

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 04.09.2019. godine, broj 9700/05-VMM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Povezanost polimorfizma gena za glutation s-transferaze i prenatalne izloženosti faktorima sredine kod osoba sa poremećajima autističnog spektra“

kandidata dr Vanje Mandić Maravić, zaposlene u Institutu za mentalno zdravlje u Beogradu. Mentor je Doc. Dr Milica Pejović-Milovančević, a komentori prof. Tatjana Pekmezović i prof. Marija Plješa-Ercegovac

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Akademik Dušica Lečić-Toševski, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu u penziji
2. Prof. Dr Darija Kisić Tepavčević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. Dr Karmen Stankov, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Vanje Mandić Maravić je na ukupno 143 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, metod istraživanja, rezultati istraživanja, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 28 tabela. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisan pojam poremećaja autističnog spektra. Detaljno je opisana istorija, klasifikacija i epidemiologija ove grupe poremećaja. U okviru epidemiologije naglašena je i značajna činjenica mnogo češćeg javljanja ove grupe poremećaja kod dečaka u odnosu na devojčice. Takođe, detaljno je prikazana etiologija poremećaja autističnog spektra, s obzirom na to da se radi o grupi kompleksnih psihijatrijskih poremećaja, što je od velikog

značaja za samu temu disertacije. Pre svega opisana je genetska etiologija ove grupe poremećaja, potom je vrlo detaljno i adekvatno prikazan značaj faktora okoline u razvoju autizma. Kroz niz navedenih faktora, grupisanih na one koji deluju prenatalno i perinatalno, precizno opisanih, ukazano je na značaj ispitivanja njihovog potencijalnog uticaja na razvoj poremećaja autističnog spektra. Nakon prikaza genetskih faktora i faktora okoline, detaljno je prikazana grupa enzima glutation-S transferaza, koji igraju značajnu ulogu u detoksikaciji ćelije. Kroz opis karakteristika i uloga ove grupe enzima, vrlo je jasno ukazano na mogući značaj koji ovi enzimi mogu imati u psihijatrijskim poremećajima uopšte, pa i grupi poremećaja autističnog spektra. Naime, pokazano je da su polimorfizmi gena za glutation S-transferaze M1, T1, A1 i P1 potencijalno povezani sa razvojem neuroloških i psihijatrijskih poremećaja, pa i autizma. Prikazani su rezultati dosadašnjih istraživanja uloge polimorfizama ovih gena u autizmu, a naznačeno je i šta se ovim istraživanjem dodaje kao potencijalno novi rezultat.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od toga da se, pre svega, ispita da li postoji uticaj genskog polimorfizma *GSTA1 C69T (rs3957357)*, *GSTM1*, *GSTP1 Ile105Val (rs1695)* i *GSTT1* na rizik za nastanak poremećaja autističnog spektra. Pored toga, cilj istraživanja uključuje i ispitivanje da li su i u kojoj meri genske varijante glutation S-transferaza povezane sa težinom kliničke slike, kognitivnim sposobnostima i adaptivnim ponašanjem kod pacijenata sa poremećajima autističnog spektra. Takođe, ovo istraživanje ima za cilj da utvrdi izloženost faktorima okoline (prenatalnim i perinatalnim) u uzorku, poredeći onu među pacijentima u odnosu na zdrave kontrole. U ciljeve istraživanja spada i ispitivanje jačine povezanosti između poznatih sredinskih faktora rizika i genotipa GST, kao i njihovog zajedničkog doprinosa u nastanku poremećaja autističnog spektra.

U poglavlju **metodologija** opisan je protokol istraživanja koje je sprovedeno Institutu za mentalno zdravlje, Univerzitetnoj dečijoj klinici u Beogradu, Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju i Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno su navedeni kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije, te precizno definisane grupe ispitanika. Adekvatno i informativno su opisani instrumenti koji su korišćeni u istraživanju, na taj način definišući kliničke parametre koji su u okviru istraživanja ispitivani. Jasno su definisani instrumenti koji su primenjeni kako u grupi slučajeva, tako i u grupi kontrola. Prikazana je procedura istraživanja, metode uzorkovanja, a takođe detaljno su prikazane metode određivanja genetskih polimorfizama. Zasebno su opisane statističke metode korišćene pri obradi podataka. Ovo 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, i rađeno je prema principima dobre naučne prakse Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti ili njihovi roditelji/staratelji dali su pisani pristanak pre uključanja u studiju.

Rezultati detaljno su opisani i jasno predstavljeni kroz tekstualni i tabelarni prikaz.

Diskusija je napisana pregledno, jasno obrazlažući rezultate ovog istraživanja, uz opsežan uporedni pregled podataka drugih istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 243 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Studijska i kontrolna grupa nisu se razlikovale po polu niti po starosti. 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). Tipični autizam dijagnostikovao je kod 76% dece sa poremećajima spektra autizma (PSA) u uzorku, dok je atipični autizam dijagnostikovao kod njih 24%. Prosečna vrednost ukupnog skora na WASI skali iznosila je $83,26 \pm 17,82$. Prosečna vrednost skora ukupnog adaptivnog funkcionisanja (Vineland II) iznosila je $55,47 \pm 18,87$. Kada su u pitanju polno specifične karakteristike studijske grupe, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se kod dečaka značajno češće postavlja dijagnoza tipičnog autizma (83%) u odnosu na devojčice (56%). Nisu utvrđene značajne razlike po pitanju težine kliničke slike, niti adaptivnog funkcionisanja, ali je utvrđen polno specifični model konverzije kliničkih karakteristika u svakodnevno funkcionisanje, što čini značajan i originalni nalaz ovog istraživanja.

Prilikom ispitivanja uticaja pojedinačnih genotipova na rizik za razvoj PSA pokazano je *GSTM1* aktivni genotip smanjuje rizik za PSA (OR=0,554, 95%CI: 0,313–0,983, p=0,044) u odnosu na *GSTM1* nulli genotip. Polimorfizmi *GSTT1* i *GSTP1* genotipova nisu doprinikli 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. U ovom istraživanju uzeta je u obzir činjenica da može postojati gen-gen interakcija kada su u pitanju specifični polimorfizmi i povezanost sa

rizikom oboljevanja od određenih poremećaja. Pored pojedinačnih, ispitivana je i povezanost kombinovanih genotipova GST i razvoja PSA. Kombinacija *GSTM 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 llelle* 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.

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). 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). Između dve grupe nije bilo razlike u starosti majke niti u starosti oca, u redu trudnoće, kao ni u razmaku između aktuelne i prethodne trudnoće. Takođe, između grupe slučajeva i kontrola nije bilo razlike u stručnoj spremi majke niti oca.

U dodatnu analizu koja bi ukazala na postojanje interakcije gena i okoline (GST genotip i delovanje pre- i perinatalnih faktora) uključeni su oni faktori za koje je pokazan značajan rizik u primarnoj analizi - uzimanje tokolitika tokom trudnoće i neonatalnu žuticu. Ispitivana je razlika povezanosti kod onih osoba koje su pod najvećim rizikom (rizični genotip + izloženost) u odnosu na one pod najmanjim rizikom (protektivni genotip + izostanak izloženosti). 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, nosioци *GSTP1 varijantnog* genotipa koji su bili prenatalno izloženi tokoliticima imali su 3,876 puta veći rizik (p=0,016). Kada je ispitivana interakcija rizičnog genotipa i izloženosti u smislu neonatalne žutice, za sve četiri GST izloženi nosioци 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 *GSTPI* varijantnog genotipa on iznosio 15,898 ($p<0,001$).

Takođe, ispitivan je i efekat pušenja majke tokom trudnoće u odnosu na GST genotip. Svi individualni efekti genotipova bili su bez značajnosti, dok su iste interakcije ostale značajne. Kombinacija *GSTMI* aktivnog i *GSTTI* aktivnog genotipa smanjivala je rizik za PSA ($OR=0,152$, 95%CI: 0,029–0,784, $p=0,024$), kao i kombinacija *GSTTI* aktivnog i *GSTPI* *llelle* ($OR=0,117$, 95%CI: 0,015–0,938, $p=0,043$), dok je kombinacija *GSTMI* aktivnog i *GSTPI* *llelle* 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.

Deo istraživanja orijentisan na povezanost GST genotipa i težine kliničke slike pokazao je da najblažu kliničku sliku imaju *GSTAI**CC* nosioci, dok najviše skorove odnosno najtežu kliničku sliku imaju nosioci *GSTAI**TT* genotipa. Za *GSTPI*, *GSTMI* i *GSTTI* genotipove nije pokazana značajna povezanost sa težinom kliničke slike. Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GST* genotipova sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja, nisu dobijene statistički značajne korelacije za *GSTAI* i *GSTMI* genotipove. 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 u okviru kojeg nosioci *llelle* genotipa imaju najviši skor, *IleVal* genotipa nešto niži, a *ValVal* genotipa najniži skor. Prilikom ispitivanja povezanosti statusa *GSTTI* genotipa sa merama intelektualnog i adaptivnog funkcionisanja, dobijena je statistički značajna korelacija za WASI skor matrix reasoning raw, odnosno granična korelacija za T skor. U oba slučaja, osobe sa PSA koje su imale aktivni genotip imale su značajno niže skorove, što znači lošije funkcionisanje prema toj skali.

U ovom istraživanju nije bilo značajne povezanosti pojedinih genotipova sa vrstom prvih simptoma. Takođe, nije bilo povezanosti sa tipom autizma (tipični vs netipični).

Kada je razvoj jezika u pitanju, 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.

U grupi slučajeva ispitivana je povezanost GST genotipa i postojanja konvulzija tokom života. Pokazana je značajna povezanost između *GSTAI* 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, dok za druge genotipove nije pokazana statistička značajnost, kako za konvulzije tokom života, tako ni za dijagnozu epilepsije.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su dečaci češće imali dijagnozu tipičnog autizma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Lai i sar., 2011). Za trenutne kliničke skorove merene ADIR-om (socijalni reciprocitet, komunikacija i RRSB), nije utvrđena razlika između dečaka i devojčica što je potvrđeno u nekoliko studija (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). Studija koja je rađena kod dece sa PSA pokazala je i da su devojčice imale izraženije simptome komunikacije, tok su dečaci imali više RRSB simptoma (Hartley i Sikora, 2009). U literaturi nema puno podataka o polnim razlikama u adaptivnom funkcionisanju. Studija koja je ispitivala 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 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. Studije koje su do sada 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).

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). Nekoliko studija pronašlo je povišen rizik za razvoj PSA kod nosilaca *GSTM1 null* 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 null* 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 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.

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 rezultatima ovog istraživanja. Ipak, rezultati ove studije pokazuju da kombinacija *GSTT1 aktivnog* genotipa može delovati protektivno u kombinaciji sa specifičnim GST genotipovima. 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).

Rezultati ove 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.

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., 2015; 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 Ileile* 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 ove 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.

Kada su u pitanju perinatalne komplikacije, 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, neonatalnu žuticu i sindrom respiratornog distresa. 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). Dosadašnja istraživanja potvrdila su da je neonatalna žutica 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). Sa druge strane, pojedine studije nisu utvrdile povećanje rizika za razvoj PSA kod postojanja neonatalne žutice (Croen i sar., 2005). Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajno povišen rizik za razvoj poremećaja autističnog spektra kod postojanja RDS, što je u skladu sa nalazima iz prethodnih studija (Dodds i sar., 2011, Glasson i sar., 2004, Buchmayer i sar., 2009). 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.

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. 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). Intrakranijalna hemoragija nije se izdvojila kao individualni faktor rizika u ovom istraživanju. Do sada je ispitivana 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 kranio cerebralna povreda, nije

pokazao značajno povećanje rizika za poremećaje autističnog spektra (Duan i sar., 2014), što je u skladu sa rezultatom ove studije. 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.

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, antidepresivi, antikoagulantna terapija i hronično korišćenje narkotika (RR=2.66) (Dodds i sar., 2011). 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). 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. 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). 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). 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. 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). 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).

Kao što je već navedeno, samo su tri studije do sada ispitivale udruženo delovanje genotipova GST i okolinskih faktora na rizik za razvoj PSA (Rahbar i sar., 2014; Rahbar i sar., 2015; Rahbar i sar., 2016). U prvoj je ispitivana interakcija *GSTMI*, *GSTPI* i *GSTTI* genotipova i koncentracije arsena u krvi dece sa PSA i grupi dece sa urednim razvojem, gde je pokazano da su nosioci *GSTPI IleIle* genotipa imali značajno više koncentracije arsena (Rahbar i sar., 2014). U drugoj studiji pokazano je da *GSTPI* 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 *GSTPI*, ali da je ova razlika postojala samo u grupi zdravih kontrola, te pretpostavljaju da je PSA status neka vrsta moderatora efekta *GSTPI* genotipa (Rahbar i sar., 2016). U ovom istraživanju, za *GSTMI* 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. 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. Glutathion 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 rezultatima ove studije (Tang i sar., 2015). Ovo je prva studija koja ispituje ovu interakciju gena i okoline u poremećajima spektra autizma.

Ovo je prvo istraživanje koje se bavi ispitivanjem *GSTA1* genotipa i rizika za razvoj PSA. Takođe, ovo je prvo istraživanje koje ispituje interakciju pojedinih *GST* genotipova i prenatalnih i perinatalnih, kao i familijalnih faktora. Takođe, do sada nisu rađene studije koje su ispitivale povezanost *GST* genotipova i težine kliničke slike i adaptivnog funkcionisanja.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Mandić-Maravić Vanja, Pejović-Milovančević Milica, Pekmezović Tatjana, Plješa-Ercegovac Marija, Mitković-Vončina Marija, Lečić-Toševski Dušica. Perinatalne komplikacije, faktori sredine i poremećaji autističnog spektra. Medicinski podmladak 2016, vol. 67, br. 4, str. 20-251.

2. Mandić-Maravić V, Corić V, Mitković-Vončina M, Djordjević M, Savić-Radojević A, Ercegovac M, Matić M, Simić T, Lečić-Toševski D, Tosković O, Pekmezović T, Plješa-Ercegovac M, Pejović-Milovančević M. Interaction of glutathione S-transferase polymorphisms and tobacco smoking during pregnancy in susceptibility to autism spectrum disorders. Sci Rep 2019 Mar 1;9(1):3206. doi: 10.1038/s41598-019-39885-w.

3. Mandić-Maravić V, Mitković-Vončina M, Plješa-Ercegovac M, Savić-Radojević A, Djordjević M, Pekmezović T, Grujić R, Ercegovac M, Simić T, Lečić-Toševski D, Pejović-Milovančević M. Autism spectrum disorders and perinatal complications – is oxidative stress the connection? Frontiers in psychiatry, 2019, in press. doi: 10.3389/fpsyt.2019.00675

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Povezanost polimorfizama gena za glutation S-transferaze i prenatalne izloženosti faktorima sredine kod osoba sa poremećajima autističnog spektra**“ dr Vanje Mandić Maravić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju potencijalnog uticaja *GST* genotipova i razvoja PSA, prenatalnih i perinatalnih komplikacija i razvoja PSA, kao i njihove interakcije u nastajanju ove grupe poremećaja. Jasno je pokazano da specifični genotipovi mogu povećavati rizik za razvoj PSA, kao i određena kombinacija rizičnih *GST* genotipova. Takođe, jasno je ukazano na specifične pre- i perinatalne komplikacije koje su povezane sa rizikom za razvoj ove grupe poremećaja. Na kraju, pokazano je postojanje interakcije specifičnih *GST* genotipova i faktora okoline u povećanju rizika za razvoj poremećaja spektra autizma. Na taj način, ovo istraživanje ukazuje da je moguće pretpostaviti da je jedan deo etiologije složenog psihijatrijskog poremećaja kakav je autizam, upravo oksidativni stres koji povezuje mehanizam dejstva i specifičnih genotipova, ali i specifičnih rizičnih pre i perinatalnih faktora. 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.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Vanje Mandić Maravić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.09.2019.

Članovi Komisije:

Akademik Prof. dr Dušica Lečić Toševski

Prof. dr Darija Kisić Tepavčević

Prof. dr Karmen Stankov

Mentor:

Doc. dr Milica Pejović Milovančević

Mentor:

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Mentor:

Prof. dr Marija Plješa-Ercegovac
