



Daiga Bauze

**AUTISKĀ SPEKTRA  
TRAUCĒJUMU  
ĢENĒTISKIE ASPEKTI**

Promocijas darba kopsavilkums  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – medicīniskā ģenētika

Rīga, 2014



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Daiga Bauze

AUTISKĀ SPEKTRA  
TRAUCĒJUMU  
ĢENĒTISKIE ASPEKTI

Promocijas darba kopsavilkums  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – medicīniskā ģenētika

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts:

VSIA BKUS Medicīniskās ģenētikas un Bērnu psihiatrijas klīnikā un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā

Darba zinātniskie vadītāji:

*Dr. med. Baiba Lāce,*

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Latvija

*Dr. med. profesore Raisa Andrēziņa,*

Rīgas Stradiņa universitātes Psihiatrijas un narkoloģijas katedra, Latvija

Darba zinātniskie konsultanti:

*Dr. med. Zanda Daneberga,*

VSIA BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnika, Latvija

*Dr. Arnis Riževs,*

VSIA BKUS Bērnu psihiatrijas klīnika, Latvija

Oficiālie recenzenti:

*Dr. biol. asociētais profesors Edvīns Miklaševics,*

RSU Onkoloģijas institūts, Latvija

*Dr. biol. Inna Iņāškina,*

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Latvija

*Dr. med. profesors Manfrēds Volfersdorfs (Manfred Wolfersdorf),*

Baireitas psihiatrijas un psihoterapijas klīnika, Vācija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 30. jūnijā plkst.15.00

Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:

[www.rsu.lv](http://www.rsu.lv)



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar ESF projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu, vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

Promocijas padomes sekretārs:

*Dr. med. Arvīds Irmejs*

## SATURS

|  |    |
|--|----|
| 1. IEVADS.....   | 7  |
| 1.1. Darba mērķis .....  | 10 |
| 1.2. Darba uzdevumi .....  | 10 |
| 1.3. Darba hipotēze .....  | 11 |
| 1.4. Zinātniskā novitāte .....                                       | 11 |
| 1.5. Darba praktiskā nozīme.....                                     | 12 |
| 1.6. Darba izstrāde.....   | 12 |
| 1.7. Promocijas darba apjoms un struktūra .....                      | 13 |
| 2. MATERIĀLI UN METODES.....   | 14 |
| 2.1. Pētāmās grupas.....   | 15 |
| 2.1.1. AST pacienti.....   | 15 |
| 2.1.2. AST pacientu anketa.....                                      | 17 |
| 2.1.3. Ģimene ar Aspergera sindromu .....                            | 20 |
| 2.1.4. Kontroles grupa .....   | 22 |
| 2.2. Metodes.....  | 22 |
| 2.2.1. Antropometrisko mērījumu veikšana AST pacientiem.....         | 22 |
| 2.2.2. DNS izdalīšana AST pacientiem un kontroles grupas pārstāvjiem | 23 |
| 2.2.3. AST asociācijas pētījuma SNP izvēle.....                      | 23 |
| 2.2.4. AST asociācijas pētījumam izvēlēto SNP genotipēšana.....      | 24 |
| 2.2.5. Farmakoģenētiskā marķiera izvēle .....                        | 24 |
| 2.2.6. Farmakoģenētiskā marķiera genotipēšana .....                  | 25 |
| 2.2.7. Risperidona terapijas izvērtēšanas kritēriji.....             | 25 |
| 2.2.8. Pilna eksoma sekvenēšana ģimenei ar Aspergera sindromu.....   | 26 |
| 2.2.9. Eksoma sekvenēšanas datu analīze.....                         | 26 |
| 2.2.10. Potenciālo kandidātģeņu atlase.....                          | 27 |
| 2.2.11. Kandidātģeņu sekvenēšana un analīze.....                     | 28 |
| 2.3. Datu statistiskā analīze .....                                  | 28 |
| 3. REZULTĀTI .....   | 31 |
| 3.1. AST pacientu antropometriskais un klīniskais raksturojums ..... | 31 |
| 3.2. Izvēlēto SNP asociācijas analīze .....                          | 35 |
| 3.3. Farmakoģenētiskā marķiera <i>CYP2D6</i> analīze .....           | 36 |
| 3.4. Eksoma sekvenēšanas analīze ģimenei ar Aspergera sindromu ..... | 39 |
| 4. DISKUSIJA .....   | 44 |
| 4.1. AST pacientu antropometriskais un klīniskais raksturojums ..... | 44 |
| 4.2. Izvēlēto SNP asociācijas analīze .....                          | 50 |
| 4.3. Farmakoģenētiskā marķiera <i>CYP2D6</i> analīze .....           | 52 |
| 4.4. Eksoma sekvenēšanas analīze ģimenei ar Apergera sindromu.....   | 56 |
| 5. SECINĀJUMI .....  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| 6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU ..... | 62 |
| 6.1. Zinātniskie raksti par pētījuma tēmu.....      | 62 |
| 6.2. Konferenču tēzes par pētījuma tēmu.....        | 63 |
| 7. PATEICĪBAS.....                                  | 68 |
| 8. LITERATŪRAS SARAKSTS .....                       | 69 |

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

|        |   |
|--------|---|
| ADOS   | Autisma diagnostikas novērošanas skala (angļu val., <i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i> )   |
| ALAT   | Alanīnaminotransferāze  |
| ASAT   | Aspartātaminotransferāze  |
| AST    | Autiskā spektra traucējumi (angļu val., <i>autism spectrum disorders</i> )  |
| CI     | Ticamības intervāls (angļu val., <i>confidence interval</i> )   |
| CNS    | Centrālā nervu sistēma  |
| CNV    | Kopiju skaita varianti (angļu val., <i>copy number variation</i> )  |
| CYP    | Citohromgrupa (angļu val., <i>cytochrome</i> )  |
| DNS    | Dezoksiribonukleīnskābe   |
| DSM-IV | Diagnostiskā un statistiskā psihisko traucējumu rokasgrāmata, 4. izdevums (angļu val., <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>th</sup> Edition</i> ) |
| FISH   | Fluoriscentā in situ hibridizācijas metode (angļu val., <i>Fluorescence in Situ Hybridization</i> )   |
| GWAS   | Visa genoma asociācijas pētījumi (angļu val., <i>genome-wide association study</i> )  |
| IQ     | Intelektu koeficients (angļu val., <i>Intelligence quotient</i> )   |
| LOD    | Izredžu logaritms (angļu val., <i>logarithm of the odds</i> )   |
| MAF    | Retākās alēles biežums (angļu val., <i>minor allele frequency</i> )   |
| OR     | Izredžu attiecība (angļu val., <i>odds ratio</i> )  |
| PCR    | Polimerāzes ķēdes reakcija (angļu val., <i>polymerase chain reaction</i> )  |
| RNS    | Ribonukleīnskābe  |
| SD     | Mainīgā lieluma standartnovirze (angļu val., <i>standard deviation</i> )  |

|           |  |
|-----------|--|
| SNP       | Viena nukleotīda polimorfisms (angļu val., <i>single nucleotide polymorphism</i> ) |
| SSK-10    | Pasaules veselības organizācijas Starptautiskā slimību klasifikācija, 10. izdevums |
| VSIA BKUS | Valsts Akciju Sabiedrība Bērnu Klīniskā Universitātes slimnīca                     |
| $\chi^2$  | Hī kvadrāta tests  |

## 1. IEVADS

Viens no biežākajiem agrīnā bērnu psihiatrijā un neiroloģijā konstatētiem attīstības traucējumiem saistīts ar autisko spektru (AST), kuram raksturīgi sociālās mijiedarbības, komunikācijas traucējumi un stereotipiski uzvedības modeļi (SSK-10, DSM-IV). AST sākas līdz trīs gadu vecumam un savlaicīgi nediagnosticēti tie var izraisīt bērnam smagu invalidizāciju.

DSM-IV (Diagnostiskā un statistiskā psihisko traucējumu rokasgrāmata, 4. izdevums) un SSK-10 (Pasaules Veselības organizācijas Starptautiskā slimību klasifikācija, 10. izdevums) slimību klasifikatoros definēti AST diagnostiskie pamatkritēriji un izdalīti pieci apakštipi: bērniņas autisms, Aspergera sindroms, atipisks autisms, disintegratīvi traucējumi bērniņā, Retta sindroms (DSM-IV, SSK-10). Diagnozes precizēšanai, lai objektīvi izvērtētu pacienta veselības stāvokli, papildus tiek izmantotas standartizētās uzvedības un personības skalas diagnostiskās skalas (*Lord et al., 2002*).

Pēdējo desmit gadu laikā, uzlabojoties diagnostikām tehnoloģijām, vērojama izteikta AST prevalences palielināšanās. Tās rādītāji pasaulē ir no 35 līdz 60 uz 10000 bērniem (*Tantam and Girgis, 2008; Fombonne, 2008; Elsabbagh et al., 2012*). Nav atklātas statistiski ticamas atšķirības starp dažādām etniskām, kultūras un sociālekonomiskām populācijām (*Elsabbagh et al., 2012*). Agrīnajos pētījumos uzskatīja, ka zēni, salīdzinot ar meitenēm, slimo četras reizes biežāk (1:4), bet pēc pēdējo epidemioloģisko pētījumu datiem konstatēts, ka AST meitenēm diagnosticē jau biežāk (1:3) un tā norise izpaužas smagākā formā nekā zēniem (*Myers and Johnson, 2007; Fombonne, 2008; Fombonne, 2009*).

AST raksturīgs augsts pārmantošanas risks. Pēc neseno prospektīvo longitudinālo pētījumu datiem atklāts, ka atkārtotais risks ir 18,7%, ja ģimenē



jau ir bērns ar AST (*Chakrabarti and Fombonne, 2001; Icasiano, 2004; Lauristen et al. 2005; Ozonoff, 2011*).

AST etioloģijā viena no pirmajām teorijām uzskatīja, ka ģimenes un psihosociālie faktori var būt cēlonis traucējumu attīstībai. Šī teorija apstrīdēta, jo AST ir komplekss traucējums, kura etioloģijā vienlaicīgi var būt iesaistīti ārējās vides un ģenētiskie faktori (*Bettelheim, 1967; Rutter and Schopler, 1987; Courchesne et al., 2003; Gilberg, 2006; Gardener et al., 2011*).

AST ģenētiskā izpētē veikti nelīdzsvarotās saistības, kandidatģēnu, asociāciju pētījumi un eksperimentālie pētījumi ar dzīvnieku modeļiem, kā arī visa genoma asociāciju pētījumi (GWAS), visa genoma CNV (kopiju skaita varianti, angļu val., *copy number variation*) pētījumi (*Freitag et al., 2010*). AST 10–15% gadījumos var būt viena no galvenajām agrīnajām monogēno slimību pazīmēm (*Folstein and Rosen-Sheidley, 2001*). Pieņemts visus AST iedalīt arī pēc etioloģiskajiem faktoriem. Izšķir sindromālos AST, kas populācijā sastopami 15% gadījumā no visiem AST un 85% gadījumos nesindromālie jeb idiopātiskie AST, kuru cēlonis nav zināms (*Gillberg and Coleman 1996; Lintas and Persico, 2009*). Nākošās paaudzes sekvenēšanas tehnoloģijas nodrošina plašāku cilvēka genoma analīzi. Eksoma sekvenēšana ir ātra un ekonomiska metode, lai atklātu retas *de novo* mutācijas kompleksu slimību gadījumā. Uzskata, ka AST ir sporādisks traucējums un biežākais tā cēlonis ir *de novo* mutācijas (*O’Roak et al., 2011*).

Pastāv uzskats, ka AST pacientiem ir raksturīgs fenotips, kas atšķir tos no apkārtējiem indivīdiem. Viens no pētniecības mērķiem ir noskaidrot, vai pastāv ne tikai uzvedības, sociālās komunikācijas, valodas un intelekta atšķirības starp AST un veseliem indivīdiem, bet arī antropometriskās atšķirības (*Abrahams and Geschwind, 2008; Miles et al., 2008; Ozgen et al 2010*).

AST gadījumā, pacientiem iespējamas blakus slimības (*Gillberg, 2006*). Zināms, ka 75–80% AST pacientiem ir dažādas pakāpes garīgā

atpalcība un 11–39% iespējamās epilepsijas lēkmes (*Gillberg, 2006; Tuchman, 2006*). 42% bērniem ar garīgu atpalcību ir epilepsijas lēkmes, turpretim AST bērniem bez garīgas atpalcības, epilepsijas lēkmes sastopamas 6–8% (*Tuchman et al., 1991*). Valodas attīstības traucējumi AST pacientiem var būt saistīti gan ar garīgu atpalcību, gan kā atsevišķs simptoms nesaistīts ar IQ attīstības pakāpi. Bērniem ar specifiskiem valodas attīstības traucējumiem, AST pazīmes var izpausties vieglā vai mērenā formā, vai pat var būt vienīgais AST vadošais simptoms (*Gillberg, 2006*).

AST ir komplekss traucējums, kuram bieži mēdz būt nopietnas blakus slimības, arī terapijas izvēle ir komplekša. Tās pamatā ir apmācība ar īpašām pedagoģiskām metodēm, lai integrētu bērnu sabiedrībā. Ārstēšanas procesā iesaistīta multidisciplināra komanda, kurā uzsvars pamatā tiek likts uz valodas spēju, komunikāciju un sociālo iemaņu attīstīšanu. Smagos slimības gadījumos pielieto medikamentozu terapiju (*Correia et al., 2010*). 31% ar AST medikamentozā terapijā lieto antipsihotiskus medikamentus, antidepresantus un garastāvokļa stabilizatorus (*Mayers, 2007; Mandell et al., 2008; Taylor et al., 2009; Correia et al., 2010*). Risperidons ir vienīgais otrās paaudzes antipsihotiskais līdzeklis, kura lietošana ir apstiprināta pediatrijas praksē (*Jesner et al., 2008; Mandell et al., 2008; Stahl, 2008; ZVA, 2011*).

Medikamentozās terapijas efektivitātes un blakņu riska mazināšanai nākotnē būtu nepieciešama individualizētā terapija, izmantojot farmakoģenētikas iespējas (*Woodcock and Lesko, 2009; Costa e Silva, 2013*). Pirmās un otrās paaudzes antipsihotisko medikamentu metabolizāciju nosaka vairāki P450 marķieri, viens no tiem ir *CYP2D6*, kurš nodrošina antipsihotisko medikamentu metabolizāciju aknās, šī gēna polimorfisms var būt biežākais blakusefektu cēlonis (*Rodriguez-Antona et al., 2009; Correia et al., 2010*).

Agrīna AST diagnostika ļauj savlaicīgi uzsākt bērna socializēšanu un integrēšanu sabiedrībā, nodrošinot adekvātu nemedikamentozās un medikamentozās terapijas izvēli, tādējādi mazinot bērna invalidizācijas iespēju.

Šis ir aktuāls pētījums, jo līdz šim Latvijā nav veikta AST antropometriskā, ģenētiskā un farmakoģenētiskā izpēte.

## 1.1. Darba mērķis

Atrast nesindromālo autiskā spektra traucējumu attīstības ģenētiskos riska faktoros, izmantojot klīnisko datu, antropometrisko mērījumu un molekulārās ģenētikas datu analīzi, noteikt raksturīgo pacientu fenotipu un izvērtēt medikamentozās terapijas iespējas ar farmakoģenētikas metodi.

## 1.2. Darba uzdevumi

1. Izveidot labi raksturotu autiskā spektra traucējumu pētījuma paraugkopu un iegūto antropometrisko mērījumu, citoģenētisko, bioķīmisko un molekulāro izmeklējumu informāciju iekļaut speciāli šim pētījumam izveidotā anketā.
2. Analizēt fenotipiskos, antropometriskos parametrus autiskā spektra traucējumu pacientiem un salīdzināt mērījumu rezultātus ar standartpopulāciju, lai noskaidrotu traucējumam raksturīgās atšķirīgās pazīmes.
3. Veikt hromosomu 11q22.3, 11p13, 11p15.4-15.3 un 15q13.3-14 lokusus esošo ģenētisko marķieru izpēti autiskā spektra traucējumu pacientiem un kontroles grupai, lai atrastu asociāciju ar autiskā spektra traucējumiem.
4. Noteikt (CYP) P450 marķiera *CYP2D6* alēļu *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* saistību ar otrās paaudzes antipsihotikā līdzekļa risperidona efektivitāti un blaknēm.
5. Identificēt ģimeni ar autiskā spektra traucējumiem, kuras ciltskoka dati liecina par monogēnu slimību, un veikt pilnu eksoma sekvenēšanu, lai atrastu potenciālos autiskā spektra traucējumus izraisošos kandidātgēnus.

### 1.3. Darba hipotēze

1. Autiskā spektra traucējumu pacientiem var būt liels augums, svars, palielināts galvas apkārtmērs un citas fenotipiskās pazīmes, kas raksturīgas šiem traucējumiem kopumā un atšķiras no pārējās populācijas. Izmantojot antropometrisko mērījumu analīzi, var izveidot autiskā spektra traucējumiem raksturīgā fenotipa aprakstu.
2. Pēc autiskā spektra traucējumu kandidātģēnu analīzes datiem, nav viena noteicošā hromosomu lokusa, kas iesaistīts traucējumu etioloģijā. Hromosomu 11p13, 11p15.4-15.3, 11q22.3, 15q13.3-14 lokusu polimorfismi varētu būt asociēti ar autiskā spektra traucējumiem.
3. Genotipējot P450 marķiera *CYP2D6\*4* un *CYP2D6\*41* alēles, var noteikt to saistību ar otrās paaudzes psihotropā medikamenta risperidona efektivitāti un blaknēm, tādējādi ļautu izvērtēt individuāli katram AST pacientam pielietotās medikamentozās terapijas efektivitāti un blakņu risku.
4. Autiskā spektra traucējumi ir sporādiski, kura etioloģijā var būt iesaistītas spontānas *de novo* mutācijas un nav saistītas ar noteiktu pārmantošanas tipu. Izmantojot eksoma sekvenēšanu, ir iespējams analizēt lielāku apjomu, lai noteiktu potenciālos autiskā spektra traucējumu izraisošos patogēnos gēnu variantus.

### 1.4. Zinātniskā novitāte

Promocijas darbā apkopoti dati par AST pacientu izveidoto paraugkopu Latvijā, veikta tās klīniskā un ģenētiskā izvērtēšana. Analizēti fenotipiskie un antropometriskie parametri izveidotajai AST paraugkopai. Šis ir pirmais pētījums Latvijā, kurā veikta nesindromālā AST molekulāri ģenētiskā

izpēte. Atrasta statistiski ticama asociācija ar SNP (viena nukleotīda polimorfisms, angļu val., *single nucleotide polymorphism*) rs112112733, kurš lokalizēts starp 11q22.3 hromosomā esošiem gēniem *DDX10* un *EXPH5*, kuri varētu būt iespējamie AST kandidātgēni. Veikta farmakoģenētisko marķieru *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* biežuma analīze AST pacientu grupā. Analizētas medikamentozā terapijā biežāk lietotā otrās paaudzes antipsihotiskā līdzekļa risperidona biežākās blaknes un efektivitāte. Veikta pilna eksoma sekvenēšana ģimenei ar Asperģera sindromu, kura atbilst autosomāli dominatājam pārmantošanas tipam, atrasts iespējams potenciālais AST kandidātgēna variants *KCNH6*.

## 1.5. Darba praktiskā nozīme

Promocijas darba ietvaros, balstoties uz literatūras apskatu, izstrādātas rekomendācijas agrīnai AST diagnostikai bērniem līdz trīs gadu vecumam pediatrijas, bērnu psihiatrijas un bērnu neiroloģijas praksē. Izstrādāts algoritms AST izmeklēšanai gan bērnu psihiatrijas, gan medicīniskās ģenētikas konsultēšanā.

## 1.6. Darba izstrāde

Pētījumam pacientu atlase veikta Valsts Akciju Sabiedrības Bērnu klīniskā universitātes slimnīcas (VSIA BKUS) Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikās. DNS izdalīšana no pacientu bioloģiskā materiāla un molekulāri ģenētiskā izpēte veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Atļauju veikt pētījumu izsniegusi Rīgas Stradiņa Universitātes Medicīnas ētikas komiteja 14.01.2010.

Promocijas darbs izstrādāts ar ESF līdzfinansēta projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienoš. Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009, atbalstu.

## **1.7. Promocijas darba apjoms un struktūra**

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā uz 150 lappusēm pēc klasiskas darba struktūras. Darbs strukturēts desmit nodaļās: Ievads; Literatūras apskats; Materiāli un metodes; Rezultāti; Diskusija; Secinājumi; Publikācijas; Pateicības; Literatūras saraksts un Pielikumi. Promocijas darbs satur 20 tabulas, 10 attēlus un 4 pielikumus. Literatūras sarakstā ir 298 autoru un autoru kolektīvu darbi.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījums veikts laika posmā no 2006. gada līdz 2013. gadam, četrās secīgās fāzēs.

**Pirmā pētījuma fāzē**, laika posmā no 2006.–2013. gadam veikta AST pacientu atlase VSIA BKUS BS Gaiļezērā Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikās. Izmantojot AST diagnostiskos kritērijus, standartizētās uzvedības un personības skalas, ADOS testu veikta AST pacientu atlase. Šajā pētījuma fāzē salīdzināta AST antropometrisko mērījumu procentīļu procentuālā attiecība ar standartpopulāciju, salīdzinātas IQ pakāpes un epilepsijas lēkmju biežums starp AST pacientu dzimuma grupām, lai atrastu iespējamās raksturīgās AST fenotipiskās pazīmes.

**Otrā pētījuma fāzē**, laika posmā no 2010.–2011. gadam Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā no AST pacientu bioloģiskā materiāla izdalīts DNS. Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā veikts gadījuma kontroles asociācijas pētījums, kurā analizēti četri reto alēļu varianti (rs11212733, kurš lokalizēts 11q22.3 rs1394119, kurš lokalizēts 11p15.4-15.3 lokusā, rs2421826, kurš lokalizēts 11p13 hromosomas lokusā, kā arī rs1454985, kurš lokalizēts 15q13.3-14 lokusā) AST pacientiem un kontroles grupai, lai noteiktu šo SNP iespējamo asociāciju ar AST.

**Trešā pētījuma fāzē**, laika posmā no 2011.–2012. gadam, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā veikta otrās paaudzes antipsihotiskā medikamenta risperidona analīze AST pacientiem. Tika izvēlēts citohromgrupas (CYP) P450 marķieris *CYP2D6*. Pētījumā analizētas *CYP2D6* gēna divas alēles: *CYP2D6\*4* (rs3892097), *CYP2D6\*41* (rs28371725). Veikts gadījuma kontroles asociācijas pētījums alēļu biežuma noteikšanai AST pacientu un kontroles grupās. Noteikta risperidona metabolizācijas pakāpe un

analizētas biežākās blaknes un to saistība ar *CYP2D6* haplotipu AST pacientiem, kuri medikamentozā terapijā lietoja risperidonu.

**Ceturtajā pētījuma fāzē**, laika posmā no 2011.–2013. gadam, no visiem AST atrasta ģimene, kurā AST ciltskokā pārmantojas atbilstoši monogēnam iedzimšanas tipam un, lai noskaidrotu gēnu, kurš izraisa slimību, veikta eksoma sekvenēšana 2011. gadā Pekinas Ģenoma institūtā, Ķīnā veikta pilna eksoma sekvenēšana trīs šīs ģimenes locekļiem. No 2012.–2013. gadam, balstoties uz iegūtajiem eksoma sekvenēšanas rezultātiem, veikta atlasīto astoņu gēnu variantu sekvenēšana pēc Sangera metodes visiem ģimenes locekļiem.

## **2.1. Pētāmās grupas**

### **2.1.1. AST pacienti**

Kopš 2006. gada, pētījumam tika atlasīti 196 pacienti, kuri konsultēti VSIA BKUS BS Gaiļezērā Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikās. Primāri pacientu atlase veikta, vadoties pēc SSK–10 diagnostiskajiem kritērijiem un standartizētām uzvedības un personības skalām: THE CHAT (*The CHecklist for Autism in Toddlers*, pirmo 18 mēnešu pārbaude), (*Baron-Cohen et al.*, 1992); AQ (*Autism Spectrum Quotient* – autiskā spektra traucējumu aptauja bērniem vecumā no četri līdz 11 gadu vecumam), (*Baron-Cohen et al.*, 2006); Kembridžas Universitātes uzvedības un personības jautājumi bērniem līdz četri gadu vecumam; Kembridžas Universitātes sociālās un komunikatīvās attīstības jautājumi; CAST (*Childhood Asperger Syndrome Test* – bērniības Aspergera sindroma tests), (*Scott et al.*, 2002; *Williams et al.*, 2006). Pozitīva rezultāta gadījumā, katrs pacients ar aizdomām par iespējamu AST, tika sūtīts pie klīniskā psihologa, kurš veica specializētu, standartizētu diagnostiku, izmantojot ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*)



testu, izvēloties katram pacienta vecumam atbilstošu diagnostisko moduli (*Lord et al.*, 2002), lai apstiprinātu AST.

Tā kā valodas attīstības traucējumi un dažādas pakāpes garīgās atpalicības līmenis ir visbiežākās AST blakus slimības, katram pacientam logopēds izvērtēja ekspresīvās un receptīvās valodas prasmes, kā arī klīniskais psihologs pārbaudīja intelektu, nosakot IQ pakāpi, izmantojot Vudkoka-Džonsona Intelekta skalas bērniem (*Woodcock*, 2003), Minhenes funkcionālās attīstības diagnostikas testu (*Hellbrugge et al.*, 1994), Vekslera testa (*Wechsler*, 1974), modifikācijas atbilstoši katrai bērna vecuma grupai. Tādējādi atlasīti 173 pacienti, kuriem tika apstiprināta diagnoze AST.

No pētījuma grupas izslēgti pacienti ar citiem psihiskiem traucējumiem, kuri pēc padziļinātās izmeklēšanas neatbilda AST diagnostiskajiem kritērijiem.

Lai pētāmā grupa būtu homogēnāka un izslēgtu sindromālo autismu, katru pētījuma apakšgrupas pacientu izvērtēja ārsts ģenētiķis. Nepieciešamības gadījumā, pēc indikācijām, AST pacienti tika nosūtīti uz ģenētiski bioķīmisko, citoģenētisko, molekulāro izmeklēšanu, lai izslēgtu biežākos monogēnos sindromus, iedzimtas vielmaiņas slimības un hromosomālos sindromus.

Atbilstošu indikāciju gadījumā, VSIA BKUS BS Gaiļezērā Medicīniskās ģenētikas klīnikā veikti sekojoši standarta izmeklējumi:

- 1) Citoģenētikas laboratorijā: standarta kariotipa analīze, 15q11.13 delēcija vai duplikācija, 22q11.2 delēcija, hromosomu subteloīnu rajonu analīze ar *FISH* (fluorescentā in situ hibridizācijas metode);
- 2) DNS laboratorijā: *FMRI* gēna analīze (trauslās X hromosomas sindroms), *MeCP2* gēna analīze (Retta sindroms), DNS metilēšanas analīze 15q11-13 lokusam (Eindželmaņa un Prādera-Willija sindroma izslēgšana).

- 3) Ģenētiskās bioķīmijas laboratorijā: organisko skābju spektrs, mukopolisaharīdu kvantitatīvā un kvalitatīvā analīze, oligosaharīdi urīnā, aminoskābju spektrs asinīs un urīnā.

Katra AST pacienta vecāki vai aizbildņi iepazīnās un parakstīja RSU Ētikas komisija akceptētu piekrišanas formu dalībai pētījumā un bioloģiskā materiāla (asins parauga) ģenētiskai izpētei.

### **2.1.2. AST pacientu anketa**

Iegūtie dati par AST pacientu reģistrēti speciāli šim pētījumam izveidotajās anketās, kurās iekļāva maksimāli pilnvērtīgu informāciju par pacienta agrīno attīstību, slimības sākumu un attīstību, kā arī ģimeni.

Anketā iekļāva sekojošu informāciju par katru pacientu:

- 1) Ģimenes anamnēze un ciltskoks līdz pat trešajai paaudzei;
- 2) Grūtniecības anamnēze;
- 3) Jaundzimušā perioda norise, bērna psihomotorā attīstība līdz viena gada vecumam;
- 4) Bērna psihomotorā attīstība līdz 3–4 gadu vecumam;
- 5) Veica antropometriskos mērījumus;
- 6) Izvērtēja epilepsijas lēkmes;
- 7) Visiem pacientiem veica:
  - EEG (elektroencefalogrāfiju), lai izslēgtu epileptisku aktivitāti;
  - dzirdes pārbaudi, lai izslēgtu vājdzirdību.
- 8) Pacientiem, kuriem anamnēzē bijušas neskaidras etioloģijas epilepsijas lēkmes, kā arī attīstības regress, valodas zudums, veica MRI (magnētiskās rezonanses) un/vai DT (datortomogrāfijas) izmeklējumus, lai izslēgtu organisku CNS bojājumu.
- 9) Katram pacientam veica sekojošas analīzes:

- VSIA BKUS BS Gaiļezērā Klīniskajā laboratorijā: pilna asins aina (eritrocītu, leukocītu un trombocītu skaits, hemoglobīna līmenis, eritrocītu grimšanas ātrums pēc Vestegrēna metodes).
  - VSIA BKUS BS Gaiļezērā Klīniskajā laboratorijā asins bioķīmiskie rādītāji: aspartātaminotransferāzes (ASAT), alanīnaminotransferāze (ALAT), laktāts, urīnskābe, glikozes līmenis asinīs, homocisteīns. Nepieciešamības gadījumā – folskābes, B<sub>12</sub> vitamīna līmenis asins serumā.
- 10) Pacienti, kuriem izvērtējot objektīvo atradni, bija indikācijas ģenētiskai izmeklēšanai, tika nosūtīti tālākai izmeklēšanai uz VSIA BKUS BS Gaiļezērā Medicīnas ģenētikas klīniku, kā arī, vadoties pēc klīniskās ainas, tika veikti ģenētiskie izmeklējumi.
- 11) Pacienti ar aizdomām par iespējamu ģenētisku patoloģiju papildus veica:
- EhoKG (ehokardiogrāfiju), lai izslēgtu iespējamu iedzimtu sirdskaiti;
  - USG (ultrasonogrāfiju) vēdera dobumam, lai izslēgtu iedzimtu patoloģiju aknās, nierēs, urīnizvadceļos;
  - okulista konsultācija, lai izslēgtu redzes traucējumus.
- 12) Pacientu bioloģiskais materiāls (asins paraugs), ar vecāku vai aizbildņu rakstisku piekrišanu, ka bioloģiskais materiāls tiek izmantots tālākos pētnieciskos nolūkos, nogādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, kurā veica izdalītā DNS parauga uzglabāšana un analīzi.
- 13) Pacienta fotoattēls (tikai ar iepriekšēju vecāku vai aizbildņu piekrišanu, datu kolekcijas veidošanai).

Tā kā pētījums bija retrospektīvs un prospektīvs un tika veikts četros secīgos etapos, laika posmā no 2006. līdz 2013.gadam, līdz ar to, pacientu skaits katrai pētījuma fāzei bija atšķirīgs (sk.2.1. attēlu).

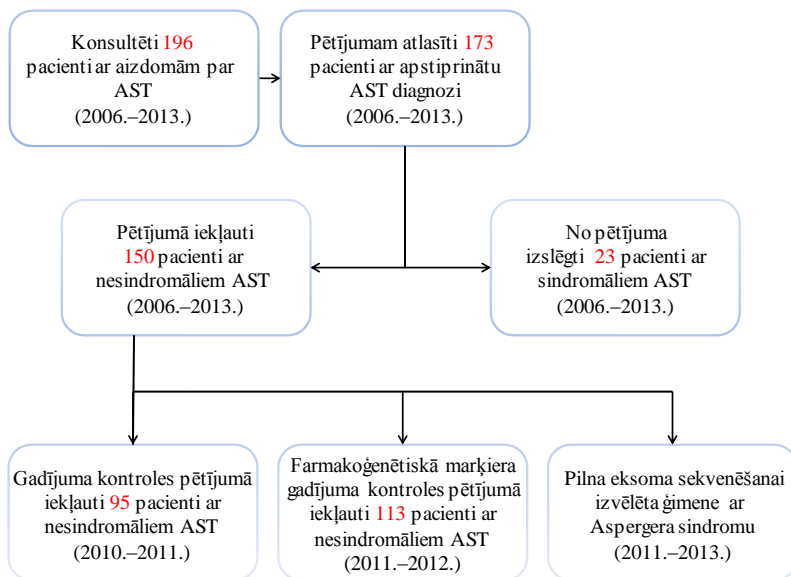
**Pirmā pētījuma fāzē**, izmantojot BKUS BS Gaīlezerā Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikas medicīnisko ierakstu un konsultāciju datus, laika posmā no 2006. līdz 2013.gadam, tika izvērtēti 196 pacienti ar aizdomām par AST. No tiem atlasīti 173 pacienti ar AST. Lai pētāmā grupa būtu homogēna, no tās tika izslēgti 23 pacienti ar apstiprinātu monogēnu vai hromosomālu patoloģiju, kas veidoja sindromālā AST grupu. Analizēti 150 nesindromālo AST pacientu fenotipiskie un antropometriskie mērījumu dati.

**Otrā pētījuma fāzē**, pētāmo grupu veidoja no jau esošiem 150 nesindromālā AST grupas atlasītiem 95 pacientiem, kuriem laika posmā no 2010. līdz 2011.gadam, ar rakstisku vecāku vai aizbildņu piekrišanu, tika paņemts bioloģiskais materiāls tālākai ģenētiskai izpētei.

**Trešā pētījuma fāzē**, no jau esošiem 150 nesindromālā AST grupas pacientiem, laika posmā no 2011. līdz 2012. gadam, 113 uz to brīdi iekļautiem AST pacientiem veikta farmakoģenētiskā marķiera analīze.

30 pacienti ar AST no šīs grupas, vecumā no četri līdz 15 gadu vecumam (bērna vidējais vecums 7,16 gadi, SD 2,39), medikamentozā terapijā lietoja otrās paaudzes antipsihotisko līdzekli risperidonu. Analizēta šī medikamenta efektivitāte un blaknes.

**Ceturta pētījuma fāzē**, laika posmā no 2011. līdz 2013. gadam, no jau esošās pētāmās AST grupas izvēlējās ģimeni ar Asperģera sindromu, kura atbilda autosomāli dominantam pārmantošanas tipam. Veikta pilna eksoma sekvenēšana trīs šīs ģimenes locekļiem un sekvenēšana pēc Sangera metodes visiem pieciem ģimenes locekļiem.

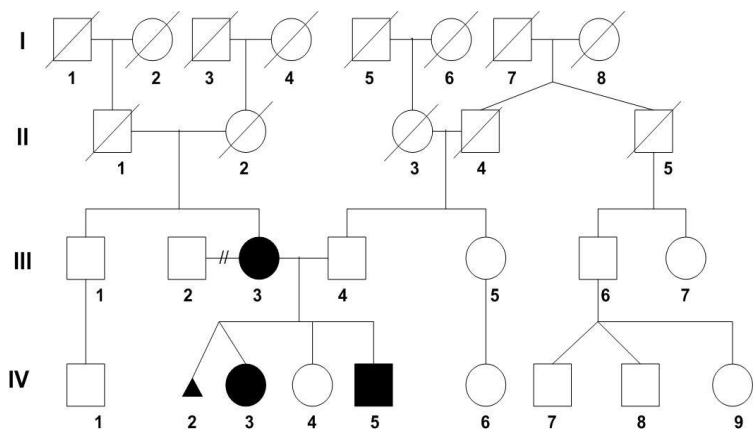


2.1. att. **Pacientu atlasē algoritms**

### 2.1.3. Ģimene ar Asperģera sindromu

Lai identificētu iespējamus AST izraisošos kandidātģenus, no pētījuma grupas pēc autosomāli dominantā pārmantošanas tipa, izvēlējās ģimēni ar Asperģera sindromu, kuras trīs ģimenes locekļiem veica pilnu eksoma sekvenēšanu.

Izvēlēta ģimene pēc sekojošiem kritērijiem: bērnam un vienam no vecākiem bija jābūt AST, lai atbilstu autosomāli dominantajam iedzimšanas tipam. Pētījumā tika iekļauta ģimene, kurā divās paaudzēs konstatēts Asperģera sindroms (sk. 2.2. att.).



2.2. att. Ģimenes ar Aspergera sindromu ciltskoks

**IV-3.** Paciente bija 11 gadu veca meitene ar uzvedības traucējumiem. Sociālās adaptācijas un komunikācijas traucējumi, kas izpaudās kā grūtības kontaktēties ar vienaudžiem. Emocionāliem traucējumiem, kā arī reizēm agresivitāti pret citiem ģimenes locekļiem. Meitenei bija īpatnējas, stereotipas roku kustības, specifiskas intereses par dinosauriem, valodas attīstības traucējumi, ierobežota sejas mīmika, neveiklas kustības, komunikācijas traucējumi ar vienaudžiem un ģimenes locekļiem, stereotipi rituāli. Diagnosticēts Aspergera sindroms. IQ līmenis bija normāls ( $> 70$ ).

**IV-4.** Astoņus gadus veca meitene. Dzimusi no otrās grūtniecības, otrām dzemdībām, bez patoloģiskas norises. Septiņu gadu vecumā meitenei sākās uzvedības traucējumi. Meitene kļuvas agresīva pret jaunāko brāli un vecāko māsu. Pievienojās obsesīvi–kompulsīvi traucējumi, pazuda interese par mācībām, pievienojās miega traucējumi, grūtības adaptēties skolā, kā arī stereotipas roku kustības. Meitenei veikta izmeklēšana, bet AST nediagnosticēja. IQ līmenis bija normāls ( $> 70$ ).

**IV-5.** Septiņus gadus vecs zēns. Piecu gadu vecumā zēnam sākās afektīvi garastāvokļa traucējumi, depresīvi traucējumi, stereotipas roku kustības, pastiprināta sensorā uztvere. Zēnam sākās komunikācijas un socializācijas traucējumi gan skolā, gan mājās, viņš kļuva vienaldzīgs pret vienaudžiem. Diagnosticēts Aspergera sindroms. IQ līmenis bija normāls (> 70).

**III-3** (māte). 45 gadus veca sieviete, kurai kopš agrīna bērna vecuma, skolas laikā bijušas komunikācijas problēmas, socializācijas traucējumi un specifiskas intereses par pūķiem un dinozauriem. Pusaudžu vecumā bijuši depresīvi traucējumi. Pēc klīniskā psihologa diagnostikas, mātei apstiprināts Aspergera sindroms.

**III-4** (tēvs). 45 gadus vecs vīrietis. Garīgās veselības traucējumi nebija konstatēti.

## **2.1.4. Kontroles grupa**

Atlasīta kontroles grupa, kurā pēc nejaušas atlases principa iekļāva 190 potenciāli veselas, savstarpēji neradniecīgas personas no Valsts iedzīvotāju genoma datubāzes Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā. Šo personu anamnēzē nebija datu par AST vai citiem psihiskiem traucējumiem ģimenē un pēc dzimuma attiecības kontroles grupa tika saskaņota ar pētāmo grupu.

## **2.2. Metodes**

### **2.2.1. Antropometrisko mērījumu veikšana AST pacientiem**

Antropometriskie mērījumi veikti visiem AST pacientiem. Kā galvenie mērījumi tika izvēlēti auguma garums, ķermeņa svars un galvas apkārtmērs. Katra AST pacienta veikto mērījumu izvērtēšanai izmantoja

Latvijas bērnu fiziskās attīstības novērtēšanas normatīvus (*Krūmiņa et al.*, 2007) un starptautiski standartizētās procentīlu līknes (*Jones*, 2006). Salīdzināti AST antropometrisko mērījumu procentīlu procentuālais rādītājs ar standartpopulācijas procentīlu procentuālo rādītāju.

Kā biežākās AST blakus slimības analizētas garīgās atpalcības, anamnēzē konstatētās epilepsijas lēkmes un valodas traucējumi. Savstarpēji salīdzināts to biežums starp AST pacientu zēnu un meiteņu grupām.

### **2.2.2. DNS izdalīšana AST pacientiem un kontroles grupas pārstāvjiem**

AST pacientiem un kontroles grupas pārstāvjiem DNS izdalīts no asins parauga Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un studiju centrā, izmantojot standarta hloroforma – fenola metodi (*Sambrook et al.*, 1989), pēc Latvijas Valsts Iedzīvotāju genoma datubāzes standartiem.

### **2.2.3. AST asociācijas pētījuma SNP izvēle**

SNP izvēlēti vadoties pēc publikācijām par plašiem genoma un AST asociācijas pētījumu rezultātiem, kuros analizēti AST potenciāli nozīmīgi lokusi. Par SNP atlasē kritērijiem tika izvēlēti izvērtēto publikāciju pētāmo grupu lielums, kuras veidoja pārstāvji no dažādām etniskām populācijām, kā arī nesindromālo AST subfenotipi (valodas traucējumi, garīgās atpalcības) un iepriekš ar AST asociēto SNP nozīmīgākās LOD vērtības (*Liu et al* 2008; *Cho et al.*, 2011). Tika izvēlēti divi savstarpēji nesaistīti plaši genoma saistības pētījumi (*Liu et al.*, 2008; *Cho et al.*, 2011). Pirmajā pētījumā 1397 ģimenēm ar AST no Ziemeļamerikas un Eiropas analizēti 5371 SNP (*Liu et al.*, 2008). Savukārt, otrajā pētījumā 42 Korejiešu ģimenēm ar AST analizēti 3022 SNP (*Cho et al.*, 2011). Vadoties pēc šo pētījumu rezultātiem, atlasīti četri potenciāli nozīmīgi SNP, kuri iesaistīti AST attīstībā. Izvēlētajiem SNP, bija noteikta



augstākā asociācija ar AST un izvērtējot p vērtības, tās bija mazākas par 0,0001. Genotipēšanai tika izvēlēti sekojoši marķieri: rs11212733, kurš lokalizēts 11q22.3 hromosomas lokusā ( $p = 9,76 \times 10^{-6}$ ), (Cho et al., 2011), rs1394119 ( $p = 0,00004$ ), kurš lokalizēts 11p15.4-15.3 lokusā, rs2421826 ( $p = 0,0003$ ), kurš lokalizēts 11p13 hromosomā, kā arī rs1454985 ( $p = 0,00001$ ), kurš lokalizēts 15q13.3-14 lokusā (Cho et al., 2011; Liu et al., 2008).

#### **2.2.4. AST asociācijas pētījumam izvēlēto SNP genotipēšana**

Gadījuma kontroles asociācijas pētījumam izvēlēto SNP genotipēšana veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, izmantojot *TaqMan* reaktīvu principus. Genotipēšana ar *RT-PCR/HRM* (reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija ar augstas izšķirtspējas kušanas analīzi) veikta ar *ViiATM7 Real-Time PCR* sistēmu (*Applied Biosystems*, Karlsbāde, ASV) un *GeneAmp® PCR System 9700* sistēmu (*Applied Biosystems*) (*ABI 7500 Real-Time PCR system, Applied Biosystem*, Karlsbāde, ASV), vadoties pēc ražotāja ieteikumiem.

Iegūtos rezultātus manuāli analizēja ar *7500 Real Time PCR System Software*.

#### **2.2.5. Farmakoģenētiskā marķiera izvēle**

AST pacientiem farmakoterapijā kā viens no biežāk izvēlētiem medikamentiem ir otrās paaudzes antipsihotiskais līdzeklis risperidons, kurš pēc starptautisko pediatrijas asociāciju, Latvijas Zāļu valsts aģentūras (ZVA) ir atļauts lietot medikamentozā terapijā bērniem no piecu līdz 17 gadu vecumam (Mandell et al., 2008; Stahl, 2008; Taylor et al., 2009; ZVA, 2011).

Risperidona metabolizācija noris aknās. Metabolizācijas procesā būtiska nozīme ir citohromu grupas (CYP) P450 marķierim *CYP2D6*, kurš aknās intensīvi hidrolizē risperidonu par 9-hidroksi-risperidonu. *CYP2D6*

primāri 50% nodrošina medikamenta metabolizāciju (*Ingelman-Sundberg et al.*, 2007; *Rodriguez-Antona et al.*, 2009). Risperidona abiem metabolītiem ir nozīme gan terapijas efektivitātē, gan arī blakņu attīstībā. *CYP2D6* gēns ir ļoti polimorfs, balstoties uz publikācijām, datubāzēm un komerciāli piedāvātiem testiem, pētījumam izvēlētas šī gēna divas alēles: *CYP2D6\*4* (rs3892097), *CYP2D6\*41* (rs28371725) (*Ingelman-Sundberg et al.*, 2007; *Rodriguez-Antona et al.*, 2009; *Anderson*, 2010; *Correia et al.*, 2010; *ZVA*, 2011; *cgcgeneitics*, 2011).

### **2.2.6. Farmakoģenētiskā marķiera genotipēšana**

*CYP2D6\*4* (rs3892097) un *CYP2D6\*41* (rs28371725) genotipēšana veikta Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un studiju centrā, izmantojot *TaqMan* reaktīvus. Genotipēšanai izmantota reālā laika PCR veikta ar *ViiA<sup>TM</sup>7 Real-Time PCR* sistēmu (*Applied Biosystem*, Karlsbāde, ASV) un *GeneAmp® PCR System 9700* sistēmu (*Applied Biosystems*) (*ABI 7500 Real-Time PCR system*, *Applied Biosystem*, Karlsbāde, ASV), vadoties pēc ražotāja ieteikumiem.

Iegūtos rezultātus analizēja ar *7500 Real Time PCR System Software* versiju.

### **2.2.7. Risperidona terapijas izvērtēšanas kritēriji**

Risperidona terapijas efektivitātes izvērtēšanas galvenais kritērijs bija AST uzvedības simptomu mazināšanās, tādu kā: pašdestruktīva uzvedība, agresija, destruktīva uzvedība pret citiem, miega traucējumi, stereotipiskas kustības un rituāli. Izvērtētas izmaiņas valodas, komunikācijas un socializēšanās prasmēs. Efektivitātē novērtēja vai medikamenta terapijas efekts ir labvēlīgs, neefektīvs vai pretējs, blakņu izraisošs. Risperidona terapijas efektivitāti izvērtēja sākot no viena mēneša līdz diviem gadiem, kopš terapijas uzsākšanas brīža.

Risperidona blaknes klasificēja, izmantojot Zāļu valsts aģentūras reģistra un medikamenta ražotāju rekomendācijas. Visbiežākās ( $\geq 1/10$ ), biežākās ( $\geq 1/100$  līdz  $1/10$ ), retākās ( $\geq 1/1000$  līdz  $< 1/100$ ), retas ( $\geq 1/10000$  līdz  $< 1/1000$ ), ļoti retas ( $< 1/10000$ ) (ZVA, 2011). Tika izvērtētas visbiežāk sastopamās risperidona blaknes: paaugstināts prolaktīna līmenis, virssvars, pastiprināta apetīte, tahikardija, sedācija, ekstrapiramidālie simptomi.

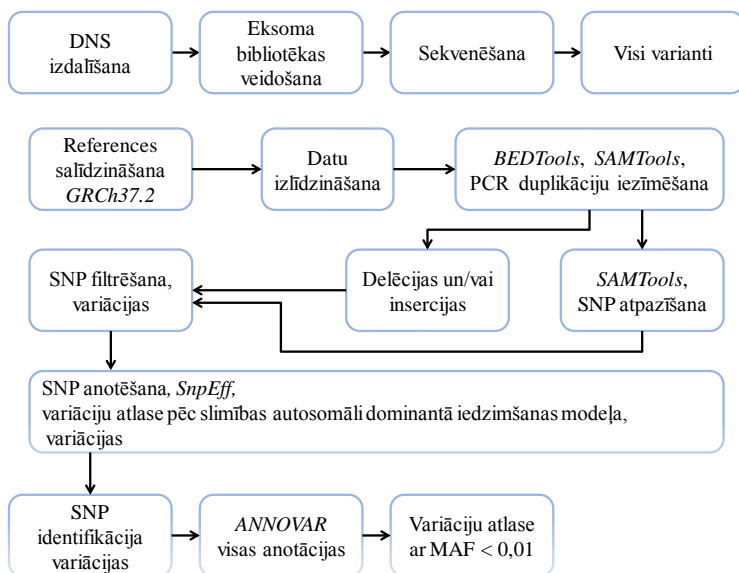
Kā risperidona panesamības kritēriji tika izvērtēti klīniskās atradnes parametri: prolaktīna, aspartātaminotransferāzes (ASAT) un alanīnamino - transferāzes (ALAT) līmenis asinīs, elektrokardiogrāfijas (EKG) rādītāji, neiroloģiskie simptomi, tajā skaitā arī ekstrapiramidālie traucējumi.

### **2.2.8. Pilna eksoma sekvenēšana ģimenei ar Aspergera sindromu**

Ģimenei, kurā diagnosticēts Aspergera sindroms divās paaudzēs, veikta pilna eksoma sekvenēšana slimajam bērnam (IV-3) un abiem vecākiem (III-3, III-4) Pekinas Genoma institūtā, Ķīnā (*Beijing Genomics institute*), izmantojot *Illumina HiSeq 2000* sistēmu, „sapārto-galu” („*paired-end*”) sekvenēšanas metodi.

### **2.2.9. Eksoma sekvenēšanas datu analīze**

Eksoma sekvenēšanas rezultātu analīze veikta sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījuma centra speciālistiem (sk. 2.3. att.). Tālākai analīzei izvēlējās SNP, kuri atbilda alternatīvās alēles dominantā pārmantošanas tipa modelim. Atlasīja SNP, kuru frekvence 1000 genomu datubāzē bija  $\leq 0,01$  un kuri nebija sastopami *dbSNP132* datu bāzē (*1000genome*, 2013).



2.3. att. eksoma sekvenēšanas datu analīzes algoritms

## 2.2.10. Potenciālo kandidātģēnu atlase

Izveidotais SNP saraksts pēc to lokalizācijas tika salīdzināts ar jau eksistējošām AST datu bāzēm. No šīm datu bāzēm atlasīti potenciālie AST kandidātģēni.

AST kandidātģēnu atlases kritēriji:

- 1) izvēlēti tikai *homo sapiens* modeļi, lai atrastu iespējamus slimību izraisošos kandidātģēnus cilvēkiem;
- 2) gēna ekspresija notiek CNS, izslēgti tie SNP, kuri neekspresējas CNS;
- 3) tā kā pētījuma mērķis bija atrast iespējamus nesindromālā AST kandidātģēnus, no izveidotā SNP saraksta izslēgti jau aprakstītie un datubāzē iekļautie monogēno slimību SNP (omim, 2013).



blakus slimību saistību ar AST, izmantots Fišera precīzais tests (*Fisher Exact*). Noteikts, ka statistiskās ticamības p vērtības sliekšnis ir mazāks par 0,05. Izredžu attiecība (OR), kas ir viena notikuma varbūtība vienā no grupām attiecībā uz šā paša notikuma varbūtību otrajā grupā, aprēķināta ar 95% ticamības intervālu (CI).

Datu statistiskai apstrādei izmantota *SPSS 19 Windows* programmatūra (SPSS Inc., Chicago, IL, ASV).

Gadījuma kontroles AST un izvēlēto SNP asociācijas pētījuma analīze veikta izmantojot *PLINK 1.06* programmatūru (*Purcell et al., 2007*), salīdzinot AST un kontroles grupu datu statistiskai apstrādei izmantots standarta Hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) tests ar Bonferoni korekciju, jeb multiplās testēšanas korekciju. Visiem analizētajiem marķieriem tika noteikts vai ir novirze no Hārdija-Veinberga līdzsvara. Haplotipa analīze veikta, izmantojot standarta Hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) testu. Alēļu biežuma un 95% ticamības intervāls noteikts izmantojot standarta Hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) testu. Statistiski ticama asociācija tika uzskatīta, ja  $p < 0,05$ . Lineārās regresijas analīzei kā mainīgos rādītājus izmantoja AST pacientu vecumu, dzimumu, IQ līmeni un anamnēzē konstatētās epilepsijas lēkmes.

AST un farmakoģenētiskā marķiera pētījumā izmantota aprakstošās statistikas procentuālā proporcija, analizēts alēļu biežums pacientu un kontroles grupā, izmantots Fišera precīzais tests. Statistiski ticama asociācija tika uzskatīta, ja  $p < 0,05$ . Izvērtēts otrās paaudzes antipsihotiskā līdzekļa risperidona blakņu un terapijas korekcijas biežums pacientu grupā. Veikta haplotipu analīze AST pacientu un kontroles grupā. Izmantota lineārās regresijas analīze, lai noteiktu saistību starp risperidona devu un izvēlētajiem ģenētiskajiem marķieriem. Kā mainīgie rādītāji izvēlēti bērna vecums, dzimums, risperidona deva, IQ līmeni, ASAT, ALAT rādītāji. Statistiskā analīze veikta izmantojot *PLINK 1.06* programmatūru (*Purcell et al., 2007*).

Eksoma sekvenēšanas datu analīzei, izmantotas brīvi pieejamās *GATK* (*gatk*, 2013) un *ANNOVAR* (*annovar*, 2013) programmas.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. AST pacientu antropometriskais un klīniskais raksturojums

Pētījuma pirmā fāze veikta VSIA BKUS BS Gaļezers Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikās. Analizēti AST pacientu antropometrisko mērījumu rādītāji un biežākās AST blakus slimības.

Pēc SSK-10 diagnostiskajiem kritērijiem, ADOS testa rezultātiem atlasīti 173 pacienti ar AST. Lai atdiferencētu sindromālo autismu no nesindromālā, AST pacientiem veikta ģenētiskā izmeklēšana, kā rezultātā atklātas 23 (13,29%) monogēna, hromosomāla un iedzimta vielmaiņas patoloģija, kuru sākotnējā izpausme pacientam bija AST ar attīstības regresu. Iegūtie dati par atklāto ģenētisko patoloģiju skaitu un to procentuālo sadalījumu apkopoti 3.1. tabulā. Šie pacienti tika izslēgti no tālākā pētījuma.

Izslēdzot sindromālā AST pacientus no paraugkopas, tālāko pētījuma grupu veidoja 150 nesindromālā AST pacienti. Aprakstīti un analizēti AST raksturojošie antropometriskie un biežāko blakus slimību vidējie rādītāji.

Pētījumā analizēti dati par 150 AST pacientiem, kuru vidējais vecums bija 8,1 (SD = 3,15) gads. No visiem pētāmā grupā iekļautiem 150 AST pacientiem 121 (80,66%) bija zēni, kuru vidējais vecums bija 7,9 (SD = 2,82) gadi un 29 (19,33%) meitenes, kuru vidējais vecums bija 8,4 (SD = 4,24) gadi. Analizējot pēc AST apakštipiem, vidējie rādītāji pacientu vecumam bērniības autisma grupā (n = 58) bija 7,6 (SD = 2,54) gadi, Aspergera sindroma grupā (n = 4) vidējais bērna vecums bija 7,7 (SD = 3,34) gadi un AST pacientu grupā (n = 88), vidējais bērna vecums bija 8,3 (SD = 3,46) gadi.

Pēc diagnožu sadalījuma visiem pētījumā iekļautajiem AST pacientiem, bērniības autisma grupā bija 58 (38,66%) pacienti, Aspergera sindroma grupā četri (2,66%) pacienti, bet AST grupā 88 (58,66%) pacienti.



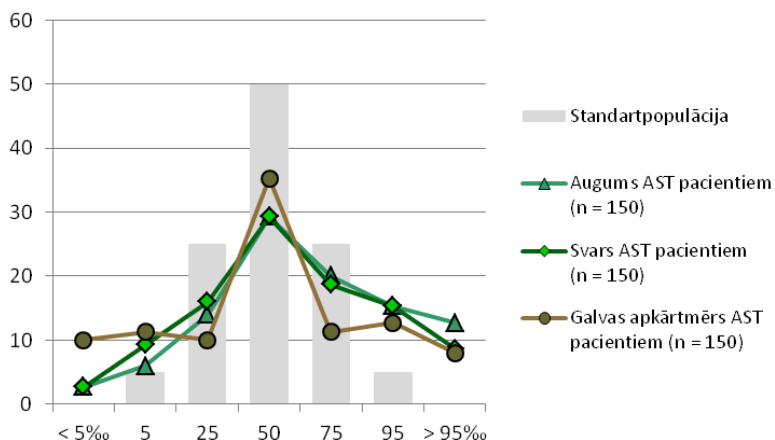
**Sindromālā autisma pacientu skaits un procentuālais sadalījums sākotnēji  
atlasītajā pacientu grupā**

| <b>Diagnosticētā ģenētiskā patoloģija</b>  | <b>Gadījumu skaits</b> | <b>Procentuālais sadalījums</b> |
|--|------------------------|---------------------------------|
| Kompleksa hromosomu pārmaiņa<br>46,XY,t(1;2;17)(q23;p21;q25.3)   | 1                      | 4,35%                           |
| Kompleksa hromosomu pārmaiņa<br>46,XY,der(1)(1pter→1q25:13q21→13q32:7p21→7pter),<br>der(7)(13qter→13q21:7q31→7p21:7q32→7qter),<br>der(13)(13pter→13q21:1q25→1qter) | 1                      | 4,35%                           |
| 15q11-13 duplikācija<br>(MIM #608636)  | 2                      | 8,69%                           |
| 15q11-13 delēcija<br>Eindželmaņa sindroms<br>(MIM #105830)   | 3                      | 13,04%                          |
| Kabuki sindroms<br>(MIM #147920)   | 1                      | 4,35%                           |
| 22q11.2 delēcija<br>DiGeorge sindroms<br>(MIM #188400)   | 2                      | 8,69%                           |
| Trauslās X hromosomas sindroms<br><i>FMR1</i> gēna mutācija<br>(MIM #300624)   | 6                      | 20,09%                          |
| Retta sindroms<br><i>MECP2</i> gēna mutācija<br>(MIM #312750)  | 2                      | 8,69%                           |
| $\alpha$ -1-mannozidoze<br>(MIM #609458)   | 1                      | 4,35%                           |
| Cx26 gēna mutācija (sensoreirāla vājdzirdība)<br>(MIM #220290)   | 2                      | 8,69%                           |
| Tuberozā skleroze<br>(MIM #191100)   | 2                      | 8,69%                           |

Analizējot dzimumu procentuālo sadalījumu starp visiem AST apakštipiem, novēroja, ka bērības autisms zēniem ir sastopams 81,03%, bet meitenēm 18,96%, Aspergera sindroms zēniem ir sastopams 75%, bet meitenēm 25%, AST zēniem tika konstatēts 80,68%, savukārt meitenēm 19,32% gadījumos no visiem AST apakštipiem. Statistiski ticamas atšķirības starp dzimumu grupām AST gadījumā netika konstatētas ( $p = 0,485$ ).

Analizējot AST pacientu antropometrisko mērījumu procentīļu rādītājus, kā normas variants tika pieņemts no piektās līdz 95% (percentīlei). Rezultāts, kurš bija mazāks par 5% tika pieņemts kā mazs savam vecumam, savukārt lielāks par 95%, tika definēts kā liels savam vecumam (Jones, 2006; Krūmiņa et al., 2007). Analizēja iegūtās AST pacientu un standartpopulācijas auguma, svara, galvas apkārtmēra procentīļu procentuālo attiecību.

Savstarpēji salīdzināja AST pacientu antropometrisko mērījumu procentīļu procentuālo sadalījumu attiecībā pret standartpopulācijas sadalījumu. Salīdzinātie auguma, svara un galvas apkārtmēra rādītāji attēloti 3.1. attēlā.



3.1. att. AST pacientu un standartpopulācijas antropometrisko mērījumu procentuālais sadalījums

Kā biežākās blakus slimības AST pacientiem analizēja garīgās atpalcības pakāpes un epilepsijas lēkmju biežumu. Konstatēja, ka no visiem AST pacientiem normāls intelekta ( $IQ > 70$ ) līmenis bija 29 (18,66%) pacientiem, viegla ( $IQ 50-69$ ) garīga atpalcība 77 (51,33%) pacientiem, vidēji smaga ( $IQ 35-49$ ) garīga atpalcība 34 (22,66%) pacientiem un smaga ( $IQ 24-30$ ) garīga atpalcība desmit (6,66%) pacientiem.

Salīdzinot IQ sadalījumu pa dzimumiem, statistiski nozīmīgas atšķirības nekonstatēja.

Analizējot medicīnisko ierakstu datus par epilepsijas lēkmju biežumu anamnēzē visiem pētījumā iekļautajiem AST apakštipu pacientiem, novēroja, ka 135 (90%) pacientiem epilepsijas lēkmes netika konstatētas, astoņiem (5,33%) pacientiem bijušas febrīlas epilepsijas lēkmes agrīnā bērna vecumā, diviem (1,33%) pacientiem konstatētas atsevišķas epilepsijas lēkmes dzīves laikā, bet pieciem (3,33%) pacientiem diagnosticēta epilepsija. Analizējot pa dzimumiem, epilepsijas lēkmes AST zēnu grupā konstatētas astoņiem pacientiem (6,61%), bet AST meiteņu grupā tās novērotas septiņiem pacientiem (24,13%). Salīdzinot pa dzimumu grupām, epilepsijas lēkmes statistiski ticami biežāk novēroja AST meiteņu grupā ( $p = 0,0106$ ).

Salīdzinot epilepsijas lēkmju biežumu AST pacientiem un garīgās atpalcības pakāpi, statistiski ticamu atšķirību novēroja, ka vieglas garīgas atpalcības grupā epilepsijas lēkmes sastopamas retāk ( $p = 0,057$ ), bet biežāk tās konstatēja smagas garīgas atpalcības grupā ( $p = 0,009$ ).

Analizējot valodas attīstības traucējumus, konstatēja, ka 148 (98,66%) pacientiem diagnosticēti gan ekspresīvās, gan receptīvās valodas attīstības traucējumi un tikai diviem (1,33%) pacientiem no AST grupas, valodas traucējumi netika novēroti. Analizējot pēc dzimuma sadalījuma, AST zēnu grupā valodas traucējumi konstatēti 119 pacientiem (98,34%), bet AST meiteņu grupā tos konstatēja visām 29 pacientēm (100%).

### 3.2. Izvēlēto SNP asociācijas analīze

Pētījuma otrajā fāzē 95 pētījumā iekļautiem AST pacientiem, no kuriem bija iegūts bioloģiskais materiāls un kuru vecāki bija piekrituši bērna bioloģiskā materiāla analīzei un 190 nejausināti atlasītiem, nosacīti veselīem kontroles grupas pārstāvjiem veikta genotipēšana četriem ģenētiskiem marķieriem: rs11212733, rs1394119, rs2421826 un rs1454985.

Analizējot genotipa sadalījumu, pēc Hārdija–Veinberga vienādojuma, atklāja, ka alēļu sadalījums AST pacientu un kontroles grupā ir līdzsvarā, izņemot rs1394119 polimorfismu ( $p < 0,05$ ), tādēļ šis polimorfisms no tālākā pētījuma tika izslēgts. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Analizēto SNP alēļu gadījuma kontroles asociācijas rezultāti

| SNP                             | Hromosomālā lokalizācija | MAF pacientiem | MAF kontrolei | $\chi^2$ | P vērtība | P koriģētā | OR    | 95%CI     |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|---------------|----------|-----------|------------|-------|-----------|
| rs11212733<br>g.12041239<br>T>A | 11q22.3                  | 0,552          | 0,432         | 6,982    | 0,008     | 0,024      | 1,625 | 1,13–2,31 |
| rs2421826<br>g.35170605<br>G>A  | 11p13                    | 0,352          | 0,432         | 0,554    | 0,456     | 1,0        | 1,154 | 0,79–1,68 |
| rs1454985<br>g.4205023<br>T>C   | 15q13.3–q14              | 0,447          | 0,399         | 1,118    | 0,291     | 1,0        | 1,217 | 0,84–1,75 |

SNP (*single nucleotide polymorphism*) – viena nukleotīda polimorfisms

MAF (*minor allele frequency*) – retākās alēles biežums

$\chi^2$  – Hī kvadrāts

P<sub>koriģētā</sub> – Bonferroni korekcija

CI – ticamības intervāls

OR – izredžu attiecība

Analizējot izvēlētos marķierus, tika atrasts, ka SNP rs11212733 ir statistiski nozīmīgi asociēts ar AST ( $p = 0,008$ ,  $p_{\text{koriģēta}} = 0,024$ ), savukārt rs2421826 ( $p = 0,456$ ,  $p_{\text{koriģēta}} = 1,0$ ) un rs1454985 ( $p = 0,291$ ,  $p_{\text{koriģēta}} = 1,0$ ) polimorfismam netika konstatēta statistiski nozīmīga asociācija ar AST.

Analizējot haplotipus rs11212733/rs2421826, kuri lokalizēti 11. hromosomā, haplotipu biežumu, novēroja, ka biežākais haplotips AST pacientu grupā ir A/A ( $p = 0,122$ ), bet kontroles grupā T/A ( $p = 0,012$ ), atšķirība starp grupām bija statistiski nozīmīga.

Veicot AST lineārās regresijas analīzi, lai noteiktu AST asociāciju ar analizēto SNP polimorfismu, kā kovariātus izmantoja AST pacientu vecumu, dzimumu, IQ līmeni un anamnēzē konstatētās epilepsijas lēkmes. Veicot datu analīzi, statistiski ticama asociācija netika atklāta, rezultāti nav atspoguļoti.

### 3.3. Farmakoģenētiskā marķiera *CYP2D6* analīze

Farmakoģenētikas mērķis bija noteikt *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* alēļu biežumu AST pacientu un kontroles grupās, kā arī izvērtēt šo alēļu nozīmi izvēlētās otrās paaudzes antipsihotiķa risperidona terapijas efektivitātes prognozei.

Medikamentozās terapijas efektivitātes izvērtēšanai, ņemot vērā, ka pētījums bija veikts 2011. gadā un rekrutēti 113 AST pacienti, šiem pacientiem un 190 kontroles grupas pārstāvjiem noteica citohromgrupas P450 psihotropo medikamentu metabolizācijas pakāpi.

Analizējot abas grupas, statistiski ticama atšķirība starp pacientu un kontroles grupām netika atklāta. *CYP2D6\*4* T alēles biežums pacientu grupā bija 0,191, bet kontroles grupā 0,188 ( $p = 0,933$ , OR = 1,019), *CYP2D6\*41* T alēles biežums pacientu grupā bija 0,113, bet kontroles grupā 0,053 ( $p = 0,012$ , OR = 2,257).

Analizējot *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) haplotipu biežumu starp AST pacientiem (n = 113) un kontroles grupu (n = 190), statistiski ticamu atšķirību neatklāja. Biežākais haplotips abās grupās bija *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) C/C biežums pacientu grupā bija 0,729 (p = 0,428), bet haplotipu *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) TT nekonstatēja ne kontroles, ne pacientu grupās.

AST pacientu grupā 83 pacienti nesaņēma medikamentozo terapiju, jo AST traucējumu ārstēšanā izmantoja nemedikamentozās terapijas metodes. 30 pacienti medikamentozā terapijā saņēma antipsihotisku medikamentu risperidonu. Šo grupu veidoja 23 zēni un septiņas meitenes vecumā no četriem līdz 15 gadiem (vidējais vecums 7,16 gadi).

Lai analizētu polimorfismu saistību ar terapijas efektivitāti, pacienti, kuri lietoja risperidonu tika sadalīti divās grupās, kuriem terapija bija efektīva (n = 28) un kuriem bija neefektīva (n = 2).

Ņemot vērā, ka neefektīva risperidona terapija konstatēta tikai diviem pacientiem, statistiskās metodes datu salīdzināšanai nav izmantotas, bet analizējot *CYP2D6\*41* alēles genotipus efektīvas risperidona terapijas grupā, atklāja, ka biežākais bija CC genotips (85,7%).

Neefektīvas risperidona terapija grupā *CYP2D6\*41* TT genotips netika atrasts, vienam pacientam konstatēja CT genotipu, bet otram CC genotipu. Savukārt, analizējot *CYP2D6\*4* alēles genotipus efektīvas risperidona terapijas grupā, biežākais genotips bija CC (78,6%), bet neefektīvas risperidona terapijas grupā, TT un CT genotips netika atklāts, taču CC genotips konstatēts diviem pacientiem.

Tālākajā pētījumā izveidotajai AST pacientu grupai, kuri lietoja risperidonu monoterapijā, analizēja risperidona blaknes. Konstatēto blakņu rezultātā medikamentozo terapiju ar risperidonu bija nepieciešams atcelt un mainīt pret citas grupas psihotropiem medikamentiem, kurus atļauts lietot bērnu psihiatrijas praksē.

Analizējot blakņu biežumu, 23 (76,66%) pacientiem blaknes netika novērotas. Savukārt septiņiem pacientiem (23,33%) konstatēja blaknes, līdz ar to veikta terapijas korekcija. Pieciem pacientiem (16,6%) konstatēja hiperprolaktinēmiju, vienam pacientam (3,33%) novēroja svara pieaugumu un vienam pacientam (3,33%) bradikardiju. Neiroloģiskie simptomi netika konstatēti nevienam no AST pacientam.

Salīdzinot *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) CT haplotipu efektīvas un neefektīvas risperidona grupās, haplotipa *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) CT saistību ar AST traucējumiem un farmakoterapijas efektivitāti nav konstatēta, līdz ar to šo nevar izmantot terapijas prognozei mūsu grupai.

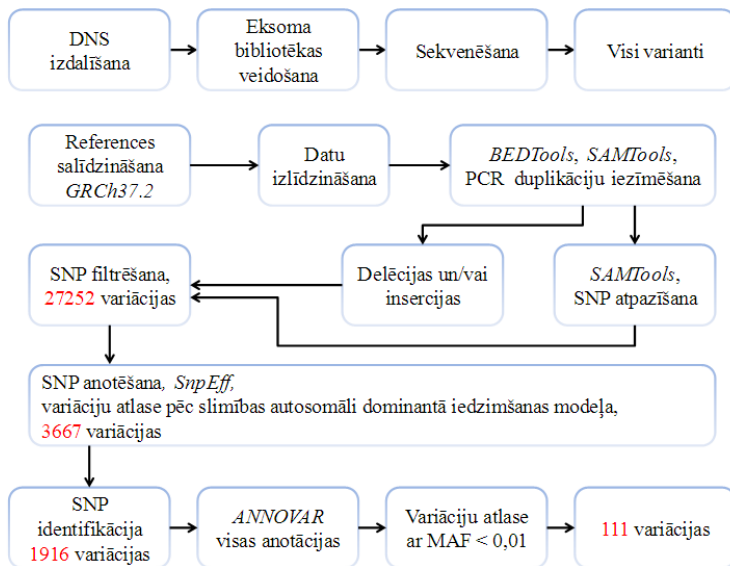
Analizējot *CYP2D6\*4* alēli risperidona blakņu grupā T alēles biežums bija 0,07143, savukārt grupā bez risperidona blaknēm, T alēles biežums bija 0,1522 ( $p = 0,4365$ , OR = 0,4286, 95%CI = 0,0481–3,189).

Analizējot *CYP2D6\*41* alēli, risperidona blakņu grupā, T alēles biežums bija 0,07143, bet grupā bez risperidona blaknēm T alēles biežums bija 0,1304 ( $p = 0,5471$ , OR = 0,5128, 95%CI = 0,0564–4,663). Pacientiem, kuriem konstatēja risperidona blaknes, kā arī pacientiem bez risperidona blaknēm, analizējot haplotipu *CYP2D6\*41/CYP2D6\*4* (rs28371725/rs3892097) CT statistiski nozīmīgu saistību neatklāja ( $p = 0,431$ ).

Risperidona vidējā deva, ko pacienti lietoja bija 0,6 mg/dn (SD = 0,56). Visiem pacientiem, kuri lietoja risperidonu monoterapijā, ASAT un ALAT rādītāji bija normas robežās. Pacientiem, kuri monoterapijā lietoja risperidonu, lineāras regresijas analizē analizēja risperidona devu, ASAT, ALAT rādītājus saistībā ar *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* alēlēm, kā kovariāti tika izmantoti pacienta dzimums, vecums un svars. Statistiski nozīmīgus rezultātus neieguva, rezultāti nav atspoguļoti.

### 3.4. Eksoma sekvenēšanas analīze ģimenei ar Aspergera sindromu

Ģimenē, kurā konstatēts Aspergera sindroms divās paaudzēs, abiem vecākiem un slimajam bērnam veica pilnu eksoma sekvenēšanu un iegūto datu analīzi. Eksoma sekvenēšanā iegūtie dati tika salīdzināti pret hg19 cilvēka genomu un paraugi III-3, III-4, IV-3 pārklāja references genoma eksomu par 91,63%, 91,66% un 91,78%. (sk. 3.5. att).



3.5. att. Eksoma datu analīzes algoritms

SNP filtrēšanas un anotēšanas rezultātā atbilstoši slimības dominantajam iedzimšanas modelim tika atlasīti potenciālie AST SNP varianti 111 gēnos. SNP šajos gēnos izraisīja aminoskābju nomaiņu jeb *missens* mutācijas. Tālākajā darba procesā anotēto SNP saraksts tika salīdzināts ar jau eksistējošām, uz pierādījumiem balstītām datubāzēm, lai atlasītu potenciāli nozīmīgākos SNP, kuri ekspresējas CNS un varētu būt saistīti ar AST.



Rezultātā tika atlasīti astoņu gēnu varianti, kuri, pēc literatūras datiem, ekspresējas CNS. No tiem *KCNJ10* un *PCDHA9-10* gēnu varianti ir aprakstīti AST datu bāzē kā iespējamie kandidātgēni.

Tālākajā procesā astoņiem gēnu variantiem tika noteikta references secība, nukleotīdu pozīcija kodējošās secībās, aminoskābju izmaiņas olbaltumvielā un alēles nomaiņas biežumu visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā (*annovar*, 2013). Iegūtie dati apkopoti 3.3. tabulā.

3.3. tabula

**Potenciālo AST kandidātgēnu variantu anotācija**

| <b>Gēns/SNP</b>                  | <b>Kodējošās aminoskābes maiņa (references secība, nukleotīdu pozīcija kodējošā secībā, aminoskābju nomaiņa olbaltumvielā)</b> | <b>ESP5400_AL L<sup>1</sup> MAF</b> |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>ARPP21</i><br>(rs151173813)   | NM_001267617:c.G1726A;p.A576T  | 0,003439                            |
| <i>KCNH6</i><br>(rs138601922)    | NM_030779:c.A161G;p.Y54C   | 0,003997                            |
| <i>KCNJ10</i><br>(rs115466046)   | NM_002241:c.G53A;p.R18Q  | 0,01227                             |
| <i>KIAA051</i><br>(rs139487660)  | NM_014732:c.G37A;p.D13N  | 0,002138                            |
| <i>LRFN2</i><br>(nav rs)         | NM_020737:c.G983A;p.R328H  | 0,000093                            |
| <i>PCDHA9-10</i><br>(rs79247475) | NM_018898:c.C2558G;p.P853R   | 0,003067                            |
| <i>MPDZ</i><br>(nav rs)          | NM_001261406:c.A4525G;p.I1509V   | 0,000104                            |
| <i>PLD5</i><br>(rs140243407)     | NM_001195812:c.G13A;p.A5T  | 0,000327                            |

<sup>1</sup> *ESP5400\_ALL – MAF in Exome Sequencing Project dataset (5,400 exomes) for all populations* – visu populāciju Eksoma Sekvenēšanas projekta MAF (alēles nomaiņas biežums) (*annovar*, 2013)

Veikta atlasīto gēnu variantu sekvenēšana pēc Sangera metodes, pārējiem ģimenes locekļiem. Izvēlēts autosomāli dominantais pārmantošanas modelis, ņemot vērā ģimenes anamnēzes datus, ka slima ir bērnu māte. Rezultātā, ģimenei ar Aspergera sindromu tika atrasti pieci SNP potenciāli nozīmīgos gēnos: *KCNJ10*, *ARPP21*, *PLD5*, *KCNH6*, *MPDZ*.

Lai noteiktu pārējo SNP iespējamo patogenitāti, tika noteikta polimorfisma vieta transkriptos, kas kodē olbaltumvielu, izmantojot *Ensembl* (*ensembl*, 2013) un *Mutalyzer* (*mutalyzer*, 2013) datu bāzes. Atrastās potenciāli nozīmīgās izmaiņas tika analizētas tiešsaistē ar *SIFT* un *Polyphen* datubāzēm, kā rezultātā tika atrasts, ka iespējama patogēna nomaiņa varētu būt *LRFN2*, *KIAA0513* un *KCNH6* gēnos (sk. 3.4. tabulu). Trīs gēnus *KIAA051*, *LRFN2*, *PCDHA9-10* izslēdza, jo šie varianti tika atrasti arī veselajiem ģimenes locekļiem – tēvam un bērnam. Pēc veiktajiem atlasēšanas etapiem tika atrasts, ka mutācija *KCNH6* gēnā varētu būt iemesls Aspergera sindroma attīstībai.

## Potenciālo kandidātģēnu variantu patogenitātes analīze

| Ģēns          | SNP identifikācija      | SNP hromosomālā pozīcija        | SNP ietekme transkriptos un kodētajās olbaltumvielās  | SNP iespējamā patogenitāte |                           |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|---|----------------------------|---------------------------|
|               |                         |                                 |   | SIFT <sup>1</sup>          | Polyphen <sup>1</sup>     |
| <i>KCNJ10</i> | rs115466046             | NC_000001.10:g.160012270<br>C>T | NM_002241.4(KCNJ10_i001): c.53G>A, p.(Arg18Gln)       | Labdabīga<br>0.34          | Labdabīga<br>0.098        |
|               |                         |                                 | NM_001195811.1(PLD5_i001): c.451G>A, p.(Ala151Thr)    | Labdabīga<br>0.33          | Iesp. ļaundabīga<br>0.749 |
| <i>PLD5</i>   | rs140243407             | NC_000001.10:g.242383388<br>C>T | NM_001195812.1(PLD5_i001): c.13G>A, p.(Ala5Thr)       | ND                         | ND                        |
|               |                         |                                 | NM_152666.2(PLD5_i001): c.637G>A, p.(Ala213Thr)       | Labdabīga<br>0.26          | Iesp. ļaundabīga<br>0.84  |
| <i>ARPP21</i> | rs151173813             | NC_000003.11:g.35780947<br>G>A  | NM_152666.1(PLD5_i001): c.361G>A, p.(Ala121Thr)       | Labdabīga<br>0.18          | Iesp. ļaundabīga<br>0.84  |
|               |                         |                                 | NM_001267617.1(ARPP21_i001): c.1726G>A, p.(Ala576Thr) | Labdabīga<br>0.46          | Labdabīga<br>0.023        |
| <i>PCDHA</i>  | rs79247475 <sup>a</sup> | NC_000005.9:g.140362125<br>C>G  | NM_001267619.1(ARPP21_i001): c.1786G>A, p.(Ala596Thr) | Labdabīga<br>0.48          | Labdabīga<br>0.037        |
|               |                         |                                 | NM_016300.4(ARPP21_i001): c.1783G>A, p.(Ala595Thr)    | Labdabīga<br>0.29          | Labdabīga<br>0.007        |
|               |                         |                                 | NM_018905.2(PCDHA2_i001): c.2513C>G, p.(Pro838Arg)    | ND                         | ND                        |

3.4. tabulas nobeigums

| Gēns     | SNP identifikācija     | SNP hromosomāla pozīcija           | SNP ietekme transkriptos un kodētajās olbaltumvielās   | SNP iespējamā patogenitāte |                       |
|----------|------------------------|------------------------------------|--|----------------------------|-----------------------|
|          |                        |                                    |  | SIFT <sup>1</sup>          | Polyphen <sup>1</sup> |
| LRFN2    | TMP_ESP_6_4<br>0399870 | NC_000006.11:g.<br>40399870<br>C>T | NM_020737.1(LRFN2_i001): c.983G>A,<br>p.(Arg328His)    | Ļaundabīga<br>0.01         | Ļaundabīga<br>0.981   |
|          |                        |                                    | NM_001261406.1(MPDZ_i001):<br>c.4525A>G,p.(Ile1509Val) | Labdabīga<br>1             | Labdabīga<br>0.001    |
| MPDZ     | TMP_ESP_9_1<br>3126523 | NC_000009.11:g.<br>13126523<br>T>C | NM_001261407.1(MPDZ_i001):<br>c.4525A>G,p.(Ile1509Val) | Labdabīga<br>1             | Labdabīga<br>0.001    |
|          |                        |                                    | NM_003829.4(MPDZ_i001): c.4624A>G,<br>p.(Ile1542Val)   | Labdabīga<br>1             | Labdabīga<br>0.001    |
|          |                        |                                    | NM_003829.3(MPDZ_i001): c.4624A>G,<br>p.(Ile1542Val)   | Labdabīga<br>1             | Labdabīga<br>0.001    |
| KIAA0513 | rs139487660            | NC_000016.9:85<br>100714<br>G>A    | NP_055547.1: c.37G>A,p.Asp13Asn                        | Ļaundabīga<br>0.03         | Ļaundabīga<br>0.991   |
| KCNH6    | rs138601922            | NC_000017.10:g.<br>61601584<br>A>G | NM_030779.2(KCNH6_i001):<br>c.161A>G,p.(Tyr54Cys)      | Ļaundabīga<br>0            | Ļaundabīga<br>0.974   |
|          |                        |                                    | NM_173092.1(KCNH6_i001):<br>c.161A>G, p.(Tyr54Cys)     | Ļaundabīga<br>0            | Ļaundabīga<br>0.991   |

<sup>1</sup> dati no *Ensembl* datubāzes (*ensembl*, 2013)

ND – nav datu

<sup>a</sup> pēc datiem *NCBI* datu bāzē iespējams, ka SNP atrodas gēna *PCDHA* paralogā, tādēļ dati par šo SNP būtu visticamāk jāvērtē kā artefakti

## 4. DISKUSIJA

Veiktajā pētījumā iekļautā AST pacientu grupa nepārstāv visu Latvijas AST populāciju, pētīta izveidotā AST paraugkopa. Pētījuma dati neatspoguļo informāciju par visiem AST Latvijā, bet ļauj spriest par AST kopējām tendencēm. No pētījuma izslēgti pacienti ar sindromālo autismu, tālākajā procesā analizēti AST pacienti ar nesindromālo jeb idiopātisko autismu. Izveidota fenotipu un genotipu raksturojoša datu bāze, analizēti antropometriskie parametri, izvēlēto polimorfismu asociācija ar AST. Izvērtēta nemedikamentozās un medikamentozās terapijas izvēle, analizēta medikamentozā terapijā izvēlēta otrās paaudzes antipsihotiķa risperidona efektivitāte un biežākās blaknes saistībā ar izvēlēto farmakoģenētisko marķieri. Atbilstoši autosomāli dominantajam pārmantošanas modelim, izvēlēta ģimene ar Aspergera sindromu divās paaudzēs un veikta pilna eksoma sekvenēšana trīs šīs ģimenes locekļiem, lai atrastu iespējamus AST kandidātģenus, kuri varētu būt iesaistīti AST etioloģijā.

Pētījuma dati ir unikāli, jo šis ir pirmais AST pētījums Latvijā.

### 4.1. AST pacientu antropometriskais un klīniskais raksturojums

Lai aprakstītu iespējamo AST fenotipu, tika analizēti antropometriskie parametri un klīniskās pazīmes, kas raksturīgas AST, kā arī meklētas iespējamās atšķirības salīdzinājumā ar standartpopulāciju. Šajā pētījuma fāzē izveidota labi raksturota un aprakstīta AST paraugkopa, kuru izmantoja tālāko ģenētisko pētījumu veikšanā. Apkopota informācija par AST klīnisko izpausmju smagumu un iespējamiem ietekmējošiem faktoriem, kas būtu svarīgi

nākotnē, lai risinātu AST pacientu sociālpsiholoģiskos un izglītības jautājumus Latvijā.

Lai atrastu AST raksturīgās fenotipiskās pazīmes, tika analizēti antropometriskie un klīniskie parametri, izmantojot SSK-10 diagnostiskos kritērijus, izvērtēšanas skalas un ADOS testu. AST pacientiem tika izvērtēts IQ, kā arī, izmantojot medicīnisko ierakstu anamnēzes datus, analizēts epilepsijas lēkmju sākšanās vecums, lēkmju profils un biežums.

Lai nodrošinātu pēc iespējas homogēnāku AST grupu, no kopējās AST pacientu grupas izslēdza tos, kuriem diagnosticēts sindromālais autisms. Veiktajā pētījumā tika konstatēts, ka 13,29% pacientiem ar AST ir diagnosticēts un apstiprināts sindromālais autisms. Mūsu pētījumā konstatētais sindromālā autisma biežums sakrīt ar citās valstīs veiktajiem līdzīgiem pētījumiem, ņemot vērā, ka šis bija pirmais šāda vieda veiktais pētījums Latvijā (*Gilberg and Coleman, 1996; Muhle et al., 2004; Lintas and Persico, 2009*). AST bieži vien ir raksturīgākais pirmais simptoms pacientiem ar hromosomālu vai monogēnu slimību. Apmēram 5% sastopamas hromosomu mikroskopiskas aberācijas, delēcijas, inversijas un translokācijas (*Jacquemont et al., 2006; Sebat et al., 2007; Marshall et al., 2008; Christian et al., 2008*). Arī mūsu pētījumā 4,35% gadījumā kā AST etioloģiskais faktors bija hromosomu aberācijas. Savukārt, no monogēnām slimībām, līdzīgi kā citās populācijās, biežākā zēniem ir trauklās X hromosomas sindroms, bet meitenēm Retta sindroms (*Muhle et al., 2004, Lintas and Persico, 2009*).

Kā galvenie antropometrisko mērījumu parametri AST pacientiem izvēlēti augums, svars un galvas apkārtmērs. Šie mērījumi veikti visās AST apakšgrupās un analizēta mērījumu procentīļu procentuālā attiecība pret standartpopulācijas mērījumu procentīļu procentiem.

Analizējot kopējo AST auguma, svara, galvas apkārtmēra procentīļu procentuālo attiecību pret standartpopulāciju, novēroja, ka AST pacientu

mērījumu rādītājiem ir palielinātas nestandarta vērtības ( $< 5\%$  un  $> 95\%$ ), kā arī samazināta  $50\%$  vērtība, salīdzinot ar standartpopulāciju, īpaši tas attiecas uz galvas apkārtmēru, kas būtu definējams kā par mazu vai par lielu savam vecumam. Ja kopīgā statistika rāda apmēram simetrisku sadalījumu starp centrālo asi ( $50\%$ ), tad analizējot parametrus atsevišķi zēnu un meiteņu grupām, novēroja zināmu asimetriju. Īpaši atšķirības sadalījumā vērojamas auguma un svara grafikos. Pētījuma mērījumi norāda, ka īpaši paaugstināts ir auguma un svara mērījumu indekss meitenēm ( $75\%$ ). Zēniem, lai arī novērojami nesimetriski auguma un svara grafiki, palielināts auguma un svara indekss nav izteikts. Tajā pašā laikā, galvas apkārtmēra indeksa sadalījums zēniem ir simetrisks pret  $50\%$ , kā arī novērojama samazināta galvas apkārtmēra ( $< 5\%$ ) un palielināta galvas apkārtmēra ( $> 95\%$ ) pārsvars, salīdzinot ar standartpopulācijas parametru. Līdzīgs galvas apkārtmēra sadalījums vērojams arī meiteņu grupai. Taču no kopējās tendences atšķiras augsti rezultāti, kas saistīti ar  $5\%$ . Sakarā ar mazu AST meiteņu paraugkopu ( $n = 29$ ), nevar apgalvot, ka tā būtu raksturīga tendence.

AST pacientiem ir raksturīgs palielināts galvas apkārtmērs (*Sacco et al., 2007; Miles et al., 2008*), ko apstiprina arī šajā pētījumā iegūtie dati, taču vērojama asimetrija dzimumu sadalījumā, redzams, ka procentuāli ir vairāk zēnu, kuriem galvas apkārtmērs atbilst  $95\%$ , kas uzskatāms kā normas varianta augšējā robeža, bet meitenēm attiecīgi zemāks, lai gan meitenēm procentuāli ir vairāk gan  $> 95\%$ , gan  $< 5\%$  grupās.

Salīdzinot ar antropometrisko pētījumu rezultātiem Latvijā, kurš veikts 2010. gadā, lai izvērtētu bērnu aptaukošanās risku un kurā apsekoti tikai 7–8 gadus veci bērni, kuri uzsāk mācības vispārīglītojošās skolās pirmajā klasē, var secināt, ka saglabājas tendence uz aptaukošanos, taču salīdzot pa dzimumiem šī tendence izteiktāka ir zēniem nekā meitenēm, kas vērojams arī mūsu veiktajā pētījumā, kurā zēniem ( $9,1\%$ ) procentuāli ir lielāka tendence

svara rādītājiem virs 95% nekā meitenēm (6,9%) (*Velika et al., 2011*). Palielināta svara rādītāji varētu būt saistīti gan ar ēšanas traucējumiem, kas raksturīgi AST pacientiem, gan kā medikamentozās terapijas blakņu izpausme. AST pacienti savā ēdienkartē izvēlās vienveidīgu pārtiku, kas bieži vien satur tikai ogļhidrātus. Savukārt smagu garstāvokļu un uzvedības traucējumu gadījumā AST pacientiem medikamentozā terapijā tiek izmantoti gan konvenciālie, gan otrās paaudzes antipsihotiskie medikamenti, kuru biežākā izraisītā blakne ir svara pieaugums.

Kā viena no biežākajām AST blakus slimībām ir garīgā atpalcība. Veiktajā pētījumā tika atklāts, ka Latvijā 80,66% pacientiem ar AST ir diagnosticēta dažādas pakāpes garīgā atpalcība un tikai 18,66% AST pacientiem intelekts atbilst normai. Veiktā pētījuma iegūtie dati norāda, ka garīgā atpalcība ir viena no biežākām AST blakus slimībām, tās biežums dažādās populācijās tiek minēts no 50–70% (*Gillberg, 2006; Sacco et al., 2007*). Salīdzinot garīgās atpalcības pakāpes starp dzimumiem, statistiski ticama atšķirība netika konstatēta, taču vērojama tendence, ka meiteņu grupā procentuāli biežāk konstatēta vieglas un smagas pakāpes garīga atpalcība, salīdzinot ar AST zēnu grupu, kas sakrīt ar citu pētījumu datiem par smagāku AST norisi meiteņu populācijā (*Fombonne, 2009*).

Epilepsijas lēkmju biežums populācijā kopumā sastopams 0,1–5% gadījumos. Epilepsijas lēkmes AST pacientiem sastopamas 8–30% gadījumos, nekā populācijā kopumā (*Danielsson et al., 2005; Tuchman and Cuccaro, 2011*). Pacientiem, kuriem ir dažādas pakāpes garīgās atpalcības, epilepsijas lēkmju biežums ir 37% (*Gillberg and Coleman, 1996; Tuchman and Cuccaro, 2011*). Mūsu pētījumā tika atklāts, ka tikai 5,33% pacientiem ar AST ir konstatētas epilepsijas lēkmes. Viena no hipotēzēm varētu būt, ka epilepsijas lēkmju biežums ir cieši saistīts ar bērna vecumu (*Spence and Schneider, 2009*). Epilepsijai raksturīgi divi sākšanās pīķi: līdz piecu gadu vecumam un pusaudžu



vecumā (*Folstein and Rosen-Sheidley, 2001; Spence and Schneider, 2009*). Lielāks risks, lai sāktos epilepsija AST pacientiem ir tieši pusaudžu vecumā (*Spence and Schneider, 2009*). Esošajā pētījumā vidējais bērna vecums bija astoņi gadi, kas sakrīt ar periodu, kurā epilepsijas lēkmes ir sastopamas reti. Otra hipotēze, iespējams, varētu būt, ka epilepsijas lēkmes bieži ir blakus slimība pacientiem ar monogēnām vai hromosomālām patoloģijām, lai padarītu esošā pētījuma grupu homogēnāku, no pētījuma grupas tika izslēgti pacienti ar diagnosticētu ģenētisku patoloģiju. Iespējams, iepriekš izvirzītās hipotēzes varētu apstiprināt, kādēļ veiktajā pētījumā epilepsijas lēkmju biežums bija zemāks, nekā citās populācijās veiktajos pētījumos.

42% AST pacientiem, kuriem ir garīga atpalcība, tiek diagnosticēta epilepsija (*Folstein and Rosen-Sheidley, 2001*). Veiktajā pētījumā epilepsijas lēkmes biežāk tika konstatētas pacientiem ar smagu garīgu atpalcību, nekā pacientiem ar normālu IQ līmeni ( $p = 0,009$ ), kas apstiprina hipotēzi, ka smagāka garīgās atpalcības pakāpe var būt biežāk saistīta ar epilepsijas lēkmēm. Iespējams to var izskaidrot, ka agrīns CNS bojājums, intrauterīna, perinatāla vai postnatāla infekcija, hipoksija vai citi ārējās vides faktori, kuri var būt par cēloni psihomotorās attīstības aizturei bērnam pēc viena gada vecuma. Otra hipotēze, kas sakrīt ar publikāciju datiem, ka pacientiem, kuriem ir garīga atpalcība, pie garīgās attīstības regresa pastāv lielāks risks, ka sāksies epilepsijas lēkmes (*Tuchman, 2006*). AST klīnika manifestējas bērniem līdz divu gadu vecumam, kas sakrīt ar biežāko epilepsijas lēkmju attīstības riska periodu, kā arī šajā periodā AST pacientiem novēro psihiskās attīstības regresu. Tas nozīmē, ja pacienta slimības anamēzē ir bijusi kaut viena epilepsijas lēkmes epizode, jādodomā, ka tā varētu izraisīt bērna psihiskās attīstības regresu, kas savukārt var provocēt atkārtotu epilepsijas lēkmju attīstību, tādējādi provocējot vēl smagākas garīgās atpalcības pakāpes attīstību. Katra epilepsijas lēkme var provocēt IQ līmeņa pazemināšanos AST pacientiem. Jo agrīnākā

vecumā bērnam sākušās epilepsijas lēkmes, jo pastāv lielāks risks, ka var attīstīties smagāka garīgās atpalcības pakāpe. Veiktajā pētījumā konstatēja, ka epilepsijas lēkmes bija biežāk novērotas meitenēm ar smagu garīgu atpalcību ( $p = 0,0106$ ).

Analizējot valodas traucējumus, vērojams, ka gan zēnu, gan meiteņu grupā AST pacientiem ir konstatēti gan ekspresīvās, gan receptīvās valodas traucējumi, kas saistīti arī ar garīgās atpalcības pakāpi. Bērna intelekta attīstībā svarīgas ir valodas prasmes, lai veicinātu socializāciju, komunikāciju, kā arī izziņas procesus. Taču valodas traucējumu gadījumā šie procesi tiek kavēti un var būt kā viens no faktoriem garīgās atpalcības attīstībā. Tādēļ ir svarīgi jau ļoti agrīnā bērna vecumā veicināt valodas prasmju attīstību.

Komandas darbā ar bērnu, kuram ir AST, noteikti jāiekļauj logopēds, ergoterapeits, speciālais pedagogs, psihologs un bērnu psihiatrs. Lai plānotu katram bērnam nepieciešamo palīdzību, svarīgi veikt vispusīgu bērna grūtību un arī resursu izvērtējumu. Ļoti būtisks ir valodas attīstības līmeņa un īpatnību izvērtējums, ko veic logopēds. Tāpat svarīgi ir psihologam izvērtēt bērna intelektuālās spējas, kas AST gadījumos var variēt no smagas garīgās atpalcības līdz ģenialitātes līmenim.

AST diagnostika Latvijā bieži vien ir novēlota un nav pieejama adekvāta ambulatorā aprūpe visā Latvijas teritorijā, kas nodrošinātu multidisciplināru pieeju AST pacientu agrīnai intervencei. Vidējais bērna vecums, kurā tiek diagnosticēts kāds no AST apakštīpiem ir astoņi gadi, kā rezultātā ir zaudēts laiks, lai iegūtu pozitīvus rezultātus no veiktās nemedikamentozās terapijas, gan valodas attīstībā, gan speciālā pedagoga apmācībā, kā arī socializācijā un integrācijā sabiedrībā. Līdz ar to, laicīgi nediagnosticētu traucējumu gadījumā, AST pacientiem iespējama smagāka garīgās atpalcības pakāpe un invalidizācija.

Ne mazāk svarīgi, bērna apmācības procesā iesaistīt ģimeni, respektīvi, apmācīt ģimeni, lai bērna integrācija noritētu sekmīgāk. Tādēļ jebkurā terapijas procesā AST pacientu ģimenes locekļiem ir jāiesaistās aktīvi, ne pasīvi vērojot un gaidot rezultātu no speciālista. Terapijas procesam pamatā vajadzētu noritēt ģimenē.

## 4.2. Izvēlēto SNP asociācijas analīze

AST etioloģijā nozīmīga ir 7. hromosoma, kurā nelīdzsvarotās saistības, kandidātģēnu un CNV pētījumos atklāti AST kandidātģēni (*IMGSAC*,1998; *Trikalinos et al.*, 2006; *Alacorn et al.*,2002; *Alacorn et al.*, 2005; *Schellenberg et al.*, 2006; *Stankiewicz and Lupski*,2010; *Freitag et al.*, 2010). Mazāk pētīta ir 11. un 15. hromosomu saistību ar AST (*Szatmari et al.*, 2007; *Liu et al.*, 2008; *Cho et al.*, 2011). Nozīmīgi ir 11p15.4-p15.3 un 15q13.3-q14 lokusi (*Spence et al.*, 2006; *Duvall et al.*, 2007). Tādēļ šie lokusi izvēlēti mūsu pētījumā. Analizēti četri SNP, kuri varētu būt iesaistīti AST etioloģijā. SNP izvēle balstīta uz literatūras datiem, ka 11. un 15. hromosomām varētu būt būtiska nozīme AST etioloģijā. Pamatojoties uz visa genoma asociācijas pētījumu, kurā tika analizēti AST subfenotipi un iekļautas 976 ģimenes no Autisma Genoma projekta, tika atrasta nozīmīga asociācija ar 11. hromosomas 11p13 rs2421826 (LOD = 2,55,  $p = 0,0003$ ), 11p14-p15.3 rs1394119 (LOD = 3,40,  $p = 0,00004$ ) un 15q13.3-q14 rs1454985 (LOD = 4,01,  $p = 0,00001$ ) lokusiem (*Liu et al.*, 2008). Savukārt, 2011. gadā Cho ar kolēģiem veiktajā asociāciju pētījumā, kurā analizēti 3022 SNP, kā nozīmīgākie tika atlasīti 30 SNP, no kuriem, statistiski ticama asociācija ar AST bija rs11212733 ( $p = 9,76 \times 10^{-6}$ ), kurš lokalizēts 11q22.3 lokusā (*Cho et al.*, 2011). Tādēļ šajā pētījumā tika izvēlēti šie četri SNP, lai analizētu, vai šiem SNP ir nozīme AST attīstībā mūsu AST pacientu grupā.

Mūsu veiktajā pētījumā netika atrasta SNP rs2421826, rs1394119 un rs1454985 asociācija ar AST. Kā viens no iemesliem varētu būt maza AST pacientu grupa, bet otrs, ne mazāk svarīgs iemesls, AST grupas homogenitāte, ņemot vērā, ka no pētāmās grupas tika izslēgti pacienti ar sindromālo autismu.

Analizētais SNP rs11212733, kurš lokalizēts starp 11q22.3 hromosomas ekso - filina 5 (*EXPH5*) gēna 5' un DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polipeptīda 10 (*DDX10*) gēna 3' reģioniem, bija statistiski ticami asociēts ar AST ( $\chi^2 = 6.982$ ,  $p_{\text{koriģētā}} = 0.033$ , OR = 1.625, 95% CI 1,13–2,31).

*EXPH5* ir proteīnu-kodējošais gēns, kurš lokalizēts 11. hromosomas garā pleca lokusā 22.3. Zināms, ka šī gēna funkcijas saistītas ar *Rab27*, kurš regulē neneironālo šūnu eksocitozi, tādu kā lītisko granulu (*lytic granule*) sekrēciju citotoksiskās T šūnās, aizkuņģa dziedzerā  $\beta$ -šūnu insulīna produkciju, kā arī atbrīvo histamīnu saturošās granulas tuklajās šūnās. *Rab27* atbild arī par melanosomu transportu melanocītos (*Kondo et al.*, 2006). *EXPH5* nav iesaistīts neirolģiskajos procesos, tādēļ iespējams, tam nav ievērojamas nozīmes AST attīstībā.

*DDX10* gēns ir lokalizēts 11. hromosomas garā pleca 22–23 lokusā un kodē RNS helikāzi, iesaistīts daudzos šūnas procesos, kas saistītas ar sekundārām RNS strukturālām izmaiņām. Šis gēns iesaistās translācijas iniciācijā, šūnas kodola un mitohondriālā splaisingā, ribosomu un splaisosomu izveidē. Lai gan nav zināms, kuras RNS molekulas ietekmē šī helikāze, samazināta *DDX10* gēna funkcija var radīt regulācijas problēmas RNS līmenī (*Savitsky et al.*, 1996). AST etioloģijā iesaistīti citi *DDX* grupas gēni. Autisma datu bāzē kā potenciālie AST kandidātgēni minēti *DDX11* un *DDX35* gēni (*AutDB*, 2013). *DDX11* gēns, kurš lokalizēts hromosomas 12p11 lokusā ir saistīts ar neirogliālo šūnu diferenciācijas traucējumiem AST pacientiem (*Hu et al.*, 2006). *DDX35* gēnam, kurš lokalizēts hromosomas Xp22.11 lokusā un kodē RNS helikāzi, atrasta saistība ar AST (*Pinto et al.*, 2010). *DDX10* gēns arī

varētu būt kā iespējamais kandidātgēns, kuram būtu nepieciešams veikt turpmāko izpēti saistībā ar AST attīstību.

Analizējot iespējamo haplotipu saistību ar AST, statistiski ticami atšķīrās rs11212733/rs2421826 T/A haplotipa biežums kontroles un AST pacientu grupās ( $p = 0,012$ ). Haplotips rs11212733/rs2421826 T/A biežāk bija sastopams kontroles grupā. Tas norāda, ka šis haplotips varētu būt protektīvs. Hipotētiski varētu pieņemt, ka šis haplotips varētu būt saistīts ar zemāku AST attīstības risku.

AST pacientiem lineārās regresijas analizē pārbaudot saistību ar SNP un diagnozi, intelektu (normāls, viegla, vidēji smaga un smaga garīga atpalcība), epilepsijas lēkmju esamību (ir/nav bijuši anamnēzē) netika atrasta statistiski ticama asociācija ( $p < 0,05$ ). Iespējamo saistību varētu ietekmēt pacientu dzimums, vecums, galvas apkārtmērs, IQ līmenis un anamnēzē konstatētās epilepsijas lēkmes, šie rādītāji tika izmantoti kā kovariāti, taču arī šajā gadījumā netika iegūti statistiski ticami rezultāti ( $p < 0,05$ ).

### **4.3. Farmakoģenētiskā marķiera *CYP2D6* analīze**

Pētījuma trešās fāzes mērķis bija izvērtēt otrās paaudzes antipsihotiskā medikamenta risperidona farmakoterapijas efektivitāti un panesamību pacientiem ar AST. AST pacientu ārstēšanā, smagos slimības gadījumos, tiek izmantota medika - mentozā terapija: ja pacientam ir izteikta hiperaktivitāte un uzmanības deficīta sindroms, agresivitāte, epilepsijas lēkmes, miega traucējumi, garstāvokļa traucējumi, kā arī obsesīvi-kompulsīvi traucējumi un šizofrēnijai līdzīgu simptomu gadījumā (*Mandell et al., 2008*). Šo traucējumu ārstēšanā pamatā izmanto psihotropos medikamentus. Biežāk tiek lietoti atipiskie jeb otrās paaudzes antipsihotiskie līdzekļi, antidepresanti, garstāvokļa stabilizatori un psihostimulatori. Terapijas izvēle saistīta ar prevalējošo sindromu. Taču medikamentozās terapijas izvēle ir problemātiska, jo bieži uz

medikamentiem var būt paradoksālas, neadekvātas reakcijas (*Gillberg, 2006*). Farmakoterapija AST pacientiem tiek izvēlēta individuāli. Uz pierādījumiem balstīti dati liecina par risperidona, metilfenidīna un atsevišķu SASI izmantošanu AST uzvedības traucējumu ārstēšanā (*Taylor et al., 2009*). Viens no biežāk ieteiktajiem otrās paaudzes antipsihotiskajiem preparātiem ir risperidons (*Correia et al., 2010*). Tomēr jāņem vērā, ka medikaments var izraisīt nopietnas blaknes: metabolos traucējumus, tādus kā svara pieaugums, hiperprolaktinēmiju, kā arī lielu devu gadījumā iespējamās nopietnas neiroloģiskas, ekstrapiramidālas blaknes (*West and Waldrop, 2006; Jesner et al., 2007*). Nav veiktu pētījumu un datu par medikamentu efektivitāti un panesamību bērniem līdz piecu gadu vecumam. Līdz ar to medikamenta un devu izvēle ir jāpielāgo individuāli, vadoties pēc klīniskās gaitas (*Taylor et al., 2009*).

Ņemot vērā, ka psihiatrijas praksē pacientiem, sakarā ar nevienmērīgo slimības klīnisko gaitu un atšķirīgo medikamentu metabolizāciju, iespējama atšķirīga reakcija uz psihotropo medikamentu ietekmi, bieži vien nav iespējams izmantot antipsihotisko līdzekļu terapijas shēmas visiem pacientiem vienādi. Reti, bet var klīniskā praksē pielietot personalizēto medicīnu, kas balstās uz medikamenta metabolizācijas pakāpes noteikšanu pirms medikamentozās terapijas uzsākšanas. Katram pacientam reakcija uz terapiju ir atšķirīga, tā ir atkarīga no medikamentu metabolizācijas. Izmantojot personalizētās medicīnas iespējas, nosakot katram pacientam psihotropo medikamentu metabolizācijas pakāpi, iespējams izvēlēties piemērotāko medikamentu un tā devu (*Woodcock and Lesko, 2009*). Psihisku traucējumu gadījumā cēlonis var būt vienlaicīgi vairāku faktoru ietekme, gan ārvides, gan ģenētisko, tādējādi tiek izjaukta normāla neurotransmisija smadzenēs. Genotipēšanas rezultātā tiek noteiktas gēnu variācijas, kuru kodējošie proteīni ir iesaistīti neurotransmisijā, kā arī psihotropo medikamentu metabolizācijā (*Costa e Silva, 2013*). Tādējādi

farmakoģenētikas pielietošanai psihiatrijas praksē ir potenciāls paaugstināt klīnisko efektivitāti un mazināt blaknes (*Woodcock and Lesko, 2009*). Uz do to brīdi jau tiek piedāvāti psihotropo medikamentu farmakoģenētiskie testi, kuru izmantošanas gadījumā ir iespējams noteikt katram pacientam piemērotāko psihotropo medikamentu un tā devu (*cggenetics, 2011*).

Par medikamenta metabolisma individuālām atšķirībām primāri ir atbildīgas CYP450 enzīmu oksidatīvās un katalītiskās reakcijas (*Anderson, 2010*). Viens no svarīgākajiem gēniem, kurš iesaistīts otrās paaudzes antipsihotiķu metabolizācijā, tajā skaitā nodrošinot risperidona metabolisma enzīmu regulāciju, ir *CYP2D6* gēns, kurš ir ļoti polimorfs (*Ingelman-Sundberg et al., 2007*).

Izmantojot jau gatavo piedāvāto alēļu sarakstu, mūsu veiktajā pētījumā nav iegūti pārlicinoši rezultāti. Risperidona biotransformāciju aknās nodrošina vienlaicīgi vairāku P450 marķieru darbība. Šajā pētījumā tika analizēts tikai viens *CYP2D6*, bet antipsihotisko medikamentu metabolizācijā nozīme ir ne tikai *CYP2D6*, bet arī *CYP3A* un *CYP1A2* (*Rodriguez-Antona et al., 2009*). Tas varētu būt iemesls, kādēļ mūsu pētījuma rezultāti ir negatīvi. Neskatoties uz to, ka *CYP2D6* tiek uzskatīts par svarīgāko, iespējams, visu iesaistīto marķieru mijiedarbībai ir lielāka nozīme, nekā izolētu marķieru analīzei, jo tā var nedot gaidītos rezultātus. Pārbaudītajiem farmakoģenētiskajiem marķieriem neatrada nozīmi risperidona blakņu un efektivitātes noteikšanā. Ņemot vērā, ka *CYP2D6* gēns ir polimorfs, iespējams būtu jāanalizē arī pārējās šī gēna alēles, kas iesaistīti risperidona metabolismā, jo *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* ir maz informatīvi, pēc mūsu pētījuma rezultātiem.

Veiktajā pētījumā biežākais terapijas korekcijas iemesls bija hiperprolaktinēmija. Biežākā risperidona blakne konstatēta hiperprolaktinēmija, kuras cēlonis, iespējams, ir saistīts ar AST neurotransmiteru defektu, bet ne primāri ar ksenobiotiķu metabolismu. Dopamīns nomāc prolaktīna

atbrīvošanos, ja tiek stimulēti D2 receptori, turpretim serotonīns veicina prolaktīna atbrīvošanos, ja tiek stimulēti 5HT2A receptori (Stahl, 2008). Ja D2 receptori ir bloķēti, dopamīns vairs nevar kavēt prolaktīna atbrīvošanos, līdz ar to prolaktīna līmenis paaugstinās. Taču, ja vienlaicīgi inhibē 5HT2A receptorus, serotonīns vairs nevar stimulēt prolaktīna atbrīvošanos. Bloķējot D2 receptorus, tiek mazināta hiperprolaktinēmija (Stahl, 2008). AST gadījumā neurotransmiteru regulācijas mehānisms ir izjaukts, tas nozīmē, ka nav izslēgts, ka AST gadījumā var tikt provocēta hiperprolaktinēmija neatkarīgi no pielietotās risperidona terapijas. Medikamentu izsauktās blaknes varētu būt saistītas ar AST pacientu vielmaiņas, serotonīna un dopamīna sintēzes traucējumiem, jo blaknes tika konstatētas, g. k., pacientiem ar dažādas pakāpes garīgu atpalcību. Tas nozīmē, ka jo smagāka ir AST gaita, jo lielāks risks, ka attīstīsies blaknes un terapija būs neefektīva, neatkarīgi no izvēlēta medikamenta grupas un metabolizācijas pakāpes. Hipotētiski var spriest, ka hiperprolaktinēmija nav saistīta ar *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41*, 5HT2A metabolismu. Pieņemtā hipotēze balstās uz publikācijām par to, ka neurotransmiteru disbalanss AST gadījumā var izraisīt hiperprolaktinēmiju (Stahl, 2008).

Iespējams, būtu nepieciešamas izvēlēties papildus marķierus terapijas efektivitātes izvērtēšanai. Nevar izslēgt, ka pētāmās grupas jauda ir pārāk maza, lai varētu izvērtēt farmakoģenētisko marķieru nozīmi. Taču, no personalizētās medicīnas skata punkta, katrā individuālajā gadījumā marķierim ir jābūt informatīvam, jo komerciālo testu gadījumā, rezultāts tiek attiecināts uz katru gadījumu individuāli, ne kopumā uz lielām izpētes grupām. Šajā pētījumā izvēlētie farmakoģenētiskie marķieri *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* nav saistīti ar risperidona efektivitāti un blaknēm. Haplotipu analīzē netika atrasta saistība *CYP2D6\*4/CYP2D6\*41*(rs28371725/rs3892097) C/T (p = 0.4) ar risperidona



devu un ģenētiskajiem marķieriem, tādēļ to nevar izmantot risperidona farmakoterapijas prognostikā.

Veiktajā pētījumā citohromgrupas (CYP) P450 marķiera *CYP2D6* izmainīto alēļu *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*41* biežums nav atšķirīgs AST pacientu un kontroles grupā. AST pacientiem lineārās regresijas analizē pārbaudot saistību starp SNP un bioķīmiskajiem rādītājiem ASAT, ALAT, netika atrasta statistiski ticama asociācija ( $p < 0,05$ ). Iespējamo saistību varētu ietekmēt pacientu dzimums, vecums IQ līmenis un anamnēzē konstatētās epilepsijas lēkmes, šie rādītāji tika izmantoti kā kovariāti lineārajā regresijā, bet arī šajā gadījumā netika iegūti statistiski ticami rezultāti ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4. Eksoma sekvenēšanas analīze ģimenei ar Apergera sindromu**

AST ir multifaktoriāli, kuru pārmantošanas mehānisms vēl nav noskaidrots. Izteikta hipotēze, ka AST attīstībā svarīgāka nozīme ir CNV un punktveida mutācijām (*Sebat et al., 2007*, *Marshall et al., 2008*; *Glessner et al., 2009*; *Pinto et al., 2010*; *Levy et al., 2011*; *Sanders et al., 2011*). AST etioloģijā nav iesaistīts viens gēns, bet vienlaicīgi iespējamās vairāku gēnu variāciju kombinācijas ar ārējās vides faktoru ietekmi. AST raksturīgs ļoti plašs klīnisko simptomu diapazons, sākot no ļoti smaga, zemu funkcionējoša stāvokļa līdz augsti funkcionējošam stāvoklim, kuru gadījumā traucējums skar galvenokārt sociālās funkcionēšanas, komunikācijas sfēras un var būt saistīts ar valodas un mācīšanās iemaņu traucējumiem. AST traucējumu grupā labi definēti diagnostiskie kritēriji ir bērības autismam un Apergera sindromam, kas patiesībā ir visu AST pretpoli. Šobrīd pētniecībā uzmanība pievērsta visu AST ģenētiskai izpētei, bet mazāk literatūrā minēti dati tieši par Apergera sindroma ģenētisko izpēti.

Pacienti ar Aspergera sindromu agrīnā bērna attīstības periodā reti nonāk bērnu psihiatra redzeslokā, jo sindroma izpausmes var būt vieglā pakāpē. Taču vēlākajā dzīves periodā, uzsākot mācības skolā, pusaudžu vecumā traucējumam var pievienoties citi garīgās veselības traucējumi, tādi kā obsesīvi-kompulsīvi, šizotipiskas personības iezīmes, afektīvi garastāvokļa traucējumi, šizoafektīvi vai šizofrēnijai līdzīgi stāvokļi un tikai retrospektīvi, pēc anamnēzes datiem, var pieņemt, ka pacientam jau agrīnā bērna vecumā ir bijuši sociālās funkcionēšanas, emocionālie un komunikācijas traucējumi, kas varētu atbilst Aspergera sindroma simptomātikai.

Aspergera sindroms biežāk raksturīgs zēniem nekā meitenēm, bet ņemot vērā, ka pēc pēdējo gadu epidemioloģisko pētījumu datiem, prevalences rādītāji pieaug, uzlabojoties diagnostiskajām tehnoloģijām, Aspergera sindroms arvien biežāk tiek konstatēts arī meitenēm (Gillberg, 2006; Fombonne, 2009).

Šajā pētījumā pilnai eksoma sekvenēšanai tika izvēlēta ģimene, kurā Aspergera sindroms ir konstatēts divās paaudzēs, turklāt, traucējums konstatēts mātei un diviem bērniem, gan meitai, gan dēlam. Lai gan Aspergera sindroms var tikt pārmantots gan autosomāli, gan saistīti ar X hromosomu (*Betancur*, 2011), tomēr pēc ciltskoka izvēlētajā ģimenē visticamākais bija autosomāli dominantais iedzimšanas tips. Analizējot no eksoma sekvenēšanas iegūtos datus, tika atlasītas iespējami patogēnas izmaiņas piecos gēnos – *KCNJ10*, *ARPP21*, *PLD5*, *KCNH6* un *MPDZ*. Lai novērtētu to iespējamo patogenitāti – sekvenču varianti tika pārbaudīti tiešsaistē ar *SIFT* (*sift*, 2013) un *PolyPhen* (*polyphen*, 2013) datubāzēm, kā arī *Ensembl* (*ensembl*, 2013) un *Mutalyzer* (*mutalyzer*, 2013) datu bāzēm, kā arī apskatīts literatūrā par šo gēnu kodēto olbaltumvielu iespējamo lomu AST patoģenēzē.

***KCNJ10*** (*potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10*) gēns – lokalizēts 1q23.2 lokusā, regulē sinaptisko aktivitāti starp neironiem. K kanālu regulators, saistīts ar AST (*Sicca et al.*, 2011) un epilepsiju

(*Buono et al.*, 2004). *KCNJ10* gēnam ir viens transkripts. Identificētā nukleotīdu nomaiņa atrodas eksonā, un ierosina aminoskābes arginīna nomaiņa uz glutamīnu. Dotā nukleotīda nomaiņas biežums visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā ir 0,01227 (*ensembl*,2013). Veicot nukleotīdu nomaiņas varianta ietekmes simulāciju, izmantojot *PolyPhen* un *SIFT* programmatūras, polimorfisms netiek atzīmēts kā iespējami patogēns, tāpēc arī tika atmests kā slimību izraisošs mūsu pētījumā.

***ARPP21*** (*21-kD cAMP-regulated phosphoprotein*) gēns – lokalizēts 3p24.3 lokusā un kodē olbaltumvielu, kas ir kalmodulīna (*calmodulin*) (CaM; 114180) signāla regulētājs, tam ir galvenā nozīme neurotransmiteru sistēmas regulēšanā, tas regulē CaM-atkarīgo kināzi (CaMKI) un proteīna fosfatāzi-2B (PP2B) (*Rakhilin et al.*, 2004). Gēns ekspresējas astainā kodola (*nucleus caudatus*), zemgarozas kodolu apvalka (*putamen*), sēdošā kodola (*nucleus accumbens*), smadzeņu garozas (*cortex cerebellum*) un filoģenētiski jaunākās garozas (*neocortex*) rajonos (*Brene et al.*, 1994). *ARPP21* gēnam ir 37 transkripti, identificētā nukleotīdu nomaiņa kodējošā daļā atrodas piecos no tiem, un var ierosināt alanīna nomaiņu uz treonīnu. Dotā nukleotīdu nomaiņa nav aprakstīta saistībā ar patoloģiju un visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā tā biežums ir 0,003439 (*ensembl*, 2013), kā arī veicot nukleotīdu nomaiņas varianta ietekmes simulāciju, izmantojot *PolyPhen* un *SIFT* programmatūras, polimorfisms visticamāk nav patogēns.

***PLD5*** (*Phospholipase D family, member 5*) gēns – lokalizēts 1q43 lokusā un kodē olbaltumvielu, kura regulē aksonu veidošanos un neurotransmiteru glutamāta receptoru metabotropo signālsistēmu (*Dhami and Ferguson*, 2006; *Kanaho et al.*, 2009). Genoma plašos asociācijas pētījumos atklāts, ka viens no polimorfismiem (rs2196826) ir saistīts ar AST, kuriem nav valodas traucējumu (*Anney et al.*, 2010). *PLD5* gēnam ir astoņi transkripti, mūsu pētījumā identificētā nukleotīdu nomaiņa kodējošā daļā atrodas četros no

tiem un izraisa aminoskābju izmaiņas. Minētie transkripti kodē neaktīvas enzīma izoformas un tāpēc identificētā izmaiņa visticamāk nav patogēna, kas sakrīt ar *SIFT* programmas simulācijas datiem. Identificētais SNP (rs140243407) ir aprakstīts gan 1000genoma datu bāzē un visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā tā biežums ir 0,000327 (*ensembl*, 2013).

***MPDZ*** (*multiple PDZ domain protein*) gēns – lokalizēts 9p23 lokusā, tā kodētais proteīns nodrošina proteīnu savstarpējo mijiedarbību, saistībā ar serotonīna 5-HT-2C receptoru (*Ullmer et al.*, 1998). *MPDZ* gēnam ir 21 transkripts, atrastā nukleotīdu nomaiņa kodējošā daļa lokalizēta desmit gēna transkriptos, kuros izraisa izoleicīna nomaiņa uz valīnu. Dotā nukleotīdu nomaiņa nav aprakstīta saistībā ar patoloģiju un visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā tā biežums ir 0,000104 (*ensembl*, 2013). Veicot nukleotīdu nomaiņas varianta ietekmes simulāciju, izmantojot PolyPhen un *SIFT* programmatūras, polimorfisms nav atzīts par patogēnu.

***KCNH6*** (*potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6*) gēns – lokalizēts 17q23.3 lokusā. Tā kodētais proteīns ir saistīts ar ERG (*Ether-A-Go-Go-related gene 2*), kas nosaka uzvedību. Gēns ekspresējas CNS, īpaši ožas sīpoliņa (*bulbus olfactorius*), smadzeņu garozas (*cortex cerebri*), hipokampa (*hippocampus*), hipotalāma (*hypothalamus*), un smadzenīšu rajonos (*cerebellum*) (*Papa et al.*, 2003). *KCNH6* gēnam ir seši transkripti. Mūsu pētījumā identificētā nukleotīdu nomaiņa atrodas divu transkriptu kodējošā daļā un var ierosināt aminoskābes tirozīna nomaiņu uz cisteīnu. Veicot nukleotīdu nomaiņas varianta ietekmes simulāciju, izmantojot *PolyPhen* un *SIFT* programmatūras, polimorfisms ir atzīts kā patogēns. Dotai nukleotīdu nomaiņai līdz šim vēl nav veikti funkcionālie pētījumi saistībā ar patoloģiju, kā arī tā nav iepriekš aprakstīta saistībā ar patoloģiju. Tā kā visu populāciju eksoma sekvenēšanas projektā tā biežums ir 0,003997 (*ensembl*, 2013), kā arī modulējot tās patogenitāti abās programmās, tā tika atrasta kā

patogēna arī mūsu ģimenē šī izmaiņa visticamāk varētu būt izraisījusi Aspergera sindromu. Ir atrasti marķieri hromosomas 17q11-21 lokusā, kuriem ir nozīmīga saistība ar AST (*Younan et al* 2003; *Stone et al.*, 2004; *Cantor et al.*, 2005), taču līdz šim nav aprakstīta *KCNH6* gēna asociācija ar AST.

Rezultātā tika iegūts, ka *KCNH6* varētu būt iespējamais patogēnais variants ģimenei ar Aspergera sindromu. Lai to pārbaudītu, būtu nepieciešama šī varianta analīze arī citiem pacientiem ar Aspergera sindromu, lai noteiktu vai šim variantam ir nozīme Aspergera sindroma etioloģijā, kā arī vai Aspergera sindroms varētu tik pāmantots dominatā veidā no vienas paaudzes uz otru. Patogenitātes izvērtēšanai būtu nepieciešami tālākie funkcionālie pētījumi.

Ņemot vērā, ka AST diagnostika Latvijā ir novēlota, vadoties pēc starptautiskām rekomendācijām, ir izstrādātas rekomendācijas AST diagnostikai bērniem līdz trīs gadu vecumam Latvijas ģimenes ārstiem, pediatriem, bērnu neirologiem un bērnu psihiatriem. Savlaicīga un agrīna šo traucējumu diagnostika, kā arī atbilstošas terapijas izvēle ļauj mazināt bērna invalidizāciju un integrēt sabiedrībā.

## 5. SECINĀJUMI

1. Izveidota labi aprakstīta autiskā spektra traucējumu paraugkopa, kuras dati iekļauti speciāli šim pētījumam izveidotā anketā. Konstatēts, ka dažādas pakāpes garīgās atpalcības biežums ir 80,66%, epilepsijas lēkmju biežums ir 5,33%, valodas traucējumi 98,66%. Epilepsijas lēkmes biežāk novērotas pacientiem ar smagu garīgu atpalcību ( $p = 0,009$ ).
2. Analizējot antropometrisko mērījumu datus un fenotipiskās pazīmes, autiskā spektra traucējumu pacientiem vērojams palielināts galvas apkārtmērs un lielāks svars, salīdzinājumā ar standartpopulāciju, kas sakrīt ar citu starptautisku pētījumu datiem.
3. Atrasta statistiski ticama asociācija ar autiskā spektra traucējumiem un SNP rs11212733 ( $p = 0,008$ ), kurš lokalizēts 11q22.3 lokusā starp *DDX10* un *EXPH5* gēniem, kuri būtu iespējamie autiskā spektra traucējumu kandidātģēni.
4. Citohromgrupas (CYP) P450 marķiera *CYP2D6* alēļu *CYP2D6\*4* T, *CYP2D6\*4I* T biežums nav atšķirīgs autiskā spektra traucējumu pacientu un kontroles grupā. Netika atrasta saistība autiskā spektra traucējumu medikamentozā terapijā lietotā otrās paaudzes antipsihotika risperidona blaknēm ar citohromgrupas (CYP) P450 marķiera *CYP2D6* alēlēm *CYP2D6\*4* T, *CYP2D6\*4I* T, pētītie marķieri nav informatīvi.
5. Ģimenei ar Aspergera sindromu veikta pilna eksoma sekvenēšana, izmantojot autosomāli dominantās pārmantošanas tipa modeli, atlasīti potenciālo kandidātģēnu varianti, no kuriem, izmantojot modelēšanas metodi, identificēts patogēns *KCNH6* gēna variants, kurš varētu būt iespējamais autiskā spektra traucējumu kandidātģēns.

## 6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

### 6.1. Zinātniskie raksti par pētījuma tēmu

1. A. Pentjuss, O.Rubenis, **D. Bauze**, L. Aprupe, B. Lace. Flux variability analysis approach of autism related metabolism in stoichiometric model of mitochondria. *Biosystems and Information Technology*, 2013; 2: 27–42.
2. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, R. Andrezina, B. Lace. Role of CYP2D6\*4 and CYP2D\*41 in Autism Spectrum Disorder Therapy. *Nordic Journal of Psychiatry*, 2013.gads (iesniegts).
3. **D. Bauze**, L. Piekuse, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, I. Vaivade, K. Viksne, R. Andrezina, B. Lace. Association a Single Nucleotide Polymorphism in Chromosome 11 with Autism Spectrum Disorder in a North–Eastern European Population. *Proceedings of the Latvian Academy of Science*, 2012. gads (pieņemts).
4. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, Z. Daneberga, A.Dzalbs, Dz.Locmele, R. Andrezina, B. Lace. The Clinical Analysis of Patients with Autism and Autism Spectrum Disorders. *RSU zinātniskie raksti*, 2012.: 43–50. lpp.
5. **D. Bauze**. Autisma ģenētiskais aspekts. A. Vabale “Autisms un autiskā spektra traucējumi. Ieskats teorijā un praksē”. *RSU*, 2008: 18.–21. lpp.
6. Z. Daneberga, Z. Krūmiņa, B. Lace, **D. Bauze**, N. Pronina, R. Lugovska. The Fragile X Syndrome: 13 Years of Experience. *Proceedings of the Latvian Academy of Science, Section B*, 2011 (65): 67–72.
7. Z. Daneberga, Z. Krumina, B. Lace, **D. Bauze**, N. Pronina, R. Lugovska. Fragile X Syndrome in Mentally Retarded Patients from

Latvia. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences, 2009; 63 (1): 70–72.

## 6.2. Konferenču tēzes par pētījuma tēmu

1. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, K. Viksna, R. Andrezina, B. Lace. Pharmacogenetic Study of Second Generation Antipsychotic Therapy in Autism Spectrum Disorders. Eiropas Cilvēkā ģenētikas konference, Parīze, Francija, 2013. gada jūnijs, European Journal of Human Genetics, Vol. 21 Sup 2, p. 503.
2. **D. Bauze**, L. Piekuse, L. Kevere, Z. Kronberga, I. Vaivade, K. Viksne, A. Rizevs, R. Andrezina, J. Klovinš, B. Lace. Study of Single Nucleotide Polymorphism in Chromosomes 11 and 15 in Autism Spectrum Disorder. 20. WPGC Hamburgā, Vācijā, 2012. gada oktobris, p. 133.
3. L. Kevere, S. Purviņa, **D. Bauze**. The link between hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism and psychiatric disorders in children and adolescents. Neuropsychiatrie de l'enfance et de l'adolescence. IACAPAP 2012 20<sup>th</sup> World Congress – Paris. Juillet 2012, Vol. 60. No. 5S. p. S227.
4. A. Dzalbs, A. Stamere, G. Kalnberza, I. Teilane, **D. Bauze**, D. Locmele, I. Grinfeldē, I. Micule, Z. Krumina, L. Kornejeva, D. Kalniete, M. Miklaseviča, E. Miklasevičs, R. Lugovska. Submicroscopic chromosome rearrangements in Latvian children with developmental delay and congenital anomalies. Laboratorine Medicina. 11<sup>th</sup> Baltic Congress of Laboratory Medicine – Vilnius, May 2012, p. 11.
5. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, L. Piekuse, M. Kreile. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T



- polymorphism and psychiatric disorders in children. European Neuropsychopharmacology, Vol 22, Sup 1, 2012, p. S64-S65.
6. A. Dzalbs, Z. Krūmiņa, I. Grīnfelde, **D. Bauze**, G. Kalnbērza, R. Lugovska. Hromosomu trausluma sindromu ctoģenētiskās diagnostikas metodes. 2012. gada RSU Zinātniskās konferences tēzes, 203. lpp.
  7. L. Kevere, A. Rizevs, **D. Bauze**, S. Jelisejevs, D. Doke, I. Zarde, J. Iznovs. Epilepsy in Children and Adolescents with Organic Personality and Behavioral Disorders. 2012.gada RSU Zinātniskās konferences tēzes, 204. lpp.
  8. L. Kevere, S. Purviņa, **D. Bauze**, M. Zeibārts, R. Andrēziņa, L. Piekuse, M. Kreile, I. Purviņš. MTHFR gēna polimorfisms un homocisteīna līmeņa atšķirības bērniem un pusaudžiem ar šizofrēnijas spektra saslimšanām. RSU 2012. gada zinātniskās konferences tēzes, 232. lpp.
  9. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Riževs, S. Jeļisejevs, Z. Daneberga, A. Dzalbs, D. Ločmele, Z. Krūmiņa, R. Andrēziņa, B. Lāce. Autisma un autiskā spektra traucējumu fenotipisko pazīmju, antropometrisko mērījumu, bioķīmisko rādītāju salīdzinājums un analīze. RSU 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 239. lpp
  10. L. Kevere, S. Purviņa, **D. Bauze**, M. Zeibārts, A. Riževs, S. Jeļisejevs, M. Caune, I. Purviņš, R. Andrēziņa. Paaugstināts homocisteīna līmenis bērniem un pusaudžiem ar psihotiskiem un afektīviem traucējumiem. RSU 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 191. lpp.
  11. A. Dzalbs, **D. Bauze**, B. Lāce, Z. Krūmiņa, D. Ločmele, I. Mičule, I. Grīnfelde, I. Teilāne, G. Kalnbērza, R. Lugovska. Subtelomēru rajonu pārmaiņas bērniem ar attīstības aizturi un iedzimtām anomālījām: sākotnējie rezultāti. RSU 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 228. lpp.

12. A. Dzalbs, G. Kalnbērza, I. Teilāne, **D. Bauze**, R. Lugovska. Fluorescentā *in situ* hibridizācijas metode submikroskopisku hromosomu aberāciju diagnostikā bērniem ar attīstības aizturi un iedzimtām anomālijām. Apvienotais Pasaules Latviešu zinātnieku 3. kongresa un Letonikas 4. kongresa tēzes, 2011., 29. lpp.
13. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, Rizevs A, S. Jelisejevs, Andrezina R, B. Lace. Psychopharmacological Treatment of Autism Spectrum Disoder. ENCP, 03–07.09.11., Parīze, Francija.
14. **D. Bauze**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, S. Jelisejevs, R. Andrezina, B. Lace. Autism Spectrum Disorders and Seizure Syndrome. ESHG, 28–31.05.11., Amsterdama, Nīderlande.
15. M. Kreile, L. Piekuse, **D. Bauze**, Y. Stankevich, A. Zarina, B. Lace, A. Krumina. No association between functional polymorphisms in MTHFR and childhood schizoprenia in Latvian population. ESHG, 28–31.05.11., Amsterdama, Nīderlande.
16. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, A. Rizevs, S. Jelisejevs, M. Caune, I. Purvins, R. Andrezina. Influence of homocysteine on psychiatric disorders. WFSBP Congress 2011, 29–02.06.11., Prāga, Čehija.
17. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, A. Rizevs, S. Jelisejevs, M. Caune, I. Purvins, R. Andrezina. Elevated level of homocysteine for children and adolescents with psychotic and mood disorders. ECNP koference, 14–16.04.11., Pēterburga, Krievija.
18. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, A. Rizevs, S. Jelisejevs, M. Caune, I. Purvins, R. Andrezina. Paaugstināts homocisteīna līmenis bērniem un pusaudžiem ar psihotiskiem un afektīviem traucējumiem. RSU Zinātniskā konference, 14–15.04.11., Rīga.

19. L. Piekuse, B. Lace, **D. Bauze**, Z. Daneberga, N. Pronina, A. Krumina. Novel MTDNA mutation found in patient with mental retardation. 4<sup>th</sup> International Congress of Myology, 09-13.05.11., Lille, Francija.
20. L. Kevere, A. Rizevs, **D. Bauze**, S. Jelisejevs, D. Doke, I. Zarde, J. Iznovs. Epilepsy in children and adolescents with organic personality and behavioral disorders. BCNC, 14.06–16.06.11., Rīga.
21. Z. Daneberga, Z. Krumina, B. Lace, **D. Bauze**, N. Pronina, R. Lugovska. Fragile X syndrome in Latvia: clinical, molecular and population genetic aspects. BCNC, 14–16.06.11., Rīga.
22. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, A. Rizevs, S. Jelisejevs, M. Caune, I. Purvins, R. Andrezina. Children and adolescents with psychotic and mood disorders and level of homocysteine. WPA 18–22.09.11., Argentīna.
23. A. Dzalbs, G. Kalnberza, I. Teilane, **D. Bauze**, D. Locmele, I. Grinfelde, I. Micule, Z. Krumina, B. Lace, R. Lugovska. Subtelomeric aberration in Latvian children with developmental delay and congenital anomalies. *Chromosome Research*, (2011), Vol. 19, Supp.1, S37–S118-S119.
24. **D. Bauze.**, L. Kevere, Z. Kronberga, A. Rizevs, S. Jelisejevs, Dzalbs A., N. Pronina, Z. Daneberga, Z. Krumina, D. Locmele, R. Andrezina, B. Lace, Seizure Syndrome and Autistic Spectrum Disorders. 11. Baltijas bērnu neirologu asociācijas konferences tēzes, 2011., 11. lpp.
25. Z. Daneberga, Z. Krumina, B. Lace, **D. Bauze.**, N. Pronina, R. Lugovska. Fragile X syndrome in Latvia: clinical, molecular and population genetic aspects. 11. Baltijas bērnu neirologu asociācijas konferences tēzes, 2011., 20. lpp.
26. A. Dzalbs, **D. Bauze**, Z. Krumina, B. Lace, D. Locmele, I. Grinfelde, I. Micule, G. Kalnberza, I. Teilane, R. Lugovska. Screening for subtelomeric rearrangements by fluorescent in situ hybridization in

- children with developmental delay and congenital anomalies. 11. Baltijas bērnu neirologu asociācijas konferences tēzes, 2011., 18. lpp.
27. A. Dzalbs, G. Kalnberza, B. Lace, D. Locmele, I. Teilane, **D. Bauze**, R. Lugovska. Molecular cytogenetic characterization of unbalanced karyotypes by fluorescent *in situ* hybridization using subtelomeric probes. 11. Baltijas bērnu neirologu asociācijas konferences tēzes, 2011., 22. lpp.
28. L. Kevere, S. Purvina, **D. Bauze**, M. Zeibarts, A. Rizevs, S. Jelisejevs, M. Caune, I. Purvins, R. Andrezina. Elevated level of homocysteine for children and adolescents with psychotic and mood disorders. 2<sup>nd</sup> Young Psychiatrists Network Meeting abstract booklet, 6–8.04.11., pp. 39–40.
29. Z. Krumina, **D. Bauze**, I. Grauduma. ERT in a girl with Hunter syndrome. 10<sup>th</sup> International Workshop on Lysosomal Storage Disorders, 3–4.12.10, pp. 53 Prāga, Čehija.

## 7. PATEICĪBAS

Vislielākā un vissirsnīgākā pateicība mana darba vadītājai *Dr. med.* Baibai Lācei par ieguldīto enerģiju, darbu, padomiem, pacietību, sapratni un atbalstu promocijas darba izstrādē un sagatavošanā.

Paldies *Dr. med.* profesorei Raisai Andrēziņai par padomiem promocijas darba izstrādes un sagatavošanas laikā.

Paldies Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par iespēju veikt promocijas darba molekulārās ģenētikas izpēti, jo īpaši *Dr. med.* Jānim Kloviņam, par iespēju veikt eksoma sekvenēšanu un Ivaram Silamiķelim par eksoma datu analīzi.

Pateicos saviem promocijas darba konsultantiem *Dr. med.* Zandai Danebergai un bērnu psihiatram Arnim Riževam par padomiem darba sagatavošanā.

Paldies klīniskai psiholoģei Zanei Kronbergai par palīdzību promocijas darba izstrādē.

Paldies VSIA BKUS Bērnu psihiatrijas un Medicīniskās ģenētikas klīnikas kolēģiem, māsiņām, mūsu palīgiem par nesavtīgo palīdzību un atbalstu darba tapšanā.

Vissirsnīgākais paldies visiem AST pacientiem, viņu vecākiem un aizbildņiem par piedalīšanos pētījumā.

Pateicos Rīgas Stradiņa Universitātei par iespēju studēt doktorantūras studiju programmā un par finansiālo atbalstu, kas tika sniegts no ESF līdzekļiem.

Vislielākais un sirsnīgākais paldies maniem vecākiem, manai ģimenei un maniem draugiem par atbalstu, sapratni, palīdzību un izturību.

## 8. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Krūmiņa D., Kokare I., Biķis E. Latvijas bērnu fiziskās attīstības novērtēšana. – Rīga: SIA Medicīnas apgāds, 2007. – 23.–31. lpp.
2. Velika B., Pudule I., Grīnberga D. Bērnu antropometrisku parametru un skolas vides pētījums Latvijā, 2010. – Rīga: Veselības ekonomikas centrs, 2011. – 20.–27. lpp.
3. Zāļu valsts aģentūra. Latvijā. <http://www.zva.gov.lv.anonymous> (sk.20.02. 2011).
4. Abrahams B. S., Geschwind D. H. Review Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology // *Nat Rev Genet*, 2008; 9 (5): 341–55.
5. Alarcon M., Cantor R. M., Liu J., et al. Autism Genetic Research Exchange Consortium. Evidence for a language quantitative trait locus on chromosome 7q in multiplex autism families // *American Journal of Human Genetics*, 2002; 70 (1): 60–71.
6. Alarcon M., Yonan A. L., Gilliam T. C., et al. Quantitative genome scan and Ordered-Subsets Analysis of autism endophenotypes support language QTLs // *Molecular psychiatry*, 2005; 10 (8): 747–757.
7. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. – 4<sup>th</sup> ed. – Washington: D. C. American Psychiatric Publishing, 1994.
8. Anderson G. D. Developmental pharmacokinetics // *Semin Pediatr Neurol*, 2010; 17: 208–213.
9. Anney R., Klei L., Pinto D., et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism // *Human molecular genetics*, 2010; 19 (20): 4072-4082.

10. Baron-Cohen S., Allen J., Gillberg C. Can autism be detected at 18 month? The needle, the haystack, and the CHAT // *Br J Psychiatry*, 1992; 161: 839–843.
11. Baron-Cohen S., Hoekstra A. R., Knickmeyer R., Wheelwright S. The Autism Quotient (AQ) – Adolescent Version // *J Autism Dev Disord*, 2006; 36:343–350.
12. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting // *Brain research*, 2011; 1380: 42–77.
13. Brene S., Lindfors N., Ehrlich M, et al. Expression of mRNAs encoding ARPP-16/19, ARPP-21, and DARPP-32 in human brain tissue // *J. Neurosci*, 1994; 14: 985–998.
14. Buono R. J., Lohoff F. W., Sander T., et al. Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility // , 2004; 58 (2-3): 175–83.
15. Cantor R. M., Kono N., Duvall J. A., et al. Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21 // *American Journal of Human Genetics*, 2005; 76 (6): 1050–1056.
16. Chakrabarti S., Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children // *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2001; 285 (24): 3093–3099.
17. Cho S. C., Yoo H. J., Park M. et al. Genome-wide association scan of Korean autism spectrum disorders with language delay: a preliminary study // *Psychiatry Investig*, 2011; 8: 61–66.
18. Christian S. L., Brune C.W., Sudi J. et al. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder // *J Biologic Psychiatry*, 2008; 63 (12): 1111–1117.

19. Correia C. T., Almeida J. P., Santos P. E., et al. Pharmacogenetics of risperidone therapy in autism: association analysis of eight candidate genes with drug efficacy and adverse drug reactions // *Pharmacogenomics J*, 2010; 10: 418–430.
20. Costa e Silva J. A. Personalized medicine in psychiatry: new technologies and approaches // *Metabolism*, 2013; 62 (1): 40–4.
21. Danielsson S., Gillberg I. C., Billstedt E. et al. Epilepsy in young adults with autism: a prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood // *Epilepsia*, 2005; 46 (6): 918–23.
22. Dhimi G. K., Ferguson S. S. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis // *Pharmacol Ther*, 2006; 111 (1): 260–71.
23. Duvall J. A., Lu A., Cantor R. M., et al. A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families // *The American Journal of Psychiatry*, 2007; 164 (4): 656–662.
24. Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcin C et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. // *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 2012; 5(3):160-179.
25. Folstein S. E., Rosen-Sheidley A. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder // *Nature reviews.Genetics*, 2001; 2 (12): 943–955.
26. Fombonne E. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders // *Pediatric Res*, 2009; 65(6): 591–598.
27. Fombonne E. Is autism getting commoner? // *Br J Psychiatry*, 2008; 193 (1): 56–59.



28. Freitag C. M., Staal W., Klauck S. M., et al. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications // *European child and adolescent psychiatry*, 2010; 19 (3): 169–178.
29. Gillberg C. Autism spectrum disorders // *A Clinician's Handbook of Child and Adolescent Psychiatry* / Ed. by Gillberg C., Harrington R., Steinhausen, H. C. – Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press, 2006 – Pp. 447–489.
30. Gillberg C., Coleman M. Autism and medical disorders: a review of the literature // *Dev Med Child Neurol*, 1996; 38: 191–202.
31. Glessner J. T., Wang K., Cai G., et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes // *Nature*, 2009; 459 (7246): 569–573.
32. Hellbrugge T., Lajosi F., Menara D. Münchener Funktionelle Entwicklung – gsdagnostik. – Lubeck : Hansisches Verlagskontor, 1994.
33. Hu V. W., Frank B. C., Heine S., et al. Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes // *BMC Genomics*, 2006; 18 (7): 118.
34. Icasiano F. Childhood autism spectrum disorder in the Barwon region: a community based study // *Journal of paediatrics and child health*, 2004; 40 (12): 696.
35. Ingelman-Sundberg M., Sim S. C., Gomez A., Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects // *Pharmacol Ther*, 2007; 116 (3): 496–526.

36. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q // *Hum Mol Genet*, 1998; 7: 571–8.
37. Jacquemont M. L., Sanlaville D., Redon R., et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders // *J Med Genet*, 2006; 43 (11): 843–849.
38. Jesner O. S., Aref-Adib M., Coren E. Risperidone for autism spectrum disorder // *Cochrane Database Syst Rev*, 2007; 24: CD005040.
39. Jones K. L. Smith's recognizable patterns of human malformation. – 6<sup>th</sup> ed. –Philadelphia: W.B.Saunders, 2006. – Pp. 835–863.
40. Kanaho Y., Funakoshi Y., Hasegawa H. Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth // *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1791 (9): 898–904.
41. Kondo H., Shirakawa R., Higashi T., et al. Constitutive GDP/GTP exchange and secretion-dependent GTP hydrolysis activity for Rab27 in platelets // *J. Biol Chem*, 2006; 281 (39): 28657–28665.
42. Krug D. A., Arick J., Almond P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior // *J Child Psychol Psychiatry*, 1980; 21 (3): 221–229.
43. Lauritsen M. B., Pedersen C. B., Mortensen P. B. Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study // *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 2005; 46 (9): 963–971.
44. Levy D., Ronemus M., Yamrom B., et al. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders // *Neuron* 2011; 70 (5): 886–897.

45. Lintas C., Persico A. M. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the art for the clinical geneticist // *J Med Genet*, 2009; 46 (1): 1–8.
46. Liu X. Q., Paterson A. D., Szatmari P. Genome-wide linkage analyses of quantitative and categorical autism subphenotypes // *Biol Psychiatry*, 2008; 64 (7): 561–570.
47. Lord C., Rutter M., DiLavore P. C., Risi S. Autism diagnostic observation schedule manual. – Los Angeles: Western Psychological Services, 2002.
48. Mandell D. S., Morales K. H., Marcus S. C., et al. Psychotropic medication use among Medicaid-enrolled children with autism spectrum disorders // *Pediatrics*, 2008; 121 (3): 441–448.
49. Marshall C. R., Noor A., Vincent J. B., A, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder // *Am J Hum Genet*, 2008; 82 (2): 477–488.
50. Miles J. H., Takahashi T. N., Hong J., et al.. Development and validation of a measure of dysmorphology: useful for autism subgroup classification // *Am J Med Genet*, 2008; 146A (9): 1101–1116.
51. Muhle R., Trentacoste S. V., Rapin I. The genetics of autism // *Pediatrics*, 2004; 113 (5): 472–486.
52. Myers S. M. The status of pharmacotherapy for autism spectrum disorders // *Expert Opin Pharmacother*, 2007; 8 (11): 1579–1603.
53. Myers S. M., Johnson C. P.; American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Management of children with autism spectrum disorders. // *Pediatrics*, 2007; 120 (5):1162-1182.
54. O'Roak B. J., Deriziotis P., Lee C., et al. // *Nat Genet*, 2011; 43 (6): 585–589
55. Ozgen H. M., Hop J. W., Hox J. J., et al. Minor physical anomalies in autism: a meta-analysis // *Mol Psychiatry*, 2010; 15 (3): 300–307.

56. Ozonoff S.. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study // *Pediatrics*, 2011; 128 (3): e488.
57. Pinto D., Pagnamenta A. T., Klei L., et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders // *Nature*, 2010; 466 (7304): 368–372.
58. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet*, 2007; 81: 559–575.
59. Rakhilin S. V., Olson P. A., Nishi A., et al. A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling // *Science*, 2004; 306: 698–701.
60. Rodriguez-Antona C., Gurwitz D., Leon J., et al. CYP2D6 genotyping for psychiatric patients treated with risperidone: considerations for cost-effectiveness studies // *Pharmacogenomics*, 2009; 10 (4): 685–699.
61. Sacco R., Militeri R., Frolli A., et al. Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism // *Biol Psychiatry*, 2007; 62 (9): 1038–1047.
62. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. –Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
63. Sanders S. J., Ercan-Sencicek A. G., Hus V., et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism // *Neuron*, 2011; 70 (5): 863–885.
64. Schellenberg G. D., Dawson G., Sung Y. J., et al. Evidence for multiple loci from a genome scan of autism kindreds // *Molecular psychiatry*, 2006; 11 (11): 1049–1060.

65. Scott F. J., Baron-Cohen S., Bolton P., Brayne C. The CAST (Childhood Asperger Syndrome Test): preliminary development of a UK screen for mainstream primary-school age children // *Autism*, 2002; 6: 9–31.
66. Sebat J., Lakshmi B., Malhotra D., et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism // *Science*, 2007; 316 (5823): 445–449.
67. Sicca F., Imbrici P., D'Adamo M. C., et al. Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1 // *Neurobiol Dis*, 2011; 43 (1): 239–247.
68. Spence S. J., Cantor R. M., Chung L., et. al. Stratification based on language-related endophenotypes in autism: attempt to replicate reported linkage // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2006; 141B (6): 591–598.
69. Spence S. J., Schneider M. T. The Role of Epilepsy and Epileptiform EEGs in Autism Spectrum Disorders // *Pediatr Res*, 2009; 65 (6): 599–606.
70. Stahl S. M. Antipsychotic Agents // *Stahl's Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and Practical Applications / Ed. by Stahl S. M. – 3<sup>rd</sup> ed. –USA: Cambridge University Press, 2008. – Pp. 327–413.*
71. Stankiewicz P., Lupski J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. // *Annual Review of Medicine*, 2010;61: 437-455.
72. Stone J. L, Merriman B., Cantor R. M, et al. Evidence for sexspecific risk alleles in autism spectrum disorder // *American Journal of Human Genetics*, 2004; 75(6): 1117–1123.

73. Szatmari P., Paterson A. D., Zwaigenbau L., et al.. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements // *Nature genetics*, 2007; 39 (3): 319–328.
74. Tantam D., Girgis S. Recognition and treatment of Asperger syndrome in the community // *British Medical Bulletin*, 2008; 89 (1): 41– 62.
75. Taylor D., Paton C., Kapur S. The South London and Maudsley NHS Foundation Trust Oxleas NHS Foundation Trust Prescribing Guidelines. – 10<sup>th</sup> ed. 2009. – Pp. 270–275.
76. Trikalinos T. A., Karvouni A., Zintzaras E., et al. A heterogeneity-based genome search meta-analysis for autism-spectrum disorders // *Molecular psychiatry*, 2006; 11 (1): 29– 36.
77. Tuchman R. Autism and Epilepsy: What Has Regression Go to Do with It? // *Epilepsy Currents*, 2006; 6 (4): 107–111.
78. Tuchman R., Cuccaro M. Epilepsy and Autism: Neurodevelopmental Perspective // *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2011; 11: 428–434.
79. Tuchman R., Rapin I., Shinnar S. Autistic and dysphasic children II: epilepsy // *Pediatrics*, 1991; 88: 1219–1225.
80. Wechsler Intelligence Scale for Children – Revised (WISc – R), 1974.
81. Williams J., Allison C., Scott F. et al. The Childhood Asperger Syndrome Test (CAST): test-retest reliability // *Autism*, 2006; 10: 415–427.
82. Woodcock J., Lesko L. J. Pharmacogenetics — Tailoring Treatment for the Outliers // *N Engl J. Med*, 2009; 360 (8): 811–813.
83. Woodcock Johnson III: Tests of Cognitive Abilities (Woodcock, McGrew & Mather, 2001), Diagnostic Supplement to the WJ III Tests of Cognitive Abilities Ed. by Woodcock, McGrew, Mather and Schrank, 2003.

84. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders; clinical description and diagnostic guidelines. Geneva: WHO, 1992.
85. Yonan A. L., Alarcon M., Cheng R., et al. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci // *Am J Hum Genet*, 2003; 73 (4): 886–897.
86. A Deep Catalog of Human Genetic Variation.1000 genomes // <http://www.1000genomes.org/anonymous> (sk. 21.02.2013).
87. ANNOVAR // <http://www.openbioinformatics.org/annovar/> anonymous (sk. 12.04.2013).
88. AutDB.Autism Database // [http://autism.mindspec.org/autdb/HG\\_Home.do](http://autism.mindspec.org/autdb/HG_Home.do), anonymous (sk. 18.02.2013).
89. BEDTools // <http://bedtools.readthedocs.org/en/latest/>; anonymous (sk. 13.04. 2013).
90. dbSNP.ShortGeneticVariation. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_summary](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary), anonymous (sk. 18.02. 2013).
91. EMBL-EBI.<http://www.ebi.ac.uk>, anonymous (sk. 20.04.2013).
92. Ensembl.<http://ensembl.org>, anonymous (sk. 20.04.2013).
93. GATK.<http://www.broadinstitute.org/gatk/>,anonymous (sk. 18.04.2013).
94. GeneCards. <http://www.genecards.org>, anonymous (sk. 20.04.2013).
95. Genome Reference Consortium. Human Genome Assembly Data. anonymous (sk.17.03.2013).
96. GRCh37.2 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001405.13/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.13/) anonymous (sk 21.03.2013).
97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/index.shtml>, anonymous(sk. 12.02. 2013).

98. Mutalyzer 2.0.beta-27. <https://mutalyzer.nl/>, anonymous (sk. 20.04.2013).
99. Online Mendelian Inheritance In Man. John Hopkins University. OMIM. <http://www.omim.org>, anonymous (sk. 18.02.2013).
100. Picard. <http://picard.sourceforge.net/> anonymous (sk. 21.03. 2013).
101. Polyphen.<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>,anonymous (sk. 21.04.2013).
102. SAMtools. <http://samtools.sourceforge.net/> anonymous (sk. 21.03.2013).
103. SIFT. <http://sift.jcvi.org/>, anonymous (sk. 21.04.2013).
104. SnpEff. <http://snpeff.sourceforge.net/> anonymous (sk. 21.04.2013).
105. [www.cgcgenetics.com](http://www.cgcgenetics.com), anonymous (sk. 13.01.2011).