabil* 2013; 34(9):3004-3013.
141. Mamidala MP, Polinedi A, Kumar PT, Rajesh N, Vallamkonda OR, Udani V, Singhal N, Rajesh V. Maternal hormonal interventions as a risk factor for Autism Spectrum Disorder: an epidemiological assessment from India. *J Biosci* 2013;38(5):887-92.

142. Mandic-Maravic V, Pejovic-Milovancevic M, Mitkovic-Voncina M, Kostic M, Aleksic-Hil O, Radosavljev-Kircanski J, et al. Sex differences in autism spectrum disorders: does sex moderate the pathway from clinical symptoms to adaptive behavior? *Sci Rep* 2015; 5:10418.
143. Mandy W, Chilvers R, Chowdhury U, Salter G, Seigal A, Skuse D. Sex differences in Autism spectrum disorders: Evidence from a large sample of children and adolescents. *J Autism Dev Disord* 2012; 42:1304–1313.
144. Maramara LA, He W, Ming X. Pre- and perinatal risk factors for autism spectrum disorder in a New Jersey cohort. *J Child Neurol* 2014; 29(12):1645-1651.
145. McGuire W. Perinatal asphyxia. *BMJ Clin Evid* 2007;2007. pii: 0320.
146. McLennan JD, Lord C, Schopler E. Sex differences in higher functioning people with autism. *J Autism Dev Disord* 1993; 23:217-227.
147. Meguid NA, Nashaat NH, Hashem HS, Khalil MM. Frequency of risk factors and coexisting abnormalities in a population of Egyptian children with autism spectrum disorder. *Asian J Psychiatr* 2018;32:54-58.
148. MenezoYJ, Elder K, Dale B. Link Between Increased Prevalence of Autism Spectrum Disorder Syndromes and Oxidative Stress, DNA Methylation, and Imprinting: The Impact of the Environment. *JAMA Pediatr* 2015; 169(11):1066-1067. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.2125.
149. Miles JH. Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genetics in Medicine* 2011; 13(4):278–294.

150. Modabbernia A, Mollon J, Boffetta P, Reichenberg A. Impaired Gas Exchange at Birth and Risk of Intellectual Disability and Autism: A Meta-analysis. *J Autism Dev Disord* 2016; 46(5):1847-1859. doi: 10.1007/s10803-016-2717-5.
151. Morales E, Sunyer J, Castro-Giner F, Estivill X, Julvez J, Ribas-Fitó N, et al. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on cognitive functioning effects induced by p,p'-DDT among preschoolers. *Environ Health Perspect* 2008; 116(11):1581-1585. doi: 10.1289/ehp.11303.
152. Moseley RL, Hitchiner R, Kirkby JA. Self-reported sex differences in high-functioning adults with autism: a meta-analysis. Moseley RL, Hitchiner R, Kirkby JA. *Mol Autism* 2018;9:33.
153. Mouga S, Almeida J, Café C, Duque F, Oliveira G. Adaptive Profiles in Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. *J Autism Dev Disord* 2015; 45(4):1001-1012. doi: 10.1007/s10803-014-2256-x.
154. Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. A novel approach to study oxidative stress in neonatal respiratory distress syndrome. *BBA Clin* 2014; 3:65-69.
155. Odnozhivkina UG, Sytchev VI, Nurullin LF, Giniatullin AR, Zefirov AL, Petrov AM. β 2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect. *Eur J Pharmacol* 2015; 765:140-153. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.020.
156. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci* 2011; 120 Suppl 1:S49-75.

157. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol* 2015; 56:155-169. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.05.007.
158. Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun* 2012; 26(4):623-634. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.015.
159. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response and phospholipids metabolism at the feto-maternal interface by N-acetyl cysteine. *Pediatr Res* 2008; 64(4):334-339. doi: 10.1203/PDR.0b013e318181e07c.
160. Pasamanick B, Rogers ME, Lilienfeld AM. Pregnancy experience and the development of behavior disorders in children. *Am J Psychiatry* 1956; 112:613-618.
161. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, et al. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 1993; 53(1):220-233.
162. Pejović Milovančević M, Vešić M, Jelisavčić M, Nikšić S, Pilić GR, Mandić Maravić V. Family paracentric inversion of the short arm of chromosome X (Xp21.2p11.23) and connection with autism spectrum disorders. *Srp Arh Celok Lek* 2012; 140(11-12):760-764.

163. Pejovic-Milovancevic MM, Mandic-Maravic VD, Coric VM, Mitkovic-Voncina MM, Kostic MV, Savic-Radojevic AR. Glutathione S-Transferase Deletion Polymorphisms in Early-Onset Psychotic and Bipolar Disorders: A Case-Control Study. *Lab Med* 2016; 47(3):195-204. doi: 10.1093/labmed/lmw017.
164. Perera FP, Whyatt R, Hoepner L, Wang S, Camann D, Rauh V. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 2009; 124(2):e195–202. doi:10.1542/peds.2008-3506 94.
165. Perry A, Flanagan HE, Dunn Geier J, Freeman NL. Brief report: the Vineland Adaptive Behavior Scales in young children with autism spectrum disorders at different cognitive levels. *J Autism Dev Disord* 2009; 39:1066–1078.
166. Piacentini S, Polimanti R, Squitti R, Ventriglia M, Cassetta E, Vernieri F, et al. GSTM1 null genotype as risk factor for late-onset Alzheimer's disease in Italian patients. *J Neurol Sci* 2012; 317(1-2):137-140.
167. Pickles A, Bolton P, Macdonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim CH, et al. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. *Am J Hum Genet* 1995; 57(3):717-726.
168. Pilowsky T, Yirmiya N, Shulman C, Dover R. The Autism Diagnostic Interview-Revised and the Childhood Autism Rating Scale: differences between diagnostic systems and comparison between genders. *J Autism Dev Disord* 1998; 28:143–151.
169. Ping J, Wang H, Huang M, Liu ZS. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence of genotype on enzymatic properties. *Toxicol Sci* 2006; 89(2):438-443.

170. Piven J, Palmer P, Jacobi D, Childress D, Arndt S. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry* 1997; 154(2):185-190.
171. Polimanti R, Piacentini S, Fuciarelli M. HapMap-based study of human soluble glutathione S-transferase enzymes: the role of natural selection in shaping the single nucleotide polymorphism diversity of xenobiotic-metabolizing genes. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21:665–672.
172. Polimanti R, Carboni C, Baesso I, Piacentini S, Iorio A, De Stefano GF, et al. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: functional inter-ethnic differences in detoxification systems. *Gene* 2013; 512(1):102-107.
173. Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, Tiribelli C. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signal* 2014; 26(3):512-520. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.029.
174. Radovanovic S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Djukic T, Suvakov S, Krotin M, et al. Markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2012;18(6):493-501.
175. Raicevic S, Eventov-Friedman S, Bolevich S, Selakovic D, Joksimovic J, Djuric J, et al. Correlation between oxidative stress and G6PD activity in neonatal jaundice. *Mol Cell Biochem* 2014; 395(1-2):273-279. doi: 10.1007/s11010-014-2136-x.

176. Rahbar MH, Samms-Vaughan M, Ma J, Bressler J, Loveland KA, Ardjomand-Hessabi M, et al. Role of metabolic genes in blood arsenic concentrations of Jamaican children with and without autism spectrum disorder. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11:7874–7895.
177. Rahbar MH, Samms-Vaughan M, Ma J, Bressler J, Loveland KA, Hessabi M, et al. Interaction between GSTT1 and GSTP1 allele variants as a risk modulating-factor for autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord* 2015; 12:1-9.
178. Rahbar MH, Samms-Vaughan M, Ma J, Bressler J, Dickerson AS, Hessabi M, et al. Synergic effect of GSTP1 and blood manganese concentrations in Autism Spectrum Disorder. *Res Autism Spectr Disord* 2015; (18):73-82.
179. Rahbar MH, Samms-Vaughan M, Pitcher MR, Bressler J, Hessabi M, Loveland KA, et al. Role of Metabolic Genes in Blood Aluminum Concentrations of Jamaican Children with and without Autism Spectrum Disorder. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(11).
180. Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S et al. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63(9):1026-1032.
181. Reszka KJ, McGraw DW, Britigan BE. Peroxidative metabolism of beta2-agonists salbutamol and fenoterol and their analogues. *Chem Res Toxicol* 2009; 22(6):1137-1150. doi: 10.1021/tx900071f.
182. Rinehart NJ, Cornish KM, Tonge BJ. Gender differences in neurodevelopmental disorders: autism and fragile x syndrome. *Curr Top Behav Neurosci* 2011; 8:209-229. doi: 10.1007/7854_2010_96.

183. Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 1999; 65(2):493-507.
184. Ritvo ER & Freeman BJ. Current research on the syndrome of autism: introduction. The National Society for Autistic Children's definition of the syndrome of autism. *J Am Acad Child Psychiatry* 1978; 17:565–575.
185. Rutter M. Aetiology of autism: findings and questions. *J Intellect Disabil Res* 2005; 49(Pt 4):231-238.
186. Rutter M & Hersov L. *Child psychiatry: Modern approaches*. Oxford: Blackwell Publishing, 1977.
187. Rutter M. Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium. *J Abnorm Child Psychol* 2000; 28(1):3-14.
188. Rutter M, Moffitt TE, Caspi A. Gene-environment interplay and psychopathology: multiple varieties but real effects. *J Child Psychol Psychiatry* 2006; 47(3-4):226-261.
189. Sandin S, Schendel D, Magnusson P, Hultman C, Surén P, Susser E, et al. Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Mol Psychiatry* 2016; 21(5):693-700.
190. Sasanfar R, Haddad SA, Tolouei A, Ghadami M, Yu D, Santangelo SL. Paternal age increases the risk for autism in an Iranian population sample. *Mol Autism* 2010; 1(1):2.
191. Saulnier CA & Klin A. Brief report: social and communication abilities and disabilities in higher functioning individuals with autism and Asperger syndrome. *J Autism Dev Disord* 2007; 37:788–793.

192. Schanen NC. Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 2006; 15(Suppl2):R138–150.
193. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tancredi DJ, et al. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. *Epidemiology* 2011; 22(4):476-485.
194. Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, et al. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(1):80-89.
195. Schendel D & Bhasin TK. Birth weight and gestational age characteristics of children with autism, including a comparison with other developmental disabilities. *Pediatrics* 2008; 121(6):1155-1164.
196. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2011; 360:1– 16.
197. Shelton JF, Tancredi DJ, Herz-Picciotto I. Independent and dependent contributions of advanced maternal and paternal ages to autism risk. *Autism Res* 2010; 3(1):30-39.
198. Shishido E, Aleksic B, Ozaki N. Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 2014; 68(2):85-95.
199. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91:31S–8S.

200. Smits LJM, Essed GGM. Short interpregnancy intervals and unfavourable pregnancy outcome: role of folate depletion. *Lancet* 2001; 358(9298):2074–2077.
201. Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Rep* 2015;67(3):569-80.
202. Sørensen MJ, Grønberg TK, Christensen J, Parner ET, Vestergaard M, Schendel D, et al. Antidepressant exposure in pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Clin Epidemiol* 2013; 5:449-59. doi: 10.2147/CLEP.S53009. eCollection 2013.
203. Sparrow SS, Balla DA, Cicchetti DV. *Vineland Adaptive Behavior Scales*, second edition. American Guidance Services, Circle Pines, Minn; 2005.
204. Starr E, Berument SK, Pickles A, Tomlins M, Bailey A, Papanikolaou K, et al. A family genetic study of autism associated with profound mental retardation. *J Autism Dev Disord* 2001; 31(1):89-96.
205. Sun C, Zou M, Zhao D, Xia W, Wu L. Efficacy of Folic Acid Supplementation in Autistic Children Participating in Structured Teaching: An Open-Label Trial. *Nutrients* 2016; 8(6). doi:10.3390/nu8060337.
206. Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE. Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord* 1998; 28(5):351-368.
207. Taioli E, Flores-Obando RE, Agalliu I, Blanchet P, Bunker CH, Ferrell RE, et al. Multi-institutional prostate cancer study of genetic susceptibility in populations of African descent *Carcinogenesis* 2011; 32:1361–1365.

208. Tang S, Wang Y, Gong X, Wang G. A Meta-Analysis of Maternal Smoking during Pregnancy and Autism Spectrum Disorder Risk in Offspring. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12:10418-10431.
209. Tew KD & Townsend DM. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17(12):1728-1737.
210. Thier R, Pemble SE, Kramer H, Taylor JB, Guengerich FP, Ketterer B. Human glutathione S-transferase T1-1 enhances mutagenicity of 1,2-dibromoethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 1996; 17(1):163-166.
211. Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Cohen D, Bronsard G, Bonnot O, Weismann-Arcache C, Botbol M, Lauth B, Ginchat V, Roubertoux P, Barbuorth M, Kovess V, Geoffray MM, Xavier J. Gene×Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry* 2014;5:53. doi: 10.3389/fpsyt.2014.00053.
212. Turner TN, Sharma K, Oh EC, Liu YP, Collins RL, Sosa MX, et al. Loss of [dgr]-catenin function in severe autism. *Nature* 2015; 520(7545): 51–56.
213. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol* 2016; 8:205-215.
214. Van Engeland H & Buitelaar JK. Autism spectrum disorders. In: Rutter's Child and Adolescent Psychiatry 5th edn (Rutter M, Bishop JVM, Pine DS, Scott S, Stevenson J, Taylor E & Thapar A. eds.) 760 – 781 (Blackwell Publishing Limited, 2008).

215. van Runnard Heimel PJ, Kavelaars A, Heijnen CJ, Peters WH, Huisjes AJ, Franx A, Bruinse HW. HELLP syndrome is associated with an increased inflammatory response, which may be inhibited by administration of prednisolone. *Hypertens Pregnancy*. 2008; 27(3):253-265. doi: 10.1080/10641950802174953.
216. van Tilborg E, Heijnen CJ, Benders MJ, van Bel F, Fleiss B, Gressens P, et al. Impaired oligodendrocyte maturation in preterm infants: Potential therapeutic targets. *Prog Neurobiol* 2016; (136): 28-49.
217. Vergnano S, Buttery J, Cailes B, Chandrasekaran R, Chiappini E, Clark E, et al. Neonatal infections: Case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 2016; 34(49):6038–6046. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.046
218. Vijayakumar NT & Judy MV. Autism spectrum disorders: Integration of the genome, transcriptome and the environment. *J Neurol Sci* 2016; 364:167-176. doi: 10.1016/j.jns.2016.03.026.
219. Viktorin A, Uher R, Reichenberg A, Levine SZ, Sandin S. Autism risk following antidepressant medication during pregnancy. *Psychol Med* 2017;47(16):2787-2796.
220. Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnel R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry* 2013; 70(1):71–77. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.266 93.
221. Volkmar FR, Klin A, Siegel B, et al. Field trial for autistic disorder in DSM-IV. *Am J Psychiatry* 1994; 151:1361-1367.

222. Volkmar FR, Lord C, Klin A, Cook E. Autism and the pervasive developmental disorders. In: *Child and Adolescent Psychiatry: A Comprehensive Textbook*, 3rd edn. Lewis, M. (ed) 551–560 (Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2002).
223. Volkmar FR, Reichow B, McPartland J. Classification of autism and related conditions: progress, challenges, and opportunities. *Dialogues Clin Neurosci* 2012; 14(3):229-237.
224. Vorstman JAS, Parr JR, Moreno-De-Luca D, Anney RJL, Nurnberger JI Jr, Hallmayer JF. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nat Rev Genet* 2017;18(6):362-376.
225. Walker CK, Ashwood P, Hertz-Picciotto I. Preeclampsia, placental insufficiency, autism, and antiphospholipid antibodies-reply. *JAMA Pediatr* 2015; 169(6):606-607. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.0345.
226. Wallace AE, Anderson GM, Dubrow R. Obstetric and parental psychiatric variables as potential predictors of autism severity. *J Autism Dev Disord* 2008; 38(8):1542-1554.
227. Wang C, Geng H, Liu W, Zhang G. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(18):e6696. doi: 10.1097/MD.0000000000006696.
228. Wechsler, D. WASI-II: wechsler abbreviated scale of intelligence - second edition. *J Psychoeduc Assess* 2013; 31:337-341.

229. Weikang C, Jie L, Likang L, Weiwen Q, Liping L. A meta-analysis of association between glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Open Med (Wars)* 2016; 11(1):578-583. doi: 10.1515/med-2016-0094. eCollection 2016.
230. Whitaker-Azmitia PM, Lobel M, Moyer A. Low maternal progesterone may contribute to both obstetrical complications and autism. *Med Hypotheses* 2014; 82(3):313-318. doi: 10.1016/j.mehy.2013.12.018.
231. Williams E, Thomas K, Sidebotham H, Emond A. Prevalence and characteristics of autistic spectrum disorders in the ALSPAC cohort. *Dev Med Child Neurol* 2008; 50(9):672-677.
232. Wing L. Language, social, and cognitive impairments in autism and severe mental retardation. *J Autism Dev Disord* 1981; 11:31-44.
233. Williams TA, Mars AE, Buyske SG, Stenroos ES, Wang R, Fatura-Santiago MF, et al. Risk of autistic disorder in affected offspring of mothers with a glutathione S-transferase P1 haplotype. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(4):356-361.
234. Wechsler, D. The Wechsler abbreviated scale of intelligence. London: Pearson Assessment, 1999.
235. Wu B & Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(12):656-668. doi: 10.1016/j.tips.2012.09.007.
236. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* 2017;135(1):29-41.

237. World Health Organisation. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (ICD-10). Geneva: WHO; 1992.
238. Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 2003; 289(1):49-55.
239. Zerrate MC, Pletnikov M, Connors SL, Vargas DL, Seidler FJ, Zimmerman AW, et al. Neuroinflammation and behavioral abnormalities after neonatal terbutaline treatment in rats: implications for autism. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322(1):16-22.
240. Zhang X, Lv CC, Tian J, Miao RJ, Xi W, Hertz-Picciotto I, et al. Prenatal and perinatal risk factors for autism in China. *J Autism Dev Disord* 2010; 40(11):1311-1321.
241. Zhang W, Modén O, Mannervik B. Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine. *Chem Biol Interact* 2010; 186(2):110-117. doi: 10.1016/j.cbi.2010.04.028.
242. Zwaigenbaum L, Szatmari P, Jones MB, Bryson SE, MacLean JE, Mahoney WJ. Pregnancy and birth complications in autism and liability to the broader autism phenotype. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002; 41(5):572–579.
243. Zwaigenbaum L, Bryson SE, Szatmari P, Brian J, Smith IM, Roberts W, et al. Sex differences in children with autism spectrum disorder identified within a high-risk infant cohort. *J Autism Dev Disord* 2012; 42:2585–2596.

Biografija autora

Dr Vanja Mandić Maravić rođena je 07.12.1981. u Puli. Osnovnu školu pohađala je po ubrzanom programu, od 1988. do 1995. godine, a Prvu beogradsku gimnaziju od 1995. do 1999. godine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1999., a diplomirala 2005. godine sa prosečnom ocenom 9.69. Tokom studiranja, školske 2003/2004. godine proglašena je za najboljeg studenta pete godine, a u periodu 2001-2006. godine bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka.

Od 2006. godine zaposlena je u Institutu za mentalno zdravlje u Beogradu.

2010. godine odbranila je završni akademski specijalistički rad iz Kliničke farmakologije i terapije, pod nazivom „GABA receptori, agonisti, antagonisti i njihova primena u psihijatrijskim poremećajima”, mentor prof. dr Milica Prostran.

Doktorske studije iz epidemiologije upisala je 2009. godine.

Tokom februara i marta 2011. godine bila je na studijskom boravku na Univerzitetu u Luivilu, Odeljenje za psihijatriju i bihejvioralne nauke, SAD. U periodu maj/jun 2017. godine bila je na studijskom i istraživačkom boravku pri Odeljenju za psihijatriju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nagoji, Japan, pod supervizijom profesora Norio Ozaki i profesora Branka Aleksića.

2013. godine položila je specijalistički ispit iz psihijatrije sa odličnim uspehom.

U periodu 2012 – 2015. vršila je dužnost sekretara Sekcije mladih psihijatara Srbije (SMPS) pri Udruženju psihijatara Srbije.

Učestvovala je u nekoliko naučno-istraživačkih projekata, i autor/koautor je u više naučno-istraživačkih članaka i sažetaka.

Jula 2018. godine imenovana je za kliničkog asistenta pri Katedri za psihijatriju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Govori engleski, francuski i italijanski jezik.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Vanja Mandić Maravić

broj upisa EP-5035/18

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION S-TRANSFERAZE I IZLOŽENOSTI PRENATALNIM FAKTORIMA OKOLINE KOD OSOBA SA POREMEĆAJIMA AUTISTIČNOG SPEKTRA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.07.2019.

Vanja Mandić Maravić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Vanja Mandić Maravić

Broj upisa EP-5035/18

Studijski program Epidemiologija

Naslov rada POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION S-
TRANSFERAZE I IZLOŽENOSTI PRENATALNIM FAKTORIMA OKOLINE KOD
OSOBA SA POREMEĆAJIMA AUTISTIČNOG SPEKTRA

Mentor doc. dr Milica Pejović Milovančević

Komentor prof. dr Tatjana Pekmezović

Komentor prof. dr Marija Plješa-Ercegovac

Potpisani



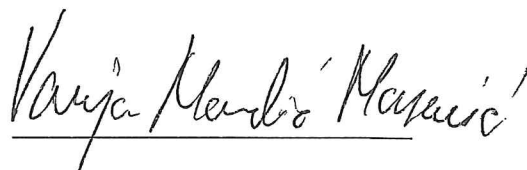
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.07.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION S-TRANSFERAZE I IZLOŽENOSTI PRENATALNIM FAKTORIMA OKOLINE KOD OSOBA SA POREMEĆAJIMA AUTISTIČNOG SPEKTRA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

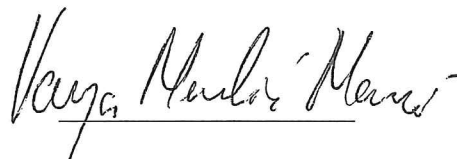
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 15.07.2019.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.