Neurobiološka podloga autizma

Čonkaš, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:579123

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

NEUROBIOLOŠKA PODLOGA AUTIZMA

NEUROBIOLOGICAL BASIS OF AUTISM

SEMINARSKI RAD

Josipa Čonkaš

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 3

2. NEUROPATOLOGIJA AUTIZMA 4

2.1. Promjene u kortikalnim mikrodomenama 6

2.2. Razvojni poremećaji u neuronskoj migraciji 6

2.3. Citoarhitektonske abnormalnosti mozga oboljelih od autizma 6

2.4. Neuroimunološki poremećaji i aktivacija glija stanica 7

3. NEUROKEMIJSKA OSNOVA AUTIZMA 8

3.1. Serotonin 8

3.2. Dopamin 9

3.3. Noradrenalin 10

3.4. Acetilkolin 11

3.5. Oksitocin 11

3.6. Endogeni opioidi 12

3.7. Kortizol 12

3.8. Aminokiselinski neurotransmiteri: glutamat i GABA 13

4. RAZVOJNA PSIHOPATOLOGIJA AUTIZMA 14

4.1. Endofenotipovi u autizmu 14

4.2. Teorija uma 14

4.3. Teorija slabe središnje povezanosti 16

5. GENETSKI MODEL AUTIZMA 17

5.1. Geni uključeni u nastanak ASD-a 17

5.2. Varijacije u broju kopija genoma 19

5.3. Uloga kromosomskog microarray-a (CMA) u dijagnostici autizma 20

6. EPIGENETIKA POREMEĆAJA AUTISTIČNOG SPEKTRA 21

6.1. Duplikacija kromosoma 15 21

6.2. Utisak i epigenetika kromosoma 7q u nastanku ASD-a 23

6.3. Genomski utisak i X kromosom 24

7. ZAKLJUČAK 25

8. LITERATURA 26

9. SAŽETAK 29

10. SUMMARY 29

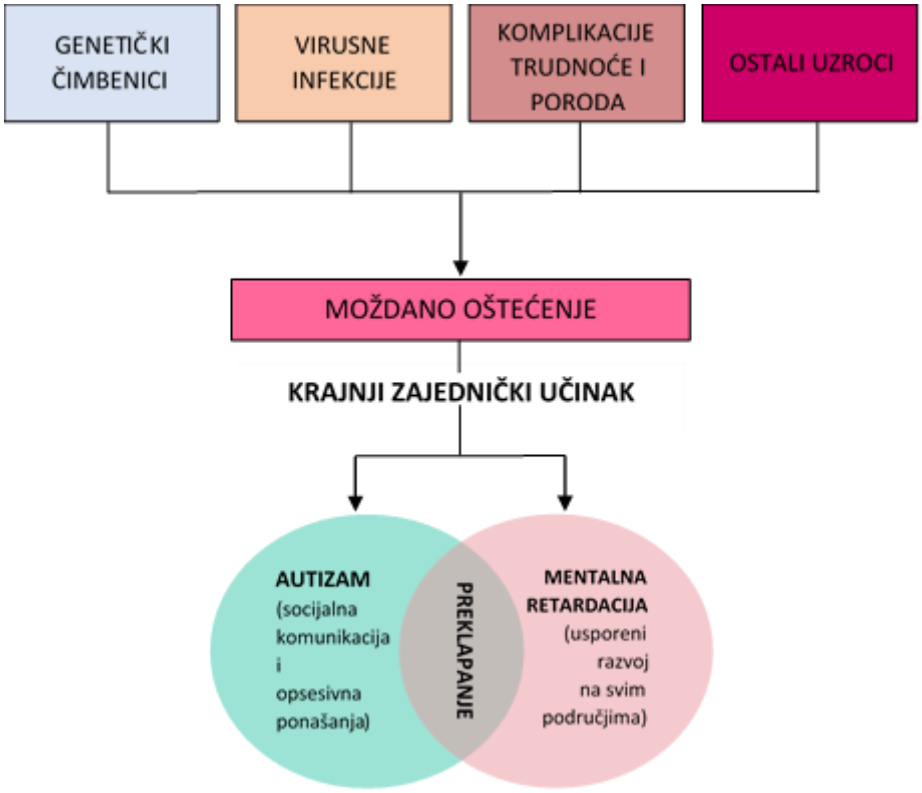
1. UVOD

Autizam je pervazivni[1] neurorazvojni poremećaj s vrlo različitim fenotipskim karakteristikama i neuropsihijatrijskim simptomima (Schmitz i Rezaie, 2008.). Pojam autizam prvi u psihijatriju uvodi E. Bleuler 1911., dok autistični poremećaj prvi puta opisuje američki psihijatar L. Kanner 1943. i naziva ga infantilnim autizmom, sukladno simptomima i dobi u kojoj se pojavljuje. Promjene se tipično manifestiraju kod djece prije treće godine starosti, kada je moguće i dijagnosticirati autizam. Riječ je o poznatoj trijadi koja uključuje: poremećaj socijalne interakcije, smanjenje ili nedostatak verbalne i neverbalne komunikacije te poremećaje u ponašanju koji uključuju ograničene interese i stereotipne uzorke ponašanja (Schmitz i Rezaie, 2008.). Kod dijagnosticiranja poremećaja autističnog spektra (ASD, od eng. *autism spectrum disorder*), simptomi koji upućuju na autizam najčešće su povezani i s drugim stanjima poput paničnih napadaja i epilepsije. Navodno povećanje broja dijagnosticiranih slučajeva autizma u posljednjem desetljeću dovelo je do razvoja teorije uključenosti određenih cjepiva kao glavnog uzroka u razvitku istog. Međutim, epidemiološka istraživanja dokazala su da nema poveznice između cjepiva i nastanka autizma te su sugerirala da na povećani broj slučajeva autizma treba gledati s oprezom, jer zbog izuzetne heterogenosti ove bolesti često dolazi do postavljanja krive dijagnoze (Miles, 2011.).

Nekada su postojale dvije teorije koje su pretpostavljale uzroke nastanka autizma: psihološka i organska. Psihološka teorija zagovarala je tezu da do autističnog poremećaja dolazi uslijed nenormalnih psiholoških interakcija unutar obitelji, prvenstveno zbog hladnog i odbijajućeg stava majke prema djetetu. Organska pak je teorija pretpostavljala da je uzrok određeni moždani poremećaj koji uzrokuje razvojni hendikep sa specifičnim simptomima. S vremenom je psihološka teorija u potpunosti odbačena i zaključeno je da najveću ulogu u etiologiji autizma, koja je izuzetno složena i multifaktorijalna, ima genetika. Otkriveno je da nastanak ASD-a uključuje interakcije različitih skupina gena i okolišnih čimbenika, poput virusnih infekcija. Kako bi prikazali sve dotad iznesene činjenice i hipoteze uzroka nastanaka autizma, Simon Baron-Cohen i Patric Bolton (1993.) razvili su model krajnjeg zajedničkog učinka (Slika 1.). Prema tom modelu čimbenici koji mogu dovesti do moždanog oštećenja su: genski uzroci, virusne infekcije rane dobi, komplikacije u trudnoći i porodu te drugi čimbenici, a kao rezultat krajnjeg zajedničkog učinka svih ili nekih od navedenih čimbenika nastaje autizam ili mentalna retardacija, koji se u nekim dijelovima preklapaju (Baron-Cohen i Bolton, 1993.). Novija istraživanja kao glavne okolišne faktore uključene u nastanak

[1] Termin "pervazivni" dolazi od latinskog glagola *pervadere* koji znači prožimati. Navedeni poremećaji istovremeno zahvaćaju (prožimaju) veliki broj razvojnih područja i mogu na različite načine i u različitoj mjeri utjecati na svaki od njih, rezultirajući velikom raznolikošću razvojnih profila i ishoda (Cepanec, Šimleša, i Stošić, 2015).

autizma navode: trudnički dijabetes, krvarenje tijekom trudnoće i lijekove poput valproične kiseline (antiepileptik), talidomida (korišten kao sedativ) i mizoprostola (potiče trudove ili djeluje abortivno) (Miles, 2011).



Slika 1. Prikaz modela krajnjeg zajedničkog učinka prema S. Baron-Cohen i P. Bolton (1993.) (Preuzeto i prilagođeno sa: http://www.cybermed.hr/clanci/poremecaji_autisticnog_spektra)

2. NEUROPATOLOGIJA AUTIZMA

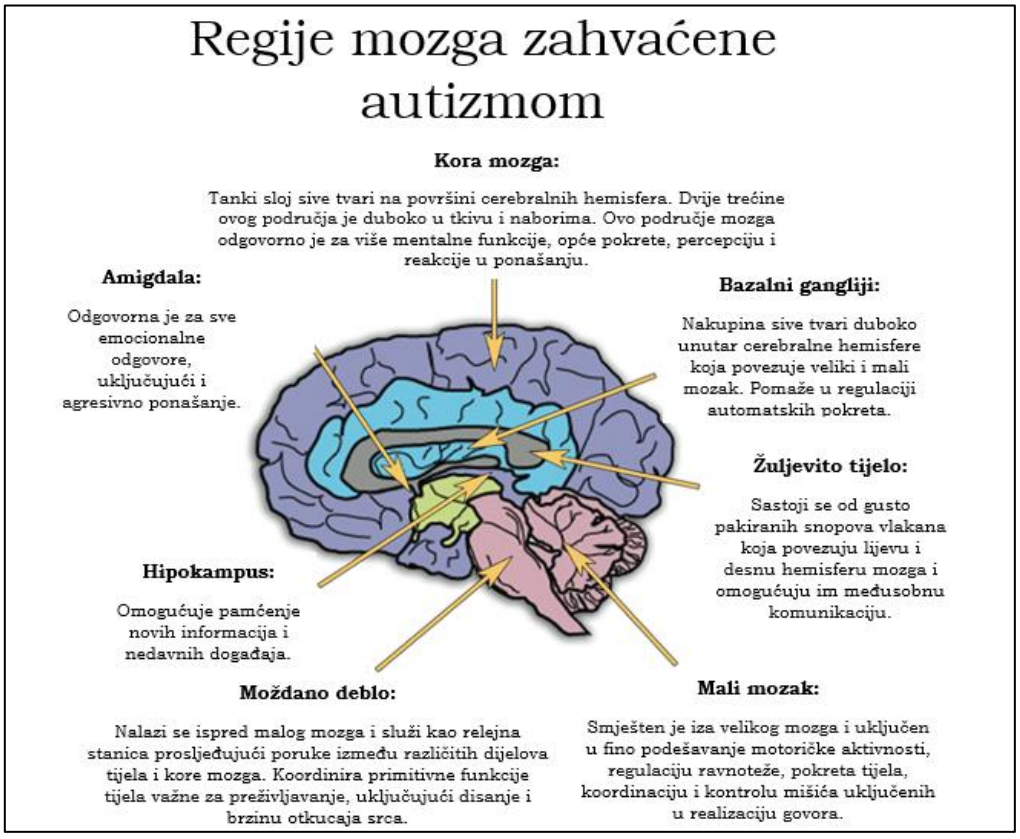
Većina neuropatoloških istraživanja autističnog poremećaja fokusirana je na moždanu koru, hipokampus i mali mozak, dok samo rijetka uključuju i amigdalu te moždano deblo. Sve regije mozga zahvaćene autizmom, uz opisane uloge istih, prikazuje Slika 2.

U više od polovice istraženih *post mortem* slučajeva dokazane su značajke kortikalne disgeneze[2], promjene u neuronskoj migraciji i organizaciji neokortikalnih mikrodomena te aktivaciji astroglija stanica (Schmitz i Rezaie, 2008.). Isto tako, u mnogim slučajevima dolazi i do gubitka

[2] 'Kortikalna disgeneza je spektar anomalija mozga uključenih u poremećaj razvoja moždane kore, nastao zbog poremećaja migracije neurona' (Klarić i sur., 2014.).

Purkinjeovih stanica malog mozga, jer su iste selektivno osjetljive na perinatalne povrede, dok gubitak tih stanica ima znatan učinak u patogenezi autizma (Kern, 2003.). U nekim istraživanjima zabilježena je i pojava makrocefalije kod djece s dijagnosticiranim autizmom, uzrokovana heterozigotnom mutacijom gena *PTEN* (eng. *phosphatase and tensin homolog*) na kromosomu 10q23 (Miles, 2011). Stoga je razvijena hipoteza disregulacije rasta mozga koja pojašnjava da nakon inicijalno pretjeranog rasta mozga slijedi faza prividnog zaustavljanja rasta, što u konačnici rezultira aberantnim povezivanjem i disfunkcijama povezanima s razvojem autističnog poremećaja (Courchesne, 2004.).

Provedeno je i nekoliko istraživanja životinjskog modela autizma te su kod odraslih potomaka miševa, čija je majka bila zaražena virusom, uočene abnormalnosti u socijalnoj interakciji, gubitak Purkinjeovih stanica, povećanje gustoće kortikalnih neurona u ranom postnatalnom razdoblju, kao i makrocefalija (Schmitz i Rezaie, 2008.). Svi navedeni poremećaji su temeljni neuropatološki pokazatelji autizma.



Slika 2. Regije mozga zahvaćene autizmom

(Preuzeto i prilagođeno sa: https://www.researchgate.net/figure/Parts-of-the-Brain-Affected-by-Autism_fig2_278305188)

2.1. Promjene u kortikalnim mikrodomenama

Za normalno procesiranje informacija i funkcionalnu aktivnost različitih kortikalnih regija neophodna je pravilna organizacija modularnih domena. Navedene domene vidljive su nakon histološkog bojanja moždane kore po Nisslu (Schmitz i Rezaie, 2008.). Kod pacijenata s autizmom primijećeno je da su kortikalne mikrodomene puno uže nego u kontrolnim slučajevima i s povećanim prostorom između konstitutivnih stanica. To ukazuje na dezorganizaciju neuropila[3] kod autizma, što je povezano s promijenjenom ekspresijom glavnog dendritičkog proteina, *MAP2* (eng. *microtubule-associated protein 2*), u frontalnom režnju. Neki znanstvenici pobijaju tu teoriju tvrdeći da mikrodomene ne obuhvaćaju razinu slojeva neokorteksa te su stoga potrebne opsežnije analize koje bi razjasnile njihovu funkcionalnu ulogu u slučaju autizma (Rockland i Ichinohe, 2004.).

2.2. Razvojni poremećaji u neuronskoj migraciji

Kod pacijenata s autizmom, prilikom snimanja magnetskom rezonancom (MRI), primijećene su kortikalne malformacije poput polimikrogirije[4], shizencefalije[5] i makrogirije[6]. Navedene promjene rezultat su poremećaja migracije neurona nastalih u prvih šest mjeseci gestacije. Uz to, poremećena neuronska migracija vjerojatno je odgovorna i za niz poremećaja kortikalne disgeneze poput zadebljanja kore mozga, povećanja gustoće neurona, promjene u kortikalnim mikrodomenama, prisustva neurona u molekularnom sloju, poremećaja granice između sive i bijele tvari itd. (Schmitz i Rezaie, 2008.). Hipotezu utjecaja poremećene neuronske migracije na nastanak autizma potvrđuje i smanjena razina proteina relina u tkivu malog mozga osoba s autizmom. Relin je izvanstanični protein koji sudjeluje u brojnim ključnim zbivanjima vezanim uz migraciju neurona i samo pozicioniranje stanica. Smanjena razina relina dokazana je čak i kod potomaka miševa čija je majka bila zaražena virusom gripe tijekom gestacije.

2.3. Citoarhitektonske abnormalnosti mozga oboljelih od autizma

Citoarhitektonske abnormalnosti kod osoba s autizmom uključuju zadebljanje kore mozga, povećanu gustoću neurona, promjene u kortikalnim mikrodomenama, prisustvo neurona u

[3] Prostor između tijela neurona u kojem nalazimo sinapse, nemijelinizirana živčana vlakna, dendrite i glija stanice.
[4] 'Makroskopski abnormalan uzorak moždane kore karakteriziran mnoštvom malih mikrogirusa odvojenih plitkim sulkusima' (Tomasović i Marušić, 2007.).
[5] Vrlo rijetka strukturna anomalija mozga u kojoj je isti prekinut s jednim ili više rascjepa ispunjenih cerebrospinalnom tekućinom (Tomasović i Marušić, 2007.).
[6] 'Patološki poremećaj u razvoju mozga koji se očituje u loše formiranim moždanim vijugama i praćen je određenim stupnjem mentalne retardacije' (http://hjp.znanje.hr/index.php?show=search_by_id&id=e1xmWRI%253D).

molekularnom sloju te poremećaj granice između sive i bijele tvari. Gotovo je nemoguće međusobno povezati navedene abnormalnosti jer su istraživanja provođena na različitim uzorcima mozga pacijenata s autizmom (Palmen i sur., 2004.). Izuzetno učinkovita metoda za otkrivanje citoarhitektonskih abnormalnosti je 'Grey Level Index' (GLI), koja se bazira na računalnom snimanju i procjenjuje gustoću tijela stanica korteksa. Indeks se definira kao omjer područja prekrivenog tijelima živčanih stanica obojanih po Nisslu i neobojanog područja (Casanova i sur., 2002.).

2.4. Neuroimunološki poremećaji i aktivacija glija stanica

Nerijetko se uz autistični poremećaj vežu i određeni neuroimunološki poremećaji poput: abnormalnog ili iskrivljenog tipa 1 i tipa 2 imunološkog odgovora pomoćničkih T-limfocita, redukcije broja CD4+ limfocita, redukcije funkcija NK stanica (eng. *natural killer cell*), kao i T-limfocita; neuravnoteženost razine imunoglobulina (Ig) u serumu te nedostatak IgA (Schmitz i Rezaie, 2008.). Smatra se da promijenjena imunološka aktivnost tijekom određenih osjetljivih stadija neurorazvoja sudjeluje u stvaranju neuroloških disfunkcija vezanih za autizam.

Glija stanice, posebice mikroglija i astrociti, osim što služe kao potpora neuronima, sudjeluju u regulaciji njihovog metabolizma te utječu na formiranje sinapsi i neurotransmisiju. Važnost glija stanica ocrtana je u recipročnom odnosu između neurona i glija stanica. Naime, poremećaji u funkciji glija stanica direktno vode disfunkciji neurona i obrnuto.

Mikroglija stanice posjeduju dvostruku funkciju u odraslom živčanom sustavu. S jedne strane imaju citotoksičnu, fagocitnu i antigen-prezentirajuću ulogu, dok s druge strane djeluju citoprotektivno i neurotrofno. Zbog navedenih funkcija pretpostavlja se da su disfunkcionalne ili aktivirane glija stanice također uključene u razvoj autizma, no još nije do kraja razjašnjeno na koji način mikroglija stanice sudjeluju u tome, jer je primijećeno da se većina istih aktivira u malom mozgu, a ne u kori mozga.

Također, u tkivu centralnog živčanog sustava pacijenata s autizmom zabilježene su i povišene razine proupalnih (*MCP-1, TARC*), regulatornih (*IL-6*) i protuupalnih (*TGF-β*) citokina, koji potječu iz astrocita (Schmitz i Rezaie, 2008.).

3. NEUROKEMIJSKA OSNOVA AUTIZMA

Neurokemijska istraživanja otkrila su niz neurotransmitera povezanih s autističnim poremećajem, a najznačajniji od njih su: serotonin, dopamin, noradrenalin, acetilkolin, oksitocin, endogeni opioidi, kortizol, glutamat i gama-aminomaslačna kiselina (GABA, od eng. *gamma-aminobutyric acid*). Navedena istraživanja su izuzetno složena, prvenstveno zbog heterogenosti autizma, ali i malih uzoraka te neprikladnih kontrolnih grupa. Većina do sada provedenih istraživanja temeljila se na promatranju kliničkih odgovora na određene farmakološke tretmane. Sama istraživanja neurokemije autizma bila su relativno neuspješna zbog nepostojanja agenasa koji bi pomogli u tretiranju osnovnih značajki ove bolesti. Kako bi se otkrila prava biološka podloga ovog poremećaja potrebno je još mnogo truda i zalaganja te prvenstveno zajedničkog rada na područjima neurokemije, neuroanatomije, psihofarmakologije i genetike.

3.1. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitripamin, 5-HT) je indolamin dobiven iz esencijalne aminokiseline triptofana i zasigurno ima najveću ulogu u nastanku autizma. Tijela serotonergičkih neurona većinom su pronađena u jezgrama raphe[7] srednjeg mozga, ponsa i produžene moždine. Učinci serotonina vidljivi su u regulaciji raspoloženja, prehrane, tjelesne temperature te uzbuđenja, no on modulira i osjetljivost na bol, seksualno ponašanje i otpuštanje hormona (Lam i sur., 2006.). Jedan od prvih poticaja za proučavanje učinaka serotonina na autizam, bio je zapažen snažan efekt serotonergičkih halucinogena poput lizergida (LSD, od eng. *lysergic acid diethylamide*). Nadalje, sljedeći dokaz uloge serotonina u ekspresiji autističnog poremećaja bilo je otkriće da akutno iscrpljivanje triptofana, prekursora serotonina, dovodi do pogoršanja simptoma autizma. Poznato je da serotonin regulira razvoj serotonergičkih neurona te hipokampusa i kore mozga, a potom preuzima ulogu neurotransmitera.

Mnoge studije dokazale su hiperserotonemiju u jedne trećine osoba s autizmom, gdje je količina serotonina u krvi bila i do 50% veća od normalne vrijednosti. Više od 99% ukupnog serotonina u krvi sadržano je u trombocitima te je upravo on uzrok nastanka hiperserotonemije u sklopu autizma. Kolevzon i sur. (2010.) ukazuju da povišena razina serotonina ima utjecaj na tendenciju ponavljanja određenih nepoželjnih ponašanja, posebice samoozljeđivanja. Zanimljivo je

[7] Jezgre raphe su nakupine serotoninskih jezgara koje se protežu kroz sredinu kaudalnog dijela retikularne formacije koja se nalazi u moždanom deblu (Hornung, 2003.).

da se hiperserotonemija javlja i u nekih drugih poremećaja poput shizofrenije, Huntingtonove bolesti i teške mentalne retardacije.

Provedeno je i nekoliko istraživanja razine 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA, od eng. *5-hydroxyindoleacetic acid*), glavnog metabolita serotonina, u cerebrospinalnoj tekućini. Cilj provedenih istraživanja bio je otkriti glavnu funkciju serotonina u autizmu, no ispostavilo se da nema dosljednih razlika između autistične i kontrolne grupe.

Mjerenjem stope sinteze serotonina u mozgu pomoću PET metode (eng. *positron emission tomography*) pokazano je da kod djece bez autizma dolazi do znatne sinteze serotonina u razdoblju između 2. i 5. godine života, dok se naknadno opadanje u sintezi javlja od 5. pa do 14. godine. S druge strane, kod autistične djece ne dolazi do pada u sintezi tijekom vremena, odnosno u razdoblju od 2. do 5. godine života vrijednosti su bile znatno niže nego u kontrolnoj skupini te dolazi do polaganog povećanja s porastom dobi u oba spola (Chugani i sur., 1999.). Ovime je dokazano da razvojna regulacija sinteze serotonina može biti uključena u patogenezu autizma.

Zbog očite genske podloge autizma, znanstvenici su se usmjerili na istraživanje gena povezanih s razvojem autizma. Jedan od njih bio je *SLC6A4* (eng. *solute carrier family 6 member 4*), gen koji kodira serotoninski prijenosnik u neuronima i trombocitima. Postoje dva polimorfizma navedenog gena: delecija kratkog (s) alela i dugog (l) alela. Provedeno je nekoliko istraživanja utjecaja polimorfizama na autizam, no dobiveni rezultati ne daju jasne dokaze o ulozi ovog gena pri nastanku autizma.

3.2. Dopamin

Dopamin je katekolamin koji se sintetizira iz aminokiseline tirozina te se većina dopaminskih neurona nalazi u području srednjeg mozga. Dopaminergički sistem mozga uključen je u širok spektar ponašanja i funkcija, uključujući kogniciju, motoričke funkcije, kontrolu jedenja i pijenja, seksualno ponašanje, neuroendokrinu regulaciju i selektivnu pozornost (Lam i sur., 2006.). Zanimanje znanstvenika za otkrivanje uloge dopamina u autizmu nastalo je nakon zapažanja da određeni blokatori dopaminskih receptora (npr. antipsihotici) mogu biti efektivni u tretiranju određenih aspekata autizma. Čini se da ublažavaju hiperaktivnost, stereotipe, agresiju i tendenciju samoozljeđivanju, pri čemu je na životinjskim modelima dokazano da upravo stereotipi i hiperaktivnost mogu nastati povećanjem dopaminergičke aktivnosti. Iako studije izvještavaju o abnormalnostima dopaminske signalizacije kod autističnih osoba, nedostaje koherentna hipoteza koja bi mogla povezati neurobiologiju dopamina s ponašanjem u ASD-u.

Nakon otpuštanja iz neurona dopamin se razgrađuje na homovaniličnu kiselinu (HVA, od eng. *homovanillic acid*) i 3,4-dihidroksifeniloctenu kiselinu (DOPAC, od eng. 3,4-*dihydroxyphenylacetic acid*). Moguće je provesti mjerenja navedenih supstanci, kao i samog dopamina u krvi i urinu, no u nekoliko provedenih istraživanja nije pronađen dokaz bilo kakvih abnormalnosti kod autističnih osoba u usporedbi s kontrolnim skupinama. Stoga navedena mjerenja mogu poslužiti isključivo za detektiranje određenih promjena u metabolizmu dopamina.

Mjerenja razine HVA u cerebrospinalnoj tekućini također su donosila raznolike rezultate, bez jedinstvenog zaključka. Cohen i sur. (1977.) primjećuju da djeca s autizmom koja pokazuju veću hiperkinezu[8] i ozbiljnije stereotipe obično imaju povišenu razinu HVA u cerebrospinalnoj tekućini.

3.3. Noradrenalin

Noradrenalin je katekolamin koji se dobiva iz dopamina uz pomoć enzima dopamin beta-hidroksilaze. Sinteza se zbiva u živčanim završecima noradrenergičnih neurona smještenih u regiji *locus coeruleus*, s dorzalne strane ponsa. Ovaj sustav ima ključnu ulogu u pozornosti, filtriranju nevažnih podražaja, odgovoru na stres, anksioznosti i pamćenju (Lam i sur., 2006.).

Kao i kod ostalih neurotransmitera, moguće je provesti mjerenje razine noradrenalina, ali i njegovog glavnog metabolita, 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG, od eng. *3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol*), u krvi. Jedina razlika od ostalih sustava je čvrsta povezanost centralnih i perifernih noradrenergičnih sustava te su stoga koncentracije u krvi i cerebrospinalnoj tekućini visoko korelirane. Na taj način čak i periferna mjerenja mogu dati uvid u funkcioniranje centralnog sustava. Mjerenja razine samog noradrenalina u svim istraživanjima pokazala su povećanu koncentraciju navedenog kod osoba s autizmom, dok mjerenjem razine MHPG-a nije pokazana razlika između autistične i kontrolne skupine.

Ispitivanjem ekskrecije noradrenalina i njegovih metabolita u urinu dobiveni su nedosljedni rezultati. Uzevši u obzir sve navedeno, može se izvesti zaključak da noradrenalin ima malu ulogu u etiologiji autističnog poremećaja.

[8] 'Zajednički naziv za nenormalno pojačane nevoljne pokrete mišića, najčešće u nekih bolesti središnjega živčanog sustava' (http://proleksis.lzmk.hr/6110/).

3.4. Acetilkolin

Acetilkolin je neurotransmiter neuromuskularne sinapse, ali i predganglijskih simpatičkih te predganglijskih i postganglijskih parasimpatičkih aksona. Postoje dvije vrste acetilkolinskih receptora: nikotinski i muskarinski, pri čemu su potonji prevladavajući. Uloga kolinergičkog sustava očituje se u razvijanju sposobnosti bolje usredotočenosti na okolinu i ostvarenju koherentnog odgovora u ponašanju. Zbog svoje uloge u razvoju i funkciji kognitivnih sposobnosti, poremećaji ovog sustava vjerojatno su povezani s nedostacima koji prate autizam, poput problema s učenjem i pažnjom.

Provedeno je nekoliko *post mortem* istraživanja kolinergičke aktivnosti kod osoba s autizmom. Perry i sur. (2001.) odlučili su usporediti mozak autističnih osoba, zatim osoba s metalnom retardacijom i normalno razvijenih osoba, grupirajući ih s obzirom na dob. Analize vezanja acetilkolina za receptore pokazale su visoku i značajnu redukciju (oko 65-75%) u vezanju za nikotinske receptore u parijetalnom i frontalnom dijelu kore mozga kod autistične skupine. Nešto niža, no također značajna redukcija od 30% javila se i kod muskarinskih receptora u parijetalnom dijelu kore, no još nije jasno kako navedene promjene utječu na etiologiju autizma (Perry i sur., 2001.).

3.5. Oksitocin

Oksitocin je peptid čija sinteza se odvija u paraventrikularnim (PVN, od eng. *paraventricular nucleus*) i supraoptičkim jezgrama (SON, od eng. *supraoptic nucleus*) hipotalamusa. Uključen je u majčinsko ponašanje, separacijsku anksioznost kod dojenčadi, seksualno ponašanje i razvoj socijalne interakcije (Lam i sur., 2006.).

Vađenjem krvi kod osoba s autizmom zabilježene su znatno niže razine oksitocina u krvi za razliku od kontrolnih skupina. Isto tako, zabilježena je niža razina oksitocina u krvnoj plazmi kod autistične djece, što može biti znak kašnjenja psihičkog sazrijevanja ove skupine ili greške u okidaču za razvojno povećanje razine oksitocina. Kod normalne djece dolazi do povećanja razine oksitocina u skladu s povećanjem razine drugih hormonalnih sustava prije pojave puberteta. Nadalje, kod slučajeva s autizmom, razina oksitocina ima negativnu korelaciju sa socijalnim vještinama. Stoga disregulacija razine oksitocina može igrati važnu ulogu u nastanku autističnog poremećaja.

Analizom DNA otkrivena je povećana metilacija u promotoru oksitocinskog receptora (*OXTR*, od eng. *oxytocin receptor*) u krvi i temporalnom korteksu autista. Hipermetilacijom ovog

gena dolazi do njegovog utišavanja, što uzrokuje poremećaj u signalnom putu oksitocina (Grafodatskaya i sur., 2010.).

3.6. Endogeni opioidi

Endogeni opioidi su peptidi s ulogom neuromodulatora u centralnom živčanom sustavu i postoje tri različita tipa: beta-endorfini, enkefalini te dinorfini. Beta-endorfini imaju najveći afinitet za μ-opioidni receptor (uključen u analgeziju i euforiju), enkefalini se primarno vežu za μ i δ-receptore (vjerojatno povezani s analgezijom), dok se dinorfini vežu za κ- receptore (uključeni u spinalnu analgeziju) (Lam i sur., 2006.). Neki od učinaka primjene opioida su: neosjetljivost na bol, stereotipno ponašanje i smanjena socijalizacija. Zbog sličnosti navedenih simptoma s onima koji se javljaju kod autizma, znanstvenici su zaključili da povećana razina opioida u tijelu može sudjelovati u nastanku bolesti.

Većina istraživanja endogenih opioida usredotočena je na mjerenje razine beta-endorfina (BE) u krvi. U nekoliko istraživanja dokazana je povišena razina navedene tvari, no bitno je navesti da BE krvne plazme dolazi iz hipofize i ne prelazi krvno-moždanu barijeru te stoga može biti pokazatelj isključivo akutnog stresa.

Studije endogenih opioida u cerebrospinalnoj tekućini dale su nedosljedne rezultate. Zbog malog broja ispitanika i pogrešno formiranih kontrolnih skupina teško je izvesti jednoznačan zaključak o kliničkoj važnosti opioida u nastanku autizma.

3.7. Kortizol

Kortizol je glukokortikoid kojeg luči kora nadbubrežne žlijezde kao odgovor na stres te je njegova sekrecija pod kontrolom hipofiznog hormona adrenokortikotropina (ACTH, od eng. *adrenocorticotropic hormone*). Funkcija kortizola u autizmu počela se detaljnije proučavati zbog teorije koja govori da neki od poremećaja u ponašanju mogu biti povezani s povišenom razinom ovog hormona stresa.

Mjerenjem razine kortizola i ACTH u krvi osoba s autizmom zabilježena je značajno povišena razina ACTH, dok je kortizol bio u normalnim vrijednostima. Prema tome, ACTH plazme je dobar marker za akutni stres, dok s druge strane kortizol ima duže vrijeme poluraspada i značajno dužu latenciju pri odgovoru na stres te kao takav pruža bolju mjeru za bazalnu razinu stresa (Lam i sur., 2006.).

3.8. Aminokiselinski neurotransmiteri: glutamat i GABA

Glutamat i gama aminomaslačna kiselina (GABA) su neurotransmiteri povezani sa široko rasprostranjenom sinaptičkom komunikacijom centralnog živčanog sustava, pri čemu je glutamat primarno ekscitacijski neurotransmiter u mozgu i leđnoj moždini, dok je GABA inhibicijski neurotransmiter u mozgu. Istraživanja ova dva neurotransmitera gotovo uvijek su povezana iz razloga što GABA nastaje upravo iz glutamata pomoću dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD).

Većinom se spominje da je u slučaju autizma GABA-ergički sustav potisnut, što dovodi do pretjerane stimulacije glutamata. Dokaz tome su pronađene abnormalnosti u staničnom razvoju limbičkog sustava i malog mozga, koji su inače bogati glutamatnim receptorima. Smatra se da pretjerana aktivnost glutamata dovodi do ekscitotoksičnosti[9] koja pak uzrokuje nenormalan razvoj neurona. Uz navedeno, aktivnost glutamata je najveća tijekom druge godine života, koja je ujedno i vrijeme javljanja prvih simptoma autizma. Zaključno, ukoliko dođe do hiperfunkcije ovog sustava, postoji mogućnost oštećenja rasta i povezanosti neurona tijekom kritičnog razvojnog razdoblja.

Isto tako, znanstvenici su uočili redukciju u količini enzima GAD za 48-61% u parijetalnom i području malog mozga kod osoba s autizmom u odnosu na kontrolu. Dobiveni rezultat predstavlja statistički značajnu razliku i pruža dokaz postojanja neuravnoteženosti u glutamat/GABA sustavima (Lam i sur., 2006.).

[9] Ekscitotoksičnost je patološki proces u kojem se živčane stanice oštećuju i odumiru zbog pretjerane stimulacije neurotransmitterima poput glutamata, aspartama i L-cisteina (https://www.sciencedaily.com/terms/excitotoxicity.htm).

4. RAZVOJNA PSIHOPATOLOGIJA AUTIZMA

Smatra se da većina psihopatoloških poremećaja ima genetsko porijeklo, no geni koji utječu na bilo koji mjerljivi fenotip obično predstavljaju samo mali udio varijabilnosti tog fenotipa. Put od gena do ponašanja je izuzetno složen te različiti rizični geni mogu drugačije reagirati na okolišne čimbenike ili pak prisutnost drugih gena, no svejedno pojedinci imaju predodređene slične ishode na razini ponašanja. Poveznica između gena i ponašanja, koja je odgovorna za sličan bihevioralni odgovor, je varijabilnost endofenotipova (Viding i Blakemore, 2007.).

4.1. Endofenotipovi u autizmu

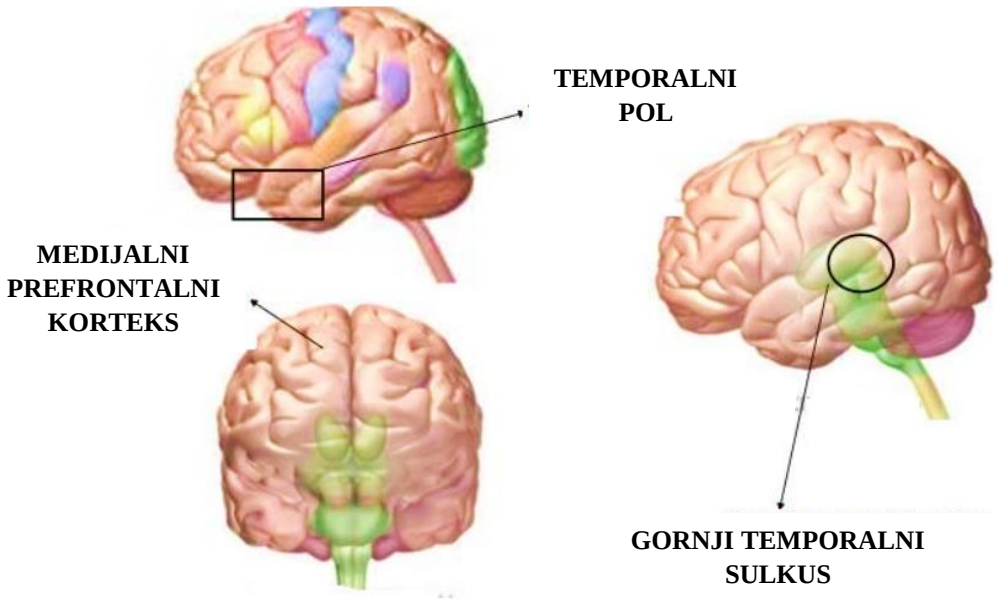
Endofenotipovi su biološki ili psihološki fenomeni poremećaja za koje se vjeruje da su dio uzročnog lanca između genskog doprinosa poremećaju i dijagnostičkih simptoma psihopatologije (Miller i Rockstroh, 2016.). Da bi se smatrao endofenotipom, biomarker mora ispunjavati pet kriterija: 1) biti pouzdan; 2) pokazati dokaze genetskih utjecaja (nasljednost); 3) biti povezan s interesnim ponašanjem/psihopatologijom; 4) povezanost s ponašanjem mora djelomično proizaći iz zajedničkih gena; 5) udruživanje s određenim ponašanjem mora biti teoretski smisleno (uzročnost) (Viding i Blakemore, 2007.). Ukoliko se endofenotip pouzdano može povezati s psihopatologijom, odnosno ukoliko ispuni sve navedene kriterije, tada je moguće navedeni endofenotip istražiti i u obitelji zahvaćenog pojedinca.

4.2. Teorija uma

Navedena teorija pretpostavlja da kod djece s autizmom nedostaje sposobnost razumijevanja vlastitog mentalnog stanja, kao i mentalnog stanja ljudi oko njih. Isto tako izostaje ili je smanjeno razumijevanje povezanosti mentalnih stanja i akcija. Djeca s normalnim razvojem izuzetno brzo stječu sposobnost mentalizacije[10] i u dobi od 5 godina mogu razumjeti kompleksne socijalne scenarije poput vjerovanja, pretvaranja i laži te razumiju da različiti ljudi imaju različite misli, što vodi razlikama u njihovom ponašanju. Kod autistične djece javlja se problem razumijevanja drugačijih vjerovanja od onih koje zastupaju sami te socijalno razumijevanje i mentalizacija zaostaju oko 5 godina u usporedbi sa zdravim vršnjacima.

[10] 'Mentalizacija je predsvjesna mentalna aktivnost koja omogućava osobi da razumije sebe i druge na temelju subjektivnih stanja i mentalnih procesa' (Maršanić i sur., 2017.).

Kod normalno razvijenih ljudi proces mentalizacije aktivira tri ključne regije mozga (Slika 3.): medijalni prefrontalni korteks (PFC, od eng. *medial prefrontal cortex*), gornji temporalni sulkus (STS, od eng. *superior temporal sulcus*) i temporalni pol (eng. *temporal poles*) (Viding i Blakemore, 2007.). Medijalni prefrontalni korteks uključen je u u praćenje unutarnjih mentalnih stanja pojedinca i okoline, gornji temporalni sulkus važan je za prepoznavanje i analiziranje pokreta i akcija, dok je temporalni pol uključen u razumijevanje značenja i procesiranja emocija. Skeniranjem mozga osoba s Aspergerovim sindromom, jednim od poremećaja ASD-a, dokazana je manja aktivnost navedenih regija tijekom određenih mentalizacijskih procesa, u odnosu na kontrolne slučajeve. Stoga se mentalizacija može smatrati endofenotipom društvenih oštećenja u autizmu (Viding i Blakemore, 2007.).



Slika 3. Neuroanatomske strukture važne za teoriju uma, odnosno mentalizaciju

(Preuzeto i prilagođeno sa: https://www.slideshare.net/ashratnam/theory-of-mind-seminar-presentation)

Navedeni endofenotip zadovoljava prvi kriterij jer postoje određeni dokazi za dobru pouzdanost pri ponovnom testiranju određenih zadataka za procjenu teorije uma. Kada govorimo o nasljednosti, studije koje su koristile eksperimentalnu procjenu sposobnosti mentalizacije kod blizanaca, dokazale su da je ista ne ili malo nasljedna. Dobiveni rezultat možda nije reprezentativan iz razloga što su za vrijeme istraživanja djeca već navršila četiri godine i bila su u stanju izvršiti jednostavne zadatke mentalizacije, dok je idealno vrijeme za utvrđivanje nasljednosti između treće i četvrte godine života, odnosno tijekom osjetljivog razvojnog razdoblja. S druge strane, nije poznato

ni jedno istraživanje genske korelacije između autizma i mentalizacije ili pak uzročnosti između mentalizacije i kasnije dijagnoze autizma.

4.3. Teorija slabe središnje povezanosti

Iako osobe s autizmom posjeduju loše društvene sposobnosti, nerijetko su izuzetno talentirane u nekom drugom području. Autistični savanti su jedan od najintrigantnijih psiholoških fenomena, a riječ je o osobama koje posjeduju neuobičajene i rijetke sposobnosti poput nadarenosti za glazbu, fotografskog pamćenja te izvanredne memorije za brojeve i datume. Pošto navedeni talenti nisu mogli biti objašnjeni poremećajem u mentalizaciji, znanstvenici su došli do tzv. teorije slabe središnje povezanosti. Spomenuta teorija opisuje postojanje pristranosti prema određenoj značajki, odnosno nesposobnosti sagledavanja cjelokupne slike ili konteksta kod autističnih osoba (Happé i Frith, 2006.). Stoga autisti bolje pamte nepovezani materijal od ostatka populacije, dok s povezanim materijalom imaju poteškoće i ne uspijevaju stvoriti smislenu cjelinu iz detalja.

Ukoliko slabu središnju povezanost sagledamo kao mogući endofenotip kroz navedenih pet kriterija, kao i kod mentalizacije, za sada nisu poznata istraživanja genske korelacije između autizma i spomenutog endofenotipa ili pak uzročnosti između istog i kasnije dijagnoze autizma. Što se tiče pouzdanosti, postoje određeni dokazi za dobru pouzdanost ponovnog testiranja središnje povezanosti. Zanimljivo je da postoji nekoliko istraživanja koja indiciraju na obiteljsko porijeklo ovog endofenotipa. Happé i sur. (2001.), u istraživanju koje je obuhvatilo 47 obitelji sa sinom koji je imao ASD, disleksiju ili normalan razvoj, dokazali su slabiju središnju povezanost kod polovice očeva i trećine majki djece s autizmom. Navedeno istraživanje bilo je prekretnica koja je otvorila put za moguća daljnja genetička istraživanja određenih aspekata autizma poput ovog.

5. GENETSKI MODEL AUTIZMA

Autistični poremećaj jedna je od najtežih i najčešćih neurorazvojih bolesti koje spadaju u grupu ASD-a (Abrahams i Geschwind, 2008.). Zbog nedostatka znanja u području genetike, autizam se u tom pogledu počeo proučavati tek 1980-ih, kada su zabilježene i prve poveznice s poremećajima kromosoma i sličnim sindromima. Krajem 1990-ih krenule su prve genske asocijacijske studije (eng. *gene association studies*), a ubrzo nakon toga i cjelogenomske studije povezanosti (eng. *whole-genome linkage study*), koje su pomogle u otkrivanju dodatnih lokusa od interesa.

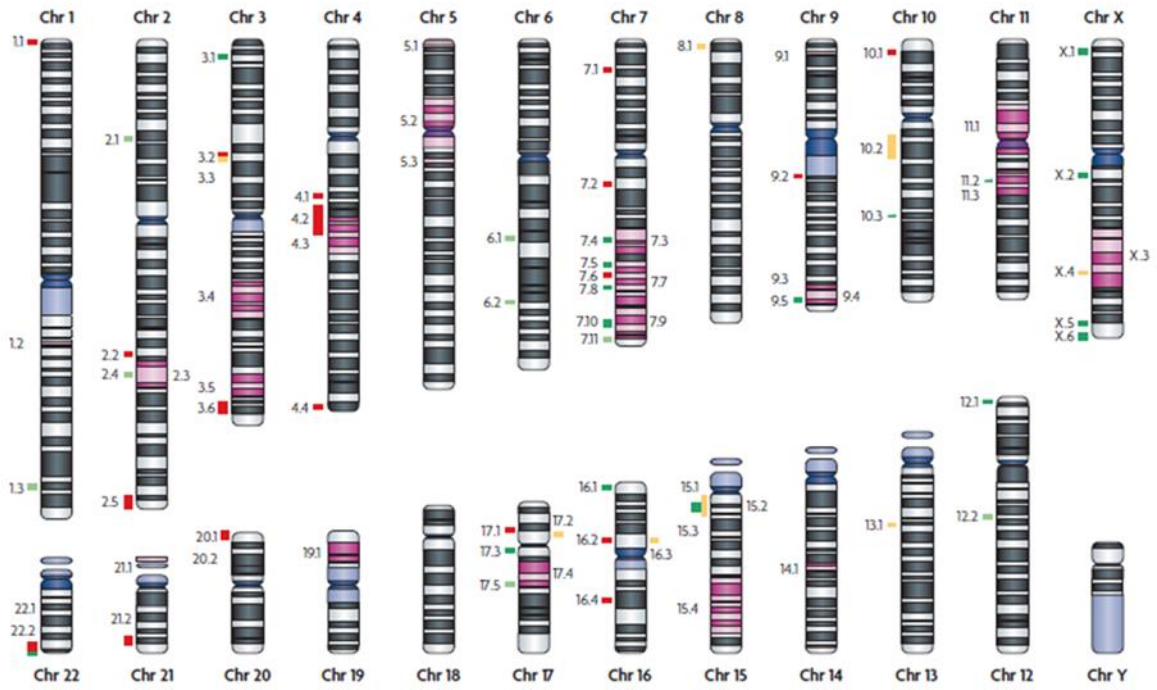
Nekoliko dokaza ide u prilog tezi da genski faktori imaju primarnu ulogu u nastanku autizma. Kao prvo nameće se sve više literature koja pokazuje da mutacije ili strukturne varijacije bilo kojeg od nekoliko gena povezanih s nastankom autizma izuzetno povećavaju rizik od razvoja bolesti. Nadalje, ukoliko u obitelji jedno dijete već ima dijagnosticiran autizam, šansa da i drugo dijete bude zahvaćeno ovim poremećajem veća je za čak 25 puta. Isto tako, braća i roditelji djeteta s dijagnosticiranim autizmom češće pokazuju suptilne kognitivne promjene, kao i promjene u ponašanju, slične onima koje nalazimo kod autističnih osoba. Na kraju, učestalost pojavnosti autizma kod dvojajčanih blizanaca je u rasponu 0-10%, dok se kod jednojajčanih blizanaca taj postotak kreće u rasponu od čak 70-90% (Abrahams i Geschwind, 2008).

5.1. Geni uključeni u nastanak ASD-a

Iako svako novo istraživanje otkrije potencijalne kandidate gena povezanih s autizmom, najveći naglasak se stavlja upravo na nekoliko njih, o kojima više slijedi u nastavku. Općenito, geni uključeni u etiologiju autizma mogu se podijeliti u tri skupine: 1) geni uključeni u strukturu i aktivnost sinapse (*NLGN3*, *NLGN4X*, *SHANK3,…)*; 2) geni uključeni u sintezu proteina (*UBE3A, CACNA1C, FMR1, PTEN,…*); 3) geni uključeni u regulaciju genske ekspresije (*UBE3A. FMRP,…*).

Otkriće mutacija u genima za neuroligin 3 (*NLGN3*) i neuroligin 4 (*NLGN4X*), poput delecija parova baza ili tranzicije citozina u timin, dovelo je do značajnog napretka u povezivanju ASD-a sa specifičnim molekulama važnim za adheziju stanica u sinapsi. Isto tako, otkrivene su mutacije i u genu *SHANK3* (eng. *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) koji kodira sinaptički protein te potonji zatim ulazi u interakciju s neuroliginima. Znanstvenici smatraju da navedene mutacije mogu djelovati sinergistički s drugim sličnim genima te sudjelovati u razvoju pojedinih poremećaja unutar ASD-a (Chaste i Leboyer, 2012.). Kod gena *CNTNAP2* (eng. *contactin associated protein-like 2*) detektirana je mutacija pomaka okvira čitanja (eng. *frameshift mutation*). Zabilježena je povezanost

navedenog gena s razvojem fokalne kortikalne displazije, kongenitalnim poremećajem koji karakteriziraju epileptični napadaji i jezično nazadovanje, kod Amiša. Zanimljiva je činjenica da dvije trećine zahvaćenih osoba u isto vrijeme ispunjava i kriterije za razvoj ASD-a (Strauss i sur., 2006.). Iako je *CNTNAP2* najpoznatiji po svojoj ulozi u grupiranju kalijevih kanala duž mijeliniziranih aksona, određene studije pokazuju visoku ekspresiju ovog gena u mozgu fetusa i prije mijelinizacije (Abrahams i Geschwind, 2008.). Navedeni dokazi govore u prilog važnosti spomenutog gena u razvoju pojedinih regija mozga uključenih u razvoj autizma. Jedan od nedavno otkrivenih gena koji se usko veže uz etiologiju autizma je *CHD8* (eng. *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8*). Isti kodira za protein koji regulira ekspresiju gena uključenih u razvoj mozga prije rođenja, putem remodeliranja kromatina. Otkriveno je više od 30 mutacija navedenog gena kod osoba s autizmom te iste smanjuju funkciju *CHD8* proteina i mogu ometati njegovu sposobnost kontrole broja i rasta neurona u mozgu (Cotney i sur., 2015). Prikaz određenih gena povezanih s etiologijom autizma nalazi se na Slici 4., dok su njihova imena i pozicije, odnosno kromosomske regije sadržane u Tablici 1.



Slika 4. Lokusi uključeni u etiologiju ASD-a (Abrahams i Geschwind, 2008.)

Unosi u ID stupcu Tablice 1. odgovaraju ideogramima pojedinih kromosoma. Crvene i žute pruge predstavljaju *de novo* gubitke i dobitke promatrane isključivo kod osoba s ASD-om. Zelene pruge odgovaraju genima uključenima u modulaciju rizika od ASD-a, odnosno svijetlozelene i tamnozelene pruge predstavljaju obećavajuće ili moguće kandidate gena koji sudjeluju u nastanku ASD-a.

Tablica 1. Geni povezani s nastankom ASD-a (Abrahams i Geschwind, 2008.)

ID	Feature	Position	Refs	ID	Feature	Position	Refs	ID	Feature	Position	Refs
1.1	Loss	1p36	3	7.4	*RELN*	7q22	117–121	15.3	Gain	15q11–15q13	4
1.2	Linkage	1q21–1q23	116	7.5	*MET*	7q31	70,123	15.4	Linkage	15q22–15q26	5
1.3	*DISC1*	1q42	122	7.6	Loss	7q31	5	16.1	*TSC2*	16p13	110
2.1	*NRXN1*	2p16	5,34	7.7	Linkage	7q32–7q34	15	16.2	Loss	16p11	4,20,35,44
2.2	Loss	2q24	4	7.8	*CADPS2*	7q31	5,45	16.3	Gain	16p11	20,35,44
2.3	Linkage	2q24–2q31	57,58,112	7.9	Linkage	7q34–7q36	14,52,68	16.4	Loss	16q21	5
2.4	*SLC25A12*	2q24	124–126	7.10	*CNTNAP2*	7q35–7q36	37–40	17.1	Loss	17p12	5
2.5	Loss	2q37	4	7.11	*EN2*	7q36	129,130	17.2	Gain	17p12	107
3.1	*OTXR*	3p25	127,128	8.1	Gain	8p23	5	17.3	*SLC6A4*	17q11	131–134
3.2	Loss	3p14	4	9.1	Linkage	9p24	5	17.4	Linkage	17q11–17q21	51,54,135
3.3	Gain	3p14	4	9.2	Loss	9q12	5	17.5	*ITGB3*	17q21	136,137
3.4	Linkage	3q22	15	9.3	Linkage	9q33	5	19.1	Linkage	19p13	140
3.5	Linkage	3q25–3q27	138,139	9.4	Linkage	9q34	15	20.1	Loss	20p13	5
3.6	Loss	3q27–3q28	3	9.5	*TSC1*	9q34	110	20.2	Loss	20p13	5
4.1	Loss	4q21	3	10.1	Loss	10p14–10p15	4	21.1	Linkage	21q11	55
4.2	Loss	4q21-23	3	10.2	Gain	10q11–10q21	4	21.2	Loss	21q22	3
4.3	Linkage	4q22–4q25	15	10.3	*PTEN*	10q23	141	22.1	Loss	22q13	4
4.4	Loss	4q35	5	11.1	Linkage	11p12–11p13	5	22.2	*SHANK3*	22q13	21,22,142,143
5.1	Linkage	5p15	5	11.2	*DHCR7*	11q13	108	X.1	*NLGN4X*	Xp22	28
5.2	Linkage	5p13–5q11	140	11.3	Linkage	11q13–11q14	15	X.2	*NLGN3*	Xq13	28
5.3	Linkage	5q12	5	12.1	*CACNA1C*	12p13	24	X.3	Linkage	Xq21–Xq25	140
6.1	*GRIK2*	6q21	144–146	12.2	*AVPR1A*	12q14–12q15	147	X.4	Gain	Xq24	3
6.2	*AHI1*	6q23	106	13.1	Gain	13q14	5	X.5	*FMR1*	Xq27	105,148
7.1	Loss	7p21	4	14.1	Linkage	14q23	149	X.6	*MECP2*	Xq28	109
7.2	Loss	7q11	3	15.1	*UBE3A*	15q11	102,103				
7.3	Linkage	7q22–7q32	52,111–113	15.2	*GABRB3*	15q12	25,114,115				

AHI1 (Abelson helper intergration site 1), ***AVPR1A*** (arginine vasopressin receptor 1A), ***CACNA1C*** (calcium channel voltage-dependent L type alpha 1C subunit), ***CADPS2*** (Ca2+ dependent activator protein for secretion 2), ***CNTNAP2*** (contactin associated protein-like 2), ***DHCR7*** (7-dehydrocholesterol reductase), ***DISC1*** (disrupted in schizophrenia 1), ***EN2*** (engrailed homeobox 2), ***FMR1*** (fragile X mentalretardation 1), ***GABRB3*** (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor beta 3), ***GRIK2*** (glutamate receptor ionotropic kainate 2), ***ITGB3*** (integrin beta 3), ***MECP2*** (methyl CpG binding protein 2), ***MET*** (met proto-oncogene), ***NLGN3*** (neuroligin 3), ***NLGN4X*** (neuroligin 4 X-linked), ***NRXN1*** (neurexin 1), ***OXTR*** (oxytocin receptor), ***PTEN*** (phosphatase and tensin homologue), ***RELN*** (reelin), ***SHANK3*** (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3), ***SLC25A12*** (solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar) member 12), ***SLC6A4*** (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin) member 4), ***TSC1*** (tuberous sclerosis 1), ***TSC2*** (tuberous sclerosis 2), ***UBE3A*** (ubiquitin protein ligase E3A)

5.2. Varijacije u broju kopija genoma

Otkriće naslijeđenih varijacija u broju kopija genoma (CNV, od eng. *copy number variation*)[11] ili pak onih nastalih *de novo* pokazalo se kao važan uzrok u nastanku ASD-a. Iako sam koncept strukturnih varijacija nije novo otkriće, pošto su kromosomalni poremećaji bili jedni od prvih

[11] Insercija ili delecija relativno velikog fragmenta DNA (>50 kb) (Abrahams i Geschwind, 2008).

otkrivenih genskih abnormalnosti povezanih s ASD-om, zanimljiva je činjenica da se čak više od 6-7% slučajeva ASD-a može povezati upravo s rijetkim strukturnim varijacijama. Dokazana je mnogo veća frekvencija u nastanku *de novo* varijacija u obiteljima sa samo jednim slučajem klinički dijagnosticiranog ASD-a (eng. *simplex families*), za razliku od obitelji sa više slučajeva klinički dijagnosticiranog ASD-a (eng. *mutiplex families*) (Abrahams i Geschwind, 2008.).

Poznata je ponavljajuća *de novo* delecija koja uključuje 30-ak gena na kromosomskoj regiji 16p11 te je dokazana u oko 1% slučajeva kroz nekoliko studija. Sljedeća zanimljiva varijacija je *de novo* delecija koja uključuje gen *CADPS2* (eng. *Ca^{2+}- dependent activator protein for secretion 2*) i 7 drugih gena regije 7q31, koji mutiran također sudjeluje u nastanku autizma. Iako prisutnost rijetkih varijacija prvenstveno povezujemo s razvojem bolesti, važno je naglasiti da to ne mora uvijek biti tako. U 1% kontrolnih slučajeva detektirana je određena *de novo* nastala varijacija u broju kopija (Sebat i sur., 2007.). Većina navedenih varijacija imala bi mnogo veću važnost pri utvrđivanju povezanosti i načina asocijacije skupa gena koji sudjeluju u razvoju autističnog poremećaja kada bi se proučavala u odnosu na gensku ekspresiju, strukturu mozga i kvantitativne aspekte socijalnog ponašanja i komunikacije.

5.3. Uloga kromosomskog microarray-a (CMA) u dijagnostici autizma

Istraživanja uz pomoć metode kromosomskog microarray-a (CMA, eng. *Chromosomal Microarray Analysis*)[12], poznate i pod nazivom komparativna genomska hibridizacija na matrici (array-CGH, eng. *Array Comparative Genomic Hybridization*), pridonijela su pružanju uvida u molekule i signalne puteve koji su možebitno promijenjeni kod ASD-a. Jedan od identificiranih gena s najviše promijenjenom genskom ekspresijom je *EPB41L3* (eng. *erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3*), poznat po interakciji s već spomenutim genom *CNTNAP2* (Abrahams i Geschwind, 2008.). Nishimura i sur. (2007.) dokazali su da se ekspresija gena razlikuje među ASD slučajevima, ovisno o genskim mutacijama i signalnim putevima. U navedenom radu identificirano je čak 68 molekula s promijenjenom ekspresijom, poput *CYFIP1* (eng. *cytoplasmic FMR1 interacting protein 1*) i *JAKMIP1* (eng. *janus kinase and microtubule interacting protein 1*), koji povezuje GABA receptore.

[12] 'Visokopropusna metoda u kojoj je mnoštvo molekula DNA različite duljine pričvršćeno za čvrstu podlogu u točno određenim točkama i s pomoću njih se otkriva prisutnost odgovarajućih označenih molekula RNA koje se izoliraju iz ispitivanih bioloških uzoraka. Temeljni princip je sparivanje komplementarnih nukleotida (A-T i C-G), što dovodi do stvaranja nukleinskih kiselina s dvostrukom uzvojnicom' (Lamot i sur., 2015.).

6. EPIGENETIKA POREMEĆAJA AUTISTIČNOG SPEKTRA

Kao što je već nekoliko puta navedeno, poremećaji autističnog spektra primarno su genetskog porijekla. Uključenost mehanizama epigenetike počela se proučavati nakon pojave autizma kod pacijenata s bolestima uzrokovanima epigenskim mutacijama, poput sindroma fragilnog X kromosoma i Rettovog sindroma (Schanen, 2006.). Rettov sindrom je neurološki poremećaj koji nastaje zbog mutacije u genu koji kodira protein *MeCP2* (od eng. *Methyl-CpG-binding protein 2*), jedan od ključnih medijatora epigenetičke regulacije ekspresije gena (Chaste i Leboyer, 2012.). S druge strane, sindrom fragilnog X kromosoma nastaje kombinacijom genskih i epigenskih mutacija, gdje povećan broj CGG ponavljajućeg slijeda na genu *FMR1* (eng. *fragile X mental retardation 1*) čini tu regiju osjetljivom na epigenetičko utišavanje te rezultira gubitkom ekspresije gena.

Jedan od primjera regulacije ekspresije gena putem epigenetičkih modifikacija je genomski utisak (eng. *genomic imprinting*). Utisnuti geni (utišani, metilirani) metiliraju se tijekom spermatogeneze ili oogeneze pa ekspresija tih gena ovisi o tome jesu li naslijeđeni od oca ili od majke. Primjer takvog gena je RELN (eng. *reelin*), koji kodira za već spomenuti protein relin te su u slučaju autizma pronađene niže razine spomenutog proteina u mozgu, što ukazuje na hipermetilaciju RELN lokusa. Kada govorimo o autizmu, najčešće metode koje su se koristile za otkrivanje 'osjetljivih' alela bile su cjelogenomska analiza (eng. *genome-wide*) i ciljane analize poput TDT analize (od eng. *transmission disequilibrium testing*). Nekoliko istraživanja u kojima se istraživao genom radi otkrivanja lokusa/gena povezanih s nastankom autizma uputilo je na to da bi se oni mogli nalaziti u regijama kromosoma 2q, 3q, 7q, 6q, 11p12-p13, 13q, 15q, 16q, 17q, 22q te na kromosomima X i Y (Schanen, 2006).

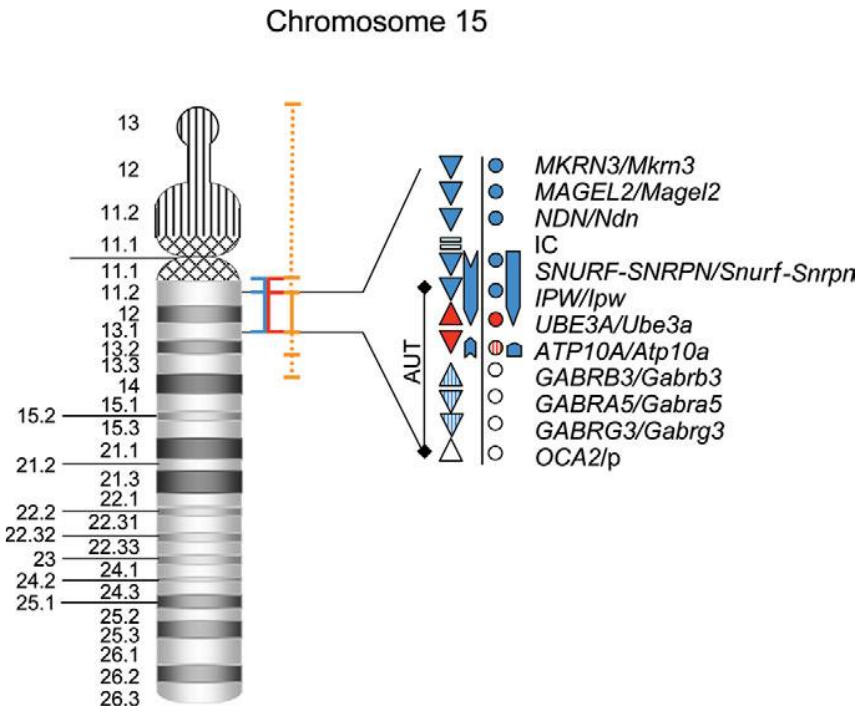
6.1. Duplikacija kromosoma 15

Duplikacija regije q11-13 kromosoma 15 porijeklom od majke je najuobičajenija ponavljajuća kromosomska aberacija povezana s poremećajima autističnog spektra i povećava rizik nastanka poremećaja autističnog spektra za čak 85% (Schanen, 2006). Duplikacija majčinog kromosoma 15, u vezi s autizmom, uzrokuje niz kognitivnih poremećaja, kašnjenja u motorici, epileptične napadaje te dismorfične crte lica, dok delecija navedene regije uzrokuje nastank Prader Willi (PWS) i Angelmanovog sindroma (AS). S druge strane, duplikacija iste regije očevog kromosoma dovodi do blagih razvojnih i kognitivnih nedostataka te je u samo četiri slučaja zabilježena poveznica duplikacije 15q11-13 očevog kromosoma s nastankom autističnog

poremećaja (Grafodatskaya i sur., 2010.). Postoje dvije forme duplikacije kromosoma 15: intersticijalna duplikacija i izodicentrični kromosom 15.

Pošto veću ulogu u nastanku autizma ima duplikacija majčinog 15. kromosoma, većina istraživanja usmjerena je na ekspresiju majčinih gena. Dva su majčina gena o čijoj se važnosti posebno raspravlja, a to su: *UBE3A* (eng. *ubiquitin protein ligase E3A*), gen koji kodira E3 ubikvitin ligazu, čija je uloga usmjeravanje molekula ubikvitina na specifične supstrate; i *ATP10A* (eng. *ATPase phospholipid transporting 10A*) koji kodira za aminofosfolipid-transportnu ATPazu. Duplicirani segment obuhvaća i dva očeva gena koji mogu sudjelovati u nastanku autizma. Riječ je o genima *NECDIN* (eng. *necdin*) i *MAGEL2* (eng. *MAGE family member L2*), čija ekspresija se očituje u mozgu te kao takvi kodiraju za proteine važne u razvoju neurona (Schanen, 2006).

Skupina utisnutih i bialelno eksprimiranih gena koja se proteže od područja kritičnog za nastanak PWS-a i AS-a, koje uključuje gene poput *UBE3A*, pa sve do klastera gena koji kodiraju za receptorske podjedinice gama-aminomaslačne kiseline (GABA) od posebnog je interesa u nastanku ASD-a zbog svoje funkcije u živčanom sustavu (Slika 5.).

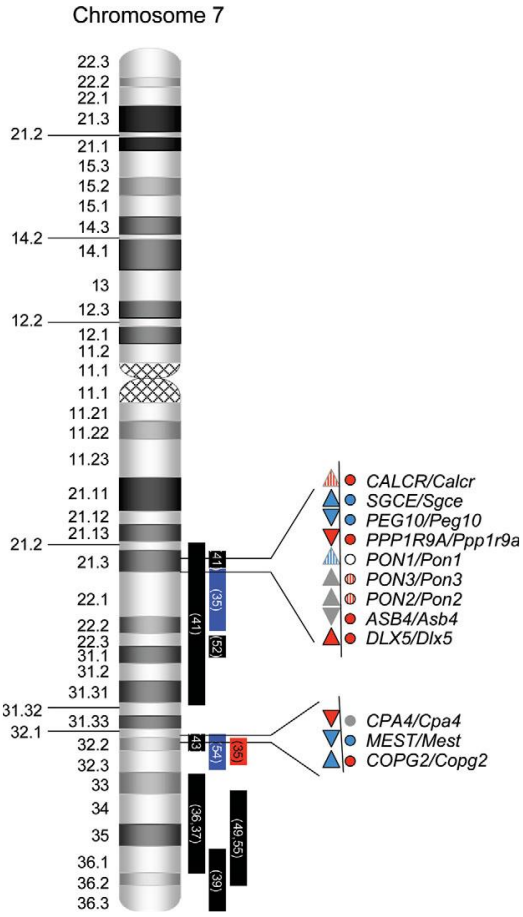


Slika 5. Ideogram kromosoma 15 prikazuje skupinu utisnutih gena, označenih skraćenicom AUT, kritičnih za nastanak autizma (Schanen, 2006.)

Istraživanja na uzorcima mozga pacijenata koji su imali dijagnosticiran autizam otkrila su abnormalnosti u metilaciji CpG otoka gena *UBE3A*, kao i smanjenu ekspresiju *UBE3A/E6-AP*. Slično tome, pošto se GABA smatra glavnim inhibitornim neurotransmiterom u tijelu, ona je ključni regulator razdražljivosti u centralnom živčanom sustavu sisavaca. Dokazano je da se ekspresija GABA receptora (GABRB3, GABRA5 i GABRG3) regulira regionalno i razvojno te su u slučaju autizma zabilježene abnormalnosti u ekspresiji navedenih receptora (Schanen, 2006.).

6.2. Utisak i epigenetika kromosoma 7q u nastanku ASD-a

Duži krak kromosoma 7 (7q) bio je uključen u istraživanja ASD-a od samih početaka te je zaključeno da postoje dva ili više lokusa na navedenom kromosomu koji su povezani s nastankom tog poremećaja. Prvi klaster gena, bliže centromeri, obuhvaća regiju 7q21-31.31 te uključuje gen *DLX5* (eng. *distal-less homeobox transcription factor 5*), eksprimiran od majke. Navedeni gen spada u obitelj gena koji kodiraju grupu tzv. 'homeobox' transkripcijskih faktora, koji sudjeluju u razvoju živčanog sustava, i kao takav može sudjelovati u nastanku ASD-a. Geni *DLX5* i *DLX2* (eng. *distal-less homeobox 2*) sudjeluju u regulaciji ekspresije enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD), koji pak stvara neurotransmiter GABA-u (Schanen, 2006.). Drugi klaster gena, koji se nalazi u regiji 7q32.2, obuhvaća četiri očeva i jedan majčin gen – *CPA4* (eng. *carboxypeptidase A4*), čija funkcija nije povezana s nastankom autizma. Četiri gena eksprimirana s očeve strane obuhvaćaju: 1) *MEST* (eng. *mesoderm specific transcript*), 2) *MESTIT1* (eng. *MEST intronic transcript 1*), 3) *COPG2* (eng. *coatomer protein complex subunit gamma 2*) i 4) *COPG2IT1* (eng. *COPG2 imprinted transcript 1*) (Slika 6.). Usprkos naporu znanstvenika, ni za jedan od navedenih gena nije moguće sa sigurnošću tvrditi da sudjeluje u nastanku ASD-a, iako su vjerojatno suradnici u etiologiji autizma. Moguće je da provedene analize nisu detektirale važna mjesta metilacije te su stoga potrebne opsežnije analize ekspresije i metilacije spomenutih gena (Schanen, 2006.).



Slika 6. Ideogram kromosoma 7 prikazuje dva klastera gena koji možebitno sudjeluju u etiologiji i nastanku autizma (Schanen, 2006.)

6.3. Genomski utisak i X kromosom

Zbog tzv. rodne pristranosti (eng. *gender bias*) koja govori u prilog tome da ASD zahvaća muškarce čak četiri puta više nego žene, Skuse i sur. 1997. godine postavili su intrigantnu hipotezu uključivši mehanizme epigenetike u objašnjenje rodne pristranosti kod ASD-a. U istraživanju koje je uključivalo 80 žena s Turnerovim sindromom, monosomijom X kromosoma (45, X), dokazano je da porijeklo X kromosoma utječe na mjere socijalne kognicije te da su bolji rezultati dobiveni kod žena koje su X kromosom naslijedile od oca (Skuse i sur., 1997.). Na temelju tog otkrića predloženo je postojanje utisnutog lokusa koji povećava stopu društvenog ponašanja i na taj način 'štiti' žene od ASD-a i drugih poremećaja koji zahvaćaju društvene i jezične vještine. S druge strane, navedeni model tvrdi da je isti taj lokus utišan na X kromosomu porijeklom od majke te je na taj način onemogućena njegova ekspresija kod muškaraca, što ih direktno čini podložnijima već spomenutim poremećajima (Skuse i sur., 1997.).

7. ZAKLJUČAK

Autizam, kao i ostali pervazivni razvojni poremećaji, većinom je idiopatski, odnosno uzrok i etiologija navedenog su još uvijek nepoznati, dok se samo mali dio slučajeva objašnjava poznatim mutacijama gena. Od prvotne teze da se uzrok nastanka autizma krije u emocionalno hladnim i neosjetljivim roditeljima koji ne prihvaćaju svoje dijete, razvojem znanosti došlo se do spoznaje da autizam nastaje kao rezultat neurološke abnormalnosti, no uzrok, u većini slučajeva, ostaje i dalje nepoznat. Smatra se da čak oko 1000 gena na određeni način sudjeluje u nastanku istog, pri čemu promjene u većem broju gena, uz interakciju s mnoštvom okolišnih, epigenetičkih, imunoloških, metaboličkih i drugih čimbenika čine ovaj poremećaj izuzetno heterogenim i teškim za istraživanje. Vrlo rijetko se događa da mutacija samo jednog gena uzrokuje nastanak poremećaja iz spektra autizma, osim u slučaju rijetkih mutacija ili kromosomskih abnormalnosti; dok je većinom riječ o interakciji dva ili više gena povezanih upravo s ranim fazama razvoja mozga. Poremećena ekspresija gena narušava sintezu i aktivnost proteina koji utječu na više aspekata razvoja mozga, uključujući: proizvodnju, rast i organizaciju neurona, razvoj i funkciju sinapsi, poremećenu normalnu strukturu slojeva kore i drugih regija mozga, itd. Pretpostavlja se da su upravo navedene citoarhitektonske abnormalnosti uzrok poteškoća na emocionalnom planu te u socijalnim interakcijama i imitaciji osoba s autizmom. Uz gensku podlogu, veliku ulogu u razvoju ovakvih poremećaja imaju i promjene u koncentraciji niza neurotransmitera, kao i njihovih receptora, pri čemu se poseban naglasak stavlja na povećanu razinu serotonina. S psihološkog gledišta, razlikujemo kognitivni i bihevioralni model autizma. Dok bihevioralni model promatra načine ponašanja kroz vidljivu manifestaciju poremećaja, odnosno trijadu oštećenja karakterističnih za autizam, kognitivni model sagledava načine na koje autistična osoba gleda na svijet oko sebe. Definiranje i istraživanje endofenotipova putem psiholoških modela omogućuje rastavljanje kompleksnih neuropsiholoških procesa na sastavne cjeline i na taj način osigurava direktniju i uspješniju genetičku analizu. Zaključno, zbog izrazite genske heterogenosti, i lokusne i alelne, te nedovoljno istraženog djelovanja endofenotipova, odnosno poveznice između genskih varijacija i fenotipa, teško je osmisliti ciljani tretman koji bi omogućio potpuni oporavak djece već u najranijim fazama djetinjstva. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na rješavanje spomenutih nedostataka i uz individualni pristup pokušati razotkriti glavne uzroke nastanka autizma, što bi pak dovelo do općeg napretka u terapiji.

8. LITERATURA

Abrahams, B. S. i Geschwind, D. H. Advances in autism genetics: On the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* **9,** 341–355 (2008.).

Baron-Cohen, S. i Bolton, P. Autism: the Facts. *Oxford Univ. Press*. New York. **109,** (1993.).

Casanova, M. F., Buxhoeveden, D. P., Switala, A. E. i Roy, E. Neuronal Density and Architecture in the Brains of Autisctic Patients. *J. Child Neurol.* **7,** 515–521 (2002.).

Cepanec, M., Šimleša, S. i Stošić, J. Rana dijagnostika poremećaja iz autističnog spektra - Teorija, istraživanja i praksa. *Klin. Psihol.* **8,** 203–224 (2015.).

Chaste, P. i Leboyer, M. Autism risk factors: Genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin. Neurosci.* **14,** 281–292 (2012.).

Chugani, D. C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J. J., Lee, J., Chugani, H. T. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann. Neurol.* **45,** 287–295 (1999).

Cohen, D. J., Caparulo, B. K., Shaywitz, B. A. i Bowers, M. B. Dopamine and serotonin metabolism in neuropsychiatrically disturbed children. *Arch. Gen. Psychiatry* **34,** 545–550 (1977.).

Cotney, J., Muhle, R. A., Sanders, S. J., Liu, L., Willsey, A. J., Niu, W., Liu, W., Klei, L., Lei, J., Yin, J., Reilly, S. K., Tebbenkamp, A. T., Bichsel, C., Pletikos, M., Sestan, N., Roeder, K., State, M. W., Devlin, B., Noonan, J. P. The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat. Commun.* **6,** 1–11 (2015).

Courchesne, E. Brain development in autism: Early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **10,** 106–111 (2004.).

Grafodatskaya, D., Chung, B., Szatmari, P. i Weksberg, R. Autism spectrum disorders and epigenetics. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **49,** 794–809 (2010.).

Happé, F., Briskman, J. i Frith, U. Exploring the cognitive phenotype of autism: Weak 'central coherence' in parents and siblings of children with autism: I. Experimental tests. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **42,** 299–307 (2001.).

Happé, F. i Frith, U. The weak coherence account: Detail-focused cognitive style in autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **36,** 5–25 (2006.).

Hornung, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. J. Chem. Neuroanat. **26**, 331–343 (2003.).

Kern, J. K. Purkinje cell vulnerability and autism: A possible etiological connection. *Brain Dev.* **25,** 377–382 (2003.).

Klarić, A. Š., Kolundžić, Z., Šimić, Ž., Đaković, I., Gotovac, N., Mejaški Bošnjak, V. Cerebralna paraliza i pridružena neurorazvojna odstupanja u djece s kortikalnom disgenezom. *Paediatr. Croat.* **58,** 295–300 (2014.).

Kolevzon, A., Newcorn, J. H., Kryzak, L., Chaplin, W., Watner, D., Hollander, E., Smith, C. J., Cook Jr., E. H., Silverman, J. M. Relationship between whole blood serotonin and repetitive behaviors in autism. *Psychiatry Res.* **175,** 274–276 (2010.).

Lam, K. S. L., Aman, M. G. i Arnold, L. E. Neurochemical correlates of autistic disorder: A review of the literature. *Res. Dev. Disabil.* **27,** 254–289 (2006.).

Lamot, L., Vidović, M., Perica, M., Tambić Bukovac, L., Harjaček, M. Sitnopolje i analiza genskog izražaja. *Lijec. Vjesn.* **137,** 188–195 (2015.).

Maršanić, V. B., Karapetrić-Bolfan, Lj., Buljan-Flander, G., Grgić, V. „Vidjeti sebe izvana, a druge iznutra'—Mentalitacija u djece i adolescenata i tretman temeljen na mentalizaciji za adolescente. Mentalization in children and adolescents, and treatment based on mentalization for adolescents. *Soc. Psihijatr.* **45,** 43–56 (2017.).

Miles, J. H. Autism spectrum disorders-A genetics review. *Genet. Med.* **13,** 278–294 (2011.).

Miller, G. A. i Rockstroh, B. S. Progress and Prospects for Endophenotypes for Schizophrenia in the Time of Genomics, Epigenetics, Oscillatory Brain Dynamics, and the Research Domain Criteria. The Neurobiology of Schizophrenia. *Academic Press.* London. **468**, 17–32 (2016.).

Nishimura, Y., Martin, C. L., Vazquez-Lopez, A., Spence, S. J., Alvarez-Retuerto, A. J., Sigman, M., Steindler, C., Pellegrini, S., Schanen, N. C., Warren, S. T., Geschwind, D. H. Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum. Mol. Genet.* **16,** 1682–1698 (2007.).

Palmen, S. J. M. C., Van Engeland, H., Hof, P. R. i Schmitz, C. Neuropathological findings in autism. *Brain* **127,** 2572–2583 (2004.).

Perry, E. K., Lee, M. L.W., Martin-Ruiz, C. M., Court, J. A., Volsen, S. G., Merrit, J., Folly, E., Iversen, P. E., Bauman, M. L., Perry, R. H., Wenk, G. L. Cholinergic activity in autism: Abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *Am. J. Psychiatry* **158,** 1058–1066 (2001.).

Rockland, K. S. i Ichinohe, N. Some thoughts on cortical minicolumns. *Exp. Brain Res.* **158,** 265–277 (2004.).

Schanen, N. C. Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* **15,** 138–150 (2006.).

Schmitz, C. & Rezaie, P. The neuropathology of autism : where do we stand ? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **34,** 4–11 (2008).

Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang, R., Lee, Y. H., Hicks, J., Spence, S. J., Lee, A. T., Puura, K., Lehtimäki, T., Ledbetter, D., Gregersen, P. K., Bregman, J., Sutcliffe, J. S., Jobanputra, V., Chung, W., Warburton, D., King, M. C., Skuse, D., Geschwind, D. H., Gilliam, T. C., Ye, K., Wigler, M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* **316,** 445–449 (2007.).

Skuse, D. H., James, R. S., Bishop, D. V. M., Coppin, B., Dalton, P., Aamodt-Leeper, G., Bacarese-Hamilton, M., Creswell, C., McGurk, R., Jacobs, P. A. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature.* **387,** 705–708 (1997.).

Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S., Dobrin, S. E., Parod, J. M., Stephan, D. A., Morton, D. H. Recessive Symptomatic Focal Epilepsy and Mutant Contactin-Associated Protein-like 2. *N. Engl. J. Med.* **354,** 1370–1377 (2006.).

Tomasović, M. i Marušić, E. Malformacije središnjeg živčanog sustava. *Paediatr Croat.* **51,** 152–158 (2007.).

Viding, E. i Blakemore, S. J. Endophenotype approach to developmental psychopathology: Implications for autism research. *Behav. Genet.* **37,** 51–60 (2007.).

http://www.cybermed.hr/clanci/poremecaji_autisticnog_spektra (Pristupljeno: 02.08.2018.)

http://hjp.znanje.hr/index.php?show=search_by_id&id=e1xmWRI%253D (Pristupljeno: 10.08.2018.)

http://proleksis.lzmk.hr/6110/ (Pristupljeno: 20.08.2018.)

https://www.researchgate.net/figure/Parts-of-the-Brain-Affected-by-Autism_fig2_278305188 (Pristupljeno: 04.08.2018.)

https://www.sciencedaily.com/terms/excitotoxicity.htm (Pristupljeno: 21.08.2018.)

https://www.slideshare.net/ashratnam/theory-of-mind-seminar-presentation (Pristupljeno: 17.08.2018.)

9. SAŽETAK

Autizam predstavlja kompleksnu skupinu neurorazvojnih poremećaja koji utječu na normalan razvoj mozga u područjima društvene interakcije, komunikacijskih vještina i kognitivnih funkcija. Nedostatak jedinstvenog biološkog uzroka, simptoma i kliničkih značajki ovog poremećaja posljedično otežava postavljanje dijagnoze i terapije. Od prvotnih psiholoških teorija i teze da je autizam uzrokovan nenormalnim psihičkim interakcijama unutar obitelji, istraživanja su proteklih desetljeća utvrdila snažan genski utjecaj uz interakciju okolišnih faktora na razvoj istog. Počevši s kratkim uvidom u neuropatološke promjene i regije mozga zahvaćene autizmom, pregledom neurotransmitera i njihove uključenosti u etiologiju autizma, zatim razvojnom psihopatologijom autizma, uz poseban naglasak na endofenotipove te konačno genetskim i epigenetskim pristupom, ovaj seminarski rad predstavlja pregled ključnih otkrića i dosadašnjih spoznaja o poremećajima iz spektra autizma. Patogeneza neurorazvojnih poremećaja, uključujući i autizam, nedovoljno je razjašnjena te buduća istraživanja uz dostupnije moderne tehnike trebaju uključiti multidisciplinarni pristup koji će omogućiti daljnji napredak u otkrivanju biološke osnove ovog poremećaja.

10. SUMMARY

Autism refers to a complex group of neurodevelopmental disorders that influence the normal development of brain in terms of social interaction, communication skills and cognitive functions. The lack of a single biological pattern of symptoms and clinical aspects of the disorder, hinder the ability to make a diagnosis and prescribe the appropriate therapy. Beginning with the initial psychological theories and theses that autism is caused by abnormal psychological interactions within the family, the research during the past decades affirmed the role of a strong genetic influence and interaction with environmental factors in developing the disorder. Starting with a short insight into the neuropathological changes and regions of the brain affected by autism, followed by a neurotransmitter overview and their involvement in the etiology of autism as well as an introduction to the developmental psychopathology of autism while putting a particular emphasis on endophenotypes, and lastly, a genetic and epigenetic approach, this bachelor's thesis presents the overview of key discoveries and current understanding of autism spectrum disorders. Pathogenesis of neurodevelopmental disorders including autism is still inconclusive and therefore, further research along with more readily available modern techniques should include the interdisciplinary approach which will enable a further progress towards the discovery of the biological basis of the disorder.