T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GABRA5, GABRB3, GABRG3, HTR2A GEN VARYANTLARININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI OLUŞUMU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞEYMANUR TUR

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. ENDER M. COŞKUNPINAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ARALIK/2022

İTHAF

“Desteklerini her an hissettiğim annem ve babama ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak tez çalışmamı yapabilmem için gereken maddi manevi her anlamda desteğini hissettiğim, tecrübeleri ve önerileri ile çalışmamın her aşamasında fikirlerini benimle paylaşıp yol gösteren, isteklerim ve bitmek bilmeyen sorularıma saat fark etmeksizin izin günlerinde bile sabır ve anlayışla yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ender M. Coşkunpınar'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yapabilmem için gereken fiziksel şartların sağlanmasında katkısı olan ve her konuştuğumda pozitif enerji depoladığım, desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ülkan Kılıç'a ve gönüllü örnekleri ile gereken klinik verilere erişmemi sağlayan Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı Doç. Dr. Nagehan Cevher Binici hocama teşekkür ederim.

Tıbbi biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans ve doktora yapan başım ne zaman sıkışsa sorularıma cevap bulmaya çalışan, yardımlarını esirgemeyen, bir aile gibi her şeyi paylaştığımız tüm ekip arkadaşlarıma, tez yazım aşamamda desteğini esirgemeyen, bu günleri olgunluk ve sağduyuyla geçirmem için gereken peri tozunu her an sağlayan Busenur Bolat'a ve yüksek lisansımın ilk günlerinden bugüne kadar herhangi bir fikre ihtiyacım olduğunda bir anne gibi beni her zaman dinleyen, destekleyen, çalışması ve azmiyle örnek aldığım Uzm. Dr. Fatma Emre Turan Taşolar'a ve hayatımda olan bütün dostlarıma teşekkür ederim.

İlkokula başladığım günden yüksek lisansımı bitirdiğim güne kadar ki uzun eğitim hayatımda her an yanımda olan, bana güvenen, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, evlatları olmaktan gurur duyduğum annem ve babama, İstanbul da ki hayatımı paylaşan bu süreçte benimle yorulan kardeşim Ayşegül'e, uzakta olsalar da hep yanımda olan ablam, abim, eniştem ve her okul çıkışı görüntülü konuşarak sevgi depoladığım yeğenlerim Erva ile Amine'ye teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin gerçekleşebilmesi için çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalar ve ailelerine teşekkür ederim.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iii
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
TABLOLAR LİSTESİ vii
ŞEKİLLER LİSTESİ viii
SİMGELER VE KISALTMALAR x
ÖZET xi
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU (OSB) 4
2.1.1. Tanım ve Tarihçe 4
2.1.2. Semptomlar 6
2.1.3. Tanı Kriterleri 8
2.1.4. Sınıflandırılması 11
2.1.5. Prevelans ve Risk Faktörleri 12
2.1.6. Epidemiyoloji 14
2.2. TEDAVİ 15
2.3. OTİZM NÖROBİYOLOJİSİ 16
2.4. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARININ MOLEKÜLER OLUŞUM MEKANİZMASI 18
2.4.1. Tek Nükleotid Değişiklikleri 20
2.4.2. Otizmde Popülasyon Genetiği 21
2.5. HTR2A GEN MUTASYONLARI 21
2.6. GABRB3 ve GABRG3 GEN MUTASYONLARI 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25
3.1. GEREÇ 25
3.1.1. Çalışmaya Katılacak Gönüllülerin Seçimi ve Örneklerinin Eldesi 25
3.1.2. Kimyasal Maddeler 26
3.1.3. Kitler 27
3.1.4. Restriksiyon Enzimleri 27
3.1.5. Markır 27
3.1.6. Cihazlar 28
3.1.7. Solüsyon ve Çözeltiler 29

3.2.YÖNTEM 30
3.2.1. Periferik Kandan Roche Kit ile Genomik DNA izolasyonu 30
3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm 31
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 31
3.2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Mutasyon Taraması 32
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi 33
3.2.6. İstatistik Analiz 33
4. BULGULAR 35
4.1. OLGU KARAKTERİSTİĞİ 35
4.2. Rs6313 VARYANTININ ANALİZİ 35
4.2. Rs140679 VARYANTININ ANALİZİ 37
4.3. Rs2081648 VARYANTININ ANALİZİ 39
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 47
KAYNAKLAR 48
EKLER 53

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Otizm spektrum bozukluğu için şiddet seviyeleri 8

Tablo 2.2: Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V (DSM-V) otizm tanı kriterleri 10

Tablo 3.1: Kullanılan ticari kit 27

Tablo 3.2: RFLP metodunda kullanılan restriksiyon enzimleri 27

Tablo 3. 3: PCR ve RFLP metodlarında kullanılan markırlar 27

Tablo 3.4: Genlere özgü dizayn edilen primerler 32

Tablo 3.5: Bölgelere özgü PCR kondisyonları 32

Tablo 3.6: Restriksiyon enzim kesimleri için komponentler ve miktarları 33

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet karşılaştırması 35

Tablo 4.2: Rs6313 mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (TT: wild type, CC: homozigot mutant, TC: heterozigot) 37

Tablo 4.3: Otizm hasta grubunda HTR2A genotipinin düzeylere göre dağılımları 37

Tablo 4.4: GABRG3/rs140679 mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (CC: wild type, TT: homozigot mutant, CT: heterozigot) 39

Tablo 4.5: Otizm hasta grubunda GABRG3 genotipinin düzeylere göre dağılımları 39

Tablo 4.6: GABRB3 Mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (TT: wild type, CC: homozigot mutant, TC: heterozigot) 41

Tablo 4.7: Otizm hasta grubunda GABRB3 genotipinin düzeylere göre dağılımları 41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Otizm spektrum bozukluğunda belirgin görülen semptomlar.....6

Şekil 2.2: PDD-NOS, Otistik bozukluk ve Asperger sendromunun tek bir etiket altında toplanması.....11

Şekil 2.3: ICD-11 verilerine göre Otizm Spektrum Bozukluğu sınıflandırılması.....12

Şekil 2.4: Otizmde genetik seviyeden sinir sistemleri seviyesine doğru sinaptik işlev ve beyin bağlantıları. 17

Şekil 2.5: Otizmde beyin bölgelerinde görülen değişiklikler.....18

Şekil 2.6: Otizm spektrum bozukluğu fenotipi ve genetik mimarisi.....19

Şekil 2.7: HTR2A geninin kromozomal lokalizasyonu (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HTR2A).....22

Şekil 2.8: GABRB3 geninin kromozomal lokalizasyonuhttps://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GABRB3).....23

Şekil 2.9: GABRG3 geninin kromozomal lokalizasyonuhttps://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GABRG3).....23

Şekil 4.1: HTR2A geni rs6313 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (342 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 36

Şekil 4.2: HTR2A geni rs6313 varyantı PCR ürünlerinin (342 bp), MspI restriksiyon enzimi ile kesimi ve %2'lik agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü. 36

Şekil 4.3: GABRG3 geni rs140679 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (316 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 38

Şekil 4.4: GABRG3 geni rs140679 PCR ürünlerinin (316 bp), HpyCH4III restriksiyon enzimi ile kesimi ve %2'lik agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü. 38

Şekil 4.5: GABRB3 geni rs2081648 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (398 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 40

Şekil 4.6: GABRB3 geni rs2081648 PCR ürünlerinin (398 bp), MseI restriksiyon enzimi ile kesimi ve % 4'lük agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü. 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC : Autism Behavior Checklist
ADDM : Otizm ve Gelişimsel Yetersizlik İzleme Ağı
CAM : Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp
CARS : Childhood Otizm Derecelendirme Ölçeği
CDC : Hastalık Kontrol ve Önizleme Merkezi
CNV : Kopya Sayısı Varyantları
DSM-V **:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V
GABA **:** Gama Aminobütirik Asit
GABRB3 : Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Beta 3
GABRG3 : Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Gamma 3
GM : Bağırsak Mikrobiyotası
GWAS : Genom Çapı İlişkilendirme Çalışmaları
HTR2A : 5-Hidroksitriptamin (Serotonin) Reseptörü 2A
5-HT : Serotonin, 5-hidroksitriptamin
ID : Zihinsel engellilik
NDD : Nörogelişimsel Bozukluklar
OSB **:** Otizm Spektrum Bozukluğu
PDD : Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
SNP : Tek Nükleotid Polmorfizmi
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

GABRA5, GABRB3, GABRG3, HTR2A GEN VARYANTLARININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI OLUŞUMU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) bozulmuş sosyal iletişim, tekrarlayan-kısıtlı davranış, aktivite veya ilgi örüntüleri ve değişmiş duygusal işlemeyle karakterize nörogelişimsel ve nörodavranışsal bozukluktur. Prevelansı erkeklerde 4 kat daha fazla olup son yıllarda artmıştır. Otizm patofizyolojisinde immünolojik, çevresel, epigenetik ve genetik faktörler rol alır. Hastalığın belirlenmesinde birçok nörokimyasal yolak ve nöroanatomik olay etkilidir. Bu karmaşık ve multifaktöriyel durum sebebiyle otizmin patofizyolojisi hala belirsizdir. Bu çalışmada otizm etiyolojisine katkısı olduğu düşünülen GABA ve Serotonin reseptör genlerinden GABRB3, GABRG3 ve HTR2A varyant değişikliklerinin hastalık patofizyolojisi ile olası ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 3-9 yaş arası OSB tanılı 200 hasta ve 100 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Alınan periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Spesifik varyantlara özgü PCR ile RFLP metodu kullanılarak genotipleme yapıldı. Veriler SPSS v25.0 programıyla analiz edildi.

Bulgular: Elde edilen verilere göre; HTR2A (rs6313 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda mutant CC genotipi taşıma frekansı ve GABRG3 (rs140679 **C**/T) genotipleri açısından hasta grubunda mutant TT genotipi taşıma frekansı kontrol gurubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu *(*p:0,0001, p: 0,0001).* Homozigot mutant genotipe sahip bireylerin frekansının hasta grubunda kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve mutant genotiplere sahip olmanın hastalık riskini yaklaşık 1,8 kat arttırdığı tespit edildi. GABRB3 (rs2081648 T/C) genotipleri açısından hasta grubunda kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi *(p:0,36).*

Sonuç: Genetik temele sahip otizm olgularında HTR2A/rs6313 varyantındaki nokta mutasyonu ve buna bağlı olarak C alleli taşımak ve GABRG3/rs140679 varyantındaki nokta mutasyonu ve buna bağlı olarak T alleli taşımak hastalığa yatkınlık sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: GABRB3, GABRG3, HTR2A, Otizm (OSB), RFLP

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF GABRA5, GABRB3, GABRG3, HTR2A GENE VARIANTS WITH THE FORMATION OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS

ABSTRACT

Aim: Autism spectrum disorders (ASD) is a neurodevelopmental and neurobehavioral disorder characterized by impaired social communication, repetitive and restricted patterns of behavior, activity or interest, and altered emotional processing. Its prevalence is 4 times higher in men and it has increased in recent years. Immunological, environmental, epigenetic and genetic factors play a role in the pathophysiology of autism. Many neurochemical pathways and neuroanatomical events are effective in determining the disease. It is still unclear how the main symptoms of autism occur as a result of this complex and heterogeneous situation. In this study, we focused on GABA and serotonin, which are thought to contribute to the etiology of autism; It is aimed to elucidate the mechanism of the disease by investigating variant changes in the GABA receptor subunit genes GABRB3, GABRG3 and the HTR2A gene, which encodes one of the serotonin receptors.

Materials and Methods: 200 patients with ASD between the ages of 3-9 and 100 healthy volunteers were included in the study. Genomic DNA isolation was performed from peripheral blood samples taken from volunteers. Genotyping was performed using the RFLP method with PCR specific for specific variants. Data were analyzed with SPSS v25.0 program.

Results: According to the data obtained in our study; In terms of HTR2A (rs6313 T/C) genotypes, the mutant CC genotype carrying frequency in the patient group and the mutant TT genotype carrying frequency in the GABRG3 (rs140679 C/T) genotypes were found to be significantly higher in the patient group compared to the control group (*p:0.0001, p:0.0001). It was determined that the frequency of individuals with homozygous mutant genotype was significantly higher in the patient group compared to the control group, and having mutant genotypes increased the disease risk approximately 1.8 times. In terms of GABRB3 (rs2081648 T/C) genotypes, it was determined that there was no statistically significant difference in the frequency of carrying mutant CC genotype in the patient group compared to the control group (p:0.36).

Conclusion: In genetically based autism cases, carrying the point mutation in the rs6313 variant of the HTR2A gene and the C allele and the point mutation in the rs140679 variant of the GABRG3 gene and accordingly carrying the T allele provide a predisposition to the disease.

Key Words: Autism (ASD), GABRB3, GABRG3, HTR2A, RFLP

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), altta yatan bilişsel özelliklere sahip olan ve genellikle diğer koşullarla birlikte ortaya çıkan yaygın, oldukça kalıtsal ve heterojen bir nörogelişimsel bozukluktur (1). Zihinsel engellilik (ID) ve OSB dahil nörogelişimsel bozukluklar (NDD) beyin gelişiminde bozulma gösteren karmaşık bozukluklardır. Bunlar değişken şiddet, klinik belirti ve farklı derecelerde işlevsellik ve bilişsel değişkenlikle ilişkilendirilmektedir (2).

Otizm, DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) kriterlerine göre tanı alan ve 1/88 sıklıkla görülen bir hastalıktır (3). OSB'li bireyler birbirinden çok farklı olsalar da, kültür, etnik köken veya sosyoekonomik gruplardan bağımsız olarak sosyal iletişim ve kısıtlı, tekrarlayan duyusal-motor davranışlar gibi temel özelliklerle karakterize edilir (4). OSB bozulmuş iletişim, stereotipik veya tekrarlı davranışlar, anormal sosyal etkileşim dahil çeşitli klinik ve anlamsal olarak gruplanabilecek heterojen bir takım nörogelişimsel bozukluğu kapsamaktadır (5).

Otizm, erken değiştirilmiş beyin gelişimi ve sinirsel yeniden yapılanmadan kaynaklanmaktadır (6). OSB'de genel genetik yapıya bakıldığında ise yapılan zenginleştirme çalışmaları, OSB ile ilişkili olan genlerin nöronal aktivite, beyin gelişimi, transkripsiyon düzenlenmesi ve sinyalleşmenin düzenlenmesi gibi önemli konularda katkıda bulundukları ortaya konmuştur (5). OSB'li çocuklar genel popülasyona oranla tıbbi komorbiditelere daha yatkındır. Down sendromu, Nörofibromatozis tip I, Fragile X sendromu ve Duchenne kas distrofisi gibi genetik bozukluklar OSB'li çocuklarda daha yaygındır. Ayrıca %80'inde görülen uyku bozuklukları ve epilepsi, hidrosefali, makrosefali ve sinir sistemin doğuştan olan anomalileri şeklinde görülebilen nörolojik bozukluklarda yatkınlık görülmektedir (7).Otistik bozukluğun prevalansı, erkeklerde kadınlara göre yaklaşık dört kat daha yüksektir (6). OSB, öncelikle birden fazla geni içeren bir multigenik bozukluk olmasına rağmen, altta yatan mekanizmalara ilişkin öngörüler, multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir (8). OSB riskine katkıda bulunan hem nadir hem de yaygın genetik varyantları belirlemek için yapılan çalışmalarda çeşitli aday genler tespit edilmiştir. Sinapslarla ilgili risk genleri, nöreksinler, kaderinler ve nöroliginler gibi hücre yapışma proteini kodlayan genleri içerir bunlar; sinaptik vezikül döngü proteinleri sinapsin-1ve 2

(SYN1, SYN2), CACNA1E, CACNB2, KCNQ3 ve KCNQ5, KCND2, SHANK3, SYNGAP1 ve GABRG3 gibi genlerdir (9). Otizm etiyolojisi tam olarak bilinmese de genel fikir birliği otistik gelişimde çevresel faktörler ve genetik mekanizmaların birlikte predispozan olduğudur (10).

Etiyolojisi karmaşıktır ve genetik katkılar monozigot ikizlerdeki uyum dahil bozukluk oluşumundaki yüksek kalıtsallık bilinmektedir. Ancak buna rağmen yaklaşık %80'i kopya sayısı varyantları (CNV) ve monogenik mutasyonlar ile açıklanamamaktadır. Dolayısıyla otizm risk mimarisinin sadece tek nükleotid polimorfizmler (SNP), çoklu genetik mutasyonlar veya CNV'lerden oluşmadığı ayrıca düşük penetrasyonlu ve klinik fenotip geliştirme eşiğinde kombinasyonlu hareket eden çevresel faktörlerden oluştuğu düşünülmektedir (11).

Nörotransmitter sistemin işlev bozuklukları, OSB dahil birçok psikiyatrik hastalığın gelişimi ile ilgilidir. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), OSB 'nin çeşitli duyarlılıkları ve tedavilere yanıtı ile ilişkilendirilmektedir. Nörotransmitterlerin işlevleri, reseptörleri aracılığıyla taşınır. 5-Hidroksitriptamin (Serotonin) Reseptörü 2A (HTR2A), beyinde en çok ifade edilen serotonin reseptörlerinden biridir ve OSB 'nin gelişiminde rol oynamaktadır (12). HTR2A reseptörü, G proteinine bağlı reseptör ailesine aittir ve esas olarak sinaptik sonrası nöronlarda görev yapan, Serotoninin birincil uyarıcı reseptörüdür. İnsanlarda HTR2A geni, kromozom 13q14–q21 bölgesinde bulunur. HTR2A'nın ekspresyonu birkaç fonksiyonel polimorfizm tarafından düzenlenir (13). Gamma-amino bütirik asit (GABA) reseptörü sırasıyla β3, α5 ve γ3 alt birimlerini kodlayan GABRB3, GABRA5 ve GABRG3 genlerinden oluşup 15. kromozomal bölgede lokalizedir. Bu reseptörler, otistik hastaların hipokampüsünde GABA reseptör yoğunluğunun azalması ve GABAerjik inhibisyonun otizmin etiyolojisinde rol oynadığı için büyük ilgi görmektedir (14). OSB gelişiminde rol oynayan nörotransmitter sistem bozuklukları ile ilgili genlerdeki herhangi bir varyasyon otizm için potansiyel bir risk faktörü olabilir.

Otizmli hastalar ile yapılan bu çalışma ile GABRB3, GABRG3 ve HTR2A genlerinde yer alan varyant değişikliklerinin araştırılması ve hastalığın oluşum mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır. Çalışmamız, Türk toplumunda GABRB3, GABRG3 ve HTR2A genlerinde ki varyant değişikliklerinin birlikte çalışılacağı ilk proje olacaktır. Dünyanın farklı bölgelerinde yukarıda belirtilen genlerin

farklı varyantlarıyla yapılmış ve birbirleriyle aynı yönde sonuç vermiş çok az sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu çalışma ile hem bu genlerin Otizm Spektrum Bozukluklarının patofizyolojisinin aydınlatılması noktasında hem de tek başına hastalık oluşumunu tetiklemeyip ancak birlikteliklerinin hastalık oluşumuna yol açabileceği üzerinde durmuş olduğumuz gen varyantlarındaki mutasyon(lar) araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU (OSB)

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Otizm kelimesi, Yunanca kendi anlamına gelen “autós” sözcüğünden türetilmiştir. Otistik bozukluk, 1994 yılında yayınlanan Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabının (DSM-IV) dördüncü baskısında yer alan beş Yaygın Gelişimsel Bozukluktan (PDD'ler) biridir (15).

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), bozulmuş sosyal etkileşim ve iletişim becerileri ile karakterize edilen ve sıklıkla tekrarlayan veya kalıplaşmış davranış ve anormal duyusal işlem gibi diğer davranışsal semptomların eşlik ettiği bir grup nörogelişimsel bozukluktur (1).

Geçtiğimiz 50 yılda otizm nadir görülen ve dar şekilde tanımlanmış çocukluk çağı bozukluğuyken günümüzde heterojen ve oldukça yaygın görülen, iyi duyurulan ve araştırılan hale gelmiştir (4). Genellikle yaşamın ilk üç yılında ortaya çıkmaktadır ve çocukların yaklaşık %1’ini etkilemektedir (3). OSB, erken değiştirilmiş beyin gelişimi ve sinirsel yeniden yapılanmadan kaynaklanmaktadır. OSB’nin genel özelliklerinin tekrarlayan, olağandışı duyusal ve motor davranışlar, sosyal iletişim eksiklikleri olarak görülmesi ilk tanımlamadan bu yana büyük ölçüde değişmemiştir. Aynı zamanda otizm artık çok hafif ile şiddetli arasında değişebilen bir spektrum olarak tanımlanabilmektedir (4).

Otizm spektrum bozukluğunun başlangıcı gelişimsel dönemde, tipik olarak erken çocuklukta ortaya çıkarken semptomlar tam olarak ortaya çıkmayabilir (5.ICD-11 Version: 02/2022). Otizmin başlangıcı geleneksel olarak iki şekilde tanımlanır; ilkinde, çocuklar yaşamın ilk yıllarında sosyal ve iletişimsel gelişimde anormallikler gösterir. Ebeveynlerce tanımlanan en yaygın başlangıç semptomu, gecikmiş konuşma gelişimidir (16). Ancak son zamanlardaki literatüre göre tipik olarak tanıya yol açan dil anormalliklerinden önce sosyal ve sözel olmayan iletişimsel gecikmelerin geldiği öne

sürülmektedir. İkincisinde ise çocuk ilk iki yıl tipik olarak gelişiyor gibi görünürken ikinci yaşlarından sonra daha önceki becerilerini kaybederek otistik semptomlar göstermeye başlar.

Goldberg ve arkadaşlarının çalışmasına göre konuşma becerisini kaybeden çocuklar genelde isme tepki ve doğrudan bakış gibi sosyal ilgi davranışlarını da kaybeder. Ama bunun tam tersi her zaman görülmez yani bazı çocuklar sadece sosyal ilgi davranışını kaybederken konuşma becerisini kaybetmezler (17).

Hansen ve arkadaşları, regresyonlu çocukların %18'inin dil becerilerini kaybettiğini, %46'sının sosyal kayıplar yaşadığını, %36'sının ise hem dil hem de sosyal ilgide kayıp yaşadığını bulmuştur (18).

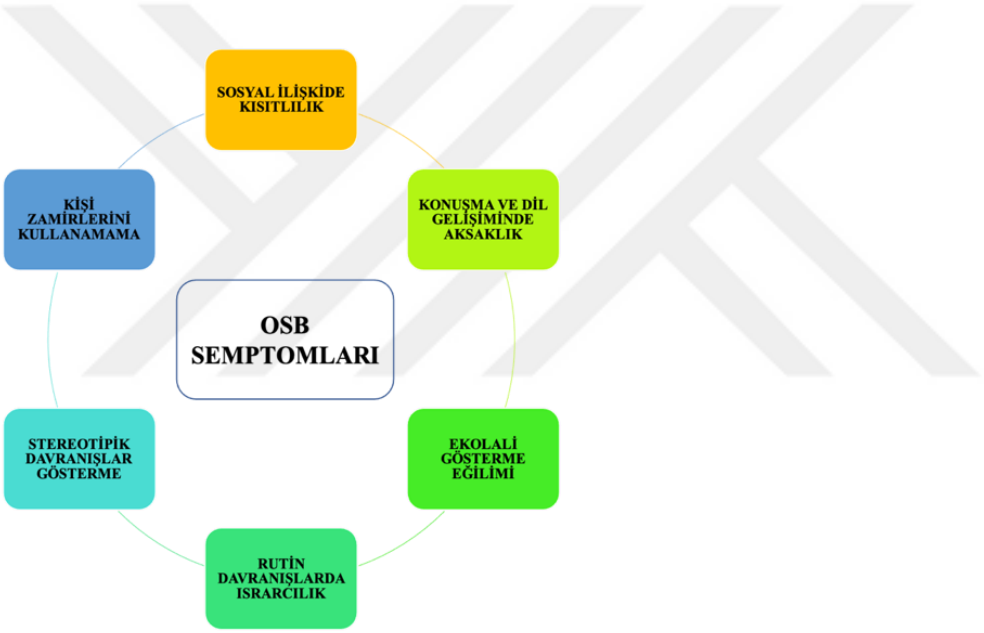
Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V (DSM-V)'te fenotipik düzeyde ayrıca etiyoloji ve görüntülenen beyin seviyelerindeki sonuçlara göre otizmin heterojenliği evrensel olarak kabul edilmektedir. DSM-IV'te bulunan yaygın gelişimsel bozukluklar (PDD) kategorisi çok kapsayıcı olduğundan otizmin daha az prototipik sunumlarına doğru sapma başlatmıştır. DSM-V'te ise mevcut olan OSB tanımı alt tipler arasındaki zaman içindeki kararsızlıklar nedeniyle bu PDD alt tiplerini birleştirmiştir (19). DSM-V'te artık OSB alt tipleri içermezken bireylerin ihtiyaçlarına göre işlevsel destek düzeyine göre tanımlanmakta olan tek durum temsil edilir. Ayrıca OSB tanısı alan kişilerin 4 davranış kriterinden 2'sini (yani, tekrarlayan konuşma veya motor hareketler, aynılıkta ısrar, sınırlı ilgiler veya duyusal girdilere olağandışı tepkiler) ve 3 sosyal kriteri (yani, sosyal-duygusal karşılıklılıktaki eksiklikler, sözel olmayan iletişim davranışlarındaki eksiklikler ve ilişkileri geliştirme, anlama ve sürdürmedeki eksiklikler) karşılıyor olmasını belirtmektedir (20).

Otizm, çeşitli gelişimsel farklılıklarla ortaya çıkan ve farklı şekillerde fenotipik davranışlarla karakterizedir. Bu farklılıkların oluşmasının altında yatan nedenler oldukça karmaşıktır. Birden fazla gelişimsel farklılık gösteren patolojik mekanizma içerebilmektedir. Sürecin bu şekilde karmaşık olması OSB tanısı alan hastalar arasında geniş davranış değişiklikleri görülmesini açıklamaktadır (21).

2.1.2. Semptomlar

Ruhsal bozuklukların sınıflandırılması için Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (DSM) standarttır. Otizm de araştırmacılar tarafından ortak belirlenen anormal davranışlara göre teşhis edilir. Otistik bozukluk, otizm spektrum bozuklukları (OSB) adı ile etiketlenerek gruplandırılmıştır. Semptomları genellikle ilk üç yaşta belirgindir ve göz temasında eksiklikler, uyaranlara aşırı tepki ve aşırı mizaç gibi olağandışı tepkiler içermektedir (*DSM-V-TR*.2013).

Kanner 1943 yılında yaptığı çalışma ile bugün hala geçerli olan otizm tanısı için kullanılabilecek temel semptomları öne sürmüştür (Şekil 2.1.) (22).



Şekil 2.1: Otizm spektrum bozukluğunda belirgin görülen semptomlar

Otizmli hastalarda erken dönemde aşağıdaki semptomlar görülebilir;

- Ortak dikkatin ortaya çıkmasındaki eksiklikler veya gecikmeler ve rol yapma oyunu,
- Atipik örtük perspektif alma,
- Karşılıklı duygusal davranışlarda eksiklikler,
- Kendi ismine verilen tepkinin azalması,
- Azaltılmış taklit,

- Gecikmiş sözlü ve sözlü olmayan iletişim,
- Motor gelişim gecikmesi,
- Alışılmadık şekilde tekrarlayan davranışlar,
- Atipik görsel-motor keşif,
- Görsel dikkati devre dışı bırakmada esnek olmama,
- Mizaçtaki aşırı değişkenlik

Bu semptomlar, yeni yürümeye başlayan çocuklar için tarama ve teşhis araçlarına katkıda bulunurken özellikle kadınlar için yüksek işlevli bireylerin tanımlanması, olması gerekenden genellikle daha geç olmaktadır (23).

Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V (DSM-V)'e göre OSB'den etkilenmenin şiddeti 3 farklı şekilde açıklanmıştır (Tablo 2.1). Bunlar çok ciddi, orta ve hafif seviyede destek gereksinimine göre gruplanmıştır ve sosyal iletişim ve kısıtlı tekrarlayan davranışlara göre bireylerin semptomlarını değerlendirmeyi sağlamaktadır.

Tablo 2.1: Otizm spektrum bozukluğu için şiddet seviyeleri

Şiddet seviyesi	Sosyal iletişim	Kısıtlı, tekrarlayan davranışlar
Seviye 3 **'Çok ciddi seviyede destek gereksinimi'**	Sözlü ve olmayan sosyal iletişim becerilerindeki ciddi eksiklikler, işlevsellikte ciddi bozulmalara, çok sınırlı sosyal etkileşimlerin başlatılmasına ve gelen sosyal girişimlere minimum tepkiye neden olur. Örneğin, az sayıda anlaşılır konuşmaya sahip, nadiren etkileşim başlatan ve yaptığında, yalnızca ihtiyaçları karşılamak için olağandışı yaklaşımlar yapan ve yalnızca çok doğrudan sosyal yaklaşımlara yanıt veren bir kişi.	Davranışta esnek olmama, değişimle başa çıkmada aşırı güçlük veya diğer kısıtlı/tekrarlayıcı davranışlar, tüm alanlardaki işleyişi önemli ölçüde engeller. Odaklanma veya eylem değiştirmede büyük sıkıntı/zorluk.
Seviye 2 **'Orta seviye destek gereksinimi'**	Sözlü ve sözlü olmayan sosyal iletişim becerilerinde belirgin eksiklikler; destekler yerindeyken bile görülen sosyal bozukluklar; sosyal etkileşimlerin sınırlı başlatılması ve diğerlerinden gelen sosyal tekliflere azaltılmış veya anormal tepkiler. Örneğin, basit cümleler konuşan, etkileşimi dar özel ilgi alanları ile sınırlı olan ve belirgin şekilde garip sözsüz iletişim kuran bir kişi.	Davranışta esnek olmama, değişimle başa çıkmada zorluk veya diğer kısıtlı/tekrarlayıcı davranışlar, sıradan gözlemci için yeterince sık görülür ve çeşitli bağlamlarda işlevselliğe müdahale eder. Sıkıntı veya odak ya da eylem değiştirmede zorluk çekme.
Seviye 1 **'Hafif seviye destek gereksinimi'**	Destekler olmadan, sosyal iletişimdeki eksiklikler gözle görülür bozulmalara neden olur. Sosyal etkileşimleri başlatmada zorluk ve başkalarının sosyal girişimlerine atipik veya başarısız tepkilerin açık örnekleri. Sosyal etkileşimlere ilgi azalmış gibi görünebilir. Örneğin, tam cümlelerle konuşabilen ve iletişim kuran, ancak başkalarıyla ileri geri konuşmaları başarısız olan ve arkadaş edinme girişimleri tuhaf ve tipik olarak başarısız olan bir kişi.	Davranışın esnek olmaması, bir veya daha fazla bağlamda işlevselliğe önemli ölçüde müdahaleye neden olur. Aktiviteler arasında geçiş yapma zorluğu. Organizasyon ve planlama sorunları bağımsızlığı engeller.

2.1.3. Tanı Kriterleri

Otizm spektrum bozukluğu heterojen ve karmaşık bir hastalık olup aynı zamanda farklı psikiyatrik bozukluklar ile örtüştüğü için doğru teşhis etmede kullanılan

ölçek ve araçlar önemlidir (15). Teşhis değerlendirilirken multidisipliner yaklaşılmalı; bireyle etkileşim, bakıcı-ebeveyn ile görüşmeler, topluluk içindeki davranış bilgilerinin toplanması, tıbbi muayene ve bilişsel değerlendirmeler ile oluşturulacak çerçeve sonucunda ortaya çıkan koşullar taranmalıdır (24).

Tanıda hasta görüşmeleri ve doğrudan gözlemlenmesi, aile görüşmeleri, kapsamlı aile öyküleri incelenmesini içeren klinik değerlendirmeler irdelenmektedir. Vllasaliu ve arkadaşları tarafından ölçekler incelenmiş ve OSB tanısı için belirli ölçekler belirlenmiştir (25). Çeşitli Gelişimsel, Boyutsal ve Tanısal Görüşme (The Developmental, Dimensional, and Diagnostic Interview (3di)), 740 öğeden oluşan ebeveynler/bakıcılarla bilgisayar ve araştırmacı tabanlı bir görüşmedir. Bu ölçek 266 maddede OSB semptomlarını,183 madde demografik arka planı, 291 madde diğer bozukluklarla olası birliktelikleri irdelemektedir (26). (CARS), 15 maddeden oluşan bir diğer OSB tanısında kullanılan ölçektir. OSB semptomlarını normal gelişimi beklenen sağlıklı çocuklar ile karşılaştırarak "1" (normal davranış) ve "4" (ciddi anormal davranış) arasında puanlayarak hafif, orta ve şiddetli OSB sınıflandırılır (27). Otizm Davranış Kontrol Listesi (ABC-Autism Behavior Checklist) 57 maddeden oluşan ilişki kurma, duyusal, nesne ve beden kullanımı, sosyal-öz bakım, dil becerisi gibi 5 alt ölçek içeren ölçektir. En yüksek puan 159 en düşük 0'dır (28).

Otizm, nöral reorganizasyon ve beyin gelişiminden kaynaklanmasına rağmen kesin tanıda güvenilir biyo-belirteçler olmaması nedeniyle davranış temelli yöntemler kullanılmaktadır (29). DSM-V de yayınlanan tanı kriterleri OSB tanısını kolaylaştırmayı amaçlamaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı V (DSM-V) otizm tanı kriterleri

A. Aşağıda verilen örneklerle şu anda veya geçmişle kendini gösteren, birden çok durumda sosyal iletişim ve sosyal etkileşimde kalıcı eksikliklerin görülmesi
A-1) Sosyal-duygusal yanıt verme eksiklikleri, sosyal etkileşimleri başlatamama veya bunlara yanıt vermeme **A-2) Göz teması ve beden dilindeki anormalliklerden yüz ifadelerinin ve sözsüz iletişimin tamamen yokluğuna kadar değişebilen sözel olmayan iletişimsel davranış eksikleri** **A-3) Yaratıcı oyun paylaşmada ya da arkadaş edinme zorlukları gibi ilişkileri anlama, sürdürme ve geliştirme eksiklikleri**
B. Aşağıda verilen örneklerle şu anda veya geçmişte en az ikisi ile görülen sınırlı, yineleyici davranış, ilgi alanları veya faaliyetler örüntüleri
B-1) Stereotipik veya tekrarlayan motor hareketler, nesne kullanımı veya konuşma **B-2) Ritüelleştirilmiş kalıplar veya sözlü sözsüz davranışlar, aynılıkta ısrar, rutinlere katı bağlılık** **B-3) Odak veya yoğunluk açısından anormal-kısıtlı, sabit ilgi alanları** **B-4) Çevrenin duyusal yönlerinde olağandışı ilgiler veya Duyusal girdilere karşı hiper veya hiporeaktivite**
C. Semptomlar erken gelişim döneminde mevcut olmalıdır.
D. Semptomlar, sosyal, mesleki veya mevcut işlevselliğin diğer önemli alanlarında klinik olarak anlamlı bozulmaya neden olur.
E. Zihinsel yetersizlik ve otizm genellikle birlikte görülür; otizm ve zihinsel yetersizlik komorbid tanılarının konabilmesi için sosyal iletişimin genel gelişim düzeyi için beklenenin altında olması gerekir.

Başlangıçta farklı ancak ilişkili bozukluklar şeklinde kategorize edilen bir grup hastalık artık sadece Otizm spektrum bozuklukları etiketiyle düşünülerek DSM-V kriterlerine uyacak şekilde bu bozuklukların hepsi tek bir şemsiye altında toplanmaktadır (Şekil 2.2) (30).



Şekil 2.2: PDD-NOS, Otistik bozukluk ve Asperger sendromunun tek bir etiket altında toplanması

Abrahams ve arkadaşlarına göre en şiddetli OSB otistik bozukluktur ve bu hastalar en şiddetli bilişsel bozukluktan muzdariptir. Diğer iki OSB türünden biri Asperger sendromudur ve daha hafif otizm şeklidir, ortalama üstünde zekâ görülürken diğer türü Yaygın Gelişimsel Bozukluktur. Tanı ölçütlerine göre otistik bozukluk kadar şiddetli olmayan bireylere PDD-NOS tanısı konurken, otizm Asperger sendromuna göre daha şiddetlidir (31).

2.1.4. Sınıflandırılması

Otizm klinik kriterlere dayalı genel olarak sendromik ve sendromik olmayan olarak sınıflandırılır. “Sendromik” tanımı ek fenotipler veya dismorfik özelliklerle birlikte olduğunu ifade ederken “Nonsendromik” tanımı Kanner’in tanımladığı hal ile ek semptom göstermeyen klasik anlamına gelmektedir. Bunların genelinde etiyoloji bilinmezken idiyopatik otizm tanımı kullanılabilmektedir. Sendromik olanlarda ise etiyoloji çoğu durumda bilinir. Sendromik tipleri sadece genetik özellikler açısından değil farklı gelişimsel özellikler ve klinik durumlar açısından nonsendromik olan tiplerden ayrılır (32).



Şekil 2.3: ICD-11 verilerine göre Otizm Spektrum Bozukluğu sınıflandırılması

International Classification of Diseases 11th (ICD-11) (Version: 02/2022) verilerine göre otizm spektrum bozukluğunu 5 farklı başlıkta sınıflamak mümkündür (Şekil 2.3). İlkinde OSB için tüm tanımsal gereksinimler karşılanır, bireyin işlevsel dili kullanma kapasitesinde yalnızca hafif düzeyde bozulma vardır veya hiç bozulma yoktur ve entelektüel işlevsellik ve uyumsal davranış ortalama aralıkta bulunur. İkincisinde hem entelektüel gelişim bozukluğu hem de OSB için tüm tanımsal gereksinimler karşılanır ve bireyin kişisel ihtiyaç ve arzuları ifade etme gibi işlevsel dili kullanma kapasitesinde yalnızca hafif düzeyde bozulma vardır veya hiç bozulma yoktur. Üçüncüsünde OSB için tüm tanımsal gereksinimler karşılanır, entelektüel işlevsellik davranışın ortalama aralıkta olduğu bulunurken işlevsel dilde göreli olarak belirgin bir bozulma vardır. Bireyin tek kelimeden veya basit ifadelerden fazlasını kullanamaması görülür. Dördüncüsünde hem OSB hem de entelektüel gelişim bozukluğu için tüm tanımsal gereksinimler karşılanır ve bireyin yaşına göre işlevsel dilde belirgin bir bozulma vardır. Birey birden fazla kelime veya basit ifade kullanamaz. Sonuncusunda ise hem OSB hem de entelektüel gelişim bozukluğu için tüm tanımsal gereksinimler karşılanmıştır ve eksiksizdir, bireyin yaşına göre işlevsel dili kullanma yeteneği yoktur (ICD-11 version: 02/2022).

2.1.5. Prevelans ve Risk Faktörleri

Otizm hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlı gelişen beyni etkileyen nörobiyolojik bir hastalıktır. Araştırmalar etiyolojideki potansiyel mekanizmaları

anlamamıza yardımcı olurken şu ana kadar tek bir birleştirici neden açıklanamamıştır (33).

Otizmin genetik kalıtım çalışmaları sonucu %40 ile %90 arasında değiştiği düşünülürken, son araştırmalar yaklaşık %50 genetik etkinin neden olduğunu göstermektedir. Geriye kalan yüzdelik kısmın ise perinatal, doğum öncesi ve sonrası çevresel faktörlere bağlı olabileceği muhtemeldir (34). Genetik katkı çeşitli biyolojik yollar boyunca ve mutasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Genetik mekanizmaya ek olarak çevresel faktörlerle de ilişkilendirilmektedir. İleri yaş, hipertansiyon, obezite, diyabetes mellitus gibi metabolik durumlar doğum öncesi riskler arasındadır (35).

Bunlara ek olarak aşağıdaki çeşitli çevresel faktörlerin otizme katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

- İleri Ebeveyn Yaşı,
- Doğum Öncesi Maruziyetler,
- Perinatal Risk Faktörleri,
- Anne İlaçları,
- Sigara ve Alkol Kullanımı,
- Aşılama,
- Beslenme,
- Toksik Maruziyeti,
- Sosyoekonomik Durum ve
- Bağırsak Mikrobiyotası (GM) dengesizliği bazı OSB vakalarını da açıklayabilmektedir (36).

Cinsiyet kromozomunda anöploidi bulunan çocuklardaki çalışmalar erkek çocuklarda otizme karşı koyamamayı gösteren sosyal işlevsellik profilleri tanımlamaktadır. Kromozomal boyuttaki çalışmalarla ise özellikle X, 2, 3, 7, 15, 16, 17 ve 22 kromozom bölgelerinin OSB ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (37). Down sendromu, Rett sendromu, tüberoskleroz, Frajil X sendromları dahil birden fazla genetik

tanının OSB ile birlikteliğinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir(38). Kimyasal maruziyeti ve hamilelikte görülen komplikasyonlar gibi gestasyonel faktörler nörogelişimi etkileyeceğinden otizm riskini artırdığı düşünülmektedir (23).

Otistik bozukluğun prevalansı, erkeklerde kadınlara göre yaklaşık dört kat daha yüksektir (6). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinin (CDC'ler) 11 lokasyondan oluşan ağda erkek ve kız oranını 4,5'e 1,2 ile 68 çocuktan birinde otizm olarak prevalansı tanımlamıştır ve veriler, birden fazla konumlardaki diğer çalışmalarla ilişkilendirilmiştir (35). ABD'de yapılan çalışmalarda prevelansın 2014 ile 2016 yılları arasında istatistiksel olarak stabilize olduğu görülmektedir. Ancak DSM-V kriterlerinin etkisi ve tanı kriterlerinde ki değişiklikler prevelansı etkileyebilmektedir (39).

2.1.6. Epidemiyoloji

Otizmin uluslararası yaygınlığı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından %0,76 olarak tahmin edilmektedir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ABD'deki çocukların yaklaşık olarak %1,68'inin otizm tanılı olduğunu öngörmektedir. Bu veriler 59 çocuktan 1 tanesinin otizm tanısı aldığını göstermektedir (40).

Otizm tüm etnik, ırksal ve sosyoekonomik gruplarda görülebilen bir hastalıktır. Bununla beraber teşhis aşamasında tek tip olarak görülmez. Siyah ve hispanik çocuklardan daha çok beyaz ırktan çocuklarda tanımlanmıştır (41). 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde aileler tarafından bildirilen OSB tanısı yaklaşık %2,5 oranındadır. Otizm ve Gelişimsel Yetersizlik İzleme Ağı (ADDM) verilerine göre OSB görülme sıklığı 2000–2002 ve 2010–2012 arasında 2 kattan fazla artmıştır (41). ABD popülasyonu ile diğer sanayileşen ülkeler benzer yaygınlık oranları göstermektedir. Sınırlı sayıda kaynağa sahip ve epidemiyolojik veri toplanmasının zor olduğu ülkelerde ise oranlar daha düşüktür. Hala sürmekte olan epidemiyolojik çalışmalar ulusal örnek verilerine göre OSB görülme sıklığının stabilize devam ettiğini göstermektedir (42). CDC verileri vaka incelemesinden önce beyaz, Hispanik olmayan çocukların OSB teşhis ihtimalinin Afrika kökenli Amerikan ve Hispanik olmayan çocuklara göre %20 daha fazla olduğunu gösterirken Hispanik çocuklara göre 50% fazla olduğunu göstermektedir. Son prevelans verileri ise OSB oranının Afrika kökenli Amerikalı ve Hispanik kökenli çocuklarda arttığını göstermektedir (CDC 2014). Etnik köken ve ırk ile tanı yaşının bağlantısını inceleyen çalışmalar çelişkili olmakla birlikte otizmin erken

dönem teşhisinin hizmetlere erişim ve sosyoekonomik seviye ile ilişkili olacağını göstermektedir (43).

2.2. TEDAVİ

Psikofarmakolojik tedaviler otizmde yaygın görülen komorbiditeler ve sunumdaki değişkenlikler nedeniyle çok zordur. OSB'li çocuklar bu tedavi ajanlarının yan etkilerine yaşıtlarından ve nörotipik gelişen akranlarından daha savunmasızlardır (44). Otizm'de görülen semptomların tedavisi için çeşitli psikofarmakolojik ilaç kullanılabilmektedir. Bu ilaçların hedef semptomlar üzerine etkisi, riskleri veya potansiyel faydaları vakalara göre değerlendirilmelidir. Genellikle OSB'li çocukların tedavisinde psikofarmakolojik ajan olarak antikonvülsanlar, antipsikotikler, alfa-2 agonistleri ve antidepresanlar kullanılmaktadır (45). Etkili tedavinin olduğu hedef belirtiler dürtüsellik, hiperaktivite, sinirlilik, dikkatsizlik ve uykusuzluk gibi durumları içermektedir (46). ABD Gıda ve İlaç Dairesi otizm ilişkili sinirlilik tedavisinde antipsikotik olarak Risperidon ve Aripiprazol'ü onaylamıştır (47). Ancak otizimdeki tekrarlayan davranışlar ve sosyal iletişim eksiklikleri gibi temel semptomların tedavisinde onaylanan bir ilaç bulunmamaktadır (46).

Yeni genetik teknolojiler ile otizm oluşumuna katkısı olan metabolik ve genetik faktörlerin rolü incelendiğinde hastaların %40'ına genetik semptomlardan teşhis konmaktadır. OSB gen varyantları, küçük DNA delesyonları, mitokondriyal disfonksiyonlu metabolik bozukluklar gibi kromozomal anormallikler ile kalıtım derecesinin %70 ile %90 olmasına rağmen moleküler tanı verimi beklenenden düşüktür (48).

Tedavi seçeneğinin az olması ve ilaçların yan etkileri nedeniyle aileler sınırlı tedaviler ve destekleyici kanıtı olmayan birbirinden farklı tedavi seçeneklerini değerlendirmektedir (49). Okul çağında olan OSB tanılı çocuklarda akademik, sosyal ve uyumsal becerilere odaklanmak gerekirken, yetişkinlikte uyumsal yaşam becerisi ve mesleki gelişime odaklanarak OSB yönetimi önemlidir (50). Tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) tedavileri omega-3 yağ asitleri, dimetilglisin vs. gibi gıda takviyeleri, laktozsuz, şekersiz, glütensiz vs. özel diyetler ve vitamin/mineral (B6 vitamini, multivitaminler vs.) takviyelerini içermektedir. Bu takviyeler OSB'li çocuklarda bulunan gastrointestinal semptomlar, konsantrasyon, uyku, duyusal veya iletişim sorunları ve temel semptomlar dahil birçok neden için kullanılabilmektedir (51). Ergen

ve çocuklarda ABD'de tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavileri (CAM) kullanım oranı yaklaşık olarak %11,6'dır. CAM kullanımı %28 ile %51 oranlarında değişmektedir. Ebeveynleri yüksek eğitim düzeyli olan, sosyoekonomik düzeyi yüksek olan ve Hispanik olmayan beyaz ailelerde CAM kullanımının daha yüksek olduğu görülmektedir (49).

Ayrıca bilişsel-davranışçı terapi, sosyal-davranışçı terapi, bitkisel tedaviler, müzik terapisi gibi tamamlayıcı farmakolojik olmayan tedavi yöntemleri de son zamanlarda ilgi görmektedir (15).

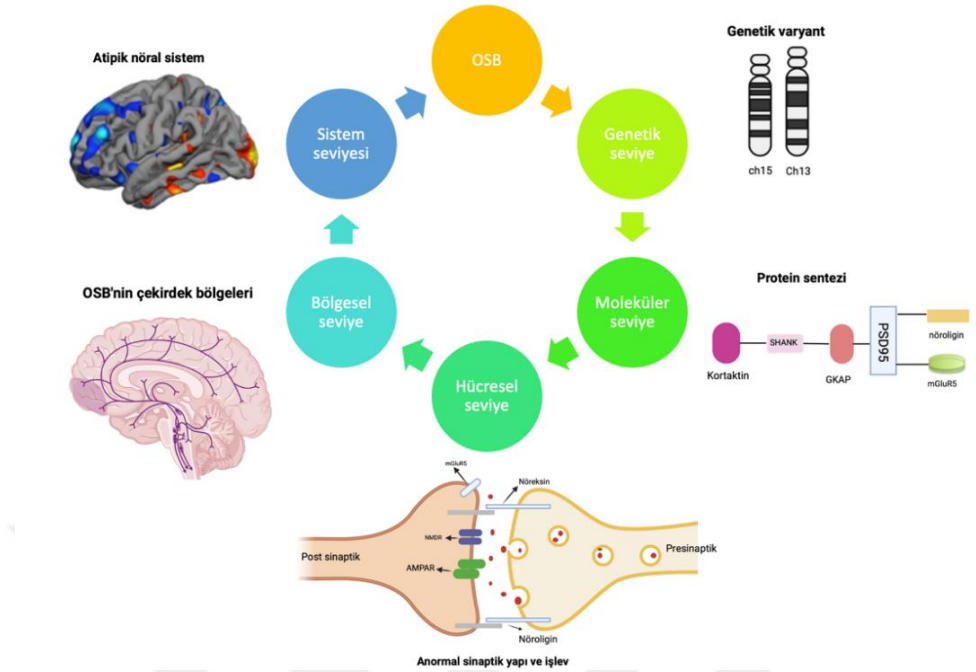
2.3. OTİZM NÖROBİYOLOJİSİ

Otizm kalıtsal ve yaygın psikiyatrik hastalıklardan biridir. Çok sayıda gen, tam olmayan penetrans ve çevre-gen etkileşiminden dolayı patofizyolojisinin araştırılması karmaşıktır (52). Otizmli hastalarda görülen morfolojik ve yapısal değişiklikler farklı nörogörüntüleme, nöropatolojik ve klinik değerlendirmeler içeren çeşitli çalışmalarla incelenmektedir. Otizm ile bağlantısı olan genlerin genelinin glutamaterjik sinapslarda sinaptik protein kodladığı ve sinaptik hareket ettiklerini ve böylece OSB patofizyolojisinde bu sinaptik işlevde bozuklukların olabileceğini göstermektedir (32).

Otizmli beyinlerdeki gen ekspresyon değişikliklerini inceleyen çalışmalar bağışıklık sistem ve glial işlevle ilgili genlerde ekspresyonun arttığını ayrıca sinaptik ve nöronal işlevle ilgili genlerde ekspresyonun azaldığını göstermektedir. Bazı doku transkriptomu analizlerinden OSB'li kortekste sinaptik ve nöronal fonksiyonlarda azalmış ekspresyon tanımlamıştır. Bu upregüle bağışıklık/glial genlerle downregüle sinaptik/nöronal genler OSB riski ile örtüşmektedir (53).

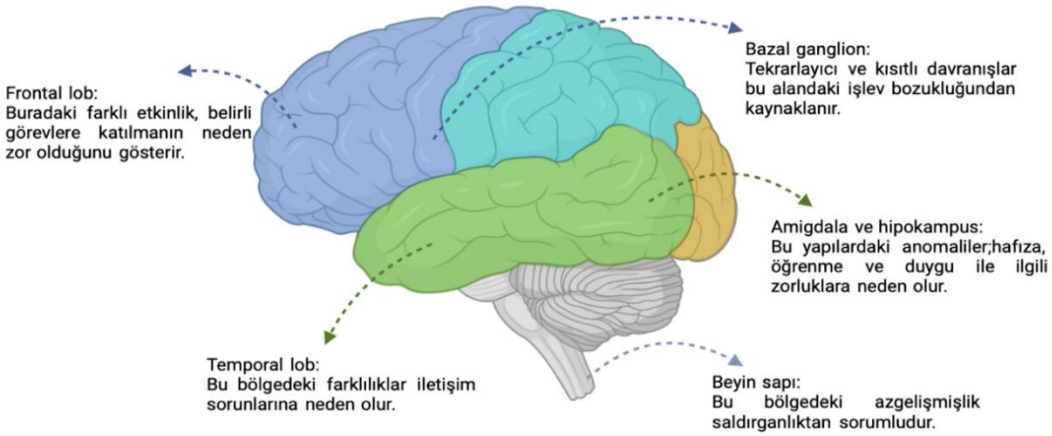
Yapılan çalışmalar otizm için uyarma-inhibisyon dengesi, kusurlu sinaptik işlev ve beyin bağlantılarından oluşan ortak etiyolojik bir yol önermektedir. OSB'de nörobiyolojik ve genetik yapıtaşları incelendiğinde sinapslarda oluşan anormalliklerden başlayıp daha büyük ölçekte kortikal sistemlerin oluşumuna kadarki dönüşümler incelenmelidir (Şekil 2.4) (54).

Otizmde görülen inhibitör devrelerde bulunan nörogelişimsel eksiklikler ve bunu takip eden uyarma/inhibisyondaki (E/I) dengesizlik yaygındır ve bu GABAerjik sinaptik iletimdeki, GABAerjik internöronların olgunlaşmasındaki veya γ-aminobütirik asit (GABA) reseptörlerinde oluşan kusurlardan dolayı oluşmaktadır (55).



Şekil 2.4: Otizmde genetik seviyeden sinir sistemleri seviyesine doğru sinaptik işlev ve beyin bağlantıları.

Post mortem otizm hastalarının beyin örnekleri incelendiğinde piramidal nöronlardan oluşan neokorteksin mikro devresi olan ve GABAerjik inhibitör nöronlarla çevrili mini sütunlarda azalma görülmüştür. Bu da otizimli beyinde inhibitör devrelerin bozuk olabileceği hipotezinin çıkmasına neden olmuştur. Yapılan farklı çalışmalarda gerçekten de OSB'li post mortem beyin dokularında GABAerjik sinir iletiminde değişiklikler gözlenmiştir. OSB'li beyinlerde GABAB reseptörlerinin ve GABAA reseptör alt birim seviyelerinin azaldığı ayrıca GABAA reseptörlerine bağlanmanın da azaldığı görülmüştür (56-58). Ayrıca yapılan çalışmalar otizm etiyolojisinde erken beyin gelişiminde serotonin sistem rolünü de vurgulamaktadır. Serotonin; öğrenme ve hafıza yetenekleri ile duygudurum ve uyku gibi beyin işlevlerinde etkilidir. Hayvan modelleri ve OSB'li çocuklarla yapılan postmortem çalışmalar serotonin ve serotonin taşıyıcı (SERT veya 5-HTT) düzeylerinin kontrolle kıyaslandığında hasta grupta yüksek olduğunu ayrıca 5-HT1A ve 5-HT2A bağlanmalarında azalma olduğunu göstermiştir (59).



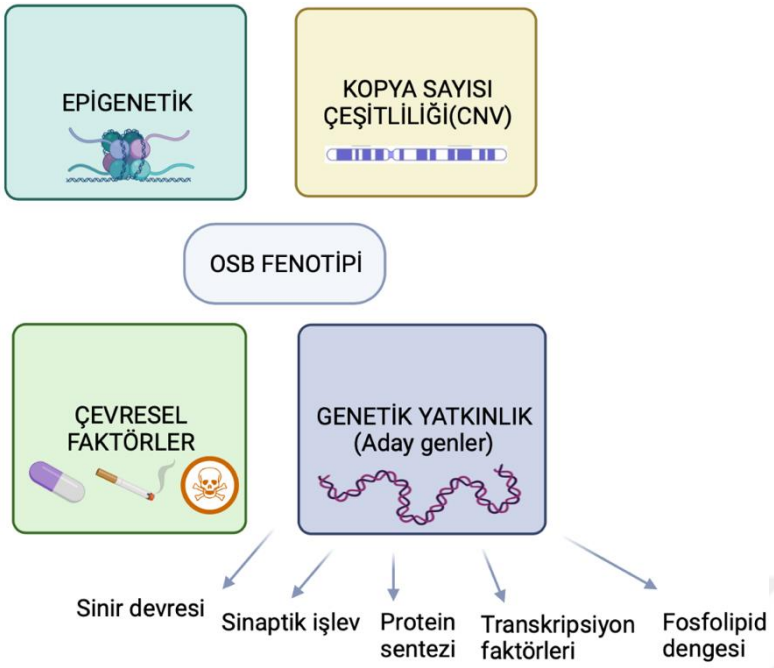
Şekil 2.5: Otizmde beyin bölgelerinde görülen değişiklikler

Otistik beyinlerde yapılan birçok çalışma beyinin çeşitli bölgelerinde anatomik veya işlevsel anormallikler olduğunu göstermektedir (Şekil 2.5.) (60). Otizmli nörotipik beyinleri ve transkriptomlarını inceleyen çalışmalar göstermiştir ki OSB'li beyinlerde uyarıcı nöronlar ve mikroglia bolluğunda ve korikal patternlerde işlev değişiklikleri olabilmektedir (61).

2.4. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARININ MOLEKÜLER OLUŞUM MEKANİZMASI

Otizm riskine katkıda bulunan hem nadir hem de yaygın genetik varyantları belirlemek için yapılan çalışmalarda çeşitli aday genler tespit edilmiştir. Bu hastalıkların genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında karyotip analizleri ile tanımlanan kromozomal düzensizlikler, mikro-array tabanlı kopya sayısı değişiklikleri (Copy Number Variations=CNV) çalışmaları ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) gibi önemli yaklaşımlar olmuştur (3).

Aile ve ikiz çalışmaları, OSB 'lerin oldukça kalıtsal olduğunu ve fenotipik varyantın yaklaşık %65-90'ının genetik faktörlerle açıklanabileceğini göstermektedir (Şekil 2.6.). OSB ler için genetik duyarlılık faktörlerinin tanımlanması, hastalığın genetik yapısı, karmaşık ve heterojen olduğundan ve aynı zamanda OSB etiyolojisine katkıda bulunan de novo genetik varyantlardan dolayı oldukça zordur (62).



Şekil 2.6: Otizm spektrum bozukluğu fenotipi ve genetik mimarisi

Otizm spektrum bozukluğunun karmaşık olan genetik yapısı araştırılmak için çeşitli hipotez ve modeller oluşturularak moleküler veri birikimi oluşturulmuştur. Bu çalışmalar sonucu elde edilen kanıtlar OSB patogenezinde çeşitli yapısal genomik varyasyonun katkısını göstermektedir. Kopya sayısı varyantları (CNV), OSB dahil nörogelişimsel bozukluk patogenezinde görülen en yaygın yapısal varyasyondur (63). Ortak risk alellerini tanımlamanın zorluğu düşünülünce, şu an ki mevcut bilgilerin geneli tipik tek bireyde yüksek risk sağlayan nadir varyant analizinden elde edilmektedir. Genomik çalışmalar ile nadir kalıtsal kopya sayısı varyantları (CNV) ve de novo ve protein bozan tek nükleotid varyantlarının (SNV) OSB patogenezinde ki rolü tespit edilmiştir (64). NLGN3, NLGN4X, SHANK3, ASTN2, PTCHD1, DDX53, NRX1N, CNTN4, CNTNAP2 OXTR, PTCHD1, NLGN1 ve SHANK1 gibi genler hem de novo ve hem de kalıtsal olarak tekrarlayan CNV'ler OSB risk genleri olarak ilişkilendirilmiştir. Ayrıca 16p11.2 (yaklaşık %0.8), 15q11-13 (yaklaşık %0.5) ve 22q11 (yaklaşık %0.5) gibi belirli lokuslarında OSB'de tekrar tekrar silindiği veya çoğaltıldığı görülmüştür (65).

2.4.1. Tek Nükleotid Değişiklikleri

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), araştırmacıların karmaşık hastalıklarla ilişkili genleri aramasını sağlayan genetik belirteçlerdir. Buna göre, birçok çalışma, SNP analizine dayalı olarak OSB hastalarında genetik değişikliklere odaklanmıştır. SNP'ler tarafından açıklanan OSB oranının %17 ile %60 arasında olduğu tahmin edilmektedir, dolayısıyla katkıları ihmal edilmemelidir. Bununla birlikte, OSB ile ilişkiden sorumlu olan genetik varyantların işlevleri yetersiz bir şekilde karakterize edilir. Bu nedenle, OSB ile ilişkili SNP'ler hakkındaki bilgilerin, OSB 'nin semptomlarını ve komplikasyonlarını hafifletmek için terapötik olarak hedeflenebilecek spesifik biyolojik mekanizmalara nasıl çevrileceği henüz tam olarak anlaşılamamıştır (66).

Son yıllarda sosyal bilimler, psikiyatri ve tıp alanındaki çalışmalarda çok büyük artış yaşanırken bunlar genom çapında spesifik varyantlar ile bozukluk arasında bağlantı kurulabilmesi için araştırmaları içermektedir. State ve arkadaşlarına göre genomik varyasyon sadece popülasyon frekansı ile karakterize edilemez ayrıca DNA yapı ve dizisi ile de ilgilidir (67). Genom çapı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), kontrol grubu ve hasta gruplarında SNP adıyla bilinen ortak gen varyantlarının yüzlercesinin sıklığının kıyaslanmasını içermektedir (68). Yüzlerce varyantın oluşu beraberinde çok fazla istatistiksel testi gerektirdiği için ve ortak varyantlarda her biri için küçük etki boyutu görülmesi nedeniyle büyük örnek boyutları genom çapı anlamlı varyantlar için gerekmektedir. Ailesel tabanlı tasarımların kullanımına dayanan diğer çalışmalar, vaka-kontrol kohortların yanı sıra daha büyük etki büyüklüğünde nadir dizi ve yapısal varyantların bozukluğa katkısını incelemiştir (69).

Normal beyin gelişiminin olabilmesi için nörotransmitterler rol almaktadır. Nörotransmitter sistemin işlev bozuklukları, OSB dahil birçok psikolojik hastalığın gelişimi ile ilgilidir. Nörotransmitterlerin oluşturduğu inhibitör/uyarma sinyallerinin dengeli olması düzgün beyin çalışması için önemlidir. Bu işlevlerde oluşan herhangi bir sapma normal olmayan nörotransmisyon ve OSB dahil çeşitli nörogelişimsel bozukluklara neden olabilmektedir (70). Yapılan çalışmalar otizmli deneklerde GABA reseptörlerinin SNP'leri ile ilişkisine ve ayrıca erken beyin gelişimde otizm etiyolojisindeki serotonin sistemin rolüne dikkat çekmektedir. Bu tarz spesifik reseptör anomalilerinin fenotipik varyasyonlara yol açtığını gösteren çalışmalara rağmen, OSB

fenotipini belirlerken her nöronal reseptörün otizm patolojisine etkisini vurgulamak oldukça zordur (59).

2.4.2. Otizmde Popülasyon Genetiği

Otizm spektrum bozukluğu genetik sorumluluğu, klinik bozukluğu olan bireylerin eğrinin bir tarafında olduğu popülasyon içinde risk sürekliliği olarak değerlendirilebilir. Popülasyon riskine genel olarak yaygın gen varyantları katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak rastgele ve çevresel etkilerin katkısı da bulunur; nadir değişkenler ise bireysel sorumluluğu risk sürekliliği boyunca düzensiz hale doğru kaydırmaktadır (71).

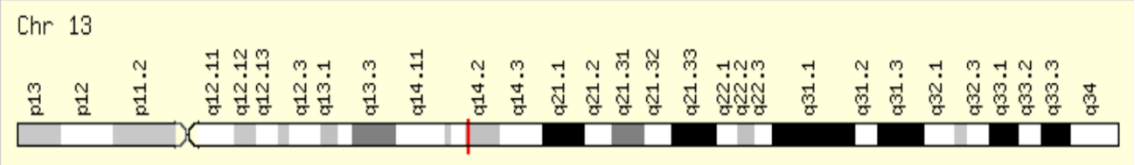
Otizmin kalıtsal olması ve popülasyonda ortak gen varyantlarının hastalık riskine katkıda bulunmasına rağmen son yıllardaki çalışmalarla bireysel varyantlarda tanımlanmıştır. GWAS çalışmalarında eksik nokta genom çapında anlamlı sonuçların nedensel genleri ya da olası mekanizmaları tanımlayamamasıdır. Yani gen varyasyonlarının hastalığa nasıl yol açtığı veya hangilerinin olası nedensel genler olduğunu anlamak için ileri ve daha fazla sayıda çalışma gerekmektedir. Çalışmaların sonucu SNP'lerin çok küçük kısmının toplam genetik varyansı yakaladığını gösterirken; GWAS sonuçları nadir ve yaygın olan varyantların OSB genetik mimarisinde katkısı olduğu konusuna vurgu yapmaktadır (71).

Genom çapı ilişkilendirme çalışmaları sonucu poligenik risk puanı ile bozuklukla ilişkili olabilecek gen varyantlarının bileşik ölçümleri oluşturularak, yaygın karmaşık bozuklukların poligenik genetik mimariye sahip olduğunu ve hastalıkla ilgili varyantların tanımlanması sağlanmıştır. Poligenik risk puanları ile hastalık durumu arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda doğrulanmıştır fakat klinik yararları tam olarak belirlenmemiştir. Bu bilgiler diğer klinik değişkenler ile birleştirilerek hastalık başlangıcının öngörülmesi ve prognoz tahmini gibi noktalarda klinik kullanıma katkı sağlayabilmektedir (72).

2.5. HTR2A GEN MUTASYONLARI

Serotonin (5-hidroksitriptamin veya 5HT), sirkadiyen ritimler, biliş, ruh hali ve sosyal davranışlar dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar (12). Serotonin taşıyıcılarının, reseptörlerinin veya serotonin yolağının enzimlerinin eksikliği, depresyon, sayısız duygudurum dalgalanmaları, duygusal dengesizlik, şizofreni ve

otizm dahil diğer nörolojik bozukluklar olmak üzere birçok hastalıkta rol oynamaktadır (13). Serotonin reseptörü ailesinde bulunan yedi gen (5-HT1-5-HT7), hafıza, öğrenme yeteneği, kas kasılmasının homeostazı ve hatta endokrin fonksiyonlarının yanı sıra esas olarak ruh hali ve uyku ile ilgili olan bu nörotransmitterin aktivitesini ortaya çıkarmada etkindir (73). Otizmdeki yüksek serotonin seviyeleri, beyindeki bir otoimmün reaksiyondan kaynaklanan serotonin reseptörlerindeki kusurlarla da ilişkili olabilir, bu da otistik hastalarda gözlenen yüksek serotonin seviyelerini açıklayabilir (74).

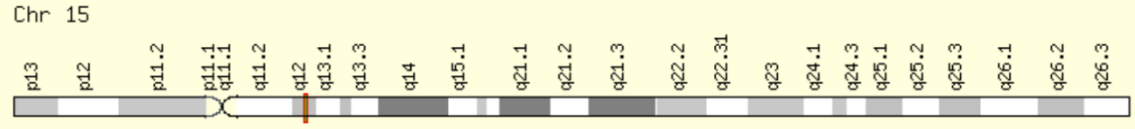


Şekil 2.7: HTR2A geninin kromozomal lokalizasyonu (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HTR2A)

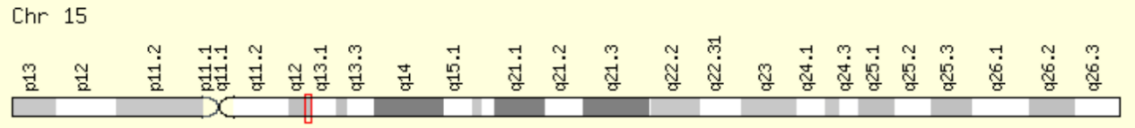
Serotonin, işlevini 5-HT (HTR) reseptör ailesi üyeleri aracılığıyla düzenler. İnsanlarda farklı serotonin reseptörlerini kodlayan genlerde birçok single nükleotid polimorfizmi (SNP'ler) tanımlanmıştır. 5-HT2A, 13q14 kromozomuna lokalize olan HTR2A geni tarafından kodlanmaktadır (Şekil 2.7.). Otizm ve depresyon dahil çeşitli bozukluklara neden olan genetik varyantları bulunmaktadır. (75).

2.6. GABRB3 ve GABRG3 GEN MUTASYONLARI

Gama-amino bütirik asit (GABA), yetişkin beynindeki başlıca engelleyici nörotransmitterdir. Postsinaptik nöronlardaki reseptörlerine bağlanarak etki eder. Multimerik transmembran GABA reseptörü, merkezi bir gözenek etrafında düzenlenmiş beş farklı alt birimden oluşur ve beyindeki hızlı sinaptik inhibisyonun çoğuna aracılık eder. Sırasıyla β3, α5 ve γ3 alt birimlerini kodlayan GABA reseptör alt birim genlerinden GABRB3, GABRA5 ve GABRG3, 15. kromozomal bölgede lokalizedir (Şekil 2.8, Şekil 2.9). Yapılan çalışmalar 15q11-q13 lokusunun otizm için aday bölge olduğunu göstermiştir. γ3, ß3 ve α5 reseptör birimlerini kodlayan bu genler GABAerjik sinyal yolaklarında da yer alır ve bu reseptörlerin değişen işleyiş ve ekspresyon seviyeleri GABA sinyal yolaklarındaki değişiklikler nedeniyle otizm ve benzer psikiyatrik hastalıklara neden olabilmektedir (70).



Şekil 2.8: GABRB3 geninin kromozomal lokalizasyonuhttps://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GABRB3)



Şekil 2.9: GABRG3 geninin kromozomal lokalizasyonuhttps://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GABRG3)

Otizm karmaşık genetik köklere sahip; poligenik ve yüksek oranda kalıtsal olduğundan etiyolojisinde genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. 15q11–q13 kromozomu, genomik DNA delesyonlarının ve duplikasyonlarının oluşumu için hotspot bir bölge olarak, otizme yatkınlıkta genetik çalışmaların odak noktası olmuştur. Bu bölgenin anne tarafından ve baba tarafından silinmesi sırasıyla Angelman sendromuna ve Prader-Willi sendromuna yol açar. Bu silmelerin her ikisi de OSB özelliklerini paylaşır. Prader-Willi/Angelman sendromu kritik bölgesiyle örtüşen bir duplikasyonu olan hastalar muhtemelen gelişimsel gecikme, hipotoni, epilepsi, zihinsel yetersizlik, dismorfik özellikler ve otistik davranış gibi farklı klinik belirtiler göstereceklerdir. Belirli bir pentameri oluşturan bireysel reseptör alt birimlerinin miktarları ve fonksiyonel yetenekleri, beynin farklı bölümlerindeki sinyallemenin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Bu nedenle, bu bölgedeki genler, otizm yatkınlığına potansiyel katkılarının araştırılması için güçlü adaylar haline gelmiştir (14). Bu reseptörler, otistik hastaların hipokampüsünde GABA reseptör yoğunluğunun azalması ve GABAerjik inhibisyonun otizmin etiyolojisinde rol oynadığı için büyük ilgi görmektedir (76). Örneğin, OSB 'li kişilerin ölüm sonrası beyinlerinde glutamat ve GABA reseptörlerinin ifadesinde anormallikler gözlenmiştir. In vivo, proton manyetik rezonans spektroskopisi ([1H]MRS), çocukların korteks ve bazal gangliyonlarında ve OSB li erişkinlerde bazal gangliyonlarda glutamat ve glutamin düzeylerinde değişiklikler ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, OSB'li çocuklarda çeşitli beyin bölgelerinde GABA'da azalmalar bildirilmiştir (77).

Otizmli hastalar ile yapılan bu çalışmada GABRB3, GABRG3 ve HTR2A genlerinde yer alan varyant değişikliklerinin hastalığın oluşum mekanizması ile ilişkisi ortaya konmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Araştırmamızın etik kurul onayı 16.09.2021 tarihinde Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun "**2021.09.16-61**" no'lu kararıyla alınmıştır. Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin (BAP) "**2022/066"** sayılı projesiyle desteklenmiş ve EQUATOR (Enhancing the Quality and Transparency of Research)'da yer alan Diagnostic/Prognostic Studies klavuzuna uygun olarak yapılmıştır (Genet Med. 2011;13(5):453-456. PMID: 21502867).

3.1.1. Çalışmaya Katılacak Gönüllülerin Seçimi ve Örneklerinin Eldesi

Çalışmaya İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde sağlık kurul raporu çıkartılan ve yapılan klinik değerlendirme sonucunda DSM-V tanı kriterlerine göre ''Otizm Spektrum Bozukluğu'' tanısı alan 3-9 yaş arası 200 OSB'li hasta ve 100 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Örneklem büyüklüğü G-Power programı ile yapılan güç analizi sonucunda >%80 olarak belirlendi. Kontrol grubu, hastanenin Sağlam Çocuk polikliniğine başvuran, hastane kayıtlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda; akut veya kronik tıbbi hastalığı olmayan (otoimmun veya inflamatuar, endokrinolojik, nörolojik, kardiyojenik vb), herhangi bir ilaç tedavisi almayan ve bilinen bir psikiyatrik rahatsızlığı olmayan, yaş ve cinsiyet açısından benzer çocuklardan oluşturuldu.

Gönüllülerin ebeveynleri tarafından gönüllü olur formu imzalandıktan sonra rutin izlem sırasında 2 ml periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alınarak, soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledildi.

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

- 3-9 yaş aralığında olmak
- DSM-V tanı kriterlerine göre klinik görüşme ile Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı almak
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olduğuna dair yazılı onam vermek

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

- Akut veya kronik tıbbi hastalığı olma (otoimmun veya inflamatuar, endokrinolojik, nörolojik, kardiyojenik, vb)
- Mental retardasyon (6 yaş altı için gelişim geriliği) tanısı olma. Olgu grubunda eşzamanlı bulunan yıkıcı davranış düzenleme bozuklukları (Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, Davranım bozukluğu, Karşıt Olma Karşıt Gelme Bozukluğu), özgül öğrenme bozukluğu, anksiyete bozuklukları ve psikotropik ilaç kullanımı olan olgular araştırmaya alınacaktır.
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olduğuna dair yazılı onam vermemek
- 9 yaşından büyük olmak

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- 10X PCR Buffer (Mg2Cl free)
- Amonyum Asetat (NH4Ac)
- Amonyum Klorür (NH4Cl)
- Asetik Asit
- Borik Asit
- Disodyum EDTA (Na2EDTA)
- dNTP mix
- EDTA
- Etil Alkol
- Etidyum Bromür
- İzopropanol
- MgCl2
- Potasyum Bikarbonat (KHCO3)
- Primerler
- Proteinaz K
- Restriksiyon enzimleri ve Tamponları
- SDS
- Tris
- Taq Polimeraz

3.1.3. Kitler

Deneylerde kullanılan ticari olarak satın alınan kitler Tablo 3.1, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan ticari kit

KİT	KULLANIM AMACI	REAKSİYON SAYISI
ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit	DNA izolasyonu	100

3.1.4. Restriksiyon Enzimleri

Tablo 3.2: RFLP metodunda kullanılan restriksiyon enzimleri

ENZİM	TANIMA BÖLGESİ	SICAKLIK
MspI (Thermo Fisher)	5' C↓C G G 3' 3' G G C↑C 5'	37°C
HpyCH4III (NEB)	5' A C N↓G T 3' 3' T G↑N C A 5'	37°C
MseI	5' T↓T A A 3' 3' A A T↑T 5'	65°C

3.1.5. Markır

Tablo 3. 3: PCR ve RFLP metodlarında kullanılan markırlar

DNA MARKIR	BOYUT
Biomatik- 50bp DNA ladder	500-50bp
Hibrigen-20bp DNA ladder	300-60bp

3.1.6. Cihazlar

Ekipman türü, Modeli	Kullanım Amacı
• PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue-Ray/ tcst-9620)	PCR İşlemi
• Derin Dondurucu (-80^{o}C) • (DAIHAN/Duo Freez U500)	Örneklerin Muhafazası
• Derin Dondurucu (-20^{o}C) • (BOSCH/GSN36AI31)	Örneklerin Muhafazası
• Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610)	Elektroforez İşlemi
• Hassas Terazi, 0.1 mg hassasiyeti • (SHIMADZU/ATX224, SEG)	Solüsyon Hazırlanması
• Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Moleküler Çalışmalarda, tüm deneylerde
• Isıtıcı Blok Stuart (SBH130D)	Moleküler Çalışmalarda
• Elektroforez (Hoefer)	Gen ekspresyon çalışmasında
• Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G: BoxF3)	Moleküler genetik çalışmalarında, agaroz jel sonrası sonuçların incelenmesi ve kayıt altına alınması amacıyla kullanılacaktır.
• Spektrofotometre ve Florometre • (DENOVIX/DS-11FX)	DNA/RNA/miRNA/protein miktar tayini
• Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj	Genel Kullanım
• Horizontal Elektroforezler (Hoefer)	Agaroz jel yürütme
• Güç Kaynağı (Hoefer/PS300B)	Elektroforez işleminde
• İnkübator (DAIHAN/ IG-50)	İnkübasyon gerektiren tüm çalışmalarda
• Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)	Genel kullanım
• Distile su cihazı	Genel kullanım
• Kar buz makinesi	Genel kullanım
• +4 buzdolabı (Arçelik)	Genel kullanım
• Biyolojik Güvenlik Kabini (Biobase Class 2)	DNA ve RNA izolasyon işlemleri, PCR işlemleri

3.1.7. Solüsyon ve Çözeltiler

• **Eritrosit Parçalama Çözeltisi (RBL):**

8,74 g NH4CL

1 g KHCO3 0,0372 g Na_2EDTA

1 litre distile suda çözüldü. pH 'sı 7,4 olarak ayarlandı. Ayarlamada HCL ve NaOH çözeltileri kullanıldı. Otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

• **Lökosit Parçalama Çözeltisi (WBL):**

8 ml 5 M NaCl

20 ml 0,5 M Na_2EDTA

Steril distile su ile 400 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

• **Amonyum Asetat (9M NH_4Ac):**

732,26 g NH_4Ac

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, sterilizasyon için 0,2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

• **Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10 (pH 7,2):**

10 g SDS steril distile su ile 100 ml'de çözüldü. pH'ı HCl ile 7,2'ye ayarlandı. Sterilizasyon için 0,2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

• **EDTA (0,5 M):**

86,1 g EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Oda ısısında saklandı.

• **Proteinaz K:**

0,02 g. Proteiaz K 1 ml steril distile su ile çözüldü ve -20°C'de saklandı.

• **Tris EDTA (TE) (pH: 8,0):**

10 ml 1 M Tris-HCL (pH 8,0)

20 ml 0,5 M EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

• **Tris-HCL (pH 8,0):**

121,1 g Tris-HCL

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. PH'ı HCl ile 8,0'a ayarlandı. Otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

• **6X Agaroz Jel Yükleme Tamponu:**

2,5 mg Bromfenol mavisi 10 ml distile suda çözüldü.

Oda ısısında saklandı.

• **50 X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA):**

242 g Tris baz

57,1 g Glasiyal asetik asit

100 ml EDTA (0,5M)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

• **5 X TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA):**

60,57 g Tris baz

30,90 g Borik asit

40 ml EDTA (0,5M)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Periferik Kandan Roche Kit ile Genomik DNA izolasyonu

- Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen, EDTA'lı tüplerdeki periferik kanın 200 µl'si kit protokolüne uygun bir şekilde (High Pure PCR Template Preparation Kit) genomik DNA izolasyonu için kullanıldı.
- Hibridizasyon fırını +70°C'ye ayarlanarak Elution buffer +70°C'ye konuldu.
- 1,5 ml'lik ependorf tüplere:
  - 200 µl Kan
  - 200 µl Buffer
  - 40 µl Proteinaz K
- Eklenip vortekslenerek, +70°C'de 10 dk bekletildi.
- 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Ardından Filtreli (spin column) tüpe aktarıldı.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve alt kısım atılarak yeni toplama tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl 4a (Removel Buffer) konuldu ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısım atılarak yeni toplama tüpüne konuldu.

- Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer) konuldu ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısım atılarak yeni toplama tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl 4 (Washing Buffer) konuldu ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt kısım atılırak yeni toplama tüpüne konuldu.
- 14000 rpm'de 15 sn spin yapılarak toplama tüpleri atıldı ve 1,5 ml'lik ependorfe konuldu.
- Spin column tüplerde filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 30 µl Elution buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreye takılı DNA aşağıya geçerek DNA elde edilmiş oldu.

Bu metodla ekstrakte edilen DNA örnekleri sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 soğutucuda saklandı. (ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit /Product No: 11796828001).

3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'lar DENOVIX DS-11 FX spektrofotometrik cihazıyla ölçüldü. 1,7-1,8 arası değerler OD260 / OD280 oranlarında saf olarak kabul edildi. Bu değerlerde yeterli konsantrasyona sahip ve PCR için uygun DNA örnekleri tespit edildi.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Ön görülen HTR2A, GABRB3 ve GABRG3 gen bölgeleri için öncelikle spesifik primer dizaynı yapıldı (Tablo 3.4) ve sonrasında in slico PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR işleminde, her gen için 1,5 µl DNA kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımı 96 plate'e hazırlandı. PCR karışımı her örnek için 15,2 µl dH_2O; 2,5 µl buffer; 2 µl MgCl; 2 µl dNTP (2,5mm); 0,5 µl Forward Primer; 0,5 µl Reverse Primer; 0,5 µl DMSO, 0,3 µl Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Genler için tasarlanan primerlere ait uygun bağlanma koşulları, 94^0C'de 1 dakika ön denatürasyon, 94^0C'de 30 saniye denatürasyon, 51-60^0C'de 45 saniye primer bağlanması, 72^0C'de 30 saniye zincir uzaması ve son elongasyon 72^0C'de 5 dakikadır. Bölgeler toplam 37 döngüde Thermal Cycler (Blue- Ray/ tcst-9620) cihazıyla amplifiye edildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.4: Genlere özgü dizayn edilen primerler

SNP	PRİMER
Rs6313	F: TCTGCTACAAGTTCTGGCTT R: CTGCAGCTTTTTCTCTAGGG
Rs140679	F: CTGGGATTCCTGTTGCGTG R: CACACTCATCTCAAACAGCG
Rs2081648	F: CCTGTTCATTTGGGGTGTTC R: GGCGGGAGAATGGTGTGAA

Tablo 3.5: Bölgelere özgü PCR kondisyonları

SNP	Denatürasyon	Döngü sayısı	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Son uzama
Rs6313	94°C- 1dk	35	94°C- 30 sn	50.0°C	72°C-30sn	72°C-5dk
Rs140679	94°C- 1dk	37	94°C- 30 sn	54.1°C	72°C-30sn	72°C-5dk
Rs2081648	94°C- 1dk	37	94°C- 30 sn	56.5°C	72°C-30sn	72°C-5dk

3.2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Mutasyon Taraması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu yapılan farklı DNA bölgelerinden genlere ait spesifik bölgelerdeki varyant değişimlerinin saptanması için bölgeye özgü restriksiyon enzimleri tespit edildi. Her enzime özgü miktarı ayarlanan komponentlerle toplam hacim 15 µl olacak şekilde reaksiyon tüpüne hazırlandı (Tablo 3.6). Restriksiyon kesimi için gereken sürelerde spesifik restriksiyon enzimleri kullanıldı. Ardından mutasyon olup olmadığını belirlemek için agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. Kullanılan restriksiyon enziminin belirli bölgelerden kesmesine bağlı olarak agaroz jelde çeşitli boyutlarda bantlar görüntülendi.

Tablo 3.6: Restriksiyon enzim kesimleri için komponentler ve miktarları

Komponent	Miktar
dH_2O	3 µl
10X Buffer	1,5 µl
Restriksiyon enzimi	0,5 µl
PCR ürünü	10 µl
Toplam:	15 µl

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Toz agaroz DNA uzunluğuna uygun miktarlarda tartılarak erlen mayer'e aktarıldı ve üzerine 1XTBE tamponu eklendi. Mikrodalga fırında hazırlanan çözelti ısıtılarak homojen hale getirildi.

Çözeltiye 2 µl etidyum bromür çeker ocak altında eklendi ardından horizontal elektroforez matriksine aktarıldı ve hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Taraklar jele yerleştirilerek donması için çeker ocak içinde bekletildi. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi ve kuyucukların üzerini geçecek kadar 1XTBE tamponundan eklendi. En baştaki kuyucuğa DNA Ladder eklenip sonraki kuyucuklara yüklenecek örnekler, Loading Dye ile karıştırılarak yükleme yapıldı. Ardından jel 90 volt elektrik akımında 450 mA'de DNA uzunluklarına uygun sürelerde yürütüldü. Yürütme sonunda elde edilen jel görüntüsü CCD kameralı Jel Görüntüleme Sistemi (Syngene/G: BoxF3) ile görüntülendi.

3.2.6. İstatistik Analiz

Projede elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS (Version 25.0) programı kullanıldı. Otizm spektrum bozukluğu olan hastalarının sonuçları sağlıklı kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldı. Proje sonucunda elde edilen klinik ve demografik veriler ikili karşılaştırma için ki-kare ve student T testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılığı test etmek için ANOVA ve non-parametrik Mann Whitney U testleri kullanıldı. Klinik/demografik değişkenler (Crosstab), Fischer's Exact

Testi ile değerlendirilerek istatistik analiz tamamlandı. Elde edilen veriler için istatistiksel anlamlılık değeri $P \leq 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. OLGU KARAKTERİSTİĞİ

Çalışmaya İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tanı konulan 200 otizmli hasta ve 100 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Olguların demografik verileri Tablo 4.1'de verilmiştir. Ortalama yaş 3-9 arası olarak tespit edilmiştir.

Hasta ve kontrol olgularından alınan periferik kan örneklerinden sırasıyla DNA izolasyonu, PCR ve RFLP metodu ile genotipleme yapılmıştır. PCR ile amplifiye edilen gen bölgeleri ve restriksiyon kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

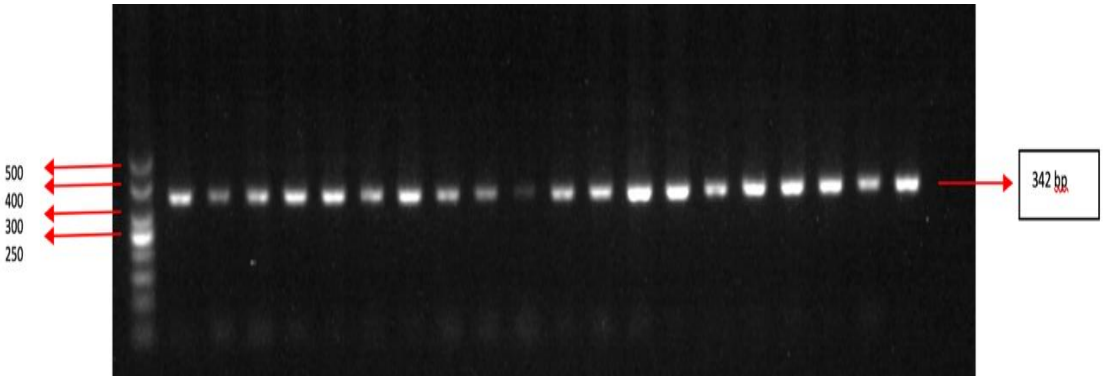
Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet karşılaştırması

	HASTA						**KONTROL**						
Cinsiyet	**N**			**%**			**N**			**%**			**P değeri**
Erkek Kız	160 40			80 20			65 35			65 35			***0,016**
	N	**%**	**Ort.**	**Min.**	**Max.**	**SS.**	**N**	**%**	**Ort.**	**Min.**	**Max.**	**SS.**	**P değeri**
Yaş	200	73,3	5,935	3	9	1,7554	100	26,4	5,833	2	10	2,2766	0,707

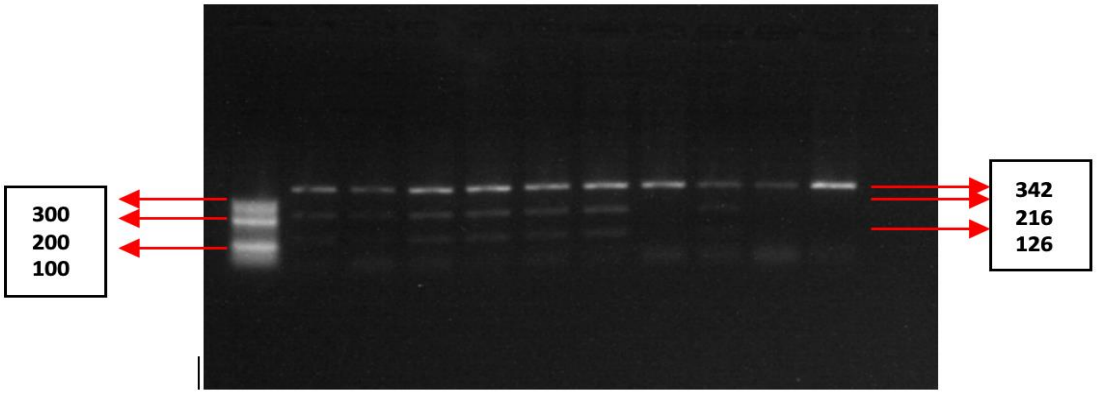
N=Toplam sayı, SS=Standart Sapma, Ort=Ortalama,Min=Minimum, Max=Maksimum

4.2. Rs6313 VARYANTININ ANALİZİ

5-HTR2A geninde yer alan rs6313 varyantı 342 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır. Bu bölgeye spesifik olarak dizayn edilen primerler kullanılarak bu 342 bç uzunluğundaki bölge PCR yöntemi ile amplifiye edildi ve 2%'lik agaroz jel ile görüntülendi (Şekil 4.1). Amplifiye edilen PCR ürünleri daha sonra MspI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Mutant olan CC allelleri enzimin tanıma bölgesinde olduğu için 126 ve 216 bç'lik 2 fragment şeklinde, wild type olan TT alleli enzimin tanıma bölgesinde olmadığı için 342 bç'lik tek fragment şeklinde, heterozigot olan TC alleli ise 126, 216 ve 342 bç'lik 3 fragment şeklinde görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: HTR2A geni rs6313 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (342 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.2: HTR2A geni rs6313 varyantı PCR ürünlerinin (342 bp), MspI restriksiyon enzimi ile kesimi ve %2'lik agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü.

Hasta ve kontrol gruplarında görülen genotip ve allel dağılımları Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Yapılan istatistik analizlerle rs6313 varyantının hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda hem genotip hem de allel bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarında en yüksek dağılım 40% ve 58% ile T/C heterozigot genotipi olarak tespit edilmiştir. Genotip karşılaştırılması sonucu p değeri 0.0001 olarak bulunurken, allel karşılaştırılması sonucunda ise p değeri 0,007 olarak bulundu. Hasta grubunun düzeylere göre genotip oranları Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Rs6313 mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (TT: wild type, CC: homozigot mutant, TC: heterozigot)

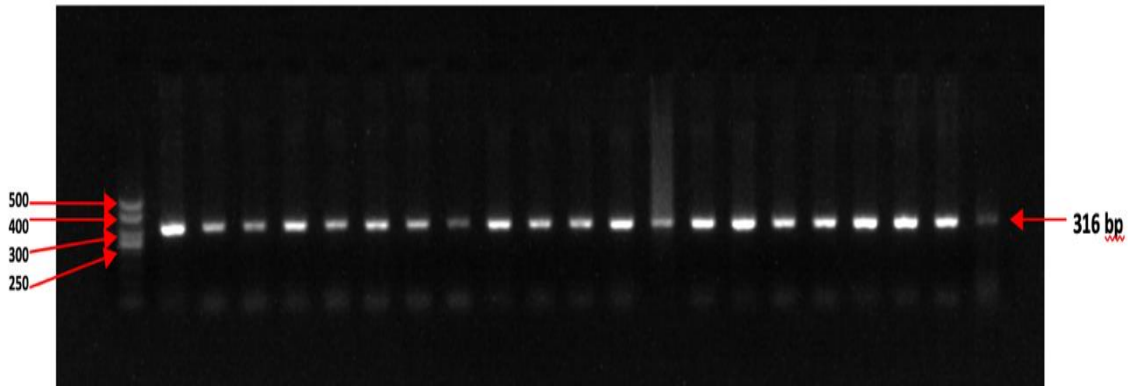
	OSB		KONTROL			
HTR2A/rs6313	N=200	%	N=100	%	X^2	P Değeri
Genotip						
TT	65	32,5	35	35	18,37	*0,0001
CC	55	27,5	7	7		
TC	80	40,0	58	58		
Allel						
T	210	52,5	128	64	7,16	*0,007
C	190	47,5	72	36		

Tablo 4.3: Otizm hasta grubunda HTR2A genotipinin düzeylere göre dağılımları

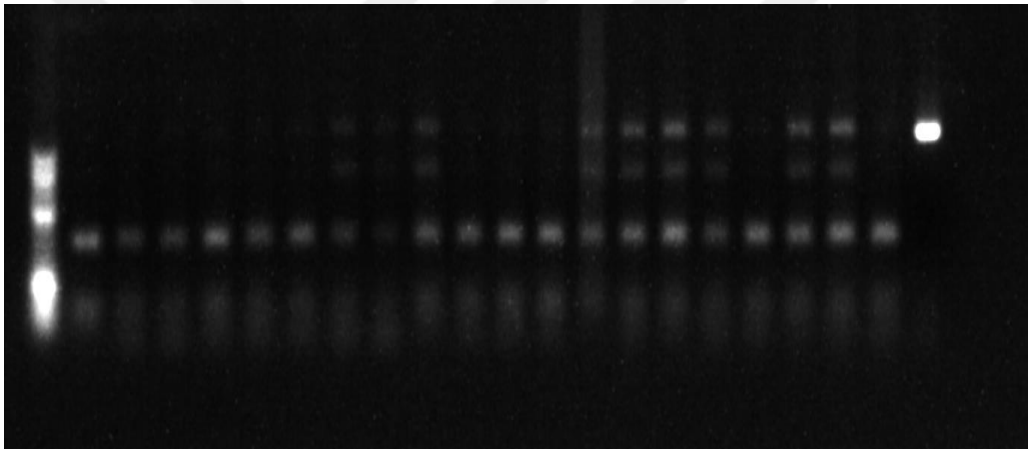
Düzey	TT	CC	TC	TOPLAM	%
Atipik	24	24	38	86	43
Şiddetli	17	9	24	50	25
Orta	17	11	9	37	18,5
Hafif	7	11	9	27	13,5

4.2. Rs140679 VARYANTININ ANALİZİ

GABRG3 geninde yer alan rs140679 varyantı 316 bç uzunluğundadır. Bu bölgeye spesifik olarak dizayn edilen primerler kullanılarak bu 316 bç uzunluğundaki bölge PCR yöntemi ile amplifiye edildi ve 2%'lik agaroz jel ile görüntülendi (Şekil 4.3). Daha sonra elde edilen PCR ürünleri HpyCH4III restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Wild type olan CC alleli olan olgular 69, 87 ve 160 bç'lik 3 fragment şeklinde, mutant olan TT allelleri 69 ve 247 bç'lik 2 fragment, heterozigot CT allelli olanlar ise 316, 160,87 ve 69 bç'lik 4 fragment şeklinde 2%'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3: GABRG3 geni rs140679 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (316 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.4: GABRG3 geni rs140679 PCR ürünlerinin (316 bp), HpyCH4III restriksiyon enzimi ile kesimi ve %2'lik agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü.

Hasta ve kontrol gruplarında görülen genotip ve allel dağılımları Tablo 4.4'de gösterilmektedir. Yapılan istatistik analizlerle rs140679 varyantının hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda hem genotip hem de allel bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi. Genotip karşılaştırılması sonucu p değeri 0.0001 olarak bulunurken, allel karşılaştırılması sonucunda ise p değeri 0,003 olarak bulundu. Hasta grubunun düzeylere göre genotip oranları Tablo 4.5'te gösterilmektedir.

Tablo 4.4: GABRG3/rs140679 mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (CC: wild type, TT: homozigot mutant, CT: heterozigot)

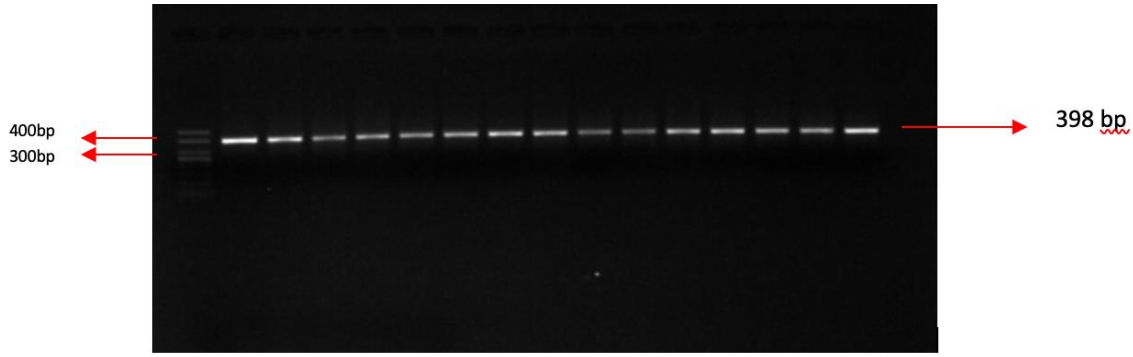
	OSB		KONTROL			
GABRG3/Rs140679	N=200	%	N=100	%	X^2	P Değeri
Genotip						
CC	41	20,5	44	44	18,21	***0,0001**
TT	4	2	1	1		
CT	155	77,5	55	55		
Allel						
C	237	59,25	143	71,5	8,61	***0,003**
T	163	40,75	57	28,5		

Tablo 4.5: Otizm hasta grubunda GABRG3 genotipinin düzeylere göre dağılımları

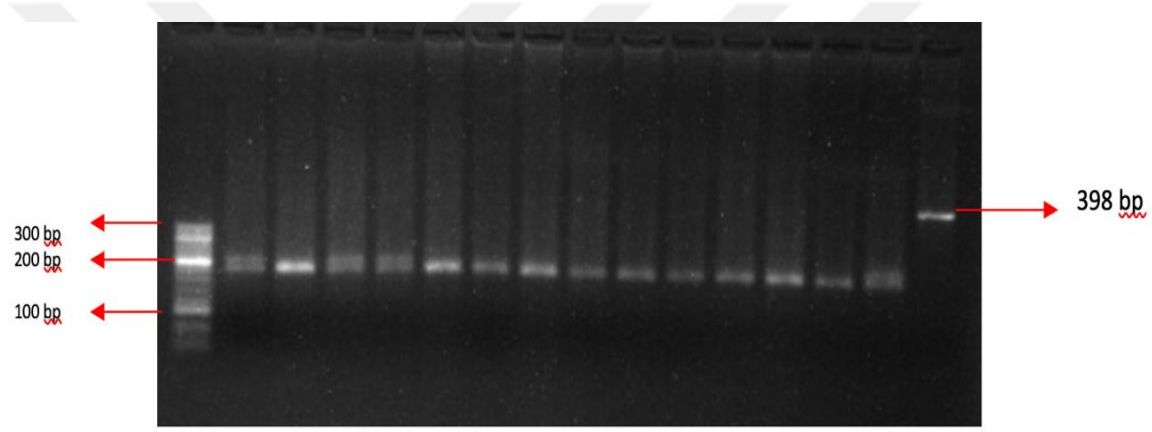
Düzey	CC	TT	CT	TOPLAM	%
Atipik	10	1	42	53	26,5
Şiddetli	11	0	30	41	20,5
Orta	12	1	33	46	23
Hafif	8	2	50	70	35

4.3. Rs2081648 VARYANTININ ANALİZİ

GABRB3 geninde yer alan rs2081648 varyantı 398 bç uzunluğundadır. Bu bölgeye spesifik olarak dizayn edilen primerler kullanılarak bu 398 bç uzunluğundaki bölge PCR yöntemi ile amplifiye edildi ve 2%'lik agaroz jel ile görüntülendi (Şekil 4.5). Daha sonra elde edilen PCR ürünleri MseI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Wild type olan TT allelli olgular 184,179, 21 ve 14 bç'lik 4 fragment şeklinde, mutant olan CC allelleri 198 ,179 ve 21 bç'lik 3 fragment, heterozigot CT allelli olanlar ise 198, 184, 179, 21 ve 14 bç'lik 5 fragment şeklinde 4%'lük agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: GABRB3 geni rs2081648 varyantı polimorfizmini saptamak için PCR-RFLP metodu kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin (398 bp) %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.6: GABRB3 geni rs2081648 PCR ürünlerinin (398 bp), MseI restriksiyon enzimi ile kesimi ve % 4'lük agaroz jel ile elektroforezindeki görüntüsü.

Hasta ve kontrol gruplarında görülen genotip ve allel dağılımları Tablo 4.6'da gösterilmektedir. Yapılan istatistik analizlerle rs2081648 varyantının hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda genotip ve allel bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edildi. Genotip karşılaştırılması sonucu p değeri 0,36 olarak bulunurken, allel karşılaştırılması sonucunda ise p değeri 0,18 olarak bulundu. Hasta grubunun düzeylere göre genotip oranları Tablo 4.7'de gösterilmektedir.

Tablo 4.6: GABRB3 Mutasyon taraması sonucu genotip ve allel dağılımları (TT: wild type, CC: homozigot mutant, TC: heterozigot)

	OSB		KONTROL			
GABRB3/rs2081648	N=200	%	N=100	%	X^2	P Değeri
Genotip						
TT	88	44	48	24	1,99	0,36
CC	46	23	16	8		
TC	66	33	36	18		
Allel						
T	242	60,5	132	66	1,71	0,18
C	158	39,5	68	34		

Tablo 4.7: Otizm hasta grubunda GABRB3 genotipinin düzeylere göre dağılımları

Düzey	TT	CC	TC	TOPLAM	%
Atipik	34	12	14	60	30
Şiddetli	15	10	17	42	21
Orta	33	18	17	68	34
Hafif	6	6	18	30	15

5. TARTIŞMA

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), DSM-V kriterlerine göre tanı konulan sınırlı ilgi alanları, sosyal iletişimde eksiklikler ve tekrarlayan davranışlar ile karakterize olan nörogelişimsel bozukluktur (33). Otizmde yapılan aile ve ikiz çalışmaları ile genetik katkının yüksek olduğu hatta yaklaşık %40 ila %90 arasında kalıtım derecesinin olduğu tahmin edilmektedir. De novo, germline, heterozigot mutasyonlar ile ilgili çalışmaların sonucu 100'den fazla genomik bölge ve gen, hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Genetik değişikliğin boyutu tek bir nükleotidden binlerce nükleotide kadar değişen sub-mikroskopik DNA segmentlerine kadar değişebilmektedir (1). Otizmde davranışsal işleyişle ilgili son bulgular patofizyolojisinde değişen beyin bağlantılarına dikkat çekmektedir (15).

İnsanlarda nörotransmitter reseptörlerin farklı tiplerini kodlayan genlerde çeşitli tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlanmış olmasına rağmen bu varyantların OSB oluşumuna katkısı hala sonuçlanmamıştır. Nörotransmitterlerin işlevleri reseptörleri aracılığıyla iletildiği için çalışmamızda öncelikle OSB yatkınlığı ile ilişkili olabileceği düşünülen ve beyinde bol miktarda ekspresyonu olan serotonin reseptörlerinden biri (5-HTR2A) seçilmiştir. Serotonin (5-HT,5-hidroksitriptamin), sosyal davranışlar, biliş, sirkadiyen ritim ve ruh hali gibi fizyolojik süreçlerde yer alan bir nörotransmitterdir (78). Serotonin 2A reseptörü (5-HTR2A) beyin ve periferde serotonerjik sinyalleşme yolağında önemli bir bileşendir. Trombositlerdeki aktivasyonu hücre içi kalsiyum depolarında salınıma aracılık ederken ayrıca reseptör agregasyonunu teşvik eder ve buna bağlı olarak kalsiyum tepkisinin düşmesine yol açar. Yapılan çalışmalarda otizmli çocuklarda sağlıklılardan düşük kalsiyum tepkisinin olduğu ve OSB'nin gelişiminde serotonin bozukluklarının rol oynadığı rapor edilmiştir (79). Lokalizasyonu 13. kromozom üzerinde olan 5-HTR2A geni otizm ve depresyon gibi bozukluklarla ilişkilendirilen birçok genetik varyanta sahiptir (80). Serotonin sinyalleşmesinde bulunan genlerle ilgili çalışmalar 2 farklı potansiyel heterojen kaynağına dikkat çeker, birincisi negatif ve pozitif çevresel faktörlere yanıt olan genin alelleri (rs6313, rs6311 vs.) arasındaki gen-çevre etkileşimi iken ikincisi otizm ve depresyon gibi çeşitli nöropsikiyatrik komorbid durumları içermektedir (80). Çalışmamızda da incelediğimiz bu fonksiyonel varyantlardan biri rs6313 tek nükleotid polimorfizmidir. Sirkadiyen

ritimleri yöneten yollar üzerindeki yakınsak etkiler, nöropsikiyatrik hastalıklar ile hipoksi ve merkezi beyin sapı disfonksiyonu ile uyku bozukluğu arasındaki temel etiyolojik ilişkiyi desteklemektedir. Depresyon ve otizmde sirkadiyen sistem düzenleyici genlerin de yer aldığı ayrıca mevsimsel ışık döngülerinin beyindeki serotonin sinyalini etkilediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (79-81). Serotonin ve sirkadiyen sistemlerin bağlantıları otizm, majör depresyon ve bipolar bozukluk gibi nörodavranışsal bozukluklar için önemlidir. Bu iki sistem duygusal davranışları birlikte düzenlerken otizm gibi duygudurum bozukluklarıyla da ilişkili oldukları gösterilmiştir (82). Literatürdeki çeşitli yayınlarda Otizm Spektrum Bozukluğu'nun patofizyolojisinde serotonerjik sistemin rol oynadığı bildirilmektedir. 5-HT reseptörü bağlanma çalışmaları ve buna bağlı yapılan bağlantı analizi sonuçları HTR2A'yı OSB için potansiyel bir aday gen olarak değerlendirmektedir. HTR2A geni üzerinde farklı bölgelerde bulunan üç SNP [1438A/G (rs6311), 102T/C (rs6313) ve 1354C/T (rs6314)] üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli nöropsikiyatrik bozuklukların etiyolojisi ilişkilendirilmiştir. Ancak Guhathakurta ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayımlanan makalede bu belirteçlerin ASD ile ilişkisi gösterilememiştir. Bu nedenle, HTR2A'nın Hint popülasyonunda ASD için genetik bir belirteç olmadığı iddia edilmiştir. Bizim çalışmamız Guhathakurta ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile örtüşmemektedir. Ancak, HTR2A geninin -1438A/G ve 102T/C lokuslarında CpG bölgelerinin metilasyonu fark edilmiş ve biyoinformatik analizler sonucunda, genin promotör bölgesinde, PBL'lerde HTR2A'nın biallelik ekspresyon modelini destekleyen CpG adacıklarının olmadığı ortaya çıkarılmıştır (83). (Bu durum aslında kendi içerisinde çelişen bir durumdur. DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların otizmdeki HTR2A düzensizliğine olası katkısı literatürdeki farklı makalelerde de (84) rapor edilmiştir. Smith ve arkadaşları 2014 yılında yayımlanan makalelerinde C alelinin HTR2A geni rs6311 varyantında otizm için bir risk aleli olabileceğini bildirmişlerdir (85). Spurlock ve arkadaşları, Unschuld ve arkadaşları, Chen ve arkadaşları ise özellikle Asya toplumlarında rs6313 varyantı T102C dönüşümünde C allelinin neredeyse tam bir bağlantı dengesizliğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (86-87-88). Gong ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yayımlanan makalede ise C aleli ile otistik benzeri özellikler arasındaki ilişkiye dikkat çekilerek otizmli bireylerde sosyal etkileşim eksikliklerinin altında yatan nedenin bu polimorfizmden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (89). Tüm bu literatür bilgileri incelendiğinde HTR2A geni rs6313 varyantı

T102C dönüşümünde C allelinin hastalık patofizyolojisindeki rolü ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda da çoğu literatür ile uyumlu olarak, üzerinde çalıştığımız Türk popülasyonunda HTR2A / rs6313 polimorfizminin otizmli bireylerde hem genotipik hem de allelik değişimlerle istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç verdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, şiddetli otizm vakalarında tespit edilen C alleli düzeyinin orta ve hafif otizmli bireylerden daha yüksek bulunması ($p = 0,007$) hem polimorfik ($p = 0,0001$) hem de semptomatik açıdan elde etmiş olduğumuz sonucun kendi içerisinde tutarlı ve hastalık oluşumu yönünde de öngördürücü olduğunu da kanıtlar niteliktedir.

Otizm spektrum bozukluğu (OSB) patofizyolojisinde önemli olduğu düşünülen bir diğer hipotez ise OSB'nin GABAerjik işlev bozukluktan dolayı oluşabileceğidir. Kromozom 15 üzerinde yer alan GABRβ3 geni, koordinasyon, hareket kontrolü ve denge ile ilişkili olan serebellumda yüksek oranda ifade edilirken, ayrıca bilişsel ve sosyal işlevlerle de ilgili olduğu bilinmektedir. GABRβ3 eksikliği bulunan farelerde yapılan çalışmada azalan beslenme davranışları, zayıf motor beceriler, hafıza ve öğrenme zorlukları ile elektroensefalografik anormallikler görülmüştür. Bu gen içindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ile OSB arasındaki ilişkiler bazı çalışmalarda analiz edilmiştir. Literatürde bu durumu destekleyen nöropatolojik, biyokimyasal ve genetik çok sayıda bulgu yer almaktadır. GABAA reseptörünün alfa5, beta3 ve gama3 alt birimlerini kodlayan genlerin bulunduğu 15q11-q13 bölgesi de bu anlamda üzerinde en çok çalışılan bölgelerdir (90-91). GABRβ3'ün anormal ekspresyonunun, genin promotör bölgesinde belirli genetik varyantların varlığının bir sonucu olarak bazı yayınlarda rapor edilmiştir. Ancak, literatürde yer alan verilerin birbiriyle tutarlı olduğunu söylemek güçtür. OSB hastalarında GABRβ3 geninin anormal ekspresyonunun altında yatan mekanizmanın anlaşılabilmesi için diğer biyolojik yolakların da incelenmesi gerekmektedir. Bu sebeple biz de çalışmamızda 15q11-q13 bölgesinde bulunmakla birlikte litertürdeki varyantlardan farklı olarak GABRβ3 geninin rs2081648 varyantındaki polimorfizmi inceledik. Noroozi R. ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yayımlanan bir meta analiz çalışmasında bu konudaki makaleler ele alınarak OSB ile GABA reseptörü SNP'leri arasındaki ilişki araştırılmış ve otizm ile ilişkili olmadığına dair kanıtlar rapor edilmiştir. Örneğin Yang ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yayımlanan makalede Çin popülasyonunda GABRβ3 rs2081648 polimorfizmlerinin OSB hastaları ve kontrolleri arasında genotipik ve allelik olarak istatistiksel bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir (92). Bizim sonuçlarımız da yukarıda

belirtilmiş olan makaleleri destekler niteliktedir. Ancak bizim elde etmiş olduğumuz SNP verisi kromozom 15q11-q13 bölgesinde bulunmakla birlikte farklı bir varyantın polimorfizmine bakmış olmamız sebebiyle her ne kadar hastalık ilişkisi göstermese de literatüre bir katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızın bir diğer bölgesi GABRG3 alt birimidir. GABA reseptörü beyindeki hızlı sinaptik inhibisyonların genelinde aracıdır ve bu yüzden farklı alt birimlerinin otizm ile olası bağlantısı çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Sitogenetik çalışmalar, kromozom 15q11-q13'ün otizm riskini artıran aday bir bölge olabileceğini öne sürdüğü için de özellikle GABRG3 bölgesinde çok sayıda SNP taraması yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri olan ve Wang L. ve arkadaşları tarafından Çin Han popülasyonu üzerinde yapılan ve 2018 yılında yayımlanan bir makalede 41 ayrı SNP üzerinde durulmuştur. 512 OSB olan hasta ve 575 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bu makalede GABRG3 geni üzerinde yer alan 6 ayrı SNP incelenmiş ve bunlardan rs7180500 varyantı otizm ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da incelemiş olduğumuz rs140679 varyantı da dahil 5 varyant için ise herhangi bir hastalık bağlantısı bulunmadığı rapor edilmiştir (93). Ali ZA. Ve arkadaşları tarafından 2022 yılında yayımlanmış olan başka bir çalışmada ise Irak popülasyonunda GABRG3 geni rs208129 varyantı ele alınmış ve 60 hasta 60 sağlıklı kontrol ile yapılan bu çalışmada rs208129 polimorfizmi ile OSB arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir (94). Tochigi M. ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yayımlanan makalede de 15q11-q13 kromozomal bölgesinde inceledikleri SNP'lerin OSB ile ilişkisinin olmadığı rapor edilmiştir (95). Silvia K. ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayımlanan makalede ise Slovak çocuklar üzerinde yapılan çalışmada GABRG3 geni rs28431127 polimorfizminin OSB ile ilişkisinin olmadığı tespit edilmiştir (96). Marisa M. Menold ve arkadaşları tarafından Amerika'da yapılan ve 2001 yılında yayımlanan diğer bir makalede ise GABRG3 geni Exon 5_539T/C 0.02 ve Intron 5_687T/C 0.03 lokasyonlarındaki SNP değişikliklerinin OSB ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Çin Han popülasyonunda yapılan ve Shuhan Yang ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yayımlanan diğer bir makalede de GABRG3 rs208129 polimorfizmleri ile OSB arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir (92). Benzer şekilde Saha S. ve arkadaşları tarafından Hint popülasyonunda yapılan ve 2022 yılında yayımlanmış olan makalede de GABRG3 rs897173 polimorfizminin OSB ile ilişkilendirildiği görülmektedir (97). Buraya kadar verilen örneklerden de görüleceği

üzere GABRG3 geni üzerindeki farklı varyantların OSB üzerinde toplumdan topluma farklı sonuçlar verdiği literatürde sabittir. Ancak bizim çalışmamızda ele almış olduğumuz rs140679 polimorfizmi ile ilgili literatürde 2021 yılda yayımlanan ve Adak P. ve arkadaşları tarafından Batı Bengal toplumunda yapılmış olan (70) ve Lu GB. ve arkadaşları tarafından Çin popülasyonunda yapılmış olan sadece iki çalışma bulunmaktadır (98), rs140679 polimorfizmi bu çalışmalardan ilkinde OSB ile ilişkilendirilirken diğerinde ilişkili olmadığı rapor edilmiştir. Türk popülasyonunda ise bu varyant ilk defa bizim çalışmamızda ele alınmıştır. Bu sonuçlardan da görüleceği üzere bu varyantın henüz yeterince bir sayı üzerinde çalışılmadığı açıktır. Ancak bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuç oldukça açık ve rs140679 polimorfizminin ve T alleli taşıyor olmanın OSB patofizyolojisinde oldukça önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Otizm spektrum bozuklukları (OSB'ları) doğası gereği multifaktöriyeldir ve hem genetik hem de çevresel faktörleri içerir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen veriler OSB etiyolojisinde epigenetiğin önemli rolünü ortaya koymuştur. Nörogelişimsel bozukluklar durumunda gözlenen en yaygın epigenetik değişiklik biçimlerinden biri de, gelişimsel ve dokuya özgü mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen imprintingdir.

Mevcut çalışmamız ile bir Türk popülasyonunda OSB ile HTR2A geninde rs6313, GABRG3 genindeki rs 140679 ve GABRB3 genindeki rs2081648 arasındaki korelasyonu incelenmiştir. GABRG3 genindeki rs140679 polimorfizmi Türk popülasyonunda ilk defa bizim çalışmamızda ele alınmıştır. Bu bölge ile ilgili hasta ve kontrol sayılarının arttırılarak çalışılmasının hem OSB etiyolojisi ile ilişkilendirdiğimiz bu bölgenin hastalık oluşumunda ne kadar etkin bir risk faktörü olduğunun ortaya konması hem de sonuçlarımızın literatüre vereceği katkıyı arttıracağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızın sonuçlarına göre HTR2A/rs6313 T102C polimorfizminin bireylerin empatik ve otistik özelliklerini modüle etmede etkin olduğu ve HTR2A polimorfizminin daha fazla sayıda C aleli olan bireylerde, HTR2A reseptörlerinin daha ziyade post-sinaptik membranlarda dağıldığını düşünmekteyiz. Bu durumun T102C dönüşümü sonucu HTR2A geninin postsinaptik membranlarda spontan uyarıcı olarak dağılımına bağlanabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J., Jones, R. M., Pickles, A., & State, M. W. (2020). Autism spectrum disorder. Nature reviews Disease primers, 6(1), 1-23.
2. Thapar, A., Cooper, M., & Rutter, M. (2017). Neurodevelopmental disorders. Lancet Psychiatry 4 (4): 339–346. In.
3. Butler, M. G., Youngs, E. L., Roberts, J. L., & Hellings, J. A. (2012). Assessment and treatment in autism spectrum disorders: a focus on genetics and psychiatry. Autism research and treatment, 2012.
4. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. The lancet, 392(10146), 508-520.
5. Quesnel-Vallieres, M., Weatheritt, R. J., Cordes, S. P., & Blencowe, B. J. (2019). Autism spectrum disorder: insights into convergent mechanisms from transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 20(1), 51-63
6. Veenstra-VanderWeele, J., & Cook, E. (2004). Molecular genetics of autism spectrum disorder. Molecular psychiatry, 9(9), 819-832.
7. Al-Beltagi, M. (2021).Autism medical comorbidities. World journal of clinical pediatrics,10(3), 15.
8. DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S. R., Schmitz, C., Schultz, R. T., Crawley, J., & Young, L. J. (2006). The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. Journal of Neuroscience, 26(26), 6897-6906.
9. Rylaarsdam, L., & Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic causes and modifiers of autism spectrum disorder. Frontiers in cellular neuroscience, 385.
10. Nisar, S., Bhat, A. A., Masoodi, T., Hashem, S., Akhtar, S., Ali, T. A., Amjad, S., Chawla, S., Bagga, P., & Frenneaux, M. P. (2022). Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. Molecular psychiatry, 27(5), 2380-2392.
11. Jaini, R., Wolf, M. R., Yu, Q., King, A. T., Frazier, T. W., & Eng, C. (2021). Maternal genetics influences fetal neurodevelopment and postnatal autism spectrum disorder-like phenotype by modulating in-utero immunosuppression. Translational Psychiatry, 11(1), 1-14.
12. Abdulamir, H. A., Abdul-Rasheed, O. F., & Abdulghani, E. A. (2018). Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children. Saudi medical journal, 39(5), 487.
13. Cieslinska, A., Fiedorowicz, E., Jarmolowska, B., Kordulewska, N., Kostyra, E., Moszynska, M., & Savelkoul, H. F. (2019). Polymorphisms rs6313 and rs6314 in serotonin receptor gene (HTR2A) and serotonin concentration in autistic children.
14. Collins, A. L., Ma, D., Whitehead, P. L., Martin, E. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., Hussman, J. P., Haines, J. L., Cuccaro, M. L., & Gilbert, J. R. (2006). Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. Neurogenetics, 7(3), 167-174.
15. Sharma, S. R., Gonda, X., & Tarazi, F. I. (2018). Autism spectrum disorder: classification, diagnosis and therapy. Pharmacology & therapeutics, 190, 91-104.
16. De Giacomo, A., & Fombonne, E. (1998). Parental recognition of developmental abnormalities in autism. European child & adolescent psychiatry, 7(3), 131-136.
17. Goldberg, W. A., Osann, K., Filipek, P. A., Laulhere, T., Jarvis, K., Modahl, C., Flodman, P., & Spence, M. A. (2003). Language and other regression: assessment and timing. Journal of autism and developmental disorders, 33(6), 607-616.
18. Hansen, R. L., Ozonoff, S., Krakowiak, P., Angkustsiri, K., Jones, C., Deprey, L. J., Le, D.-N., Croen, L. A., & Hertz-Picciotto, I. (2008). Regression in autism: prevalence and associated factors in the CHARGE Study. Ambulatory Pediatrics, 8(1), 25-31.
19. Mottron, L., & Bzdok, D. (2020). Autism spectrum heterogeneity: fact or artifact? Molecular psychiatry, 25(12), 3178-3185.
20. Wiggins, L. D., Rice, C. E., Barger, B., Soke, G. N., Lee, L.-C., Moody, E., Edmondson-Pretzel, R., & Levy, S. E. (2019). DSM-5 criteria for autism spectrum disorder maximizes diagnostic sensitivity and specificity in preschool children. Social psychiatry and psychiatric epidemiology, 54(6), 693-701.
21. Wozniak, R. H., Leezenbaum, N. B., Northrup, J. B., West, K. L., & Iverson, J. M. (2017). The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science, 8(1-2), e1426.

22. Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. Nervous child, 2(3), 217-250.
23. MC, L. (2013). Lombardo, Michael V, Baron-Cohen S. Autism. Lancet, 383(9920), 896-910.
24. Ozonoff, S., Goodlin-Jones, B. L., & Solomon, M. (2005). Evidence-based assessment of autism spectrum disorders in children and adolescents. Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology, 34(3), 523-540.
25. Vllasaliu, L., Jensen, K., Hoss, S., Landenberger, M., Menze, M., Schütz, M., Ufniarz, K., Kieser, M., & Freitag, C. M. (2016). Diagnostic instruments for autism spectrum disorder (ASD). Cochrane Database of Systematic Reviews(1).
26. Skuse, D., Warrington, R., Bishop, D., Chowdhury, U., Lau, J., Mandy, W., & Place, M. (2004). The developmental, dimensional and diagnostic interview (3di): a novel computerized assessment for autism spectrum disorders. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 43(5), 548-558.
27. Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., & Daly, K. (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). Journal of autism and developmental disorders.
28. Krug, D. A., Arick, J. R., & Almond, P. J. (1993). Autism screening instrument for educational planning: An assessment and educational planning system for autism and developmental disabilities: Examiner's manual. Pro-Ed.
29. O'Reilly, C., Lewis, J. D., & Elsabbagh, M. (2017). Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. PloS one, 12(5), e0175870.
30. Singh, A. N. (2014). Increases in the Prevalence of Autism Disorder: Exploring Biological and Socio-Environmental Factors. Inquiries Journal, 6(09).
31. Abrahams, B. S., & Geschwind, D. H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. Nature Reviews Genetics, 9(5), 341-355.
32. Sztainberg, Y., & Zoghbi, H. Y. (2016). Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. Nature neuroscience, 19(11), 1408-1417.
33. Hodges, H., Fealko, C., & Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. Translational pediatrics, 9(Suppl 1), S55.
34. Tchaconas, A., & Adesman, A. (2013). Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update. Current opinion in pediatrics, 25(1), 130-143.
35. Sanchack, K. E., & Thomas, C. A. (2016). Autism spectrum disorder: Primary care principles. American family physician, 94(12), 972-979.
36. Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. Cellular and Molecular Life Sciences, 76(7), 1275-1297.
37. Johnson, C. P., Myers, S. M., & Disabilities, C. o. C. w. (2007). Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. Pediatrics, 120(5), 1183-1215.
38. Yoo, H. (2015). Genetics of autism spectrum disorder: current status and possible clinical applications. Experimental neurobiology, 24(4), 257.
39. GuiFeng, X., Strathearn, L., BuYun, L., & Wei, B. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among US children and adolescents, 2014-2016. JAMA, Journal of the American Medical Association, 319(1), 81-82.
40. Palinkas, L. A., Mendon, S. J., & Hamilton, A. B. (2019). Innovations in mixed methods evaluations. Annual review of public health, 40, 423.
41. Baio, J. (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010.
42. Sheldrick, R. C., Maye, M. P., & Carter, A. S. (2017). Age at first identification of autism spectrum disorder: an analysis of two US surveys. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 56(4), 313-320.
43. Christensen, D. L., Braun, K. V. N., Baio, J., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., & Kurzius-Spencer, M. (2018). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. MMWR Surveillance Summaries, 65(13), 1.
44. Accordino, R. E., Kidd, C., Politte, L. C., Henry, C. A., & McDougle, C. J. (2016). Psychopharmacological interventions in autism spectrum disorder. Expert opinion on pharmacotherapy, 17(7), 937-952.
45. Madden, J. M., Lakoma, M. D., Lynch, F. L., Rusinak, D., Owen-Smith, A. A., Coleman, K. J., Quinn, V. P., Yau, V. M., Qian, Y. X., & Croen, L. A. (2017). Psychotropic medication use among insured children with autism spectrum disorder. Journal of autism and developmental disorders, 47(1), 144-154.

46. Stepanova, E., Dowling, S., Phelps, M., & Findling, R. L. (2022). Pharmacotherapy of emotional and behavioral symptoms associated with autism spectrum disorder in children and adolescents. Dialogues in clinical neuroscience.
47. Lamy, M., & Erickson, C. A. (2018). Pharmacological management of behavioral disturbances in children and adolescents with autism spectrum disorders. Current problems in pediatric and adolescent health care, 48(10), 250-264.
48. Genovese, A., & Butler, M. G. (2020). Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD). International journal of molecular sciences, 21(13), 4726.
49. DeFilippis, M. (2018). The use of complementary alternative medicine in children and adolescents with autism Spectrum disorder. Psychopharmacology bulletin, 48(1), 40.
50. Smith, T., & Iadarola, S. (2015). Evidence base update for autism spectrum disorder. Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology, 44(6), 897-922.
51. Hanson, E., Kalish, L. A., Bunce, E., Curtis, C., McDaniel, S., Ware, J., & Petry, J. (2007). Use of complementary and alternative medicine among children diagnosed with autism spectrum disorder. Journal of autism and developmental disorders, 37(4), 628-636.
52. Barak, B., & Feng, G. (2016). Neurobiology of social behavior abnormalities in autism and Williams syndrome. Nature neuroscience, 19(5), 647-655.
53. Kissel, L. T., & Werling, D. M. (2022). Neural transcriptomic analysis of sex Differences in autism spectrum disorder: Current insights and future directions. Biological Psychiatry, 91(1), 53-60.
54. Ecker, C., Spooren, W., & Murphy, D. (2013). Translational approaches to the biology of Autism: false dawn or a new era? Molecular psychiatry, 18(4), 435-442.
55. Oberman, L. M. (2012). mGluR antagonists and GABA agonists as novel pharmacological agents for the treatment of autism spectrum disorders. Expert opinion on investigational drugs, 21(12), 1819-1825.
56. Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. European Journal of Neuroscience, 47(6), 534-548.
57. Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Kneeland, R. E., & Liesch, S. B. (2011). Metabotropic glutamate receptor 5 upregulation in children with autism is associated with underexpression of both Fragile X mental retardation protein and GABAA receptor beta 3 in adults with autism. The Anatomical Record, 294(10), 1635-1645.
58. Oblak, A. L., Gibbs, T. T., & Blatt, G. J. (2011). Reduced GABAA receptors and benzodiazepine binding sites in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. Brain research, 1380, 218-228.
59. Marotta, R., Risoleo, M. C., Messina, G., Parisi, L., Carotenuto, M., Vetri, L., & Roccella, M. (2020). The neurochemistry of autism. Brain sciences, 10(3), 163.
60. Wang, Y., Hu, D., Wu, Z., Wang, L., Huang, W., & Li, G. (2022). Developmental Abnormalities of Structural Covariance Networks of Cortical Thickness and Surface Area in Autistic Infants within the First 2 Years. Cerebral Cortex.
61. Willsey, H. R., Willsey, A. J., Wang, B., & State, M. W. (2022). Genomics, convergent neuroscience and progress in understanding autism spectrum disorder. Nature Reviews Neuroscience, 23(6), 323-341.
62. Bralten, J., Van Hulzen, K., Martens, M., Galesloot, T., Arias Vasquez, A., Kiemeney, L., Buitelaar, J., Muntjewerff, J., Franke, B., & Poelmans, G. (2018). Autism spectrum disorders and autistic traits share genetics and biology. Molecular psychiatry, 23(5), 1205-1212.
63. Vicari, S., Napoli, E., Cordeddu, V., Menghini, D., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., & Tartaglia, M. (2019). Copy number variants in autism spectrum disorders. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 92, 421-427.
64. Bacchelli, E., Cameli, C., Viggiano, M., Igliozzi, R., Mancini, A., Tancredi, R., Battaglia, A., & Maestrini, E. (2020). An integrated analysis of rare CNV and exome variation in Autism Spectrum Disorder using the Infinium PsychArray. Scientific Reports, 10(1), 1-13.
65. Woodbury-Smith, M., & Scherer, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. Developmental Medicine & Child Neurology, 60(5), 445-451.
66. Golovina, E., Fadason, T., Lints, T., Walker, C., Vickers, M., & O'Sullivan, J. (2021). Understanding the impact of SNPs associated with autism spectrum disorder on biological pathways in the human fetal and adult cortex. Scientific Reports, 11(1), 1-15.
67. Thapar, A., Pine, D. S., Leckman, J. F., Scott, S., Snowling, M. J., & Taylor, E. A. (2017). Rutter's child and adolescent psychiatry. John Wiley & Sons.

68. Sullivan, P., Agrawal, A., Bulik, C., Andreassen, O., Borglum, A., Breen, G., Cichon, S., Edenberg, H., Faraone, S., & Gelernter, J. Consortium, PG (2017). Psychiatric Genomics: An Update and an Agenda. American Journal of Psychiatry, 175(1), 15-27.
69. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., & Spector, E. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine, 17(5), 405-423.
70. Adak, P., Sinha, S., & Banerjee, N. (2021). An association study of gamma-aminobutyric acid type a receptor variants and susceptibility to autism spectrum disorders. Journal of autism and developmental disorders, 51(11), 4043-4053.
71. Thapar, A., & Rutter, M. (2021). Genetic advances in autism. Journal of autism and developmental disorders, 51(12), 4321-4332.
72. Lewis, C. M., & Vassos, E. (2020). Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. Genome medicine, 12(1), 1-11.
73. Rose'Meyer, R. (2013). A review of the serotonin transporter and prenatal cortisol in the development of autism spectrum disorders. Molecular Autism, 4(1), 1-16.
74. PS, P. S. B., & Vinchurkar, A. (2016). Study of serotonin level in autism. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research, 5, 550-553.
75. Smith, R. M., Papp, A. C., Webb, A., Ruble, C. L., Munsie, L. M., Nisenbaum, L. K., Kleinman, J. E., Lipska, B. K., & Sadee, W. (2013). Multiple regulatory variants modulate expression of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in human cortex. Biological Psychiatry, 73(6), 546-554.
76. Mahdavi, M., Kheirollahi, M., Riahi, R., Khorvash, F., Khorrami, M., & Mirsafaie, M. (2018). Meta-analysis of the association between GABA receptor polymorphisms and autism spectrum disorder (ASD). Journal of Molecular Neuroscience, 65(1), 1-9.
77. Horder, J., Petrinovic, M. M., Mendez, M. A., Bruns, A., Takumi, T., Spooren, W., Barker, G. J., Künnecke, B., & Murphy, D. G. (2018). Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. Translational Psychiatry, 8(1), 1-11.
78. Liu, H., Huang, X., Xu, J., Mao, H., Li, Y., Ren, K., ... & Wang, W. (2021). Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. Neurobiology of stress, 15, 100417.
79. Khanzada, N. S., Butler, M. G., & Manzardo, A. M. (2017). GeneAnalytics pathway analysis and genetic overlap among autism spectrum disorder, bipolar disorder and schizophrenia. International Journal of Molecular Sciences, 18(3), 527.
80. Gadow, K. D., Pinsonneault, J. K., Perlman, G., & Sadee, W. (2014). Association of dopamine gene variants, emotion dysregulation and ADHD in autism spectrum disorder. Research in developmental disabilities, 35(7), 1658-1665.
81. Kronfeld-Schor, N., & Einat, H. (2012). Circadian rhythms and depression: human psychopathology and animal models. Neuropharmacology, 62(1), 101-114.
82. Ciarleglio, C. M., Resuehr, H. E. S., & McMahon, D. G. (2011). Interactions of the serotonin and circadian systems: nature and nurture in rhythms and blues. Neuroscience, 197, 8-16.
83. Guhathakurta, S., Singh, A. S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ahmed, S., Ghosh, S., & Usha, R. (2009). Analysis of serotonin receptor 2A gene (HTR2A): association study with autism spectrum disorder in the Indian population and investigation of the gene expression in peripheral blood leukocytes. Neurochemistry International, 55(8), 754-759.
84. Hranilovic, D., Blazevic, S., Stefulj, J., & Zill, P. (2016). DNA methylation analysis of HTR2A regulatory region in leukocytes of autistic subjects. Autism Research, 9(2), 204-209.
85. Smith, R. M., Banks, W., Hansen, E., Sadee, W., and Herman, G. E. (2014). Familybased clinical associations and functional characterization of the serotonin 2A receptor gene (HTR2A) in autism spectrum disorder. Autism Res. 7, 459 –467. doi: 10.1002/aur.1383)
86. Chen, S. F., Shen, Y. C., and Chen, C. H. (2009). HTR2A A-1438G/T102C polymorphisms predict negative symptoms performance upon aripiprazole treatment in schizophrenic patients. Psychopharmacology (Berl.) 205, 285–292. doi: 10.1007/s00213-009-1538-z
87. Spurlock, G., Heils, A., Holmans, P., Williams, J., D'Souza, U. M., Cardno, A., et al. (1998). A family based association study of T102C polymorphism in 5HTR2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter. Mol. Psychiatry 3, 42–49. doi: 10.1038/sj.mp.4000342

88. Unschuld, P. G., Ising, M., Erhardt, A., Lucae, S., Kloiber, S., Kohli, M., et al. (2007). Polymorphisms in the serotonin receptor gene HTR2A are associated with quantitative traits in panic disorder. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 144, 424–429. doi: 10.1002/ajmg.b.30412).
89. Gong P, Liu J, Blue PR, Li S, Zhou X. Serotonin receptor gene (HTR2A) T102C polymorphism modulates individuals' perspective taking ability and autistic-like traits. Front Hum Neurosci. 2015 Oct 23;9:575. doi: 10.3389/fnhum.2015.00575. PMID: 26557070; PMCID: PMC4615938).
90. (Mahdavi M, Kheirollahi M, Riahi R, Khorvash F, Khorrami M, Mirsafaie M. Meta-Analysis of the Association between GABA Receptor Polymorphisms and Autism Spectrum Disorder (ASD). J Mol Neurosci. 2018 May;65(1):1-9. doi: 10.1007/s12031-018-1073-7. Epub 2018 May 3. PMID: 29725984.).
91. Noroozi R, Taheri M, Ghafouri-Fard S, Bidel Z, Omrani MD, Moghaddam AS, Sarabi P, Jarahi AM. Meta-analysis of GABRβ3 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. J Mol Neurosci. 2018 Aug;65(4):432-437. doi: 10.1007/s12031-018-1114-2. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30074174.).
92. Yang S, Guo X, Dong X, Han Y, Gao L, Su Y, Dai W, Zhang X. GABAA receptor subunit gene polymorphisms predict symptom-based and developmental deficits in Chinese Han children and adolescents with autistic spectrum disorders. Sci Rep. 2017 Jun 12;7(1):3290. doi: 10.1038/s41598-017-03666-0. PMID: 28607477; PMCID: PMC5468250.).
93. Wang, L., Li, J., Shuang, M., Lu, T., Wang, Z., Zhang, T., ... & Wang, L. (2018). Association study and mutation sequencing of genes on chromosome 15q11-q13 identified GABRG3 as a susceptibility gene for autism in Chinese Han population. Translational psychiatry, 8(1), 1-12.
94. Ali, Z. A., Yasseen, A. A., McAllister, K. A., Al-Dujailli, A., Al-Karaqully, A. J., & Jumaah, A. S. (2022). SNP-PCR genotyping links alterations in the GABAA receptor (GABRG3: rs208129) and RELN (rs73670) genes to autism spectrum disorder among peadiatric Iraqi Arabs. Molecular Biology Reports, 1-10.
95. Tochigi, M., Kato, C., Koishi, S., Kawakubo, Y., Yamamoto, K., Matsumoto, H., ... & Sasaki, T. (2007). No evidence for significant association between GABA receptor genes in chromosome 15q11–q13 and autism in a Japanese population. Journal of Human Genetics, 52(12), 985-989.
96. Kelemenova, S., Schmidtova, E., Ficek, A., Celec, P., Kubranska, A., & Ostatnikova, D. (2010). Polymorphisms of candidate genes in Slovak autistic patients. Psychiatric genetics, 20(4), 137-139.
97. Saha, S., Chatterjee, M., Dutta, N., Sinha, S., & Mukhopadhyay, K. (2022). GABA Receptor SNPs and Elevated Plasma GABA Levels Affect the Severity of the Indian ASD Probands. Journal of Molecular Neuroscience, 1-13.
98. Lu, G. B., Ou, P., Xu, L. P., Huang, H. L., Cheng, L., Yang, S. W., ... & Lin, Y. (2012). Relationship between gene polymorphism of GABAA receptors gene and childhood autism. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine], 46(5), 460-464.

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onay Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	GABRA5, GABRB3, GABRG3, HTR2A Gen Varyantlarının Otizm Spektrum Bozuklukları Oluşumu ile İlişkisinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	21-87

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
KARAR BİLGİLERİ	**Tarih:16.09.2021**	**Karar No:2021.09.16- 61**	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr.Ayşe BATIREL	Enfeksiyon Hastalıkları	SBÜ Kartal SÜAM	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Mahmut GÜMÜŞ	Tıbbi Onkolog	Medeniyet Üniversitesi	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. E. Turgut IŞITMANGİL	Göğüs Cerrahisi	SBÜ Abdülhamid Han SUAM	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr.Serhat KÖSEOĞLU	Periodontoloji	SBÜ Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr.Nursel ARICI	Ortodonti	OMÜ Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr.Alev	Biyokimya	SBÜ Bakırköy Sadi	E ☐	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	

SBU Hamidiye KAEK Başkanı
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK-2.Gönüllü onay formu

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:

Proje Adı: GABRA5, GABRB3, GABRG3, HTR2A Gen Varyantlarının Otizm Spektrum Bozuklukları Oluşumu ile İlişkisinin Araştırılması

Yapılacak işlemin tanımı: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tanı konulan 3-9 yaş arası 200 otizm spektrum bozukluğuna sahip hasta ve 100 sağlıklı gönüllüden çalışmaya gönüllü olanlara moleküler testler uygulanacaktır.

Araştırmanın Amacı: Otizmli hastalar ile yapacağımız bu çalışma ile GABRB3, GABRG3 ve HTR2A genlerinde yer alan polimorfizmlerin hastalığın oluşum mekanizması ile otizm patofizyolojisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Dünyanın farklı bölgelerinde yukarıda belirtilen genlerin farklı varyantlarıyla yapılmış ve birbirleriyle aynı yönde sonuç vermiş çok az sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu çalışma ile hem bu genlerin Otizm Spektrum Bozukluklarının patofizyolojisinin aydınlatılması noktasında hem de tek başına hastalık oluşumunu tetiklemeyip ancak birlikteliklerinin hastalık oluşumuna yol açabileceği üzerinde durmuş olduğumuz gen varyantlarındaki mutasyon(lar) araştırılması amaçlanmaktadır.

Araştırmada Kullanılacak Yöntemler: Çalışmaya Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tanı konulan 3-9 yaş arası 200 otizm spektrum bozukluğuna sahip hasta ve 100 sağlıklı gönüllü dahil edilecektir. Gönüllülerin ebeveynleri tarafından gönüllü olur formu imzalandıktan sonra rutin izlem sırasında gönüllülerden 2 ml EDTA'lı periferik kan örneği alınacak, soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledilecektir. Sonrasında DNA izolasyonu, ilgili gen bölgelerine özgü dizayn edilmiş primerlerin ve uygun prosedürün kullanımı ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapılacaktır. PCR ürünlerinden RFLP yöntemi ile genotipleme yapılacaktır. Elde edilen veriler SPSS v 25.0 programı ile değerlendirilecek ve istatistik analiz sonrası çalışma tamamlanacaktır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.

- Çalışmaya katılma zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırıcının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırma sırasında elde edilen test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız durumunda hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile saklanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
- Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Klinik, patolojik ve radyolojik bulgular ve alınan materyaller bundan sonraki bilimsel amaçlı çalışmalarda da kullanılabilecektir. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.

Olası riskler ve faydalar:

Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı hastalığınızın erken dönemde hızlı bir şekilde tanısının konulup yine erken dönemde etkin bir şekilde tedavi edilmesiyle birlikte uzun dönemde gelişebilecek sorunların başvuru anında öngörülmesidir.

Katılımcının/Hastanın Beyanı:

Sayın …… tarafından Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD' da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte,

……no' lu telefondan**,** arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih:

Gönüllünün Adı-soyadı: **İmzası**

Gönüllünün Telefonu :

Adresi :

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no. faks no,)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı: **İmzası**

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı: