



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN İKİZLERDE
KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN
VİTAMİN D RESEPTÖRÜ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Tuba KÖSE

Tez DanıŐmanı

Doç. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR

Ana Bilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Program Adı

Tıbbi Biyoloji

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKİM/2019

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında Tuba Köse tarafından hazırlanan
“OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN İKİZLERDE
KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN
VİTAMİN D RESEPTÖRÜ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”
Başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Üye: Prof. Dr. Ülkan KILIÇ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Üye: Doç. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İmmünoloji AD.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Üye: Prof. Dr. İlhan ONARAN

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Tıbbi Biyoloji AD.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Üye: Doç. Dr. Neslihan ABACI

İstanbul Üniversitesi ASDETAE, Genetik AD.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 21 /10 / 2019

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile
onaylanmıştır.

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Seniz KARACAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuba KÖSE

21/10/2019



ÖZET

“OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN İKİZLERDE KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN VİTAMİN D RESEPTÖRÜ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”

Amaç: Otizm spektrum bozukluğu (OSB), tüm dünyada yaklaşık 1/59 sıklıkla görülen nörogelişimsel bir bozukluktur. Hastalık genellikle yaşamın ilk üç yılı olan bebeklik döneminde ortaya çıkmaktadır. D vitamini metabolizması, katabolizması ve transportu ile ilgili genlerdeki varyasyonların otizm spektrum bozukluklarının potansiyel bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Otizm etiyolojisinin aydınlatılması için yapılan ikiz araştırmaları, kopya sayısı değişiklikleri (CNV) ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) otizm spektrum bozukluğunun etiyolojisinde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır. Ancak çoğu hastada hastalığın altında yatan genetik neden bilinmemektedir. Bu çalışmada, CNV değişikliklerine bağlı olarak VDR geninin OSB’li ikizlerdeki varyant analizlerini yaparak hastalık oluşum mekanizmalarının aydınlatılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya 64 otizm spektrum bozukluğuna sahip dizigotik ikiz hasta ve 100 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Periferik kan örneklerinden, genomik DNA izole edildi. Spektrofotometrik ölçümleri yapılan DNA’ların ApaI, TaqI ve FokI bölgelerine özgü tasarlanmış primerler ile PCR işlemi gerçekleştirildi. Uygun enzimler ile RFLP işlemi gerçekleştirilerek genotipleme yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde kategorik verilerin karşılaştırılması için Ki-Kare Testi ve ilgili bölgelerin lokalizasyonuna bağlı olarak da lojistik regresyon ve haplotip analizi yapıldı.

Bulgular: Çalışmamıza göre FokI (rs2228570 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda mutant CC genotipi taşıma frekansı, ApaI (rs7975253 G/T) genotipleri açısından hasta grubunda mutant TT genotipi taşıma frekansı ve TaqI (rs731236 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda mutant CC genotipi taşıma frekansı kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermiştir (p:0,019, p:0,039, p:0,037).

Sonuç: Bu çalışmada OSB görülen çocukluk çağı dizigotik ikiz olgulardan oluşan bir Türk popülasyonunda VDR geninin üç ayrı varyantındaki tek nükleotid değişimleri incelendi ve hastalık oluşumu ile ilişkileri belirlendi. Genotipik olarak her üç bölge içinde hastaların kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği ortaya kondu. SNP'lerin allel frekansları açısından bakıldığında ise ApaI ve TaqI allel frekanslarının OSB olan dizigotik hastalarla sağlıklı kontroller arasında istatistiksel açıdan anlamlılık gözlenirken FokI varyantı için hasta ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Otizm spektrum bozukluğu, VDR polimorfizm, İkiz çalışmaları



ABSTRACT

“INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE NUMBER OF COPY DIFFERENCES WITH THE VITAMIN D RECEPTOR IN TWINS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS”

Objective: Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with a prevalence of approximately 1/59 in the world. The disease usually occurs in infancy during the first three years of life. Variations in genes related to vitamin D metabolism, catabolism and transport are thought to be a potential risk factor for autism spectrum disorders. Twin studies to clarify the etiology of autism, copy number variations (CNV) studies, and genome-wide association studies (GWAS) provide strong evidence that genetic factors play an important role in the etiology of autism spectrum disorder. However, the genetic cause of the disease is not known in most patients. In this study, we aimed to clarify the pathogenesis and pathophysiology of VDR gene in the twins with ASD, especially in the literature due to CNV changes.

Material and Methods: The study included 64 patients with dizygotic twins with autism spectrum disorder and 100 healthy subjects. Genomic DNA was isolated from blood samples taken into hemogram tubes with EDTA. DNA spectrophotometric measurements were performed with PCR designed with region-specific primers. After PCR procedure, RFLP was performed with appropriate enzymes to determine genotypes. The results were statistically evaluated by Chi Square Test and Haplotype analysis.

Results: When the results of our study were examined, the frequency of the variant CC genotype of FokI(rs2228570 T / C), the frequency of the variant TT genotype of ApaI(rs7975253 G / T) and the frequency of the variant TT genotype of TaqI(rs731236 T / C) was significantly higher than control group (p: 0,019, p: 0,039, p: 0,037).

Conclusion: In this study, single nucleotide changes in three different variants of VDR gene were investigated in a Turkish population of dizygotic twin cases with ASD. Genotypically, it was found that patients showed statistically significant difference in all three regions compared to controls. In terms of allele frequencies of SNPs, it was observed that ApaI and TaqI allele frequencies were statistically significant between dizygotic patients with ASD and healthy controls, whereas there was no statistically significant difference between patients and healthy individuals for FokI variant.

Key Words: Autism spectrum disorder, VDR polymorphism, Twin studies



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgilerini ve desteğini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a,

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlanırken gösterdiği hoşgörü ve sabır için yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR' a,

Yüksek lisans eğitim hayatımda hem bilgi birikiminden yararlandığım hem de manevi desteğini hissettiğim İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı değerli hocam Doç. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a,

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi için gerekli hasta ve kontrol grubu örneklerinin sağlanmasında büyük yardımları olan Dr. Öğr. Üyesi Ceyda HAYRETDAG, Uzm. Dr. Pınar ALGEDİK ve Uzm. Dr. Serdar BOZLAK' a,

Tez çalışmam boyunca yanımda olarak desteklerini hiç esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım MSc. Burçin ERKAL, MSc. Kübra GÜNDÜZ, MSc. Rabia KALKAN, BSc. Kübra ÖZTÜRK, MSc. Bahar SARIKAMIŞ, MSc. Halime YILDIRIM ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Son olarak hayatım boyunca benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:2019/028

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | viii |
| ÇİZELGE TABLOSU..... | ix |
| ŞEKİLLER TABLOSU | x |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU (OSB)..... | 3 |
| 2.1.1 Tanım ve Tarihçe..... | 3 |
| 2.1.2 Otizm Spektrum Bozukluğu Tanı Kriterleri ve Semptomları | 4 |
| 2.1.3 Epidemiyoloji..... | 7 |
| 2.1.4 Etiyoloji | 8 |
| 2.1.5 OSB'ye Genetik Yaklaşım | 8 |
| 2.2. D VİTAMİNİ VE D VİTAMİNİ METABOLİZMASI | 10 |
| 2.3. D VİTAMİNİ RESEPTÖR GENİ VE POLİMORFİZMLERİ | 11 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 13 |
| 3.1. GEREÇLER | 13 |
| 3.1.1 Çalışmada Kullanılan Örnekler | 13 |
| 3.1.2 Kullanılan Cihazlar | 13 |
| 3.1.3 Kimyasal Maddeler | 15 |
| 3.1.4 Kullanılan Ticari Kitler | 16 |
| 3.1.5 Kullanılan Primerler | 16 |
| 3.1.6 Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları..... | 16 |
| 3.1.7 Kullanılan Solüsyonlar..... | 17 |
| 3.2. YÖNTEMLER..... | 18 |
| 3.2.1 Periferik Kandan DNA izolasyonu | 18 |
| 3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 20 |
| 3.2.3 Restriksiyon Enzimi Analizi | 21 |
| 3.2.4 İstatistiksel Analizler..... | 21 |
| 4. BULGULAR | 23 |
| 4.1. FOKİ POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ | 23 |
| 4.2. APAI POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ | 24 |

| | | |
|------|-----------------------------------------|----|
| 4.3. | TAQI POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ..... | 25 |
| 4.4. | GENOTİPLEME BULGULARI..... | 26 |
| 4.5. | BAĞLANTI ANALİZİ SONUÇLARI..... | 28 |
| 4.6. | LOJİSTİK REGRESYON SONUÇLARI..... | 29 |
| 5. | TARTIŞMA | 31 |
| 6. | SONUÇLAR..... | 35 |
| | KAYNAKLAR..... | 37 |
| | EKLER..... | 41 |
| 2.5. | EK 1 | 41 |
| 2.6. | EK 2 | 42 |
| 2.7. | EK 3..... | 44 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 47 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASD: Otizm Spektrum Bozukluğu, Autism Spectrum Disorder

CDC: Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi, Centers for Disease Control and Prevention

CHD: Cadherin

CNV: Kopya Sayısı Değişiklikleri, Copy Number Variation

COL2A1: Kolojen tip 2 alfa 1

DSM: Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel Kılavuzu, The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

GWAS: Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları, Genome Wide Association Studies

ICD: Uluslararası Hastalık Sınıflandırılması, International Classification of Diseases

LD: Bağlantı eşitsizliği, Linkage Disequilibrium

M-CHAT: Değiştirilmiş Erken Çocukluk Dönemi Otizm Tarama Ölçeği, Modified Checklist for Autism in Toddlers

OSB: Otizm Spektrum Bozukluğu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Polymerase Chain Reaction

RFLP: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi, Restriction Fragment Length Polymorphism

RXR: Retinoik Asit Reseptörü

VDR: Vitamin D reseptörü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization

YGB: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

YGB-BTA: Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk

ÇİZELGE TABLOSU

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1: DSM-V, OSB Tanı Ölçütleri | 5 |
| Çizelge 2.2: Otizm spektrum bozukluğundan etkilenme düzeyleri | 6 |
| Çizelge 3.1: Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar | 13 |
| Çizelge 3.2: Çalışmalar sırasında kullanılan malzemeler | 15 |
| Çizelge 3.3: PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri | 16 |
| Çizelge 3.4: RFLP yöntemi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve tamponları | 16 |
| Çizelge 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve reaksiyon koşulları. | 20 |
| Çizelge 3.6: PCR kondüsyonları..... | 20 |
| Çizelge 3.7: Restriksiyon enzimleri ve kesim şartları | 21 |
| Çizelge 3.8: VDR geni polimorfik bölgelerinin PCR ürünleri ve restriksiyon fragment uzunlukları..... | 21 |
| Çizelge 4.1: OSB ve Kontrol gruplarına ait FokI genotip ve allel dağılımları | 26 |
| Çizelge 4.3: OSB ve kontrol gruplarına ait TaqI genotip ve allel dağılımları..... | 27 |
| Çizelge 4.4: OSB hastaları arasında ApaI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı | 27 |
| Çizelge 4.5: OSB hastaları arasında TaqI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı | 27 |
| Çizelge 4.6: OSB hastaları arasında FokI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı | 27 |
| Çizelge 4.7: Varyantların bağlantı eşitsizliği için r^2 değerleri | 28 |
| Çizelge 4.8: Allelik, Recessif ve Dominant grupların karşılaştırılması..... | 29 |

ŞEKİLLER TABLOSU

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: D vitamini reseptörünün kromozomal ve protein alanları. VDR geni 12. kromozomu üzerinde yer almaktadır. VDR'de FokI, BsmI, ApaI, TaqI ve Tru9I (SNP'ler) tanımlanmıştır. | 12 |
| Şekil 4.1: FokI PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü..... | 23 |
| Şekil 4.2: FokI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü..... | 24 |
| Şekil 4.3: ApaI PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü. | 24 |
| Şekil 4.4: ApaI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü. | 25 |
| Şekil 4.5: TaqI PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü..... | 25 |
| Şekil 4.6: TaqI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü..... | 25 |
| Şekil 4.7: Varyantların bağlantı eşitsizliği için r^2 değerleri grafiği..... | 28 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (ASD, OSB), tüm dünyada yaklaşık 1/59 sıklıkla görülen nörogelişimsel bir bozukluktur. Hastalık genellikle yaşamın ilk üç yılı olan bebeklik döneminde ortaya çıkmaktadır (1). Azalmış sosyal ilişki, iletişim sorunları ve stereotipik davranışlar ASD'nin tipik klinik özellikleridir ve nörokimyasal ve genetik faktörlerin nörobiyolojisine dahil olduğu düşünülmektedir (2). Amerikalı çocuk psikiyatristi Dr. Leo Kanner 1943 yılında 11 çocuğun davranışını tarif ettiği bir makale yayınlamış ve makalesinde ilk kez "otistik" tanımını kullanmıştır (3). Otizm (ya da otistik bozukluk) günümüzde Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel Kılavuzu'na (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder V, DSM-V) göre yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) başlığı altında incelenen bir bozukluktur (4,5). Otistik bozuklukların tanısında DSM-V, ICD (Uluslararası Hastalık Sınıflandırılması) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından belirlenen ölçütler esas alınmakla birlikte DSM-V kriterleri yaygın olarak kabul görmektedir (6).

OSB, etiolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı kompleks bir hastalıktır (7). OSB gibi kompleks hastalıklar Mendeliyen hastalıklar gibi düzenli kalıtım göstermemektedir (7,8). Günümüzde gerçekleştirilen çalışmalar ile olguların birçoğunda genetik etiyojijiyi aydınlatmaya yönelik deliller saptanmıştır. İkiz çalışmaları ile elde edilen bulgular monozigot ve dizigot ikizler arasında konkordans oranlarında büyük bir fark olduğunu göstermektedir ve sonuçlar hastalığın kardeşler arasında tekrarlanma riskinin toplum riskine göre yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Otizm erkek çocuklarda kız çocuklarına oranla 4 kat daha fazla gözlenmektedir. Yapılan aile ve ikiz çalışmaları otizmin %90 oranında kalıtsal komponentinin olduğunu göstermiştir (9). Otizm etiolojisinde yer alan genetik nedenler; kromozom anomalileri (~%5), kopya sayısı değişiklikleri (%10-20), Klinik belirtileri kapsamında otizm bulgularının yer aldığı ve tek gen mutasyonlarının neden olduğu genetik sendromlar (~%5) olarak sıralanabilir (10). Bu hastalıkların genetik etiyojisinin aydınlatılmasında karyotip analizleri ile tanımlanan kromozomal düzensizlikler, mikro-array tabanlı kopya sayısı değişiklikleri (copy number variations=CNV) çalışmaları ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) önemli yaklaşımlar olmuştur (11,12). Bugüne kadar birçok gen bu yöntemlerle OSB ile ilişkilendirilmiştir ve ilişkilendirilmeye devam etmektedir (11). OSB ile ilişkilendirilmiş bazı genler ve lokuslar, zekâ geriliği, epilepsi, şizofreni, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu gibi pek çok hastalıkla da ilişkilendirilmiştir (13). Bu

çalışmalar OSB'nin genetik etiolojisinin çok karmaşık olduğunu, bağlantı gösterilen bölgelerdeki genlerin mutasyonlarının kişinin genetik yapısı dolayısıyla farklı klinik tabloları ortaya çıkarabileceğini göstermektedir (5).

D vitamini endokrin sistem, kemik ve kalsiyum homeostazı kontrolünün merkezinde yer alan, hücre çoğalması, kalsiyum emilimi ve hücre farklılaşmasını düzenleyen bir hormondur. Aktif formu 25-dihidroksivitamin D₃'tür (kalsitriol) ve tüm genomik aktivitelerini VDR vasıtasıyla gerçekleştirir. (14). D vitamini diyetle alınabilen bir steroid hormondur. İnsanlarda D vitamini için ana kaynak deridir ve ciltte D vitamininin sentezi güneş ışığını gerektirir. D vitamini beyin, sinir gelişimi ve antioksidan mekanizmalar için önemlidir. Beyin omurilik sıvısı, beyinde D vitamini sentezinde yer alan D vitamini ve enzimleri içerir (15,16).

Vitamin D reseptör (VDR) geni dokuz ekson, sekiz intron içerir ve 12q13.1 kromozomal lokalizasyonda yer alır. Çeşitli VDR polimorfizmleri fonksiyoneldir ve gen ekspresyonunu etkiler. Bunlar, başlangıç kodonunda bulunan FokI ve BsmI, ApaI ve 3'- kodlanmayan bölgede (3'UTR) yer alan TaqI polimorfizmleridir. Bu polimorfizmlerin hepsi, VDR mRNA'sının stabilitesinin düzenlenmesinde yer alır (16–18). Genin promoter bölgesinde yer alan Cdx2 polimorfizmi, kalsiyum emilimini etkileyebilen transkripsiyon aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. VDR polimorfizmleri bazı nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (18–21). Bununla birlikte, OSB için sadece sınırlı veriler mevcuttur (22).

Psikiyatrik bozukluklar ve düşük D vitamini düzeyleri arasında güneş ışığına maruz kalma, cilt pigmentasyonu, doğum mevsimi ve yer enlemi ile ilişkili faktörler arasında bir ilişki kurulmuştur (23). D vitamini düzeylerinin belirlenmesinde, metabolizmasında, katabolizmasında ve transportunda veya D vitamini bağlanmasında rol oynayan genlerdeki herhangi bir varyasyon otizm için potansiyel bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (24). Bu nedenle, vitamin D reseptörü (VDR) dahil olmak üzere D vitamininin aracılık ettiği sinyal yollarının stabilitesi de beyin gelişimi için önemli olabilir (23). VDR, embriyonik gelişim sırasında beynin çeşitli bölümlerinde eksprese edilir ve D vitamininin aktif formu, VDR aracılığıyla çeşitli hedef genleri aktive eder (16). Bu çalışmada amacımız OSB'li ikiz çocuklarda VDR polimorfizmlerinin hastalığın oluşumu ve prognozu ile ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU (OSB)

2.1.1 Tanım ve Tarihçe

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) çocuklarda yaygın olarak görülen nörogelişimsel bir bozukluktur. Bu bozukluk yaş ile uyumlu olmayan davranışlar, yetersiz sosyal iletişim ve basmakalıp motor hareketler ile tanımlanmaktadır (25).

Otizm tanımı ilk olarak Leo Kanner tarafından 1943 yılında 11 çocuk hasta üzerinde yürütülen bir çalışma sonucunda ortaya çıkmıştır. Kanner çocuk hastaların bebeklik dönemlerinden başlayarak diğer insanlar ile iletişim kurmada aşırı derecede yetersiz olduklarını tespit etmiştir. Ayrıca çocuklarda dil gelişiminde yetersizlik, duyu hassasiyet ve tekrarlayan davranışların görüldüğünü de belirtmiştir (3,26).

Kanner otizmlili çocukların tanısında temel ölçüt olarak kullanılabilir bazı kriterler öne sürmüştür. Bu kriterler günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (3);

1. Başka bireylerle sosyal ilişki kuramama
2. Konuşma ve dil gelişiminde aksaklıkların olması
3. Konuşmayı iletişim kurmada kullanmama
4. Ekolali gösterme eğilimi
5. Kişi zamirlerini kullanamama
6. Rutin davranışlarda ısrarcı olma
7. Stereotipik hareketlerin varlığı

Kanner'ın çalışmalarından bağımsız olarak yaklaşık bir yıl sonra, modern anlamda "otizm" kelimesi Avusturyalı hekim Hans Asperger tarafından da kullanılmıştır. Asperger Viyana üniversitesi hastanesinde çalışırken, iletişim kurmakta zorluk çeken, empati gösteremeyen, beden dilini anlamayan ve sesler veya sözlü ifadeler bakımından zayıf bir dili olan, normal ve bazen daha yüksek zekaya sahip çocukları gözlemlemiştir. Bu gözlemler sonucunda Asperger sendromunu tanımlamıştır (27). Asperger sendromu, bireylerin normal bir dil gelişimi ve normal/üstün zeka gelişimine sahip olması ile otizmden ayrılmaktadır (28).

1940'lı yıllarda psikiyatristler ve psikanalistler otistik davranışları çocukluk şizofrenisi ile ilişkilendirmiştir. Fakat hem Kanner hem de Asperger tanımladıkları bozuklukların çocuk şizofrenisi ve zihinsel engellilikten farklı bir durum olduğunu ayırt etmede dikkatli davranarak çalışmalarında otizmi bu durumlardan ayırmayı başarmışlardır. 60 ve 70 yıllarında yapılan

çalışmalarla otizm çocukluk şizofrenisi kavramından tamamen ayrılmıştır. Bilimsel kanıtlar otizmin nörobiyolojik bir bozukluk olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmaları takiben gerçekleştirilen nöropatolojik ve nöroradyolojik çalışmalar otizmde beyin bozukluklarının varlığını desteklemektedir (27,28).

Otizm tanısı ilk olarak 1980 yılında Zihinsel Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı III'te (DSM-III) "Yaygın Gelişimsel Bozukluklar" başlığı altında yer almıştır. 1987 yılında çeşitli düzenlemeler gerçekleştirilerek yayınlanan DSM III-R'de YGB başlığı altında "Otistik Bozukluk" ve "Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel bozukluk" (YGB-BTA) tanıları yer almıştır. 1994 yılında DSM IV ve metin revizyonu gerçekleştirilerek yayınlanan DSM-IV-TR versiyonunda ise Otistik bozukluk, Yaygın Gelişimsel bozukluk, Atipik Otizm, Asperger bozukluğu ve Rett sendromu dahil olmak üzere beş alt kategoriyle yaygın gelişimsel bozukluklara "şemsiye" yaklaşımı getirilmiştir (28).

Son olarak 2013 yılında yayınlanan DSM-V'de, otizm spektrum bozukluğunun tanı kriterleri; sosyal iletişim ve etkileşimde bozukluk ve sınırlı, tekrarlayan davranış durumları başlıkları altında toplanmıştır. Bu belirtilerin erken çocukluk döneminde ortaya çıkması gerekliliğine vurgu yapılarak Asperger sendromu, YGB-BTA ve Yaygın Gelişimsel Bozukluk başlığı altında yer alan diğer durumlar kitapçıktan çıkartılmıştır. Tanımlama için gerekli medikal testlerin yapılması, zihinsel yeterlilik düzeyinin ve dil gelişim durumunun belirtilmesi gerekli kılınmıştır (6,29).

OSB tüm etnik, ırksal ve ekonomik gruplarda görülebilmektedir. Ömür boyu sürececek bir hastalık olmasına rağmen tedaviler ve alınan hizmetler ile hasta bireyin semptomlarında ve işlevlerinde gelişmeler olabildiği görülmüştür (30)

2.1.2 Otizm Spektrum Bozukluğu Tanı Kriterleri ve Semptomları

Otizm Spektrum Bozukluklarının teşhisi uygun bir biyobelirteç bulunamadığından davranışa dayalı olarak yapılmaktadır. Tanı konulabilmesi için yaygın olarak Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından oluşturulan zihinsel bozuklukların tanısında kullanılan bir rehber olan DSM-V kriterleri kullanılmaktadır (31). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile DSM-V' te yer alan tanı kriterleri ile hastaların klinikte %60'ının tanı alabildiğini ortaya konmuştur (32).

Çizelge 2.1: DSM-V, OSB Tanı Ölçütleri

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. Şimdi veya geçmişte farklı şekillerde görülen toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimde sürekli yetersizliğin olması. |
| ▪ Toplumsal-duygusal karşılık vermedeki yetersizlik |
| ▪ Toplumsal etkileşim için kullanılan sözel olmayan iletişimsel davranışlarda yetersizlik |
| ▪ İlişkileri, geliştirmekte, devam ettirmekte ve anlamakta güçlük |
| B. Aşağıda yer alan kriterlerin en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren, şu an veya geçmişte sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ya da etkinlikler. |
| ▪ Basmakalıp veya tekrarlayıcı motor hareketler, obje kullanımı veya konuşma. |
| ▪ Aynı olmakta ısrar, rutine sıkı sıkıya bağlı olma veya ritüelleşmiş sözel ve sözel olmayan davranışlar. |
| ▪ Konu veya yoğunluk açısından anormal olan sınırlı, sabitlenmiş ilgiler. |
| ▪ Duyusal olarak aşırı ya da az duyarlılık veya çevrenin duyusal boyutuna aşırı ilgi. |
| 1. Belirtiler gelişimin erken evrelerinde mevcut olmalı. |
| 2. Belirtiler sosyal, mesleki ve başka önemli alanlarda klinik olarak anlamlı düzeyde bozukluğa yol açmalıdır. |
| 3. Bu bozukluk zihinsel yetersizlik veya genel gelişimsel gerilik sebebi ile olmamalıdır. Zihinsel yetersizlik ve OSB sıklıkla bir arada görülmektedir ancak OSB ve zihinsel engellilik tanısı konulması için sosyal iletişimsel düzeyin genel gelişimin altında olması gerekmektedir. |

Not: DSM-IV'e göre otistik bozukluk, Asperger bozukluğu ve YGB-BTA tanısı almış olanlara OSB tanısı verilmelidir. Sosyal iletişimsel alanda problem olan ancak OSB tanısı almayanlar sosyal (pragmatic) iletişimsel bozukluk açısından değerlendirilmelidir.

- Zihinsel yetersizliğin eşlik edip etmediğini,
- Dil yetersizliğinin eşlik edip etmediğini
- Bilinen bir genetik, tıbbi veya çevresel faktörün eşlik edip etmediğini,
- Başka nörogelişimsel, ruhsal veya davranışsal durumların olup olmadığını,
- Katatoni'nin eşlik edip etmediğini belirtmelidir.

DSM-V’ te otizm spektrum bozukluğundan etkilenmenin üç düzeyi yer almaktadır (25,33).

Çizelge 2.2: Otizm spektrum bozukluğundan etkilenme düzeyleri (26).

| Ciddiyet Düzeyi | Sosyal İletişim | Sınırlı, tekrarlayan davranışlar |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Düzyey 3 “Ağır düzey destek gereksinimi” | Sözel ve sözel olmayan sosyal iletişimdeki ağır yetersizlikler İşlevsellikte önemli bozukluklara Çok sınırlı düzeyde sosyal etkileşim başlatmaya Başkalarından gelen sosyal uyarılara en az düzeyde cevap vermeye neden olur. | Davranışlarda esnekliğin olmaması Değişikliğe uyum sağlamada aşırı güçlük ya da işlevselliğin tüm alanlarını olumsuz yönde etkileyen diğer sınırlı/tekrarlayan davranışlar Odak noktasını ya da eylemini değiştirmede önemli düzeyde stres ve güçlük. |
| Düzyey 2 “Orta düzey destek gereksinimi” | Sözel ve sözel olmayan iletişim becerilerinde önemli yetersizlikler Destek sağlandığında dahi sosyal yetersizliklerin görülmesi; sınırlı sosyal etkileşim başlatma Başkalarından gelen sosyal etkileşim girişimlerine az ya da anormal tepkiler verme. | Davranışlarda esnekliğin olmaması Değişikliğe uyum sağlamada güçlük ya da başkaları tarafından açıkça görülebilecek ve farklı ortamlarda işlevselliği olumsuz yönde etkileyecek kadar sık görülen diğer sınırlı/tekrarlayıcı davranışlar Odak noktasını ya da eylemini değiştirmede stres ve güçlük. |
| Düzyey 1 “Hafif düzey destek gereksinimi” | Destek sunulmadığında sosyal iletişimdeki bozukluklar fark edilebilir yetersizliklere neden olur. Sosyal etkileşim başlatmada güçlük ve başkalarının sosyal girişimlerine atipik tepki verme ya da tepki vermede başarısız olma ile ilgili açık örnekler. Sosyal etkileşime ilgi azalmış gibi görünebilir. | Davranışlarda esnekliğin olmaması bir ya da daha fazla ortamda işlevselliği önemli düzeyde olumsuz olarak etkiler. Etkinlikler arası geçişlerde güçlük. Organizasyon ve planlamadaki problemler bağımsızlığı olumsuz etkiler. |

OSB’li bireylerin sosyal iletişim/ etkileşim davranışları aşağıda yer alan davranış kalıplarını içerebilir;

- Göz temasının az veya hiç olmaması.
- İnsanlara bakmamak ya da dinlememek.
- Keyif alınan nesnelere ve etkinliklerin nadiren başkalarına işaret edilerek veya gösterilerek paylaşılması.
- İsmi söyleyen kişiye ve dikkatini çeken diğer sözlü girişimlere cevap vermemek ya da yavaş cevap vermek.

- Sohbet etmede çeşitli zorluklar yaşama.
- Sıklıkla başkalarını ilgilendirmeyen konular hakkında ve başkalarına cevap hakkı tanımadan meraklı oldukları konular hakkında uzun süre konuşmak.
- Söyledikleri ile uyumlu olmayan yüz ifadeleri, hareketler ve el kol hareketlerinin varlığı.
- Şarkı söyler gibi ya da düz ve robot benzeri sıra dışı bir ses tonuna sahip olmak.
- Başka insanların bakış açısını anlamada güçlük çekme veya başkalarının eylemlerini önceden tahmin etme ve anlamada zorluk yaşamak.

Kısıtlı / tekrarlayan davranışları ise;

- Bazı davranışları sürekli tekrarlamak veya sıra dışı davranışlarda bulunmak. Örneğin; ekolali olarak adlandırılan kelimeleri veya cümleleri tekrarlama davranışı görülür.
- Sayılar, detaylar veya gerçekler gibi belirli konulara sürekli olarak yoğun bir ilgi göstermek.
- Hareketli nesnelere veya nesnelere hareketli parçalarına aşırı odaklanmak.
- Bir rutinde gerçekleştirilen küçük değişikliklere sinirlenmek.
- Işık, gürültü veya sıcaklık gibi duyuşal girdilere karşı diğer insanlardan daha fazla veya daha az duyarlı olmak gibi davranış kalıplarını içerebilir.

OSB'li bireylerde uyku problemleri ve sinirlilik görülebilir. OSB'li insanlar birçok zorlukla karşılaşmalarına rağmen aşağıda belirtilen özellikler dahil olmak üzere birçok güçlü yöne de sahip olabilirler;

- Her şeyi detaylı olarak öğrenebilme ve bilgileri uzun süre hatırlayabilmek.
- Güçlü görsel ve işitsel öğrenen bireyler olmak.
- Matematik, bilim, müzik veya sanatta uzman olmak (30).

2.1.3 Epidemiyoloji

Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezinin (CDC-Centers for Disease Control and Prevention) Otizm ve Gelişimsel Yetersizlikleri İzleme Ağının yayınladığı verilere göre 59 çocuktan 1'in otizm spektrum bozukluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. OSB'nin tüm ırk, etnik ve sosyoekonomik gruplarda gerçekleştiği bildirilmiştir. OSB, erkekler arasında kızlardan 4 kat daha yaygın olarak görülmektedir. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki çalışmalar, OSB'li bireyleri, ortalama %1 ila %2 arasında prevalansla tanımlamaktadır (34).

Ülkemizde ise OSB görülme oranlarına ilişkin kesin bir veri bulunmamaktadır. (35).

2.1.4 Etiyoloji

OSB'nin etiyojisi belirsiz olsa da yüksek oranda kabul edilen nedensellik hipotezi çoklu faktörlerin etkileşimidir. Bozukluğun genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin nörotransmitter dengesizliği, işlevsiz nöronal yolaklar, anormal sinaptogenez ve anormal nöronal bağlantıya yol açtığı düşünülmektedir (25).

OSB'li bireylerin %20'sinde tanımlanabilir genetik anormallikler mevcuttur. Bazı genetik ve metabolik bozukluklarla (Angelman, Prader-Willi, Fragile X ve Smith-Lemli – Opitz sendromları) ve çevresel nedenlerle (konjenital kızamıkçık, antenatal valproat ve ensefalitis alımı) güçlü ilişkiler gösterilmiştir (25).

Tek yumurta ikizleri için tahmini uyumluluk oranı %60 ila %90 arasında değişirken, dizotik ikizler ve ikiz olmayan kardeşler arasında bu oran %5 ila %31 arasındadır (36–38). İkiz çalışmaları sonuçlarına dayanarak, kalıtım oranının %60 ila %80 arasında olduğu tahmin edilmektedir (38,39).

OSB'den etkilenme oranları kız ve erkek çocukları arasında önemli bir fark göstermektedir. Erkek çocuklarında bu bozukluk kız çocuklarına göre dört kat daha fazla görülmektedir. Bu durum ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve çeşitli teoriler ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda genetik, epigenetik ve hormonal faktörler bir arada değerlendirilmiştir. Araştırmalar sonucu iki teori ön plana çıkmaktadır: “aşırı erkek beyni” ve “kadın koruyucu model” teorileri (26,40).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) OSB etiyojisinde önemli bir rolü olduğu ortaya konulmuştur (26,40,41). Ayrıca, Genom taramaları, bağlantı analizleri ve aday gen yaklaşımları ile OSB ile ilişkili kromozom bölgeleri ve genler tespit edilmiştir. Majör tek bir genin ortaya konulamaması OSB'nin multifaktöriyel bir genetik hastalık olduğunu ve heterojenite gösterdiğini işaret etmektedir (42).

2.1.5 OSB'ye Genetik Yaklaşım

Otizmin genetik etiyojisinin aydınlatılması için öncelikle “sendromik ve sendromik olmayan (idiyopatik) otizm” ayrımının yapılması gerekmektedir. “Sendromik olmayan otizm”, otizmin birincil tanı olduğu ve bilinmeyen genetik veya çevresel etmenlerin, oligojenik, poligenik ve çok faktörlü mekanizmaların neden olduğu durumları tanımlamak için kullanılan bir terimdir (42). Ayrıca, non-sendromik mental retardasyon ve epilepside yer alan birçok gen, non-sendromik OSB etiyojisinde rol oynamaktadır. Bu genlerin, genetik ve çevresel

faktörlere bağılı olarak farklı şekillerde ortaya çıkan nörogelişim bozukluklarının sürekliliğini sağladığı düşünülmektedir (43).

Sendromik veya ikincil otizm terimi, tuberoz skleroz, Rett sendromu, frajil X sendromu veya diğere tıbbi genetik koşullar gibi iyi bilinen bir genetik varyantın neden olduğu bir durumu belirtmek için kullanılır. Tipik olarak malformasyonlar ve / veya dismorfik özellikler ile ilişkilidir ve “idiyopatik” OSB'den farklı olarak, erkek ve kadın cinsiyetleri arasında oransal olarak farklılık göstermektedir (42).

Genetik analizler ve OSB'li bireylerin sendromik olarak tanımlanmasındaki gelişmeler vakaların yaklaşık %50'sinde hastalığın nedeninin tespit edilmesini sağlamaktadır. Örneğın, Schaefer ve arkadaşları 2006 yılında ve sonrasında 2008 yılında OSB tanısı alan çocuklarda nedenleri belirlemek için ön değerlendirme ve üç aşamalı klinik genetik yaklaşım kullanmış ve vakaların yaklaşık %40'ında genetik bulgular tespit etmiştir. Vakaların %5'inin yüksek çözünürlüklü kromozomal analiz sonucu belirlenen kromozomal anormalliklere, %5'inin Frajil X sendromuna, %5'inin Rett sendromuna, %3'ünün PTEN gen mutasyonlarına, %10'unun diğere genetik sendromlara (Örneğın, Tüberöz Skleroz) ve %10'unun ise kromozomal mikroarray yöntemleri kullanılarak tespit edilen yapısal genomik delesyonlar ya da duplikasyonlara sahip olduğu belirlenmiştir (31). Geliştirilen yeni yöntemler ile OSB'li çocuklarda 1q24.2, 2q37.3, 3p26.2, 4q34.2, 6q24.3, 7q35, 13q13.2-q22, 15q11-q13, 15q22, 16p11.2, 17p11.2, 22q11 ve Xp22 kromozom bölgelerinde mikrodelesyonlar ve duplikasyonlar bildirilmiştir (43,44).

Shen ve arkadaşları OSB'li 933 hastada standart karyotip analizi, X kromozomu analizi ve kromozomal mikrodizileme yöntemlerini kullanarak hastaların %2,2'sinde anormal karyotip, %0,5'de frajil X sendromu ve %18,2'sinde mikrodelesyonlar ve mikroduplikasyonların bulunduğunu bildirmiştir. 16p11.2 ve 15q13.2q-13.3 bölgelerinde belirlenen duplikasyon ve delesyonların dışında tespit edilen kopya sayısı değişikliklerinin OSB'ye özgü olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, Wang ve arkadaşları OSB'li 4300 çocuk ile gerçekleştirdikleri genom boyu ilişkilendirme araştırması sonucunda kromozom 5'te bulunan ve nöronal hücre yapışma moleküllerini kodlayan cadherin 10 (CDH10) ve cadherin 9 (CDH9) genlerinin arasında yer alan altı nükleotid polimorfizmi ile bir ilişki tespit etmiştir.

OSB ile ilişkili olduğu düşünülen yaklaşık 175 aday gen tanımlanmış. Bu genler, nöroligin, nöreksin, GABA reseptörü, kadherin ve SHANK gen ailelerinin üyelerini içermektedir. Diğere genler, nörotransmitterlerin reseptörlerini ve taşıyıcılarını, onkogenlerini,

beyin kaynaklı hormonları, sinyal ve ubikuitin yolu proteinlerini ve nöronal hücre yapışma moleküllerini kodlayan gen bölgelerini kapsamaktadır (26).

Tek gen mutasyonları sebebi ile sporadik otizm görülen multipleks ailelerde kopya sayısı değişikliklerini (CNV) ve yapısal genomik değişiklikleri (DNA seviyesindeki mikrodelsiyonlar) belirlemek amacıyla mikrodizileme yöntemleri kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir (45).

De novo CNV'ler, simpleks ailelerde vakaların %7-10'unda, multipleks ailelerde %2-3'ünde ve normal kontrollerin yaklaşık %1'inde gözlenmiştir. Nadir de novo CNV'ler simpleks ailelerde taşıyıcıların %5,8-7,9'unda ve etkilenmeyen kardeşlerin %1,7-1,9'unda gözlenirken (46,47), kodlama bölgelerindeki de novo mutasyonlar OSB vakalarının <%20'sinde görülmektedir (48). Ayrıca, OSB vakalarının yaklaşık %10'unda de novo CNV'lerin iki veya daha fazlasının mevcut olduğu gözlemlenmiştir (49-51).

Varyasyonların çoğu sinaptik genleri içeren gen bölgelerinde meydana gelmektedir ve bazılarının haploinsü yetersiz bölgeler içerdiği veya dominant kalıtım paternine sahip olduğu görülmektedir. Diğer varyasyonların, ebeveynleri arasında akraba evliliği olan bireylerle gerçekleştirilen çalışmalarda NHE926, PCDH10 ve DLA1 genlerinde olduğu gibi resesif formda ifade edildikleri gösterilmiştir (52,53).

2.2. D VİTAMİNİ VE D VİTAMİNİ METABOLİZMASI

Yaygın olarak “güneş ışığı vitamini” olarak bilinen D vitamini, kolesterol kaynaklı bir steroid hormondur. Doğal olarak az miktarda gıda D vitamini içermektedir ve çoğunlukla insan cildinin güneşe maruz kalması yoluyla sentezlenir. D vitamini ultraviyole B ışığına maruz kaldıktan sonra cilt tarafından absorbe edildiğinden sentezi, enlem, mevsim, yaşam tarzı ve cilt pigmentasyonu gibi faktörlerden etkilenmektedir (54).

D vitamini öncelikle aktif olmayan bir prekürsör olarak sentezlenir, yarı ömrü 12-16 saattir. Karaciğerde D vitamini 3 haftalık yarı ömre sahip, dolaşımdaki ana şekli olan 25-hidroksi D vitamini (25(OH)D) dönüşür. Oluşan bu molekül böbrekte biyolojik olarak aktif form olan kalsitriol olarak bilinen 1,25-dihidroksi D (1,25 (OH)₂ D) formuna dönüşür (24,55).

1,25 (OH)₂ D₃ (D vitamini), çoklu beyin fonksiyonlarını düzenleyen bir nörosteroid olarak bilinmektedir. Yapılan birçok çalışma ile elde edilen kanıtlar, D vitamininin beyin gelişimi, nörotransmisyon, nöroproteksiyon ve immünomodülasyonda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, D vitamininin bu işlevleri beyinde uyguladığı kesin moleküler mekanizmalar hala belirsizdir (56).

1,25 (OH)₂ hedef hücelere girebilmek için D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanmaktadır ve retinoik asit reseptörü (RXR) ile etkileşime yol açan bir konformasyonel modifikasyona neden olmaktadır.

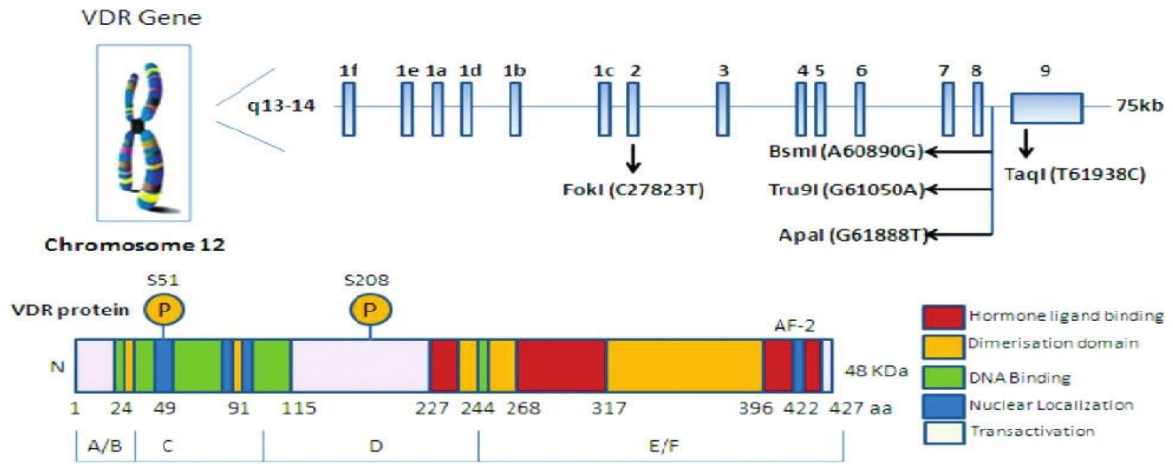
VDR, steroid-tiroid-retinoid asit reseptör üst ailesinin bir hücre içi polipeptit parçasıdır. Hücre DNA'sını hedeflemek için VDR/VDR homodimerleri veya VDR/RXR heterodimerleri oluşturur ve özel protein sentezlerine yol açar. D vitaminin en iyi bilinen işlevi, kalsiyum ve fosfat serum seviyeleri arasında doğru dengeyi sağlayarak kemik sağlığını desteklemesidir. 1,25(OH)₂'nin hücre içi VDR'ye bağlanması pek çok fizyolojik süreçte yer alan 900'den fazla geni düzenler. Bu nedenle, D vitamini son zamanlarda fizyolojik homeostazın korunmasında temel olarak kabul edilmeye başlanmıştır ve eksikliği kanser, hipertansiyon, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklar ve kardiyovasküler ve metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (24,56,57).

2.3. D VİTAMİNİ RESEPTÖR GENİ VE POLİMORFİZMLERİ

1988 yılında VDR cDNA'sının klonlanmasından sonra (58) insan VDR geninin genomik yapısının önemli bölümleri 1997 yılında ortaya konulmuştur (59).

VDR, kromozom 12q13.1 lokasyonunda yer alan, 75 kb uzunluğunda ve kolojen tip II alfa 1 (COL2A1) geninin yanında lokalize bir gen dir.(60,61). VDR geni, geniş bir promotor bölgesine ve dokuz ekzona sahiptir. Bu promotor bölgesi birçok dokuya özgün transkrip oluşturma kapasitesindedir (62).

Gen üzerinde çeşitli polimorfizmler saptanmıştır. Bu polimorfizmlerden bazıları birbiriyle bağlantı eşitsizliği (LD) gösteren intron 8, ekzon 9' da ve ekzon 2'de yer almaktadır (63–66).



Şekil 2.1: D vitamini reseptörünün kromozomal ve protein alanları. VDR geni 12. kromozomu üzerinde yer almaktadır. VDR'de FokI, BsmI, Apal, TaqI ve Tru9I (SNP'ler) tanımlanmıştır (67).

VDR polimorfizmleri gen lokusunun değişik restriksiyon enzimleriyle Southern Blot hibridizasyon yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntemler ile VDR geninin 3' ucunda Apal, EcoRV, BsmI, TaqI (68) ve Tru9I (69) restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmleri (RFLP) keşfedilmiştir.

FokI RFLP'si ise PCR yöntemi sonrası enzim kesimi işlemi ile tespit edilmiştir. FokI başlangıç kodonu polimorfizmdir. Başlangıç kodunu ATG'de T/C değişimi sonucu iki potansiyel translasyon bölgesi (ATG/ACG) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu polimorfizm tespit edilebilen tek protein polimorfizmidir. FokI polimorfizmi, VDR geninde saptanan tek protein polimorfizmidir.(58,66,70).

Bazı VDR polimorfizmleri fonksiyoneldir ve gen ifadesini etkiler. Bu polimorfizmler başlama kodonunda yer alan FokI, BsmI, Apal ve 3' ucunda yer alan TaqI'i içerir. Bu polimorfizmlerin VDR mRNA'nın stabilitesinin düzenlenmesiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (71).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu araştırma bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Hasta grubu, 2017-2018 yıllarında İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Psikiyatri Kliniğinde OSB tanısı konulan hastalar arasından seçilmiştir. Hastaların özgeçmişleri ve soy geçmişleri incelenmiş, rutin kan testleri yapılmıştır. Hastalık değerlendirmeleri M-CHAT testi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya 3-18 yaş aralığındaki, DSM-V kriterlerine göre klinik görüşme ile OSB tespit edilen dizigotik ikiz çocuklar dahil edilmiştir. Psikotik bozukluklar ve bipolar duyu durum bozuklukları tespit edilen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Otizm spektrum tanısı almamış, nörogelişimsel bir hastalığa sahip olmayan 100 sağlıklı birey kontrol grubuna alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundaki bireylerden EDTA içeren tüplere 2 ml periferik kan alınmış ve daha sonra DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve “B.10.1.TKH.4.34.H.GP.0.01/141” sayılı onay yazısı ile onanmıştır.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1: Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar.

| Sıra No | Ekipman türü, Modeli (Araç, Makine-Teçhizat vb.) | Cihazların Bulunduğu Birim | Kullanım Amacı |
|---------|----------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
| 1. | PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue-Ray/ tcst-9620) | Tıbbi Biyoloji AD. | PCR İşlemi |
| 2. | Derin Dondurucu (-80°C) (DAIHAN/Duo Freez U500) | Tıbbi Biyoloji AD. | Örneklerin Muhafazası |
| 3. | Derin Dondurucu (-20°C) (BOSCH/GSN36AI31) | Tıbbi Biyoloji AD. | Örneklerin Muhafazası |
| 4. | Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610) | Tıbbi Biyoloji AD. | Elektroforez İşlemi |
| 5. | Hassas Terazî, 0.1 mg hassasiyeti (SHIMADZU/ATX224, SEG) | Tıbbi Biyoloji AD. | Solüsyon Hazırlanması |
| 6. | Otomatik pipet seti (Eppendorf) | Tıbbi Biyoloji AD. | Moleküler Çalışmalarda, tüm deneylerde |

| | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7. | Isıtıcı Blok Stuart (SBH130D) | Tıbbi Biyoloji AD. | Moleküler Çalışmalarda |
| 8. | Elektroforez (Hofer) | Tıbbi Biyoloji AD. | Gen ekspresyon çalışmasında |
| 9. | Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G: BoxF3) | Tıbbi Biyoloji AD. | Moleküler genetik çalışmalarında, agaroz jel sonrası sonuçların incelenmesi ve kayıt altına alınması amacıyla kullanılacaktır. |
| 10. | Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIK/DS-11FX) | Tıbbi Biyoloji AD. | DNA/RNA/miRNA/protein miktar tayini |
| 11. | Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj | Tıbbi Biyoloji AD. | Genel Kullanım |
| 12. | Horizontal Elektroforezler (Hofer) | Tıbbi Biyoloji AD. | Agaroz jel yürütme |
| 13. | Güç Kaynağı (Hofer/PS300B) | Tıbbi Biyoloji AD. | Elektroforez işleminde |
| 14. | İnkübatör (DAIHAN/ IG-50) | Tıbbi Biyoloji AD. | İnkübasyon gerektiren tüm çalışmalarda |
| 15. | Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10) | Tıbbi Biyoloji AD. | Genel kullanım |
| 16. | Distile su cihazı | Tıbbi Biyoloji AD. | Genel kullanım |
| 17. | Kar buz makinesi | Tıbbi Biyoloji AD. | Genel kullanım |
| 18. | +4 buzdolabı (Arçelik) | Tıbbi Biyoloji AD. | Genel kullanım |
| 19. | Biyolojik Güvenlik Kabini (Biobase Class 2) | Tıbbi Biyoloji AD. | DNA ve RNA izolasyon işlemleri, PCR işlemleri |

3.1.3 Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan katı/ sıvı kimyasal ve sarf malzemeler belirlenen standartlara uygun olarak firmalardan temin edilmiştir. Çizelge 3.2’de çalışma sırasında kullanılan malzemeler listelenmiştir.

Çizelge 3.2: Çalışmalar sırasında kullanılan malzemeler.

| Sıra No | Malzemeler | Kullanım Amacı |
|---------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1. | 10X PCR Buffer (Mg2Cl free) (İntron Biotech, Kore) | PCR işlemi |
| 2. | Amonyum Asetat (NH4Ac) (BioBasic, Kanada) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 3. | Amonyum Klorür (NH4Cl) (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 4. | Asetik Asit (Sigma, ABD) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 5. | Borik Asit (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 6. | Disodyum EDTA (Na2EDTA) (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 7. | dNTP mix (İntron Biotech, Kore) | PCR işlemi |
| 8. | EDTA (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 9. | Etil Alkol (Merck, Almanya) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 10. | Etidyum Bromür | Jel Elektroforezi |
| 11. | İzopropanol (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 12. | MgCl2 (İntron Biotech, Kore) | PCR işlemi |
| 13. | Potasyum Bikarbonat (KHCO3) (Merck, Almanya) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 14. | Primerler (Sentegen ve Oligomer, Türkiye) | PCR işlemi |
| 15. | Proteinaz K | DNA izolasyonu |
| 16. | Restriksiyon enzimleri ve Tamponları (Thermo Scientific, ABD) | RFLP işlemi |
| 17. | SDS | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 18. | Sodyum Klorür (NaCl) (Tekkim, Türkiye) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |
| 19. | Taq Polimeraz (GeneDirex, ABD) | PCR işlemi |
| 20. | Tris (Sigma, ABD) | Moleküler çalışmalar için gerekli solüsyonların hazırlanmasında. |

3.1.4 Kullanılan Ticari Kitler

DNA izolasyon kiti High Pure PCR Template Preparation Kit Roche, ALMANYA

3.1.5 Kullanılan Primerler

Kullanılan primer setleri liyofilize şekilde teslim alındıktan sonra steril distile su ile sulandırıldıktan sonra -20 °C’de muhafaza edilmiştir. PCR reaksiyonlarında oluşturulan stok solüsyondan 10 pmol/μl konsantrasyonda hazırlanan primer solüsyonları kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için Çizelge 3.3’de belirtilen bölgelere özgü primer dizileri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3: PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri

| Polimorfizm | Primer Dizisi | |
|-------------|---------------|--------------------------------------------|
| ApaI | Forward | 5' CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA 3' |
| | Reverse | 5' GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC 3' |
| FokI | Forward | 5' AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT 3' |
| | Reverse | 5' ATG GAA ACA CCT GCT TCT TCT CCC TC 3' |
| TaqI | Forward | 5' GGG ACG ATG AGG GAT GGA TGG ACA GAG C3' |
| | Reverse | 5' GGA AAG GGG TTA GGT TGG ACA GGA 3' |

3.1.6 Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

Çizelge 3.4: RFLP yöntemi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve tamponları

| Enzim | Tanıma Dizisi |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| ApaI (10 U/μL) 10x Buffer B (Thermo Scientific) | 5' G G G C C ↓ C 3' 3' C ↑ C C G G G 5' |
| TaqI (10 U/μL) 10x Buffer (Thermo Scientific) | 5' T ↓ C G A 3' 3' A G C ↑ T 5' |
| BseGI (BtsCI, FokI) (10 U/μL) 10x Buffer Tango (Thermo Scientific) | 5' G G A T G N N ↓ 3' 3' C C T A C ↑ N N 5' |

3.1.7 Kullanılan Solüsyonlar

Eritrosit Parçalama Çözeltisi:

1 litre çözelti için:

- 8,74 gr NH_4Cl
- 1 gr KHCO_3
- 0,0372 gr (200 μl) Na_2EDTA

Lökosit Parçalama Çözeltisi:

400 ml çözelti için;

- 2,34 gr NaCl (4 M)
- 3,722 gr Na_2EDTA (0,5 M) ya da sıvı olarak hazırlamak için:
- 8 ml NaCl (5 M) ya da 10 ml (4 M)
- 20 ml Na_2EDTA (0,5 M)
- 400 ml distile su

Amonyum Asetat Çözeltisi (NH_4Ac):

100 ml çözelti için 73,226 gr NH_4Ac

%10'luk SDS Çözeltisi:

100 ml çözelti için 10 gr SDS

TBE Çözeltisi (Tris-Borik Asit-EDTA):

5X çözelti için;

- 60,57 gr Tris baz
- 30,90 gr Borik asit
- 40 ml EDTA (0,5 M)
- 1000 ml distile su

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1 Periferik Kandan DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan DNA örnekleri 2 farklı yöntem ile periferik kandan izole edilmiştir.

Tuzla Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu:

1. 2 ml'lik EDTA'lı tüplerde bulunan kan örneklerinden 1 ml alınarak 50 ml'lik falkon tüplere aktarıl ve üzerine 3 katı kadar RBL (Eritrosit Parçalama Solüsyonu) eklenir.
2. +4°C'de 15- 20 dk kanın hemoliz olması için bekletilir.
3. +4°C'de 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.
4. Üst kısım (süpernatant) dökülür ve pellet elle vurmak suretiyle homojenize edilir.
5. Pellet üzerine baştaki hacmin 2 katı kadar RBL (Eritrosit Parçalama Solüsyonu) eklenir ve +4°C'de 15-20 dk bekletildikten sonra, 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.
6. Üst kısım dökülür ve pellet elle vurmak suretiyle homojenize edilir.
7. Üzerine 1 ml WBL (Lökosit Parçalama Solüsyonu), 7,5 µl Proteinaz K, 50 µl %10 SDS eklenerek 56°C'deki su banyosunda gece boyu bekletilir (ya da 65°C'deki su banyosunda 1 saat bekletilir.)
8. Daha sonra 3700 µl 9 M Amonyum Asetat (NH₄Ac) ilave edilerek hafifçe karıştırılır.
9. +4°C'de 4500 rpm'de 20-30 dk santrifüj edilir.
10. DNA içeren üst kısım temiz falkona alınır ve çökelti atılır.
11. Üzerine 2 katı hacminde %99'luk etil alkol eklenir. Alkolün eklenmesiyle birlikte DNA yüzeye çıkmaya başlar. Üstte toplanan DNA bir pipet ucuyla yakalanır ve 1,5 ml'lik ependorf tüpe alınır.
12. 500 µl %70'lik alkol ile yıkanır, ardından 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır. Dealkolizasyon için; alkol dikkatlice dökülür ve 56°C'de 20-30 dk kapaklar açık bekletilir.
13. Alkolden uzaklaştırılan DNA (uygun miktardaki) TE tamponda veya distile suda çözündürülür ve 56°C'de 20-30 dk bekletilir.
14. DNA kalitesinin belirlenmesi için spektrofotometrede OD ölçümü yapılır.
15. DNA daha sonra -20°C'de saklanır.
- Eğer %99'luk etil alkol eklenmesiyle falkonda DNA toplanamazsa;

- Falkon tüp 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir
- Falkon santrifüjden sonra 1 ml kalana kadar yavaşça dökülür. Kalan kısım pipetle homojenize edildikten sonra ependorfa alınır.
- Daha sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Dealkolizasyon için; alkol dikkatlice dökülür, 56°C'de 20-30 dk kapaklar açık şekilde bekletilir.
- DNA, üzerine eklenen TE tamponda veya distile suda çözdürülür ve 56°C'de 20-30 dk bekletilir.
- DNA kalitesinin belirlenmesi için spektrofotometrede OD ölçümü yapılır.

Kit ile DNA izolasyon (ROCHE):

1. Hibridizasyon fırını +70°C'ye ayarlanır.
2. Elution buffer +70°C'ye konur.
3. 1,5 ml'lik ependorf içerisine:
 - 200 µl Kan
 - 200 µl Buffer (2-Yeşil Kapak)
 - 40 µl Proteinaz K
4. Vorteksenerek, 10 dk +70°C'de bekletilir.
5. Üzerine 100 µl izopropanol eklenir ve iyice çalkalanır.
6. Filtreli (spin column) tüpe aktarılır.
7. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
8. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
9. Üzerine 500 µl 4a (Removel Buffer-Siyah Kapak) konur.
10. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
11. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
12. Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer-Mavi Kapak) konur.
13. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
14. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
15. Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer-Mavi Kapak) konur.
16. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
17. Alt kısım atılır. Yeni toplama tüpü konur.
18. 14000 rpm'de 15 sn spin yapılır.
19. Toplama tüpleri atılır. Altlarına 1,5 ml'lik ependorf konur.

20. Spin column tüplerde filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 100 µl Elution buffer eklenir.
21. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
22. Filtreye takılı DNA aşağıya geçer.
23. DNA elde edilmiş olur.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin temeli, iki oligonükleotid primerinin DNA'nın homolog zincirlerinin karşı uçlarına bağlanarak Taq polimeraz enzimi yardımıyla istenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktır. Tipik bir PCR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponu, MgCl₂, dNTP'ler ve Taq polimeraz enzimini içerir. Kalıp denatürasyonu, primer bağlanması ve bağlanan primerlerin Taq polimeraz tarafından uzatılmasını içeren bir ısı döngüsünün seri halinde tekrarı belirlenen özel DNA fragmanının üssel artışı ile sonuçlanır. Sonuç olarak 30 döngülük bir PCR, hedef DNA dizisini milyonlarca kez çoğaltabilir. Bu tezde yapılan PCR içerikleri ve reaksiyon koşulları Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve reaksiyon koşulları.

| İçerik | Çoğaltılan Bölgeler | | |
|------------------------|---------------------|----------|----------|
| | ApaI | FokI | TaqI |
| DNA (ng) | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| dH ₂ O | 15,85 µl | 15,85 µl | 15,85 µl |
| MgCl ₂ (mM) | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| dNTP (mM) | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| Primer (pmol) | 0,5 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
| Tampon | 2,5 µl | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Enzim (Taq pol.) | 0,15 µl | 0,15 µl | 0,15 µl |
| Toplam Hacim | 23 µl | 23 µl | 23 µl |

Çizelge 3.6: PCR kondüsyonları

| Bölge | Başlangıç Denatürasyonu | Döngü Sayısı | Denatürasyon | Bağlanma | Uzama | Son Uzama |
|-------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|------------|-----------|
| ApaI | 94°C 1 dk | 35 | 94°C 30 sn | 66,4°C 45 sn | 72°C 40 sn | 72°C 5 dk |
| FokI | 94°C 1 dk | 35 | 94°C 30 sn | 57°C 45 sn | 72°C 40 sn | 72°C 5 dk |
| TaqI | 94°C 1 dk | 35 | 94°C 30 sn | 60°C 45 sn | 72°C 40 sn | 72°C 5 dk |

PCR sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde 30 dakika yürütülmüştür.

3.2.3 Restriksiyon Enzimi Analizi

Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağıını kopararak keser. Her restriksiyon enzimi DNA üzerinde 4-6 baz çiftlik belirli diziyi tanır ve ancak bu tanıma bölgesi bulunduğu zaman DNA'yı bu bölgeden veya bu bölgeye belirli bir uzaklıktan ve de her tanıma bölgesi için bir kesim yapacak şekilde ayırır. Farklı tanıma bölgelerine sahip pek çok enzimin var oluşu bu enzimlerin ilgili gen üzerinde oluşan bir mutasyonu veya polimorfizmi taramak için sıkça kullanılmasına olanak sağlamıştır. Tipik bir restriksiyon reaksiyonu DNA, enzim tamponu, restriksiyon enzimi ve su içerir. Reaksiyon sıcaklığı kullanılan restriksiyon enziminin optimum çalışma sıcaklığı olmalıdır. Bu tezde kullanılan restriksiyon enzimi kesim şartları Çizelge 3.7'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.7: Restriksiyon enzimleri ve kesim şartları

| Restriksiyon Enzimi | Sıcaklık | Kesim Süresi |
|----------------------------|----------|--------------|
| ApaI | 37°C | 4 Saat |
| BseGI (BtsCI, FokI) | 55°C | 4 Saat |
| TaqI | 65°C | 4 Saat |

Restriksiyon enzim kesimi işleminden sonra ürünler %2'lik agaroz jelde 30 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.

Çizelge 3.8: VDR geni polimorfik bölgelerinin PCR ürünleri ve restriksiyon fragment uzunlukları.

| Polimorfizm | PCR uzunluğu (bp) | Restriksiyon fragmentleri (bp) |
|-------------|-------------------|--------------------------------|
| ApaI | 740 | 530,210 |
| FokI | 265 | 196,69 |
| TaqI | 716 | 512,311,204 |

3.2.4 İstatistiksel Analizler

Çalışmanın gücünü belirlemek için yaptığımız power analizine (G*Power V 3.1.9.4) göre dahil edilmesi gereken hasta ve sağlıklı kontrol sayısı 64 olarak belirlendi. Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki Kare testi, haplotip analizi ve lojistik regresyon testleri uygulanmıştır.



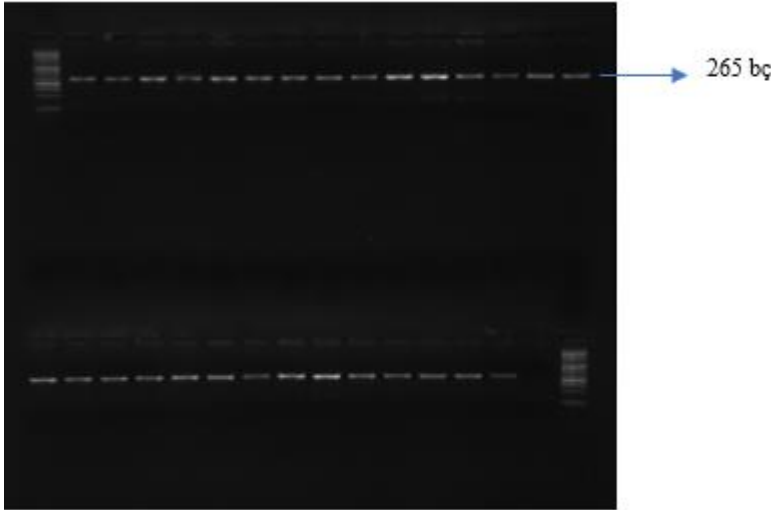
4. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Psikiyatri polikliniğinde tanı almış 64 otizm spektrum bozukluğuna sahip dizigotik ikiz ve psikotik veya nörogelişimsel bir bozukluk saptanmayan 100 sağlıklı kontrol olgusu dahil edilmiştir.

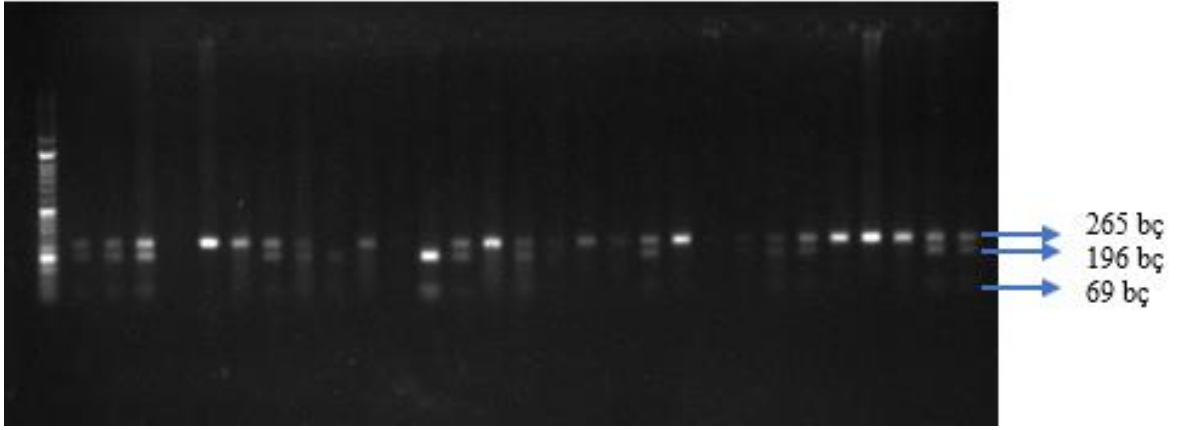
Hasta ve kontrol gruplarına ait genomik DNA örnekleri çizelge 3.4’de belirtilen şartlarda PCR metodu ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi işleminin ardından UV ışığı altında görüntülenmiştir. Amplifikasyonu başarılı olan ürünler çizelge 3.5’de belirtilen şartlar ile restriksiyon enzim kesimine tabi tutulmuştur. Restriksiyon örnekleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir.

4.1. FOKI POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ

FokI polimorfik bölgesi FokIF ve FokIR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve Şekil 4.1’de belirtilen 265 bp’lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri BseGI (BtsCI) restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2’lik jel üzerinde görüntülenmiştir. Elde edilen görüntü Şekil 4.2’de yer almaktadır. Enzim kesimi gerçekleşen ürünler 196 ve 69 bp’lik iki fragmente ayrılmaktadır.



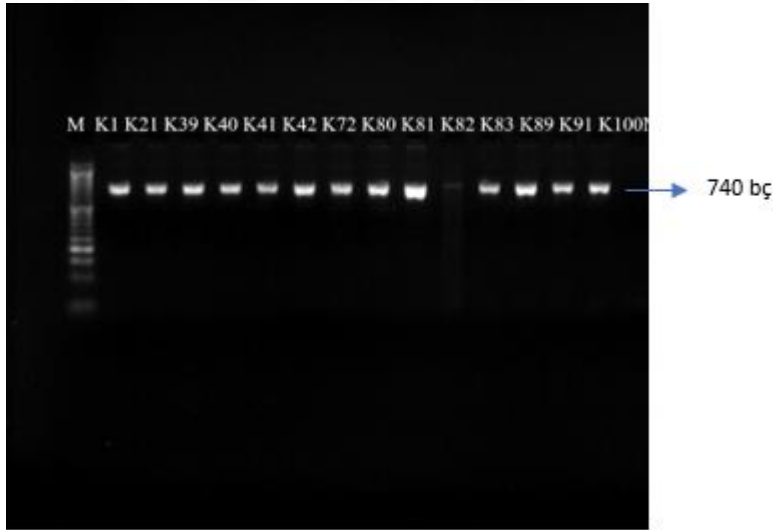
Şekil 4.1: FokI PCR ürünlerinin %2’lik agaroz jelde görüntüsü.



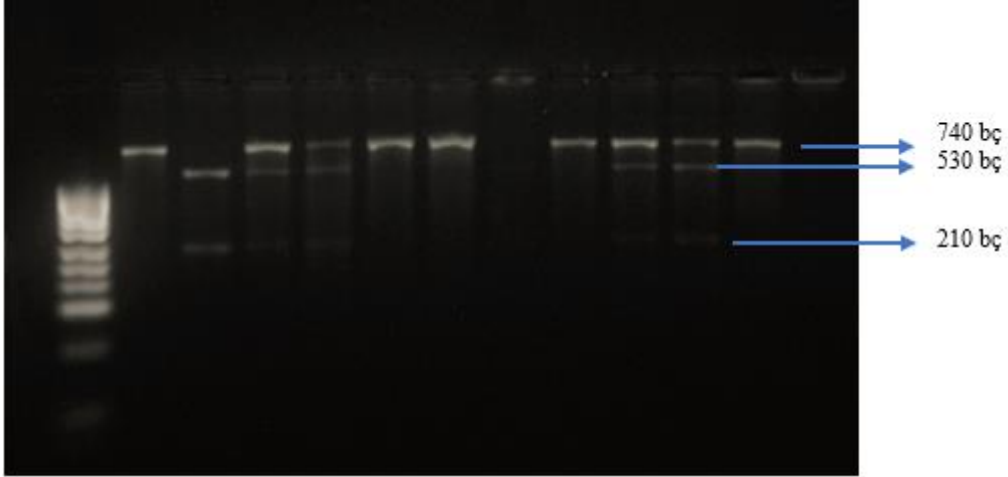
Şekil 4.2: FokI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.2. APAI POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ

ApaI polimorfik bölgesi ApaIF ve ApaIR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve Şekil 4.3'de belirtilen 740 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri ApaI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik jel üzerinde incelenmiştir. Elde edilen görüntü Şekil 4.4'de yer almaktadır. Enzim kesimi gerçekleşen ürünler 530 ve 210 bç'lik iki fragmente ayrılmaktadır.



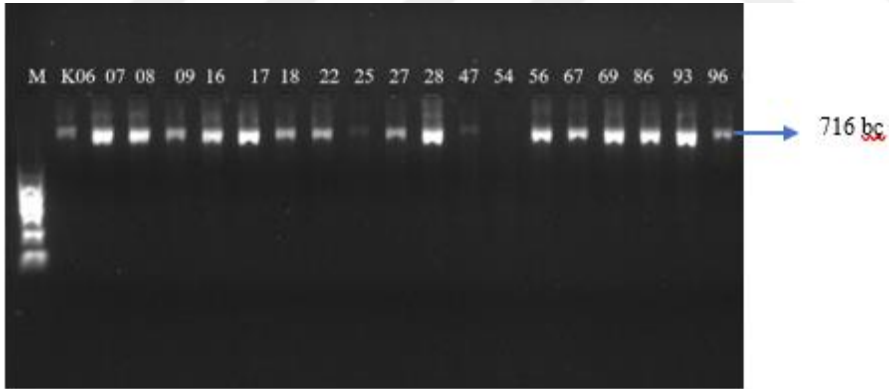
Şekil 4.3: ApaI PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.



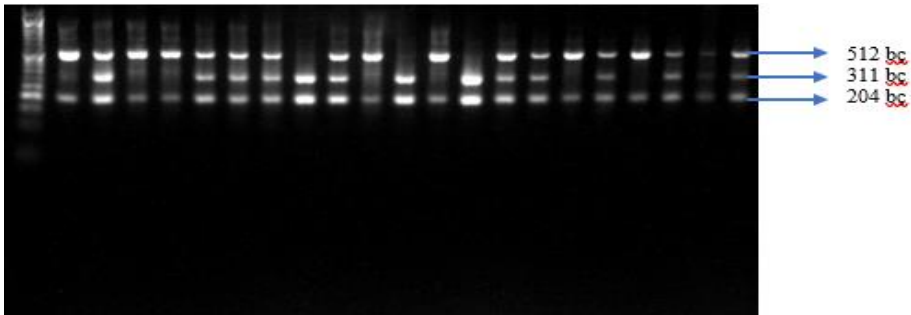
Şekil 4.4: ApalI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.3. TAQI POLİMORFİK BÖLGESİNİN ANALİZİ

TaqI polimorfik bölgesi TaqIF ve TaqIR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve Şekil 4.5'de belirtilen 716 bp'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri TaqI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik jel üzerinde incelenmiştir. Elde edilen görüntü Şekil 4.6'de yer almaktadır. Enzim kesimi gerçekleşen ürünler 512,311 ve 204 bp fragmentlere ayrılmaktadır.



Şekil 4.5: TaqI PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.



Şekil 4.6: TaqI restriksiyon kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.4. GENOTİPLEME BULGULARI

Hasta ve kontrol gruplarına ait FokI genotip ve allel dağılımları Çizelge 4.1’de görülmektedir. Hasta ve kontrol grupları arasında FokI genotipleri ve allelleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Homozigot CC genotipine sahip hasta bireylerin (15,6%) frekansında kontrol grubuna (5%) göre anlamlı bir fark olduğu ($p: 0,019$ $x^2: 7,83$) tespit edilmiştir. Allelik değerlendirmede ise C alleleline sahip bireylerin frekansının hasta grubunda (32,03%) kontrole (30%) göre anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1: OSB ve Kontrol gruplarına ait FokI genotip ve allel dağılımları

| Genotip | OSB Grubu | | Kontrol Grubu | | X ² | P |
|---------|-----------|-------|---------------|----|----------------|-------|
| | n | % | n | % | | |
| TT | 33 | 51,56 | 45 | 45 | 7,83 | 0,019 |
| TC | 21 | 32,81 | 50 | 50 | | |
| CC | 10 | 15,62 | 5 | 5 | | |
| Allel | | | | | 0,15 | 0,697 |
| T | 87 | 67,96 | 140 | 70 | | |
| C | 41 | 32,03 | 60 | 30 | | |

Hasta ve kontrol gruplarına ait ApaI genotip ve allel dağılımları Çizelge 4.2’de görülmektedir. Hasta ve kontrol grupları arasında ApaI genotipleri ve allelleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Homozigot TT genotipine sahip hasta bireylerin (7,8%) frekansının kontrol grubuna (4%) göre anlamlı olduğu bulunmuştur ($p: 0,039$ $x^2: 6,48$). T alleleline sahip bireylerin frekansının hasta grubunda (38,28%) kontrole (26,5%) göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p: 0,02$ $x^2: 5,055$).

Çizelge 4.2: OSB ve kontrol gruplarına ait ApaI genotip ve allel dağılımları

| Genotip | OSB Grubu | | Kontrol Grubu | | X ² | P |
|---------|-----------|-------|---------------|------|----------------|-------|
| | n | % | n | % | | |
| GG | 20 | 31,25 | 51 | 51 | 6,48 | 0,039 |
| GT | 39 | 60,94 | 45 | 45 | | |
| TT | 5 | 7,81 | 4 | 4 | | |
| Allel | | | | | 5,055 | 0,024 |
| G | 79 | 61,72 | 147 | 73,5 | | |
| T | 49 | 38,28 | 53 | 26,5 | | |

Hasta ve kontrol gruplarına ait TaqI genotip ve allel dağılımları Çizelge 4.3’de görülmektedir. Hasta ve kontrol grupları arasında TaqI genotipleri ve allelleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Homozigot CC genotipine sahip hasta bireylerin (12,5%) frekansı kontrol grubuna (9%) göre anlamlı olduğu bulunmuştur (p: 0,037 x^2 : 6,58). C alleleline sahip bireylerin frekansının hasta grubunda (37,5%) kontrole (25,5%) göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (p: 0,02 x^2 : 5,33).

Çizelge 4.3: OSB ve kontrol gruplarına ait TaqI genotip ve allel dağılımları

| | OSB Grubu | | Kontrol Grubu | | X ² | P |
|----------------|-----------|------|---------------|------|----------------|--------------|
| | n | % | n | % | | |
| Genotip | | | | | | |
| TT | 24 | 37,5 | 58 | 58 | | |
| TC | 32 | 50 | 33 | 33 | | |
| CC | 8 | 12,5 | 9 | 9 | | |
| | | | | | 6,58 | 0,037 |
| Allel | | | | | | |
| T | 80 | 62,5 | 149 | 74,5 | | |
| C | 48 | 37,5 | 51 | 25,5 | | |
| | | | | | 5,33 | 0,02 |

OSB hastaları arasında ApaI, TaqI ve FokI genotiplerinin OSB düzeylerine göre dağılımı Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6’ da gösterilmiştir. Hastaların OSB düzeylerine göre dağılımları incelendiğinde ApaI, TaqI ve FokI genotipleri ve düzeyler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

Çizelge 4.4: OSB hastaları arasında ApaI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı

| Düzye | GG | GT | TT |
|---------------|----|----|----|
| Hafif | 3 | 4 | 0 |
| Orta | 3 | 3 | 0 |
| İleri | 2 | 8 | 0 |
| Atipik | 3 | 11 | 3 |

Çizelge 4.5: OSB hastaları arasında TaqI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı

| Düzye | TT | TC | CC |
|---------------|----|----|----|
| Hafif | 5 | 1 | 1 |
| Orta | 5 | 2 | 0 |
| İleri | 4 | 6 | 0 |
| Atipik | 4 | 8 | 5 |

Çizelge 4.6: OSB hastaları arasında FokI genotiplerinin düzeylere göre dağılımı

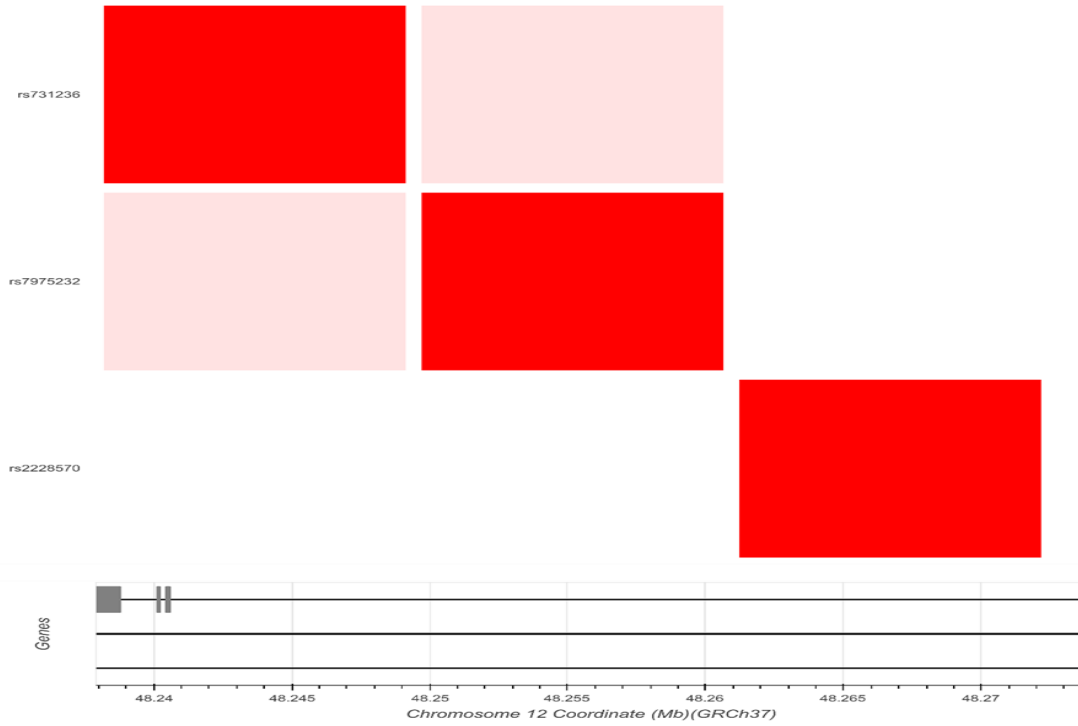
| Düzye | TT | TC | CC |
|---------------|----|----|----|
| Hafif | 3 | 1 | 3 |
| Orta | 1 | 4 | 1 |
| İleri | 4 | 4 | 2 |
| Atipik | 9 | 6 | 2 |

4.5. BAĞLANTI ANALİZİ SONUÇLARI

Rs731236, rs7975232 ve rs2228570 polimorfizmleri arasındaki ilişki bağlantı dengesizliği açısından incelendiğinde Çizelge 4.7'deki r^2 değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre incelenen polimorfizmler bağlantı dengesizliği içerisinde değildir ve birbirleri için belirteç varyant olarak kullanılmaları mümkün değildir. Yapılacak çalışmalarda her birinin ayrı ayrı genotiplenmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.7: Varyantların bağlantı eşitsizliği için r^2 değerleri

| SNP | rs 731236 | rs 7975232 | rs 2228570 |
|------------|-----------|------------|------------|
| rs 731236 | 1 | 0,121 | 0,001 |
| rs 7975232 | 0,121 | 1 | 0 |
| rs 2228570 | 0,001 | 0 | 1 |



Şekil 4.7: Varyantların bağlantı eşitsizliği için r^2 değerleri grafiği.

Renkler beyazdan koyu kırmızıya doğru ilerlemekte ve beyazdan kırmızıya gidildikçe bağlantı eşitsizliği artmaktadır. Grafiğin ortasındaki kırmızı kutucuklar varyantların kendileri ile karşılaştırmalarının sonuçlarını gösterdiği için tam eşitsizlik görülmektedir.

4.6. LOJİSTİK REGRESYON SONUÇLARI

Çizelge 4.8: Allelik, Recessif ve Dominant grupların karşılaştırılması

| SNP | T / C (Alelik) | TT/ TC | (TT+TC)/ CC (resesif) | TT/ (TC + CC) (Dominant) | Sonuç |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|
| rs 731236 (TaqI) | 1.753 [1.086- 2.829] | 2.343 [1.187- 4.627] | 2.148 [0.741-6.229] | 2.302 [1.210-4.379] | OR |
| | 5.33 | 6.13 | 2.04 | 6.56 | X² |
| | 0.02092 | 0.01331 | 0.15348 | 0.01043 | p |
| rs 2228570 (FokI) | T / C (Alelik) | TT/ TC | (TT+TC)/ CC (resesif) | TT/ (TC + CC) (Dominant) | Sonuç |
| | 1.100 [0.681- 1.775] | 0.573 [0.290- 1.130] | 2.727 [0.852-8.732] | 0.769 [0.410-1.442] | OR |
| | 0.15 | 2.61 | 3.00 | 0.67 | X² |
| | 0.69748 | 0.10641 | 0.08311 | 0.41171 | p |
| rs 7975232 (ApaI) | G/ T (Alelik) | GG/ GT | (GG+GT)/ TT (resesif) | GG/ (GT + TT) (Dominant) | Sonuç |
| | 1.720 [1.070- 2.766] | 2.210 [1.129- 4.326] | 3.188 [0.776-13.093] | 2.290 [1.186-4.422] | OR |
| | 5.06 | 5.44 | 2.79 | 6.20 | X² |
| | 0.02454 | 0.01966 | 0.09495 | 0.01277 | p |



5. TARTIŞMA

Otizm Spektrum Bozukluğu çocuklarda yaşamın ilk 3 yılında tespit edilebilen, tekrarlayan davranışlar ve sosyal iletişim sorunlarıyla karakterize nörogelişimsel bir hastalıktır. Hastalığın etiolojisinin aydınlatılamamasıyla birlikte vakaların yalnızca %10 ila %35’de bilinen majör risk faktörleri tespit edilebilmiştir. Kalan vakaların daha çok sporadik olduğu düşünülmektedir (30).

Son zamanlarda gerçekleştirilen hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar D vitamini ve VDR ile ilgili sorunların nörogelişimsel hastaların ortaya çıkmasına sebep olduğunu göstermiştir (24,56). OSB’nin nörogelişimsel bir hastalık olarak kabul edilmesi ile VDR ve OSB arasındaki ilişki araştırılmaya başlanmıştır. Yakın zamanlarda yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmalar VDR polimorfizmleri ve OSB arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir (9,71,72). Fakat çalışma sayısının az olması sebebiyle bu ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır.

Farklı nörogelişimsel bozukluklarda yüzlerce penetran risk lokusu tanımlanmıştır ve bunlar genellikle bir veya daha fazla gen içerebilen nadir (<%1 frekans) kopya sayısı varyasyonlarını (CNV'ler) içerir. Monozigotik (MZ) ikiz çiftlerin, genomik bilgilerinin %100’ünü paylaştığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, son zamanlarda hem tipik gelişmekte olan hem de klinik olarak uyumsuz MZ çiftlerinde postzigotik somatik varyantlar şeklindeki genetik farklılıklar bildirilmiştir (73). Ancak, literatürde dizigotik ikizlerle ilgili genomik bilginin ne kadarının paylaşıldığı açık değildir.

Steroid bir hormon olan D vitamin ve D vitamin metabolizmasının düzenlenmesinde büyük bir rolü olan vitamin D reseptör genin beyin gelişimde önemli bir rolü olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. D vitaminin işlevleri yerine getirebilmesi için VDR’ lere bağlanması gerekmektedir. D vitamin reseptörünün bütün memelilerin beyin hücrelerinde bulunduğu hayvan çalışmaları ile keşfedilmiştir. Beyinde VDR varlığı ilk kez sıçanlar ile gerçekleştirilen bir çalışma ile ortaya çıkarılmış ve VDR ekspresyonun erken embriyonik dönemde beynin gelişimi sırasında gerçekleştiği gösterilmiştir (57). Araştırmalar sonucunda, VDR proteininin, hipotalamus, serebellum, bazal ganglionlar, amigdala hipokampus, koku sistemi ve serebral korteks (zamansal, parietal, siyonik) bölgeler gibi sıçan ve insan beyninin birçok alanında mevcut olduğu bulunmuştur (16,24,74). Bu sebeple VDR geninde meydana gelen değişikliklerin nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir.

OSB'li bireylerde kopya sayısı değişikliklerinin ve genomik değişikliklerin tespiti amacıyla mikrodizileme yöntemi ile çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalara tek gen mutasyonları sebebiyle otizm tespit edilen aileler ve otizmin sporadik olarak ortaya çıktığı aileler dahil edilmiştir. Sebat ve arkadaşları otizmlili 165 hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmaya simpleks ailelerden 118 bireyi ve multipleks ailelerden 47 bireyi kontrol grubu ile karşılaştırarak incelemiştir. Çalışma yöntemi olarak DNA problu kromozomal mikrodizileme ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Simpleks ailelerde otizmlili bireylerin %10'un da CNV'lerin varlığı tespit edilmiştir. Multipleks ailelerde ise bireylerin %3'ünde tespit edilmiştir (75).

Schmidt ve arkadaşları anne, baba ve çocukları dahil ettikleri popülasyon temelli CHARGE (Genetik ve Çevre Kaynaklı Çocukluk Çağı Otizm Riskleri) vaka kontrol çalışmasında VDR geni üzerindeki SNP'leri incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlarda rs731236'daki paternal CC genotipinin ve rs1544410'un AA genotipinin, tek tek veya kombinasyon halinde, OSB için artan bir risk ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. Bizim bulgularımızda bu çalışmayı destekler niteliktedir (22).

2017 yılında Coşkun ve arkadaşları tarafından VDR genindeki SNP'leri tespit amacı ile Türk popülasyonundan OSB'li 237 çocuk ve 243 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler TaqI'nın CC genotipinin, FokI'nın TT genotipinin, çocukluk dönemi OSB riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. ApaI genotipinin, çocukluk çağı OSB'si için önemli bir risk faktörü olmadığı ifade edilmiştir (71). Bizim çalışmamızda Coşkun ve arkadaşlarının bulguları ile benzer sonuçlar elde edildi. Biz de elde ettiğimiz bulgulara göre FokI ve TaqI genotiplerinin ve TaqI allel frekasının OSB ile ilişki bir risk faktörü olduğunu düşünmekteyiz. Ancak Coşkun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ApaI genotipi ve allel frekası ile OSB arasında bir ilişki tespit edilememesine karşın çalışmamızda hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilmiştir (p değeri: 0,037). Literatürde postzigotik de novo CNV'lerin tipik olarak tükürük veya kandan türetilen genomik DNA'da nadir olduğu ve ikizlerde bulunan örneklerde nörogelişimsel bozuklukların uyumsuzluğunun uyumsuz CNV'ler tarafından açıklanamadığı ifade edilmektedir (73). İkizlerle yapmış olduğumuz bu çalışmada CNV'lerin ikiz olmayan hastalara göre uyumsuzluğu düşünülerek, sonuçlarımızın çalışma başlığımız ile ilgili farklılığını bu bölge itibarıyla ortaya koyduğumuz kanaatindeyiz. Rs1544410-rs731236-rs2228570-rs7975232'nin haplotip GTTT sıklığı, OSB'li çocuklarda kontrollere göre anlamlı

derecede yüksek bulunmuştur. ATCG ve GTCT haplotiplerinin sıklığının, OSB'li çocuklarda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Zang ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışma ile Çin Han popülasyonunda VDR geninde rs731236'nın CT genotipinin ve C allelinin artan çocukluk çağı OSB riski ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. OSB'li çocuklar ve kontrol grupları arasında rs1568820, rs1544410 ve rs2228570 SNP'lerinin genotipleri ve allel frekansları arasında ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir (9). Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışma sonuçları ile örtüşmemektedir. Yapısal farklılıklar veya kopya sayısı farklılıkları, incelenen genomun referans genomdan uzun diziler (>50bp) olarak farklı olduğu bölgelerde meydana gelir. Bu sonuçlar ile SNP'lerin popülasyonlara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.





6. SONUÇLAR

Bu çalışmada otizm spektrum bozukluğu görülen çocukluk çağı dizigotik ikiz olgulardan oluşan bir Türk popülasyonunda VDR geninin üç ayrı varyantındaki tek nükleotid değişimleri incelendi ve hastalık oluşumu ile ilişkileri belirlendi. Genotipik değerlendirme sonuçlarımız FokI (rs2228570 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda mutant CC genotipi taşıma frekansının, ApaI (rs7975253 G/T) genotipleri açısından hasta grubunda mutant TT genotipi taşıma frekansının ve TaqI (rs731236 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda mutant CC genotipi taşıma frekansının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermiştir (p: 0,019, p: 0,039, p: 0,037). SNP'lerin allel frekansları açısından bakıldığında ise ApaI (rs7975253 G/T) ve TaqI (rs731236 T/C) allel frekanslarının OSB olan dizigotik hastalarla sağlıklı kontroller arasında istatistiksel açıdan anlamlılık gözlenirken FokI (rs2228570 T/C) varyantı için hasta ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

Literatürde yer alan ikiz çalışmaları bazı niceliksel anlaşmazlıklara rağmen OSB'lerinin önemli ölçüde kalıtsallığını göstermiş, böylece geniş çaplı genetik çalışmaları motive etmiştir. Biz de buradan yola çıkarak yaptığımız çalışmada OSB'li dizigotik ikizlerde VDR geninde bazı varyantların hastalığa yatkınlık oluşturduğunu ortaya koyduk. Özellikle ApaI bölgesindeki tek nükleotid değişimlerinin dizigotik OSB'li hastalarda hastalığa yatkınlık oluşturduğunun ortaya konması literatüre önemli bir katkıdır. Öte yandan bir Türk popülasyonunda yapılan bu çalışma dizigotik bireylerde VDR genine ait TaqI, FokI ve ApaI gen bölgelerini içeren ve bu üç bölgenin birlikte araştırıldığı ilk çalışma olması bakımından önemlidir. Çalışma grubu bir polimorfizm çalışması için az sayıda gibi görünmekle birlikte çalışma dizigotik OSB'li çocuklar üzerinde yapılmış olup, çalışma öncesinde yapılan güç analizine göre kontrol grubu için gerekli olan sayıdan daha fazla gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir. Bununla birlikte CNV'lerin monozigotik ikizlerde %100 aktarıldığı bilgisine dayanılarak çalışmanın monozigotik OSB'li hastalarda yapılmasının patofizyolojisinin net olarak ortaya konması açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Christensen DL, Braun KVN, Baio J, Bilder D, Charles J, Constantino JN, vd. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years. *MMWR Surveill Summ* 2018;65(13):1–23.
2. Rapin I, Tuchman RF. Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatr Clin North Am* 2008;55(5):1129–46.
3. Kanner L. *Library_Kanner_1943.Pdf*. C. 2, *Nervous Child*. 1943. s. 217–50.
4. Consortium TAGP, Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, vd. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* [Internet]. 18 Mart 2007 [kaynak 16 Eylül 2019];39(3):319–28. Available at: <http://www.nature.com/articles/ng1985>
5. El-Fishawy P, State MW. The genetics of autism: Key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am*. 2010;33(1):83–105.
6. Volkmar FR, Reichow B. Autism in DSM-5: progress and challenges. *Mol Autism* 2013;4(1):13.
7. Collins AL, Ma D, Whitehead PL, Martin ER, Wright HH, Abramson RK, vd. Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics*; 7(3):167–74.
8. Nordahl CW, Lange N, Li DD, Barnett LA, Lee A, Buonocore MH, vd. Brain enlargement is associated with regression in preschool-age boys with autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108(50):20195–200.
9. Zhang Z, Li S, Yu L, Liu J. Polymorphisms in Vitamin D Receptor Genes in Association with Childhood Autism Spectrum Disorder. *Dis Markers*. 2018;2018.
10. Hagerman R, Hoem G, Hagerman P. Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Mol Autism* [Internet]. 21 Eylül 2010 [kaynak 17 Eylül 2019];1(1):12. Available at: <http://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-2392-1-12>
11. Holt R, Monaco AP. Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. *EMBO Mol Med* [Internet]. 01 Ağustos 2011 [kaynak 14 Mart 2019];3(8):438–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805639>
12. Eapen V. Genetic basis of autism: is there a way forward? *Curr Opin Psychiatry* [Internet]. Mayıs 2011 [kaynak 17 Eylül 2019];24(3):226–36. Available at: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001504-201105000-00010>
13. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, vd. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* [Internet]. 2003;34(1):27–9. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1136>
14. Häussler A, Kurtz-Costes B. Child care for preschoolers with autism: An exploration of mothers' beliefs, decision-making, and knowledge. *Early Child Res Q* [Internet]. 01 Ocak 1998 [kaynak 17 Eylül 2019];13(3):485–99. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885200699800532>
15. Balabanova S, Richter H-P, Antoniadis G, Homoki J, Kremmer N, Hanle J, vd. 25-hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr* [Internet]. 1984;62(22):1086–90. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01711378>
16. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* [Internet]. 2005;29(1):21–30. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061804001176>
17. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, Pols HAP, van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* [Internet]. 2004;338(2):143–56. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111904003075>
18. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, vd. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2009;8(7):621–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997209000421>
19. Lee YH, Kim J-H, Song GG. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* [Internet]. 2014;35(12):1947–53. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1868-4>
20. Al-Temaimi RA, Al-Enezi A, Al-Serri A, Al-Roughani R, Al-Mulla F. The Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms with Multiple Sclerosis in a Case-Control Study from Kuwait. *PLoS One* [Internet]. 05 Kasım 2015;10(11):e0142265. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142265>
21. Jiang P, Zhu W-Y, He X, Tang M-M, Dang R-L, Li H-D, vd. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. C. 12, *International Journal of*

- Environmental Research and Public Health . 2015.
22. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Sconberg JL, Schmidt LC, vd. Selected vitamin D metabolic gene variants and risk for autism spectrum disorder in the CHARGE Study. *Early Hum Dev.* 2015;91(8):483–9.
 23. Eyles DW, Burne THJ, McGrath JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* 2013;34(1):47–64.
 24. Kočovská E, Fernell E, Billstedt E, Minnis H, Gillberg C. Vitamin D and autism: Clinical review. *Res Dev Disabil.* 2012;33(5):1541–50.
 25. Mukherjee SB. Autism Spectrum Disorders — Diagnosis and Management. *Indian J Pediatr* 2017; 84(4):307–14.
 26. Masi A, Demayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neurosci Bull* 2017;33.
 27. Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Med (Plovdiv)* 2015; 57(1):19–28.
 28. Mintz M. Evolution in the Understanding of Autism Spectrum Disorder: Historical Perspective. *Indian J Pediatr* 2017; 84(1):44–52.
 29. Young RL, Rodi ML. Redefining Autism Spectrum Disorder Using DSM-5: The Implications of the Proposed DSM-5 Criteria for Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord* 2014;44(4):758–65.
 30. NIMH » Autism Spectrum Disorder [Internet]. [kaynak 05 Ağustos 2019]. Available at: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/autism-spectrum-disorders-asd/index.shtml>
 31. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet* 2018; 392(10146):508–20.
 32. Mazurek MO, Lu F, Symecko · Heather, Butter E, Bing NM, Hundley RJ, vd. A Prospective Study of the Concordance of DSM-IV and DSM-5 Diagnostic Criteria for Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 2017; 47:2783–94.
 33. RAKAP S, BİRKAN B, KALKAN S. TÜRKİYE’DE OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU ve ÖZEL EĞİTİM 2017 EDİTÖR [Internet]. 2017 [kaynak 20 Mart 2019]. Available at: http://panel.stgm.org.tr/vera/app/var/files/r/a/rapor_tohum_.pdf
 34. Redfield RR, Kent CK, Leahy MA, Martinroe JC, Spriggs SR, Yang T, vd. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014 Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and [Internet]. 2014 [kaynak 21 Mart 2019]. Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/ss/pdfs/ss6706a1-H.pdf>
 35. Engelli ve Yaşlı Hizmetleri Genel Müdürlüğü [Internet]. 2016 [kaynak 04 Ağustos 2019]. Available at: http://www.sp.gov.tr/upload/xSPTemelBelge/files/5w4h6+otizm_eylem_plani_kitap_bakanli_onaylanan_.pdf
 36. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, vd. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995; 25(1):63–77.
 37. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA. Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *JAMA Pediatr* 2009;163(10):907–14.
 38. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, vd. Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *JAMA Psychiatry* 2011; 68(11):1095–102.
 39. Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci* 2011;15(9):409–16.
 40. Fett-Conte AC, Bossolani-Martins AL, Rosan DBA. Etiology of Autism the Complexity of Risk Factors in Autism Spectrum Disorder. 2015
 41. Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H, vd. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nat Genet.* 2019
 42. Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet* 2009; 46(1):1–8.
 43. Cristina A, Luiza A, Pereira-Nascimento P. Genetic Etiology of Autism. İçinde: Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I [Internet]. InTech; 2013 [kaynak 12 Ağustos 2019]. Available at: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-autism-spectrum-disorders-volume-i/genetic-etiology-of-autism>
 44. Yuen RKC, Merico D, Bookman M, Howe JL, Thiruvahindrapuram B, Patel R V, vd. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Marc Woodbury-Smith* 2017;20:21.

45. Butler MG, Youngs EL, Roberts JL, Hellings JA. Assessment and Treatment in Autism Spectrum Disorders: A Focus on Genetics and Psychiatry. *Autism Res Treat* 2012;2012(Id):1–11.
46. Levy A, Perry A. Outcomes in adolescents and adults with autism: A review of the literature. *Res Autism Spectr Disord* 2011; 5(4):1271–82.
47. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, vd. Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron* 2011; 70(5):863–85.
48. Malhotra D, Sebat J. CNVs: Harbingers of a Rare Variant Revolution in Psychiatric Genetics. *Cell* 2012;148(6):1223–41.
49. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, vd. Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science* 2007; 316(5823):445 LP – 449.
50. Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, Karamohamed S, vd. Novel Submicroscopic Chromosomal Abnormalities Detected in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry* 2008; 63(12):1111–7.
51. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, vd. Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 2008; 82(2):477–88.
52. Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19(2):231–4.
53. Ramocki MB, Zoghbi HY. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *C. 455, Nature. Nature Publishing Group; 2008. s. 912–8.*
54. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. vitamin D and Autoimmune Diseases: is vitamin D Receptor (vDR) polymorphism the Culprit? *C. 19, REVIEWS 438 IMAJ • 2017.*
55. Ideraabdullah FY, Belenchia AM, Rosenfeld CS, Kullman SW, Knuth M, Mahapatra D, vd. Maternal vitamin D deficiency and developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Endocrinol.* 2019;241(2):R65–80.
56. Cui X, Gooch H, Petty A, McGrath JJ, Eyles D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 453:131–43.
57. Biswas S, Kanwal B, Jeet C, Seminara RS. Fok-I, Bsm-I, and Taq-I Variants of Vitamin D Receptor Polymorphism in the Development of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Cureus* 2018; 10(8):e3228.
58. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, vd. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85(10):3294 LP – 3298.
59. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, vd. Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11(8):1165–79.
60. Greco A, Villa R, Pierotti MA. Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene.* 1996;13(11):2463–6.
61. Takahashi E, Hori T, Sutherland GR. Mapping of the human type II collagen gene (COL2A1) proximal to fra(12)(q13.1) by nonisotopic in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* 1990;54(1–2):84–5.
62. Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(18):10529 LP – 10534.
63. Tokitan A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, vd. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1996; 11(7):1003–9.
64. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Eisman J, Bonjour JP. Vitamin D receptor (VDR) allelic polymorphisms and bone mass in females: Influence of age and calcium supplementation. *Osteoporos Int.* 1996;6(1):160.
65. Torres A, Machado M, Concepción MT, Martín N, Lorenzo V, Hernández D, vd. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mass changes after renal transplantation. *Kidney Int* 1996;50(5):1726–33.
66. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1850–5.
67. Bid H, Manchanda P, Kibler A, Zhang M, Ravi J. Vitamin D receptor as a therapeutic target for benign prostatic hyperplasia. *Indian J Urol* 2012; 28(4):377.
68. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen T V, vd. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367(6460):284–7.
69. Ye W-Z, Reis AF, Velho G. Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D

- receptor gene. *J Hum Genet* 2000;45:56.
70. Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, vd. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet* 1991;49(3):668–73.
 71. Coşkun S, Şimşek Ş, Camkurt MA, Çim A, Çelik SB. Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene and serum 25-hydroxyvitamin D levels in children with autism spectrum disorder. *Gene*. 2016;588(2):109–14.
 72. Balta B, Gumus H, Bayramov R, Korkmaz Bayramov K, Erdogan M, Oztop DB, vd. Increased vitamin D receptor gene expression Balta, Burhan, Hakan Gumus, Ruslan Bayramov, Keziban Korkmaz Bayramov, Murat Erdogan, Didem Behice Oztop, Muhammet Ensar Dogan, Serpil Taheri, ve Munis Dundar. 2018. “Increased vitamin D receptor gene expression. *Mol Biol Rep*. 2018;45(4):541–6.
 73. Stamouli S, Anderlid B-M, Willfors C, Thiruvahindrapuram B, Wei J, Berggren S, vd. Copy Number Variation Analysis of 100 Twin Pairs Enriched for Neurodevelopmental Disorders. *Twin Res Hum Genet* 2018;21:1.
 74. Eyles DW, Burne THJ, Mcgrath JJ. *Frontiers in Neuroendocrinology* Vitamin D , effects on brain development , adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol*; 2013;34(1):47–64.
 75. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, vd. Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism; 2007; 316(5823):445–9.

EKLER

2.4. EK 1



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : B.10.1.TKH.4.34.H.GP.0.01/144
Konu : Onay Yazısı

HASTANE BAŞHEKİMLİĞİNE
(Doç. Dr. Ender Mehmet COŞKUNPINAR'a iletmek üzere)

21/11/2018 tarihinde yapılan Ümraniye Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul toplantısında “**Otizm Spektrum Bozukluğu Olan İkizlerde Kopya Sayısı Değişikliklerinin Vitamin D Reseptörü ile İlişisinin Araştırılması**” isimli çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik açıdan bir sakınca olmadığına oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. Sait NADERİ
ETİK KURUL BAŞKANI

Ek1:Form(2 sayfa)

*Doç. Dr. Ender Mehmet
COŞKUNPINAR*

Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Etik Kurul
Adres: Elmalıkent Mahallesi. Adem Yavuz Caddesi. No:1 PK. 34760 Ümraniye/ İSTANBUL
Tel: (0216) 632 18 18/11 64 Faks: (0216) 632 71 21-24

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI ÜMRANIYE EĞİTİM VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ - İSTANBUL ÜMRANIYE
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ GELEN
GİDEN EVRAK BİRİMİ

23/11/2018 09:18 - 54132726-000-24795



0001483309

2.5. EK 2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

01) Davet edildiğiniz çalışma “Otizm Spektrum Bozukluğu Olan İkizlerde Kopya Sayısı Değişikliklerinin Vitamin D Reseptörü ile İlişkinin Araştırılması.” başlıklı akademik amaçlı projedir. Bu çalışmada ASD (Otizm spektrum bozukluğu) hastalığı bulunan bireylerde genetik değişiklikler araştırılacaktır. Alınan sonuçların ileride yapılacak olan koruyucu tedavi yöntemlerine yol gösterici olması hedeflenmektedir. Bu çalışma bir genetik araştırmadır ve bu nedenle sizden alınacak örnek ile genetik yapınız incelenecektir.

02) Eğer araştırmayı kabul ederseniz görevli hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgularınız kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. İziniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için sizden kan örneği alınacak ve atardamar tıkanıklığı olan hastalar için rutin olarak yapılan kan testi sonuçları kullanılacaktır.

03) ASD olan 100 tane ikiz gönüllünün çalışmaya dahil edilmesi planlanmaktadır. Bu araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarın da yürütülecektir.

04) Araştırmaya katılımınız sizin isteğinize bağlıdır. İsteddiğiniz zaman herhangi bir cezaya ve yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Aynı şekilde, araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabileceksiniz.

05) Bu araştırmanın size veya ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir, size bu konuda söz verilemez.

06) Size bu çalışmada herhangi bir madde verilmeyecektir.

07) Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmemektedir. Bunun yanı sıra size de bir ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumundan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.

08) Sizinli ilgili tüm klinik bilgiler, klinik bulgular ve elde edilecek genetik bulgular gizli kalacak ve kimseyle paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayınlanmasında dahi kimlik bilgileriniz kimseyle paylaşılmayacaktır.

09) Araştırma konusuyla ilgili ve araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler edinildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir. Araştırma hakkında ve araştırmayla ilgili herhangi bir olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği telefon numarası: 0 5071206190

10) Sizden bir defaya mahsus olmak üzere kolunuzdan 2 ml kan alınacaktır.

11) Toplanan örnekler yurt dışına analiz amacı ile gönderilmeyecektir.

12) Çalışmaya katılmaya karar verirsiniz kimliğinizin gizli kalması koşuluyla bu araştırmadan elde edilecek bilgi ve bulguların istendiğinde ilgili resmi makamlara verilebileceğini ve bilimsel amaçla yayınlanabileceğini kabul etmiş olursunuz.

13) Bu araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Laboratuvarın da yürütülecektir.

14) Bu formu imzalamadan önce, kendi haklarınız ile ilgili sorularınız varsa lütfen sorun. Daha sonra bu konularla ilgili sorunuz olursa, ya da herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi almak isterseniz proje araştırmacılarından Yrd. Doç.Dr. Ceyda Hayretdağ Örs ile: 05071206190 ve Uzm. Dr. Pınar Algedik ile 0507 120 61 90 numaralarından 24 saat irtibata geçebilirsiniz. (Bu yazının bir kopyası da size verilecektir)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“Otizm Spektrum Bozukluğu Olan İıkizlerde Kopya Sayısı Değışikliklerinin Vitamin D Reseptörü ile İlişkisinin Araştırılması.” isimli çalışma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan)

- Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum
 İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum
 Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Gönüllünün
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Gerekliyorsa Olur İşlemine Tanık olan
kişinin
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Araştırmacı
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

Gerekliyorsa Yasal Temsilcinin
Adı ve Soyadı:
İmzası:
Tarih:
Tel:

2.6. EK 3

M-CHAT* DEĞİŞTİRİLMİŞ ERKEN ÇOCUKLUK DÖNEMİ OTİZM TARAMA ÖLÇEĞİ

Değiştirilmiş Erken Çocukluk Dönemi Otizm Tarama Ölçeği (M-CHAT), 18-30/36 aylık çocuklarda otizmin belirtilerini tespit etmek amacıyla geliştirilmiş bir tarama ölçeğidir. M-CHAT toplam **23 maddeden** oluşmaktadır ve uygulaması yaklaşık **10-15 dakika** sürmektedir. M-CHAT sadece çocuğunuzda **otizm şüphesi** olup olmadığını gösterir.

UYARI: M-CHAT genelde ailelerin doldurduğu bir testtir. Ancak, Türkiye de yapılan araştırmada bu ölçeğin eğitilmiş sağlık çalışanları (psikolog, hemşire, vb.) yardımı ile uygulanmasının daha doğru olabileceği gösterilmiştir (Kara 2014).

Değiştirilmiş Erken Çocukluk Dönemi Otizm Tarama Ölçeği (M-CHAT)

Lütfen aşağıdaki soruları çocuğunuzun genelde nasıl olduğunu göz önünde bulundurarak cevaplamaya çalışın. Eğer belirli bir davranışı nadiren yapıyorsa (bir veya bir iki kere), çocuğunuz o davranışı yapmıyormuş gibi yanıtlayın.

1. Çocuğunuz sallanılmaktan ya da dizinizde hoplatılmaktan veya benzeri oyunlardan hoşlanır mı?
Evet /**Hayır**
2. Çocuğunuz başka çocuklarla ilgilenir mi?
Evet /**Hayır**
3. Çocuğunuz eşyalara (örneğin koltuk, kütüphane vb.) ve benzeri şeylere tırmanmayı sever mi?
Evet /**Hayır**
4. Çocuğunuz ce-e (yüzünüzü ellerinizle kapatıp açarken ce-e demek) ve saklambaç oyunlarından hoşlanır mı?
Evet /**Hayır**
5. Çocuğunuz hiç hayali oyun oynar mı? (örneğin, telefonu alıp karşısında biri varmış gibi konuşur mu veya oyuncak bebeğinin altını temizliyormuş gibi yapar mı?)
Evet /**Hayır**
6. Çocuğunuz ne olduğunu merak ettiği bir şeyi (sormak amacıyla) işaret parmağıyla gösterir mi?
Evet /**Hayır**
7. Çocuğunuz bir şeyin ilgisini çektiğini belirtmek için işaret parmağıyla gösterir mi?
Evet /**Hayır**
8. Çocuğunuz küçük oyuncakları (araba, lego gibi) ağzına almadan, fırlatıp atmadan veya elinde sallamadan (amacına uygun) oynar mı?
Evet /**Hayır**
9. Çocuğunuz bazı şeyleri (eşyalar, oyuncaklar gibi) göstermek için size getirir mi?
Evet /**Hayır**
10. Çocuğunuzla bir-iki saniyeden daha uzun süreli göz teması (gözünüzün içine bakması) kurabiliyor musunuz?
Evet /**Hayır**
11. Çocuğunuzun bazı seslerden aşırı derecede rahatsız olduğunu gözlemlediniz mi?
Evet /Hayır

12. Çocuğunuza baktığınızda ya da güldüğünüzde o da size güler mi?
Evet /**Hayır**
13. Çocuğunuz sizi taklit eder mi?
Evet /**Hayır**
14. Çocuğunuza ismiyle çağırdığınızda size yanıt verir mi?
Evet /**Hayır**
15. Çocuğunuza aynı odada bulunan bir eşyayı (örneğin, oyuncacı) işaret ettiğinizde, gösterdiğiniz eşyaya bakar mı?
Evet /**Hayır**
16. Çocuğunuz yürüyor mu?
Evet /**Hayır**
17. Sizin baktığınız şeylere çocuğunuz da bakar mı?
Evet /**Hayır**
18. Çocuğunuz yüzünün önünde parmaklarıyla anlaşılmaz hareketler yaparak ellerini seyrediyor mu?
Evet /Hayır
19. Çocuğunuz bir şeyler yapmaya çalışırken sizin dikkatinizi çekmek için çaba gösterir mi?
Evet /**Hayır**
20. Hiç çocuğunuzun iyi işitmediğinden endişe duydunuz mu?
Evet /Hayır
21. Çocuğunuz çevresindeki insanların neler söylediğini/konuştuğunu anlar mı?
Evet /**Hayır**
22. Çocuğunuz bazen boşluğa bakıyormuş gibi dalıp gider mi?
Evet /Hayır
23. Çocuğunuz bilmediği bir durumla karşılaştığı zaman sizin davranışınızı anlamak amacıyla yüzünüze bakar mı?
Evet /**Hayır**

*Modified Checklist for Autism in Toddlers

M-CHAT'in Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Testte yer alan **11, 18, 20 ve 22** numaralı sorularda **evet** olumsuz, diğer sorularda **hayır** olumsuz yanıtır. Olumsuz yanıtların belirlenmesini kolaylaştırmak amacıyla bu yanıtlar soru formunda **kalin** karakterle yazılmıştır.

Orijinal İngilizce M-CHAT'te **2, 7, 9, 13, 14, 15.** sorulardan en az ikisinde ya da **23 sorudan en az üçünde** **kalin** yazılmış seçenek işaretlenmişse çocuğun otistik spektrum bozukluğu açısından riskinin yüksek olduğu kabul edilir ve bir ocuk ve ergen psikiyatrisi uzmanına yönlendirilmesi önerilir (Robins 2001).

Türkçe kültürel adaptasyon yapılan çalışmada İngilizce orijinal çalışmadan farklı olarak **5, 10, 17, 19 ve 21** numaralı soruların da otistik spektrum bozukluğu riskini belirleme açısından yüksek tanı değeri taşıdığı saptanmış, **13** numaralı sorunun tanı gücünün ise orijinal çalışmadan farklı olarak düşük olduğu görülmüştür (Kara 2014). Bu verilere göre, M-CHAT testinin Türkçe kültürel adaptasyonunda **2, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 17, 19 ve 21** numaralı soruların en az ikisinde ya da **23 sorudan en az üçünde** **kalin** yazılmış seçenek işaretlenmişse çocuğun otistik spektrum bozukluğu açısından riskinin yüksek olduğu kabul edilmekte ve çocuğun bir ocuk ve ergen psikiyatrisi uzmanına yönlendirilmesi önerilmektedir.



ÖZGEÇMİŞ

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| Ad-Soyad: | Tuba KÖSE |
| Doğum Yeri ve Tarih: | İstanbul/ 29.05.1992 |
| Uyruk: | T.C. |
| Medeni Durum: | Bekar |
| İletişim Adresi: | Rasimpaşa mah. Celal Muhtar sok. Kadıköy/İSTANBUL |
| Telefon ve E-mail: | 0507 097 64 76/ tubaesrakose@gmail.com |
| Yabancı Dil: | İngilizce |

Eğitim Bilgileri

| | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|------|
| Yüksek Lisans | Sağlık Bilimleri Üniversitesi | 2019 |
| Lisans | Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü | 2016 |
| Lise | Erenköy Kız Lisesi | 2010 |

Staj Bilgileri

| | | |
|--------------------------------|-------------------------------------------|------|
| Genetik Lab. | Arel Üniversitesi | 2012 |
| Tıbbi Genetik AD. | İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi | 2013 |
| Evcil Hayvanlar Sağlık Merkezi | Kadıköy Belediyesi | 2017 |

Yabancı Dil

| | |
|-----------|--------------|
| İngilizce | İleri Seviye |
| Almanca | Temel Düzey |

Sınav Bilgileri

| | |
|--------------|-------|
| ALES Puanı | 74,47 |
| Yökdil Puanı | 61,25 |

Katıldığı Etkinlikler ve Kurslar

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Almanca A2 Seviyesi/ İSMEK | 2019 |
| Almanca A1 Seviyesi / İSMEK | 2019 |
| MR Görüntülerinde Beyin Parselasyonları Yaparak Hacim Hesaplama ve DT Görüntülerde Traktografi Kursu/ Sağlık Bilimleri Üniversitesi | 2018 |
| Western Blot ve Hücre Analizi Kursu/ MedSanTek Laboratuvar Malzemeleri Şirketi | 2018 |
| LightCycler 480 Cihazı Eğitimi/ ELİPS Sağlık Ürünleri Şirketi | 2018 |
| Good Medical Researcher Online Eğitimi/MedicRes-Good Medical Researcher Online Program | 2018 |
| Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası / İstanbul Medipol Üniversitesi | 2018 |
| Pedagojik Formasyon Eğitimi / Marmara Üniversitesi | 2017 |
| Adli Biyoloji ve Genetik Konferansı / Ankara Üniversitesi | 2014 |
| Kök Hücre Sempozyumu / Marmara Üniversitesi | 2013 |
| Tüp Bebek Paneli / Haliç Üniversitesi | 2013 |
| Moleküler Biyoloji ve Genetik Konferansı / Arel Üniversitesi | 2012 |
| EC Malta Dil Okulu İngilizce Eğitim Sertifikası | 2012 |
| Development and Function of the Nervous System / Boğaziçi Üniversitesi | 2012 |
| Arel Üniversitesi İngilizce Hazırlık Sertifikası | 2012 |

| Projeler | | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Proje No: 2017/034 | Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında miR-219-1 gen varyantlarının hastalığın oluşum riski üzerine etkilerinin araştırılması | SBÜ-BAP |
| Proje No: 2019/028 | Otizm Spektrum Bozukluğu Olan İkizlerde Kopya Sayısı Değişikliklerinin Vitamin D Reseptörü ile İlişkisinin Araştırılması | SBÜ-BAP |

| Üyelikler | |
|-----------------------|------|
| Türk Toraks Derneği | 2018 |
| Tıbbi Genetik Derneği | 2018 |

| Bilimsel İlgi Alanları |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Nörodejeneratif hastalıklar• Nörogenetik• Kanser• Epigenetik• Moleküler Genetik Araştırmalar |