



Poremećaj iz spektra autizma – koje su veze s nasljednim metaboličkim bolestima?

Autism spectrum disorder – what are the relations with inherited metabolic diseases?

Silvija Pušeljić^{1,2} , Nora Pušeljić^{1,2}, Ema Poznić^{1,2}, Višnja Tomac^{1,2}, Luka Perić³

¹ Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Osijek, Osijek

² Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

³ Zavod za onkologiju, Klinički bolnički centar Osijek, Osijek

Ključne riječi

AUTIZAM; NASLJEDNE METABOLIČKE BOLESTI;
GENETIKA; EPIGENETIKA

Keywords

AUTISM; INHERITED METABOLIC DISEASES;
GENETICS; EPIGENETICS

SAŽETAK. Poremećaj iz spektra autizma (PSA) kompleksan je neurobiološki poremećaj koji započinje u ranom djetinjstvu i obilježen je poteškoćama u socijalnoj interakciji, komunikaciji uz ograničene, ponavljajuće obrasce ponašanja. Ima širok spektar različitih simptoma. Epidemiološka istraživanja pokazuju trend snažnog rasta godišnje prevalencije PSA-a. Genetska podloga bolesti definirana je kod oko 10 – 20% pacijenata. Etiološka osnova PSA-a predmet je brojnih istraživanja, a tijekom posljednjih dvadesetak godina fokus mnogih studija usmjeren je na mehanizme epigenetske disregulacije. PSA je prema današnjim spoznajama multifaktorska bolest, a nastaje kao rezultat interakcije različitih genetskih i okolišnih čimbenika. Ovi čimbenici utječu na specifične neuronske krugove, oksidativni stres, neuroinflamaciju i disfunkciju mitohondrija. Time se remeti razvoj živčanog sustava, stvaranje sinapsi, povezanost između regija mozga i veličina mozga. Nesindromska forma PSA-a odnosi se na pojedince koji osim kliničkih elemenata PSA-a nemaju druga pridružena obilježja. Prevalencija nasljednih metaboličkih bolesti povezanih s nesindromskim PSA-om je niska (<0,5%) i stoga ukazuje na slabu isplativost sustavne metaboličke obrade istih. Glavni biokemijski mehanizmi predloženi u PSA-u uključuju disfunkciju mitohondrija, oksidativni stres, oslabljen kapacitet metilacije i promijenjeni metabolizam aminokiselina. Metabolomikom dijagnostikom mogu se pratiti brze dnevne varijacije u metaboličkim procesima, čime se može procijeniti složen odnos između etiologije bolesti i fiziologije organizma pružajući sveobuhvatan funkcionalni fenotip, no primjena metabolomikih analiza u kliničkoj praksi još je daleko od primjene u kliničkoj dijagnostičkoj rutini.

SUMMARY. Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurobiological disorder that begins in early childhood and is characterized by difficulties in social interaction, communication with limited, repetitive patterns of behavior. It has a wide spectrum of different symptoms. Epidemiological studies suggested a trend of strong growth in the annual prevalence of ASD. The genetic basis of the disease is defined in about 10–20% of patients. The etiological basis of ASD is the subject of numerous studies, and during the last twenty years the focus of many studies has been on the mechanisms of epigenetic dysregulation. According to today's knowledge, ASD is a multifactorial disease, which arises as a result of the interaction of various genetic and environmental factors. These factors affect specific neuronal circuits, oxidative stress, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction. This disrupts the development of the nervous system, the formation of synapses, the connection between brain regions and the size of the brain. The non-syndromic form of ASD refers to individuals who, apart from the clinical elements of ASD, have no other associated features. The prevalence of hereditary metabolic diseases associated with non-syndromic ASD is low (<0.5%) and therefore indicates a low cost-effectiveness of systemic metabolic treatment. The main biochemical mechanisms proposed in ASD include mitochondrial dysfunction, oxidative stress, impaired methylation capacity, and altered amino acid metabolism. Metabolomic diagnostics can monitor rapid daily variations in metabolic processes, which can assess the complex relationship between the etiology of the disease and the physiology of the organism, providing a comprehensive functional phenotype, but the application of metabolomic analyzes in clinical practice is still far from being used in clinical diagnostic routine.

Poremećaj iz spektra autizma (PSA) kompleksan je neurobiološki poremećaj koji započinje u ranom djetinjstvu i obilježen je poteškoćama u socijalnoj interakciji, komunikaciji uz ograničene, ponavljajuće obrasce ponašanja. Ima širok spektar simptoma te se može razlikovati od osobe do osobe. Nije stanje koje se može „izliječiti“, no uz intervencije i podrške može se značajno poboljšati kvaliteta života osoba s autizmom i njihovih obitelji. Revidiranom verzijom Dijagnostič-

kog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje – 5 (DSM-5-TR) poremećaj je heterogen i obilježen trajnim nedostatkom u recipročnoj društvenoj komu-

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Silvija Pušeljić, dr. med., <https://orcid.org/0000-0002-9500-2185>
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek;
Medicinski fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku,
Cara Hadrijana 10E, 31000 Osijek; e-pošta: puseljic.silvija@kbo.hr

nikaciji i socijalnoj interakciji (Kriterij A) i ograničeni i/ili ponavljajući obrasci ponašanja, interesa ili aktivnosti (Kriterij B), prisutni od ranog djetinjstva (Kriterij C) koji uzrokuju klinički značajna oštećenja u društvenim, profesionalnim ili drugim važnim područjima trenutnog funkcioniranja (Kriterij D). Uz riječ „autizam“ dodatno je ubačena i riječ „spektar“ jer postoji velika varijabilnost u težini i uzorku simptoma, napredovanju bolesti i prognozi.¹

Prevalencija PSA-a

Epidemiološka istraživanja pokazuju trend snažnog rasta godišnje prevalencije PSA-a. Procjene prevalencije također se jako razlikuju među studijama iz različitih zemalja, u rasponu od manje od 0,2% u Kini i Italiji do 2,7% u Južnoj Koreji.² Prema američkom Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) prevalencija PSA-a značajno je porasla te sada jedno od 36 djece u SAD-u ima poremećaj iz spektra autizma. CDC je od 2004 godine uveo mrežu za praćenje autizma i razvojnih poteškoća (engl. *Autism and Developmental Disabilities Monitoring*, ADDM). Prvo izvješće iz 2004. imalo je prevalenciju od 1 na 166 djece, a taj se broj do kraja 2023. povećao za 417% otkada je CDC počeo praćenje. Oko četiri puta je češći kod muškaraca nego kod žena.³ Ovakav trend porasta svakako nije zato što bolje dijagnosticiramo, jer da dijete razvojno odstupava vidi i roditelj ili član obitelji koji nema medicinsku naobrazbu. Isto tako, kroz dvadesetak godina nije došlo do tako dramatične promjene DNA osnove da bi se genetičkim uzrocima objasnila etiologija.

Genetičke promjene kod PSA-a

Studije sekvenciranja cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing*, WES) dobro su opisale više od 100 gena rizika za PSA, čime je genetska podloga bolesti definirana kod oko 10 – 20% osoba s PSA-om.⁴ Varijante na razini nuklearne sekvence identificirane su kod 52%, strukturne nuklearne varijante kod 46%, a 2% bile su mitohondrijske varijante.⁵ Sekvenciranje egzoma (WES) je stoga klinički dijagnostički test za osobe s neurorazvojnim poremećajima, uključujući PSA, s molekularnim dijagnostičkom prinosom od 16% za PSA.⁶ Dodatno, kromosomski mikronizovi (engl. *chromosomal microarray analysis*, CMA) otkrili su definitivno patogene varijante broja kopija (engl. *copy number variation*, CNV) u 5,4% do 14% osoba s PSA-om.⁷ *De novo* varijante u nekodirajućim regijama genoma, posebno gena promotora, donose također nove spoznaje etiopatogeneze PSA-a, te su u tijeku i nove studije sekvenciranja cijelog genoma (engl. *Whole Genom Sequencing*, WGS) za osobe s PSA-om.⁸

Uloga epigenetičkih promjena kod PSA-a

Upravo radi otvorenih pitanja etiološke osnove PSA je predmet brojnih istraživanja, a tijekom posljednjih dvadesetak godina fokus mnogih studija usmjeren je na mehanizme epigenetske disregulacije, promjena aktivnosti gena bez utjecaja na sekvencu DNA. Na granici između genetskih i okolišnih utjecaja, istraživanje epigenetskih modifikacija kao što je metilacija DNA otkriva nove uvide koji nisu vidljivi u sekvenci DNA. Epigenetika je integrirana s genetikom, jer genetička varijacija često utječe na epigenetsku varijaciju.⁹ Okolišni čimbenici djeluju mijenjanjem odgovarajućih obrazaca ekspresije gena, te mogu ostaviti karakteristične „potpise“ na razini epigenetskih modifikacija koje ostavljaju dugotrajne učinke na ekspresiju gena, osobito kada se izloženost dogodi za vrijeme intrauterinog razvoja ili u ranom postnatalnom životu.¹⁰ DNA metilacija je najčešće proučavana epigenetska modifikacija u genomskim studijama PSA-a jer je DNA metilacija relativno stabilna oznaka u tkivima, u odnosu na RNA ili histonske modifikacije. Biološki gledano, metilacija DNA u ljudskom genomu vrlo je obilna, u korelaciji je s drugim epigenetskim procesima uključujući modifikacije kromatina i histona.¹¹ PSA je prema današnjim spoznajama multifaktorska bolest, a nastaje kao rezultat interakcije različitih genetskih i okolišnih čimbenika. Ovi čimbenici utječu na specifične neuronske krugove, oksidativni stres, neuroinflamaciju i disfunkciju mitohondrija. Time se remeti razvoj živčanog sustava, stvaranje sinapsi, povezanost između regija mozga i veličina mozga.

Poodmakla dob roditelja jedan je od najdosljednije identificiranih perinatalnih čimbenika rizika za poremećaj iz autističnog spektra.¹² Većina studija opisuje povećanje rizika za dob majke iznad 35 godina, a oca iznad 40 godina. Povećanje PSA-a nije bilo ograničeno samo na poodmaklu dob oca ili majke, već i na razlike u dobi roditelja, uključujući mlađe ili starije roditelje iste dobi, kao i roditelje različite dobi.^{12,13} Ostali čimbenici rizika koji su danas dobro poznati, a utječu na promjenu epigenetskih obrazaca jesu prenatalna uporaba lijekova, posebno antidepresiva i antiepileptika, autoimune bolesti u trudnoći kao što su dijabetes i hipotireoza te infekcije u trudnoći.¹⁴ Okolinski čimbenici imaju važnu, no nerijetko i krivo interpretiranu ulogu. Posebno roditelji tijekom procesa suočavanja s činjenicom da njihovo dijete ima PSA sami istražuju uzroke i nerijetko prihvaćaju i zagovaraju teorije koje nisu nužno potkrijepljene rezultatima znanstvenih istraživanja. Kada se spomene termin „okolinski uzroci“ to se može odnositi na bilo koji čimbenik koji može utjecati na nastanak PSA-a. Rano izlaganje kemijskim stresorima uključujući olovo, bisfenol A, etanol, fluok-

setin hidroklorid može potaknuti ili pogoršati PSA. Izloženost zagađivačima zraka iz okoliša pri rođenju ili izloženost djeteta duhanskom dimu također doprinosi promjenama epigenetskih odgovora.¹⁵

Nasljedne metaboličke bolesti i PSA

Autizam i nasljedne metaboličke bolesti dva su različita stanja, ali mogu biti povezana na određene načine. Iako je svaki nasljedni metabolički poremećaj (engl. *inherited metabolic disorders*, IMD) rijedak zasebno, zajedno kao skupina bolesti imaju kombiniranu incidenciju od 1:800 do 1:2.500.¹⁶ Temeljno je potrebno razlikovati dva tipa PSA-a: sindromsku varijantu, kada pojedinac s PSA-om ima i druge komorbiditete kao što su epilepsija, motorički deficiti, dismorfična obilježja, i druge manifestacije ili bolesti koje mogu doprinijeti autističnom fenotipu. Nesindromska forma PSA-a odnosi se na pojedince koji osim kliničkih elemenata PSA-a nemaju druga pridružena obilježja. Prevalencija IMD-a među osobama s PSA-om procijenjena je u različitim studijama, u rasponu od 0,7% do 2,7%.¹⁷ Poznate su IMD čija klinička prezentacija uključuje i PSA, no većina njih daje i druga klinička odstupanja te se prepoznaju temeljem kliničke slike koja je više ili manje dio simptoma pojedinog IMD-a. Poremećaji metabolizma i transporta aminokiselina kao što su fenilketonurija, homocistinurija, nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze, nedostatak razgranatog lanca α -ketokiselinske dehidrogenaze kinaze; poremećaji ciklusa ureje; neke organske acidurije kao što su propionska acidurija, L-2 hidroksiglutarina acidurija; defekti biosinteze kolesterola (Smith-Lemli-Opitzov sindrom); mitohondrijski poremećaji (mitohondrijska encefalomiopatija, laktacidoza i moždani udar epizode – MELAS sindrom); poremećaji neurotransmitera (nedostatak jantarne semialdehid dehidrogenaze); poremećaji metabolizma purina (nedostatak adenilosukcinat liaze [ADSL], Lesch-Nyhanov sindrom); sindromi cerebralne deficijencije kreatina (CCDS); poremećaji transporta i metabolizma folata (cerebralni nedostatak folata, nedostatak metilentetrahidrofolat reduktaze); poremećaji lizosomalnog skladištenja (Sanfilippov sindrom, neuronske ceroidne lipofuscinoze [NCL]); Niemann-Pickova bolest tipa C; cerebrotendinozna ksantomatoza (CTX); poremećaji metabolizma bakra (Wilsonova bolest); poremećaji biosinteze hema (akutna intermitentna porfirija [AIP] i bolesti nakupljanja željeza u mozgu).¹⁸ Većina navedenih IEM-a ima i drugu složenu simptomatologiju, a kognitivni poremećaj ili slika PSA-a u ovim okolnostima dio su šireg fenotipa te je očekivano da će tijekom obrade zbog drugih vodećih simptoma pojedinog poremećaja primarna laboratorijska i metabolička obrada ukazati na specifična odstupanja.

Nesindromski PSA i nasljedne metaboličke bolesti

Nasljedne metaboličke bolesti odnose se na poremećaje metabolizma koji su uzrokovani genetskim mutacijama koje za posljedicu imaju poremećaj normalnih metaboličkih procesa. Kada razmatramo metaboličku obradu koju uobičajeno provodimo kod sumnje na neku IMD, čini se da je dijagnostički učinak metaboličkih ispitivanja u bolesnika s izoliranim PSA-om i bez kliničkih simptoma nizak.^{17,19} U vrlo rijetkim situacijama PSA se može pojaviti kao izolirani poremećaj na početku nekoliko IMD-a, kao što je neliječena fenilketonurija koja je dio redovnog novorođenačkog probira u republici Hrvatskoj te eventualno klasična homocistinurija ili Sanfilippova bolest. Kod nas se još primjećuje da se i dalje rutinski provodi metabolički probir kod većeg broja bolesnika s PSA-om bez obzira na izostanak pridruženog kliničkog fenotipa; ovo se prvenstveno odnosi na nesindromski oblik PSA-a. Retrospektivna studija Schiffa i suradnika istražila je dobrobiti takvoga sustavnog probira kod 274 bolesnika s nesindromskim PSA-om. Kod svih pacijenata učinjen je probir na mukopolisaharidoze, urođene pogreške metabolizma purina i pirimidina, sindrome nedostatka kreatina, organske acidurije i aminoacidopatije (mukopolisaharidi u urinu, purini i pirimidini u urinu, kreatin i gvanidinoacetat u urinu, organske kiseline u mokraći i aminokiseline u plazmi i urinu). Ova najveća sveobuhvatna analiza pokazala je da je učinjenom metaboličkom obradom provedenom na uzorku od 274 pacijenta s dijagnozom nesindromskog PSA-a kod svega jednog pacijenta verificirano trajno izlučivanje 3-metilglutakonične kiseline mokraćom. Dakle, negativni rezultati bili su kod 99,5% pacijenata, što se zapravo ne razlikuje od procijenjene prevalencije IMD-a u općoj populaciji. Ovi rezultati sugeriraju da je prevalencija IMD-a povezanog s nesindromskim PSA-om niska (<0,5%) i stoga ukazuju na slabu isplativost njihove sustavne metaboličke obrade.^{19,20} Slična opažanja imam i u osobnoj kliničkoj praksi, gdje sam na početku svoga rada gotovo svoj nesindromskoj djeci sa PSA-om radila metaboličku obradu ipak manjeg opsega nego u studiji Schiffa i suradnika (organske kiseline, aminokiseline, krniti, profil acilkrnitina) te nisam imala pozitivne rezultate, zbog čega već dulji niz godina ne provodim više ovakav sustavni pristup jer nema klinička opravdanja. Ključna je pažljiva klinička procjena, uz opreznu ponovnu procjenu kliničkih znakova. Takva medicinska praksa čini se razumnijom od skupe sustavne obrade.

Disfunkcija mitohondrija i metabolomika kod PSA-a

Glavni biokemijski mehanizmi predloženi u PSA-u uključuju disfunkciju mitohondrija²¹, oksidativni stres²²,

oslabljen kapacitet metilacije²³ i promijenjen metabolizam aminokiselina.²⁴ Istraživanja ukazuju da su pacijenti s PSA-om imali te metaboličke abnormalnosti u regijama mozga uključenim u govornu i slušnu obradu, socijalno ponašanje, senzornu i motoričku koordinaciju i pamćenje, što su ključni simptomi PSA-a.²⁵ Nekoliko mitohondrijskih funkcionalnih biomarkera, kao što su laktat, piruvat, karnitin i ubikinon, značajno su promijenjeni kod PSA-a, dok neki čak koreliraju s težinom poremećaja.^{21,25} Poznato je da mitohondriji proizvode većinu stanične energije putem oksidativne fosforilacije te su važan izvor reaktivnih vrsta kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Osim proizvodnje energije, mitohondriji igraju vitalnu ulogu u homeostazi kalcija, imunološkim i upalnim odgovorima, ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa i apoptozi. Mitohondriji imaju vlastiti genom (mtDNA), koji kodira 37 bitnih gena za pravilne mitohondrijske i stanične funkcije. Prema nekim novijim istraživanjima gotovo 80% bolesnika s PSA-om ima neki oblik mitohondrijske disfunkcije, no ne i klasičnu mitohondrijsku bolest, pa je ona aktualno referirana kao ključna u patogenezi PSA-a.²⁶ Mitohondrijska disfunkcija može biti uzrokovana primarnom disfunkcijom koja je uzrokovana mutacijom u genu koji izravno sudjeluje u proizvodnji ATP-a i sekundarnom disfunkcijom uzrokovanom drugim genetskim, metaboličkim i biokemijskim abnormalnostima koje utječu na sposobnost mitohondrija da generiraju ATP.²⁷ Biokemijske studije ukazuju na nedostatke mitohondrijske oksidativne fosforilacije u ispitanika s PSA-om, dok se uloga varijacija mitohondrijske DNA tek istražuje. Ono što trenutno znamo: mitohondrijske funkcionalne varijacije mogu igrati važnu ulogu u izazivanju ili povećanju osjetljivosti na PSA i u tom pravcu razmatraju se i istražuju i potencijalne terapijske strategije.²⁸ Budućnost dijagnostike PSA-a svakako predstavlja metabolomika, a radi se o tehnici kojom se može identificirati prisutnost cijelih skupova molekula niske molekularne težine (<1000 Da) u biološkim uzorcima (urin, feces, plazma, cerebrospinalna tekućina). Metabolomičkom dijagnostikom može se pratiti brze dnevne varijacije u metaboličkim procesima, čime se može procijeniti složen odnos između etiologije bolesti i fiziologije organizma pružajući sveobuhvatan funkcionalni fenotip. S obzirom na to da se metabolomičke tehnike temelje na prikupljanju bioloških uzoraka, njihova neinvazivnost predstavlja još jednu jaku stranu ovog pristupa, posebno u kontekstu osoba s PSA-om. Metabotip može odražavati kliničku heterogenost autizma; nekoliko metabolita može biti izraz disreguliranih metaboličkih putova. Međutim, primjena metabolomičkih analiza u kliničkoj praksi još je daleko od uvođenja, što znači da postoji potreba za daljnjim studijama za potpuni prijelaz metabolomike iz kliničkih istraživanja u kliničku dijagnostičku rutinu.

Zaključak

Poremećaj iz spektra autizma (PSA) kompleksan je neurobiološki poremećaj koji pokazuje trend snažnog rasta godišnje prevalencije. Genetska podloga bolesti može se definirati kod oko 10 – 20% pacijenata. Etiološki je posrijedi multifaktorska bolest koja nastaje kao rezultat interakcije različitih genetskih i okolišnih čimbenika koji utječu na specifične neuronske krugove, oksidativni stres, neuroinflamaciju i disfunkciju mitohondrija. Prevalencija nasljednih metaboličkih bolesti povezanih s nesindromskim oblikom PSA-a je niska (<0,5%) i stoga ukazuje na slabu isplativost sustavne metaboličke obrade istih. Metabolomičkom dijagnostikom može se pratiti brze dnevne varijacije u metaboličkim procesima, čime se može procijeniti složen odnos između etiologije bolesti i fiziologije organizma pružajući sveobuhvatan funkcionalni fenotip, no primjena metabolomičkih analiza u kliničkoj praksi još je daleko od primjene u kliničkoj dijagnostičkoj rutini.

LITERATURA

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington, DC, USA: American psychiatric Association; 2022. Text Revision.
2. Salari N, Rasoulpoor S, Rasoulpoor S, Shohaimi S, Jafarpour S, Abdoli N i sur. The global prevalence of autism spectrum disorder: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Italian Journal of Pediatrics*. 2022;48. <https://doi.org/10.1186/s13052-022-01310-w>.
3. Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder; 2023 Community Report on Autism. <https://www.cdc.gov/>
4. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY i sur. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*. 2020;180:568–84.e23. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.036.
5. Trost B, Thiruvahindrapuram B, Chan AJS, Engchuan W, Higinbotham EJ, Howe JL i sur. Genomic architecture of autism from comprehensive whole-genome sequence annotation. *Cell*. 2022;185:4409–27.e18. doi: 10.1016/j.cell.2022.10.009.
6. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK i sur. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: Exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med*. 2019;21:2413–21. doi: 10.1038/s41436-019-0554-6.
7. Hyman SL, Levy SE, Myers SM, Kuo DZ, Apkon S, Davidson LF i sur. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. 2020;145: e20193447. doi: 10.1542/peds.2019-3447.
8. Havdahl A, Niarchou M, Starnawska A, Uddin M, van der Merwe C, Warriar V. Genetic contributions to autism spectrum disorder. *Psychol Med*. 2021;51:2260–73. doi: 10.1017/S0033291721000192.
9. Heyn H. A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front Genet*. 2014;5:113.
10. Vlahos A, Mansell T, Saffery R, Novakovic B. Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, envi-

- ronmental exposure, and pregnancy outcome. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008236.
11. Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epi-genetics.* 2017;12:416–32.
 12. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2017;135(1):29–41. doi: 10.1111/acps.12666.
 13. Sandin S, Hultman CM, Kolvezon A, Gross R, MacCabe JH, Reichenberg A. Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2012;51(5):477–86.e1. doi: 10.1016/j.jaac.2012.02.018. Epub 2012 Apr 5. Erratum in: *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2012;51(6):660.
 14. Han L, Guan L, Zhang Z, Li W, Li J, Bao C i sur. Risk factors and clinical characteristics of autism spectrum disorder with regression in China. *Autism Research.* 2023;16(9):1836–46. <https://doi.org/10.1002/aur.3008>.
 5. Arora A, Becker M, Marques C, Oksanen M, Li D, Mastro-pasqua F i sur. Screening autism-associated environmental factors in differentiating human neural progenitors with fractional factorial design-based transcriptomics. *Sci Rep.* 2023; 13(1):10519. doi: 10.1038/s41598-023-37488-0.
 16. Pampols T. Inherited metabolic rare disease. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:397–431. doi: 10.1007/978-90-481-9485-8_23.
 17. Campistol J, Diez-Juan M, Callejon L, Fernandez-De Miguel A, Casado M, Garcia Cazorla A i sur. Inborn error metabolic screening in individuals with nonsyndromic autism spectrum disorders. *Dev Med Child Neurol.* 2016;58:842–7. doi: 10.1111/dmcn.13114.
 18. Žigman T, Petković Ramadža D, Šimić G, Barić I. Inborn Errors of Metabolism Associated With Autism Spectrum Disorders: Approaches to Intervention. *Front Neurosci.* 2021; 15:673600. doi: 10.3389/fnins.2021.673600.
 19. Schiff M, Benoist JF, Aïssaoui S, Boespflug-Tanguy O, Mouren MC, de Baulny HO i sur. Should metabolic diseases be systematically screened in nonsyndromic autism spectrum disorders? *PLoS ONE.* 2011;6:e21932. doi: 10.1371/annotation/456e2365-a067-4063-b11b-6a2abeba3f20.
 20. Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child.* 2006;91(11):896–9. doi: 10.1136/adc.2005.091637. Epub 2006 May 11.
 21. Frye RE. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: Unique Abnormalities and Targeted Treatments. *Semin Pediatr Neurol.* 2020;35:100829. doi: 10.1016/j.spn.2020.100829.
 22. Chen L, Shi XJ, Liu H, Mao X, Gui LN, Wang H i sur. Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). *Transl Psychiatry.* 2021;11:15. doi: 10.1038/s41398-020-01135-3.
 23. Guo BQ, Ding SB, Li HB. Blood biomarker levels of methylation capacity in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2020;141:492–509. doi: 10.1111/acps.13170.
 24. Indika NR, Deutz NEP, Engelen M, Peiris H, Wijetunge S, Perera R. Sulfur amino acid metabolism and related metabolites of autism spectrum disorder: A review of biochemical evidence for a hypothesis. *Biochimie.* 2021;184:143–57. doi: 10.1016/j.biochi.2021.02.018.
 25. Rossignol DA, Frye RE. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. *Front Physiol.* 2014;5:150. doi: 10.3389/fphys.2014.00150.
 26. Sidenkova A. Mitochondrial disorders and ASD. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in ASD. *European Psychiatry.* 2023;66(S1):S100–S101. doi:10.1192/j.eurpsy.2023.285.
 27. Balachandar V, Rajagopalan K, Jayaramayya K, Jeevanandam M, Iyer M. Mitochondrial dysfunction: A hidden trigger of autism? *Genes Dis.* 2020 Jul 16;8(5):629–639. doi: 10.1016/j.gendis.2020.07.002.
 28. Citrigno L, Muglia M, Quattieri A, Spadafora P, Cavalcanti F, Pioggia G i sur. The Mitochondrial Dysfunction Hypothesis in Autism Spectrum Disorders: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5785. doi: 10.3390/ijms21165785.
 29. Siracusano M, Arturi L, Riccioni A, Noto A, Mussap M, Mazzone L. Metabolomics: Perspectives on Clinical Employment in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13404. doi: 10.3390/ijms241713404.