

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA COX-2-765G→C ve
COX-2-1195A→G GENLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlyas KAYA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Süleyman Salih ZOROĞLU

İSTANBUL

2013

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA COX-2-765G→C ve
COX-2-1195A→G GENLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlyas KAYA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Süleyman Salih ZOROĞLU

İSTANBUL

2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince, eğitimime olan katkıları ve tez konumun belirlenmesinden yazım aşamasına kadar her aşamada, her türlü desteği sağlayan, kıymetli bilim insanı, değerli tez danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Süleyman Salih Zoroğlu'na;

Klinik eğitimim sırasında çocuk psikiyatrisi alanındaki genel bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan kıymetli bilim insanları, değerli hocalarım Prof. Dr. Nahit Motavallı Mukaddes'e, Doç. Dr. Behiye Alyanak'a, Doç. Dr. Osman Abalı'ya, Doç. Dr. Ayşe Kılınçaslan'a, Uzm. Dr. Murat Coşkun'a;

Tezimin her aşamasında destek ve ilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Bedia Ağaçhan'a, Sinem Bireller'e, Çağla Oruç'a, Zeynep Birsu Çinçin'e ve Doç. Dr. Eda Tahir Turanlı'ya;

Uzmanlık eğitimim süresince aynı ortamı paylaştığım ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire, psikolog, pedagog, sosyal çalışmacı, sekreter ve diğer personellere;

Psikiyatri ve Çocuk Nörolojisi rotasyonlarım sırasında beraber çalıştığım ve istifade ettiğim değerli hocalarım, asistan arkadaşlarım ve diğer personellere;

Çalışmama katılan tüm çocuk, ergen ve ailelerine;

Kendilerinden çok şey öğrendiğim tüm hasta ve danışanlarıma;

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan sevgili annem Nesibe Kaya ve babam Resul Kaya ve kardeşlerim Emel, Ebru, Şenol ve Hakan'a;

Ve son olarak moral ve motivasyon kaynağım, desteğini ve ilgisini eksik etmeyen ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Fatma Betül ve oğlum Ahmet Akif'e teşekkür ederim.

Dr. İlyas Kaya

2013

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	IX
SUMMARY	X
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
A.Otizm Spektrum Bozukluğu	2
1.Otistik Bozukluk	3
2.Asperger Bozukluğu	6
3.Atipik Otizm	8
4.Tanımlama ve Tarihçe	9
5.Etyopatogenez	10
a.Genetik Faktörler	10
b.Nöroanatomik Faktörler	11
c.Nörofizyolojik Faktörler	11
d.Diğer Tıbbi Durumlar ile Birliktelik	12
e. Doğum Öncesindeki, Sırasındaki ve Sonrasındaki Faktörler	12
f.Biyokimyasal Faktörler	12
g.İmmunolojik Faktörler	14
B.Otizm ve Genetik	14
1.Genetik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	15
2.Aday Genler	16
a.Reelin	16
b.Human serotonin transporter gene (SCL6A4)	16
c.Gama aminobutirik asid reseptör gen (GABR)	16
d.Nöroligin gen (NLGN)	16
e.Human oksitosin reseptör gen (OXTR)	17
f.MET	17
C.COX ve Genetik	18
1.COX-2'nin Beyindeki İşlevleri	20
2.COX-2 ve Otizm	22
YÖNTEM ve GEREÇLER:	23

A.Gereçler	23
1.Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.Kullanılan Gereçler	23
3.Kullanılan Çözeltiler	24
a.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	24
• Eritrosit Parçalama Tamponu	
• 0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)	
• Molar Sodyum Klorür (NaCl)	
• Lökositleri Parçalama Tamponu	
• 1 Molar Tris tamponu (stok)	
• 9,5 Molar Amonyum asetat	
• %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)	
• Proteinaz K (20 mg/ml)	
b.Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler	26
• Etidyum Bromür(10 mg/ml)	
• Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)	
• 50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu	
• 5X Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu	
B.Yöntemler	27
1.Periferik Kandan DNA İzolasyonu	27
2.DNA Saflık Tayini	27
3.DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması	27
4.COX-2-765 gen Polimorfizmi için Kullanılacak PCR-RFLP Yöntemi	28
5.COX-2-1195 gen Polimorfizmi için Kullanılacak PCR-RFLP Yöntemi	28
6.Klinik teşhisler ve hasta grupları	29
a.Verit Formu	30
b.Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ)	30
C. İstatistiksel uygulamalar	31
1.P (Anlamlılık Değeri)	31
2.Ki Kare Testi (X^2)	31
3. t Testi	31
4.ANOVA	32
5.Risk Hesapları	32

a. Relatif Risk	32
b.İhtimal Oranı	33
c.Yüklenen Kesit	33
6.Aile temelli ilişki analizleri	33
a.Haplotip temelli haplotip relatif risk analizi	34
b.Kalıtılabilme eşitsizliği testi (KET) (TDT)	34
c.Genişletilmiş Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (GKET)	35
BULGULAR	36
TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	46
EKLER	62

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: DSM-IV Otistik Bozukluk Tanı Ölçütleri

Tablo 2: DSM-IV Asperger Sendromu Tanı Ölçütleri

Tablo 3: DSM-IV Başka Türü Adlandırılmayan-Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanı Ölçütleri

Tablo 4: COX-2-765 geninin polimorfizminde kullanılacak primer diziler

Tablo 5: COX-2-1195 geninin polimorfizminde kullanılacak primer diziler

Tablo 6: Zeka Düzeyleri

Tablo 7: CARS skoru ve yaş dağılımı

Tablo 8: Sosyodemografik Veriler

Tablo 9: COX-2-765 gen polimorfizminde heterozigot geçişte TDT analizi

Tablo 10: COX-2-765 gen polimorfizminde HHRR analizi

Tablo 11: COX-2-765 geni için genotiplerin saptanan sayıları

Tablo 12: COX-2-1195 gen polimorfizminde heterozigot geçişte TDT analizi

Tablo 13: COX-2-1195 gen polimorfizminde HHRR analizi

Tablo 14: COX-2-1195 geni için genotiplerin saptanan sayıları

KISALTMALAR

A: Adenin

AA: Araşidonik Asit, Arachidonic Acid

ADI-R: Autism Diagnostic Interview, Revised

ADOS: Autism Diagnostic Observation Schedule

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

ANOVA: Analysis of Variance, Varyans Analizi

AM: Adreno Medullin

AS: Asperger Sendromu , Asperger Bozukluğu

ASD: Autism Spectrum Disorder

AO: Atipik Otizm

BDNF: Beyin-Kaynaklı Büyüme Faktörü, Brain-Derived Neurotrophic Factor

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BTA-YGB: Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk

C: Sitozin

CARS: Childhood Autism Rating Scale

CNV: Copy Number Variation, Kopya Sayısı Varyasyonu

COX: Siklooksijenazlar, Cyclooxygenases

ÇODÖ: Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği

DİOB: Düşük İşlevli Otistik Bozukluk, Low Functioning Autistic Disorder

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate, Deoksiribonükleotid Trifosfat

DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition-Text Revision, Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı Dördüncü Baskı Yeniden Gözden Geçirilmiş Tam Metin

EAE: Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit, Experimental autoimmune encephalomyelitis

EDTA: Etilen Diamine Tetra Asetat

EEG: Elektroensefalografi

E/K:Erkek/Kız

G: Guanin

GABA: Gama Aminobutirik Asid

GABR: Gama Aminobutirik Asid Reseptör Geni

5-HIAA: 5-Hidroksi-İndolasetik Asit

HRR: Haplotip Relatif Risk

HVA: Homovalinik Asitin

ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, Hastalıkların ve Sağlık Problemlerinin Uluslararası İstatiksel Sınıflaması

IQ: Intelligence Quotient, Zeka Bölümü

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

KET: Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi

LTP: Long-Term Potansiyalizasyon, Long-Term Potentiation

MBP: Miyelin Temel Protein, Myelin Basic Protein

MECP2: Metil-CpG-Bağlayıcı Protein 2, Methyl CpG Binding Protein 2

µl: Mikrolitre

MPTP: 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin

MRG: Magnetik Rezonans Görüntüleme

mRNA: Messenger RNA, Mesajcı RNA

MS: Multiple Skleroz

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NaCl: Sodyum Klorür

NLGN: Nöroligin Geni

NO: Nitrik Oksit

NSAİİ: Nonsteroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar

NSAID: Nonsteroidal Anti-İnflammatory Drugs

OB: Otistik Bozukluk

ONOO: Peroksinitrit

OSB: Otizm Spektrum Bozuklukları

OXTR: Human Oksitosin Reseptör Geni, İnsan Oksitosin Reseptör Geni

PCOX-1: COX-1 Proteini

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Polimerase Chain Reaction

PH: Parkinson Hastalığı

PLA2: Fosfolipaz A2, Phospholipase A2

PTGS2: Prostaglandin-Endoperoksit Sentaz 2

RFLP: Restriksiyon Parçaları Uzunluk Polimorfizmi, Restriction Fragment Length Polymorphism

RR: Relatif Risk

SCL6A4: Human Serotonin Transporter Gene, İnsan Serotonin Taşıyıcı Geni

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms

SOD: Süperoksit Dismutaz

SSGİ: Seçici Serotonin Gerilim İnhibitörleri

T: Timin

TAE: Tris-Asetik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat

TBE: Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat

TDT: Transmission Disequilibrium Test

X^2 : Chi Square, Ki Kare

YİOB: Yüksek İşlevli Otistik Bozukluk, High Functioning Autistic Disorder

YGB: Yaygın Gelişimsel Bozukluk

ZB: Zeka Bölümü

ZG: Zeka Geriliği

ÖZET

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G GENLERİNİN İNCELENMESİ

Giriş ve Amaç: Otizm sosyalizasyon yetersizliği, sözlü iletişimde anormallikler, sınırlı ve basmakalıp ilgi alanı ve davranışlar ile karakterize nöro gelişimsel bir bozukluktur. Otizmin altında yatan etiyoloji bilinmemektedir. Siklooksijenazlar (COX), membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A2 (PLA2) tarafından salınan araşidonik asitin (AA) biyoaktif prostanoidlere dönüşümünü katalizlemesi ile inflamasyon kaskadında merkezi rol oynar. COX-2'nin, çoğu dokuda tipik olarak inflamatuvar uyarılarla indüklenmesinden dolayı, inflamatuvar cevabın artırılmasından sorumlu tek izoform olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, anti- inflamatuvar ilaçlar için en uygun hedef olarak değerlendirilmektedir. Bu son bulgular COX-2 türevi ürünlerin, beyin doğal immünitesi üzerinde, beyinde endotoksin aktivasyonu sonrası, inflamasyon gelişimi ve çözülmesi üzerinde koruyucu bir etkiye aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, COX-2 gen varyantları ve otizm spektrum bozukluğu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalında takip edilen, DSM-IV Tanı Ölçütlerine göre otizm spektrum bozukluğu(OSB) olan, 2–18 yaşları arasındaki 101 çocuk ve biyolojik anne babaları alınmıştır. Ayrıca DSM–IV Ölçütleri ve Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (Childhood Autism Rating Scale-CARS) kullanılarak OSB tanısı doğrulanmış ve belirtilerin dağılımı ve sorunların şiddeti saptanmıştır. Anne baba ve çocuk üçlüsünde DNA izolasyonu için 10 cc'lik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmıştır. Kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G gen polimorfizmleri saptamak için PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu), RFLP (Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır.

Bulgular: Anne baba ve çocuk üçlüsünden alınan kanların incelenmesi ve aile temelli kalıtılabilir eşitsizliği testleri (KET) sonucunda COX-2-1195 (p:0,0262) geni otizm ile anlamlı derecede ilişkili bulunurken, COX-2-765(p:0,2248) geni ile anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular COX-2-765 ve COX-2-1195 genlerinin OSB fenotipinin oluşumunda rol oynayabileceklerini ortaya koymaktadır. Bu alanda yapılacak daha geniş genetik, epidemiyolojik ve moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

ASSOCIATION ANALYSIS OF COX-2-765G→C and COX-2-1195A→G GENES IN AUTISM SPECTRUM DISORDER

Background and Aim: Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by lack of socialization, oral communication, restricted and stereotyped interests and behaviors. The underlying etiology of autism is unknown. Cyclooxygenases (COX) play a central role in the inflammatory cascade by converting arachidonic acid (AA), released from membrane phospholipids by a phospholipase A2 (PLA2), into bioactive prostanoids. Because COX-2 is typically induced by inflammatory stimuli in the majority of tissues, it was thought to be the only isoform responsible for propagating the inflammatory response and thus, considered as the best target for anti-inflammatory drugs. These recent findings suggest that COX-2-derived products can mediate a protective effect in the progression and/or the resolution of inflammation in the brain after endotoxin activation of brain innate immunity. In this study, we aim to investigate the association between COX-2 gene variants and the autism spectrum disease.

Method: All cases were taken from children and adolescents who consecutively referred to Istanbul Faculty of Medicine, Department Child and Adolescent Psychiatry, Autism Unit. Participants were 101 children, aged 2–18 year-old, who met DSM-IV criteria for autism spectrum disorder(ASD). Childhood Autism Rating Scale-CARS was used to assess the severity of symptoms. 10cc blood sample of 101 mother father and affected child trios are taken to sterile EDTA test tube for DNA isolation. Polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and agarose gel electrophoresis are used to assess COX-2-765G→C and COX-2-1195A→G genes polymorphism in DNA samples.

Results: After analysing trio blood sample and using family based approaches like transmission disequilibrium test (TDT) we found significant association between COX-2-1195(p:0,0262) gene and autism. There is no significant association between COX-2-765(p:0,2248) gene and autism.

Conclusion: The findings of this study suggest that COX-2-765 and COX-2-1195 might appear to be a viable candidate gene for the pathogenesis of autism and have a role development of ASD phenotype. We need larger epidemiologic, genetic and molecular study in this area.

GİRİŞ

Otizm spektrum bozuklukları sosyal, iletişim ve davranışsal alanlardaki bir dizi yetersizliklerle karakterize bir grup nörogelişimsel bozukluklardır(1).Etkilenmiş kişilerin kardeşlerinde genel popülasyondan 22 kat ve daha üstü otizm görülme riski genetik mekanizmaların rolünü düşündürmektedir ve çeşitli gelişimsel dil ve kognitif problemler için yüksek risk altındadırlar; monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılan çalışmalar monozigotik ikizlerde otizm için artmış bir konkordans olduğunu göstermiştir(2,3).Halen birkaç kromozom potansiyel olarak umut vericidir. Öyle görünmektedir ki multipl gen etkileniyor gibidir(4). Siklooksigenaz-2 (Cox-2) santral sinir sistemi nöropatolojisi ve nöroplastisite ile ilgili indüklenebilir bir enzimdir(5).Alzheimer hastalığının gelişiminde koruyucu bir rol oynadığı söylenen COX-2-765 geninin C alleli (prostaglandin endoperoksit sentaz 2; PTGS2) promotör polimorfizminin AH riskinde azalma ile ilişki olduğu bildirilmiştir(162).Yoo HJ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PTGS2 (cox-2'yi kodlayan gen) polimorfizmleri, çocuklarında otizm spektrum bozukluğu olan 151 Koreli aile triosunda(anne, baba ve çocuk) değerlendirilmiştir. Bu çalışmada rs2745557nin A alleli otizm spektrum bozukluğunda tercihen ileildiği bulunmuş(p<0.01) ve GAAA haplotipi otizm spektrum bozukluğuyla anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur(5).Ayrıca bu çalışmada ADOS ve ADI-R testlerinin iletişim, karşılıklı sosyal etkileşimde kalitatif anormallikler ve overaktivasyon/ajitasyon spesifik alanlarının skorlarıyla her gen arasında anlamlı istatistiksel ilişki gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda kliniğimize başvuran Otizm spektrum bozukluğu tanılı çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babalarının kan örneklerinde COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G genlerinin incelenmesi planlanmıştır. Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalında takip edilen, DSM-IV Tanı Ölçütlerine göre OSB'li olan, 2 – 18 yaşları arasındaki 101 çocuk ve biyolojik anne babaları alınmıştır. Ayrıca DSM-IV Ölçütleri ve Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (Childhood Autism Rating Scale-CARS) kullanılarak OSB tanısı doğrulanmış ve belirtilerin dağılımı ve sorunların şiddeti saptanmıştır. Anne baba ve çocuk üçlüsünde DNA izolasyonu için 10 cc'lik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmıştır. Kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G gen polimorfizmleri saptamak için PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu), RFLP (Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır.

GENEL BİLGİLER

A. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI

Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB) tipik olarak hayatın ilk yıllarında başlayan sosyal, iletişimsel ve bilişsel gelişimde gecikme, duraklama ve sapmanın görüldüğü nöropsikiyatrik bozukluklar grubunu tanımlar (6). İlk kez Wing ve Gould (1979) Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB) ifadesini kullanmış ve üç temel alanda (sosyal karşılıklık, iletişim ve sınırlı ilgi alanı veya tekrarlayıcı davranışlar) yer alan belirtilerin her birinin değişen şiddette ve birçok farklı şekillerde ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir(7).

Otistik bozukluk hem DSM-IV-TR hem de ICD-10 (8)'da yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) başlığı altında sınıflanmış ve her iki kılavuzda da benzer şekilde tanımlanmıştır. YGB bir şemsiye kavramdır; bu başlık altında bazı yönleriyle farklı olmakla birlikte, temel olarak birbirine benzeyen otizmle ilişkili değişik bozukluklar vardır. Günlük uygulamada YGB yerine "otizm spektrum bozuklukları" terimi de kullanılmaktadır.

YGB başlığı altındaki hastalıklar: Otistik bozukluk, Rett sendromu, Çocukluğun dezintegratif bozukluğu, Asperger Bozukluğu, Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluktur (BTA-YGB).

Rett Sendromu; çok kısa süren normal bir gelişim periyodundan sonra, başın büyüme hızının azalması, amaca yönelik el hareketlerinin kaybolması, tipik el yıkama stereotipilerinin ve ciddi psikomotor geriliğin ortaya çıkması ile karakterize bir durumdur. Tanımlanan olguların büyük çoğunluğu kız olmakla beraber, literatürde bildirilmiş erkek olgular da vardır. Kızlarda sıklığı 10-15 binde 1 gibidir. Seyri otizmden belirgin şekilde farklı olsa da otistik belirtilerin ön plana çıktığı bir dönem görülür. MECP2 (metil-CpG-bağlayıcı protein 2) geninde çeşitli mutasyonlar sporadik vakaların %75-90'ında, ailesel vakaların %50'sinde bildirilmektedir (9,10).

Çocukluğun dezintegratif bozukluğunda 2 yıldan daha fazla bir süre (genellikle 3-4 yıl) süren normal bir dönem sonrasında davranış değişiklikleri ve gerileme ortaya çıkar. Alıcı ve ifade edici dilin yanı sıra sıklıkla mesane ve barsak kontrolü ile beden koordinasyonunda kayıp meydana gelir. Otizme benzer şekilde davranış özellikleri, sosyal çekilme, basit ritüeller ve alışılmadık duyuşsal davranışlar, el ve parmak stereotipileri gelişir. Çoğu zaman bir nedeni bulunamayan bu durum, başlangıç paterni, seyir ve sonuçları itibariyle otizmden ayrılır. (10)

OSB'de 3 ayrı bozukluk tanımlanmıştır: a. Otistik Bozukluk (OB), b. Asperger Bozukluğu (AS), c. Atipik Otizm (AO).

Epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde tüm OSB için ortalama prevalans 36,6-67/10000 olarak bulunmuştur (11, 12, 13, 14, 15). Bazı yazarlar ise bu oranın yaklaşık %0,5-1,1 olduğunu bildirmişler (16, 17, 18). Genellikle mental retardasyonla ilişkili olmakla birlikte, bu bozukluklar diğer gelişimsel bozukluklardan davranışsal ve gelişimsel özelliklerinin farklı olması ve bu farklılığın gelişimsel seviyeye bağlanamaması ile ayrılmaktadır (6). OSB’de Zeka Geriliği (ZG) sıklığı yaklaşık %70 civarında olduğu saptanmıştır (17).

Yıllar içinde OSB sıklığında gözlemlenen artış ile ilgili birçok neden ileri sürülmektedir. Bunlardan en önemlisi, kullanılan tanı ölçütlerindeki değişikliklerdir (15). 1960’larda Kanner’in ölçütleri kullanılırken, 1970’lerde Rutter’ın tanımlamaları, 1980’lerde ise DSM-III ve DSM-III R kullanılmıştır. Son 15 yıldır ise tanımlar DSM-IV ve ICD-10’de belirtilen ölçütlere göre konulmaktadır. Araştırmalarda kullanılan yöntemlerdeki (örneklem seçimi, örneklemin büyüklüğü, kullanılan ölçekler, tanıyı koyanların deneyimi) farklılıklar da bir diğer neden olarak belirtilmektedir.

Bunun yanında OSB ile ilgili bilgi ve farkındalığın artması, hem daha fazla olgunun kliniklere başvurmasına hem de klinisyenler tarafından daha kolay ve daha doğru şekilde tanınmasına neden olmuş, tanı yaşının düşmesini sağlamıştır. Ancak sıklıktaki artışın yukarıda belirtilen nedenlerden mi kaynaklandığı yoksa gerçek bir artışın olup olmadığı ile ilgili daha yeni çalışmalara gereksinim vardır.

1.Otistik Bozukluk

OB çocukluk çağı nöropsikiyatrik bozukluklarından biridir ve belirtileri yaşamın ilk üç yılında başlamaktadır. Temelde sosyal etkileşimde ve iletişimde yetersizlikle beraber tekrarlayıcı davranışlar ve kısıtlı ilgi alanları ile karakterize, hayat boyu süren gelişimsel bir bozukluktur (6). DSM-IV’ de Otistik Bozukluk tanısı için, 3 alandaki (sosyal gelişim alanında en az iki, iletişim becerileri alanında en az bir, tekrarlayıcı davranışlar ve kısıtlı ilgi alanında en az bir) 12 belirtiden en az 6 tanesinin olması ve belirtilerin 3 yaşından önce başlaması öngörülmüştür (1).(Tablo 1)

Fombonne, son 40 yılda yapılmış 34 epidemiyolojik çalışmanın verilerini gözden geçirdiği yazısında, genel toplumdaki OB sıklığının ortalama 13/10.000 olduğunu bildirmiştir (15). Gillberg (2005) OB oranının, OSB popülasyonunda yaklaşık %20-40 arasında olduğunu belirtmiştir (17).

Cinsiyet açısından bakıldığında erkek/kız (E/K) oranının genel toplumda yapılan

çalışmalarda ortalama 4/1 olduğu, kliniğe başvurularında ise bu oranın erkek cinsiyet yönünden daha da arttığı görülmektedir (11, 15). ZG ile birlikteliği göz önüne alındığında ise Zekâ Bölümü düştükçe kız oranının arttığı (E/K: 2/1), Yüksek işlevli grupta ise E/K oranının 6/1 – 8/1 arasında olduğu gözlenmektedir. Klinik görünüm açısından bakıldığında belirtiler kızlarda genellikle daha ağırdır ve zeka geriliği daha sıktır (19).

OB olan çocukların %30'unda normal zeka düzeyi, %30'unda hafif-orta derecede zeka geriliği ve %40'ında ağır-ileri düzeyde zeka geriliği saptanmıştır (17). OB hastaları, her hangi bir sınıflama sisteminde yer almamasına karşın, zeka geriliğinin olması ve olmamasına göre iki alt gruba ayrılır. Eğer Zeka Bölümü (ZB) puanı 70'in altındaysa Düşük İşlevli Otistik Bozukluk (DİOB - Low Functioning Autistic Disorder), 70 ve üstündeyse Yüksek İşlevli Otistik Bozukluk (YİOB - High Functioning Autistic Disorder) olarak adlandırılır. Başka bir ifadeyle olguların %70'i DİOB, %30'u ise YİOB grubundadır. DİOB ile YİOB temel belirtiler açısından benzerlikler gösterse de, ilk grupta sosyal alanda bozulma daha ağır, sorun oluşturan davranışlar daha fazladır (kişilere dokunma ve onları koklama, stereotipler, kendine zarar verme gibi) ve klinik seyir daha kötüdür (6, 19).

Tablo 1: DSM-IV Otistik Bozukluk Tanı Ölçütleri (1)

A. En az ikisi 1. maddeden ve birer tanesi 2. ve 3. maddelerden olmak üzere 1. , 2. ve 3. maddelerden toplam 6 veya daha fazla belirtinin bulunması:

1. Aşağıdakilerden an az ikisinin varlığı ile kendini gösteren toplumsal etkileşimde nitel bozulma:

- Toplumsal etkileşimi sağlamak için yapılan el-kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi birçok sözel olmayan davranışta belirgin bozulmanın olması
- Yaşlarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememe
- Diğer insanlarla eğlenme, ilgi ve başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örn. ilgilendiği nesnelere göstermeme, getirmeme, belirtmeme)
- Toplumsal veya duygusal karşılıklar vermeme.

2. Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile belirlenen iletişimde nitel bozulma:

- Konuşulan dilin gelişiminde gecikme ya da dilin hiç gelişmemiş olması (el, kol veya yüz hareketleri gibi diğer iletişim yollarını bunun yerine koyma girişimi eşlik etmemekte)
- Konuşması yeterli olanlarda, başkalarıyla söyleşiyi başlatma veya sürdürmede belirgin bir bozukluğun olması
- Basmakalıp, yineleyici ya da özel bir dil kullanma
- Gelişim düzeyine uygun çeşitli imgesel veya toplumsal taklitlere dayalı oyunları kendiliğinden oynamama.

3. Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, yineleyici (stereotipik) örüntülerin olması:

- İlgilenme düzeyi ya da odaklanma açısından anormal, bir veya daha fazla sınırlı, tekrarlayıcı ilgi örüntüsü içinde kapanıp kalma
- Özgül, işlevsel olmayan gündelik işlere veya törensel davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma
- Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örn. parmak şıklatma, el çırpma veya vurma, karmaşık vücut hareketleri)
- Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma.

B. Aşağıdaki alanlardan en az birinde, 3 yaşından önce gecikmelerin veya olağandışı bir işlevselliğin olması; 1) Toplumsal etkileşim, 2) Toplumsal iletişimde kullanılan dil veya 3) Sembolik ya da imgesel oyun

C. Bu belirtiler Rett Bozukluğu veya Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu ile daha iyi açıklanamaz.

2.Asperger Bozukluğu

AS sosyal etkileşimde zorluklar (tek yönlü sosyal ilişki, empati yoksunluğu, arkadaşlık geliştirmede zorluklar, monoton konuşma) ve sınırlı, stereotipik ilgi ve etkinliklerle tanımlanan otizm spektrum bozukluklarından biridir. AS diğer OSB'lerden bilişsel gelişim, dil ve öz bakım becerilerinde gecikme olmaması ile ayrılır (6, 19). Her ne kadar standart tanı ölçütleri arasında belirtilmemişse de motor sakarlık ve atipik dil kullanımına sıklıkla rastlanır (20). Dar kapsamlı bir konuyla yoğun ilgilenme, tek yönlü laf kalabalığı, sınırlı prozodi ve tonlama, ve motor sakarlık bu durumda tipik olarak rastlanır ancak tanı için gerekli değildir (21).

Asperger Sendromunun adı Avusturyalı çocuk doktoru Hans Asperger'den gelmektedir. Asperger, 1944 yılında, tedavi için gelen sözel olmayan iletişim becerileri olmayan, yaşlılarıyla empati kuramayan ve fiziksel olarak sakar olan çocukları tanımlamıştır (22,23). Elli yıl sonra ICD-10 ve DSM-IV'te (Tablo 2) Asperger Bozukluğu olarak tanınmıştır (24, 25). Fakat bu tanı kriterleri hakkında eleştiriler son zamanlarda artış göstermekte ve bir sonraki DSM sınıflandırma sisteminde değişiklikler beklenmektedir (26, 27, 28).

Araştırmacılar son zamanlarda AS'nin iyileştirilmesi gereken bir hastalık ve normalden bir sapma olduğu görüşünden uzaklaşıp, bunun bir özürülükten çok farklılık olduğu görüşüne yatkınlık göstermektedirler (29). AS'nin birçok yönü hakkında cevaplanmamış sorular bulunmaktadır; örneğin AS ile YİOB arasındaki ayrım şüphelidir (20) ve örtüşen yönleri tam olarak belli değildir (30,31), kısmen buna bağlı olarak AS'nin prevalansı kesin olarak belirlenememiştir.

Fombonne, çalışmasında AS prevalansının yaklaşık 4.5/10000 olduğunu öne sürmüştür(32). 2003 yılında yapılan bir değerlendirme çalışmasında prevalans oranlarının 0.03-4.84/1000 arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür. Otizmin Asperger sendromuna oranı da 1.5:1 ile 16:1 arasında değişmektedir (33). Ortalama 5:1 oranı ile otizmin oldukça konservatif bir prevalans oranı olan 13/10000 birleştirince (7), endirekt olarak AS'in prevalansının 2.6/10000 olduğu ortaya çıkar (33). Tahminlerde görülen varyans, Asperger Bozukluğu tanısında kullanılan farklı tanı ölçütleri nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Erkek çocuklar kız çocuklara nazaran AS olma konusunda daha yüksek bir risk taşımakta ve Gillberg ve Gillberg ölçütleri kullanıldığında cinsiyet oranı E/K 1.6:1 ile 4:1 arasında değişmektedir (34).

Tablo 2: DSM-IV Asperger Sendromu Tanı Ölçütleri

A. Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren toplumsal etkileşimde nitel bozulma:

1. Toplumsal etkileşim sağlamak için yapılan el kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi birçok sözel olmayan davranışta belirgin bir bozulmanın olması.
2. Yaşlılarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememesi.
3. Diğer insanlarla eğlenme, ilgilerini ya da başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örn. ilgilendiği nesnelere göstermemesi, getirmemesi ya da belirtmemesi)
4. Toplumsal ya da duygusal karşılıklar vermemesi

B. Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, basmakalıp ve yineleyici davranış örüntülerinin olması:

1. İlgi düzeyi ya da üzerinde odaklanma açısından olağandışı, bir ya da birden fazla basmakalıp ve sınırlı ilgi örüntüsü çerçevesinde kapanıp kalma
2. Özgül, işlevsel olmayan, alışageldiği üzere yapılan gündelik işlere ya da törensel davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma
3. Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örn. parmak şıklatma, el çırpma ya da burma ya da karmaşık tüm vücut hareketleri)
4. Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma

C. Bu bozukluk, toplumsal, mesleki alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında klinik olarak belirgin bir sıkıntıya neden olur.

D. Dil gelişiminde klinik açıdan önemli genel bir gecikme yoktur (örn. 2 yaşına gelindiğinde tek tek sözcükler, 3 yaşına gelindiğinde iletişim kurmaya yönelik cümleler kullanılmaktadır).

E. Bilişsel gelişimde ya da yaşına uygun kendi kendine yetme becerilerinin gelişiminde, uyumsal davranışta (toplumsal etkileşim dışında) ve çocuklukta çevreyle ilgilenme konusunda klinik açıdan belirgin bir gecikme yoktur.

F. Başka özgül bir Yaygın Gelişimsel Bozukluk ya da Şizofreni için Tanı Ölçütleri karşılanmamaktadır.

3. Atipik Otizm

Tanı, otizm ile ilişkili özelliklerin olduğu ancak belirtilerin OB ölçütlerini karşılamadığı durumlarda konur. Belirtilerin eşik altı seyrettiği (6 ölçütten daha azının varlığı), üç belirti grubundan (toplumsal etkileşim ve sözel ifadeye belirgin bozukluğa ve basmakalıp davranış ve sınırlı ilgi alanı) birinin bulunmadığı veya belirtilerin 3 yaştan önce başlamadığı durumlarda, olgular Başka Türü Adlandırılmayan-Yaygın Gelişimsel Bozukluk (BTA-YGB), diğer ismi ile Atipik Otizm (AO) tanısını alır (6, 19, 24).

AO anlamlı bir şekilde heterojen bir bozukluk olup özel alt grupların oluşturulması için çeşitli denemeler yapılmıştır; örneğin, daha fazla dikkat sorunları olan bireyler (35), veya duygusal belirtilerin karmaşık profilleri ile ilişkili sosyal problemleri olan bireyler (36). AO olan bireyler, alışılmadık duyarlılık ve atipik duygusal tepkiler (OB’de görüldüğü gibi) sergiler fakat daha iyi düzeyde bilişsel ve dil becerilerine sahiptirler. DSM-IV saha denemesinde bazı klinisyenler AS ile AO kavramlarını eşit tutmaya çalışmışlardır fakat AS ile AO arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır; örneğin AS olanlarda daha şiddetli sosyal zorlukların olması gibi (37).

Atipik Otizm OSB içinde en geniş grubu oluşturur (38,39). Aynı zamanda, Atipik Otizm bu grupta en iyi prognoza sahip olan bozukluktur (40). BTA-YGB için DSM-IV tanı kriterleri Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3: DSM-IV Başka Türü Adlandırılmayan-Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanı Ölçütleri

- | |
|--|
| <p>A. Karşılıklı toplumsal etkileşimde veya sözel yada sözel olmayan iletişim becerilerinde bozulma.</p> <p>B. Davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, yineleyici (stereotipik) örüntülerin olması</p> <p>C. Otistik Bozukluk için tanı kriterlerin karşılanmaması (geç başlangıç yaşı, atipik ve/veya eşik altı semptomatoloji).</p> |
|--|

4. Tanımlama ve Tarihçe

Yunanca ‘ben’ anlamına gelen ‘autos’ kelimesinden köken alan ‘otizm’ terimi, ilk defa Bleuler (1911) tarafından, şizofreninin temel belirtilerinden biri olarak gözlemlendiği egosantrik – ben merkezci düşünmeyi tanımlamak için kullanılmıştır (16). 1943’de Leo Kanner “Autistic disturbances of affective contact” adlı ünlü makalesinde, diğer insanlara karşı belirgin ilgisizlikleri olan 11 çocuğun klinik özelliklerini detaylı olarak tarif etmiş, bu çocuklarda alışılmadık davranış özellikleri ile değişikliğe direnç ve dil işlevlerinde bozukluk olduğunu anlatmıştır. Bu tabloyu ‘erken bebeklik otizmi – early infantil autism’ olarak adlandıran Kanner, otizmi ‘aşırı yalnızlık’ anlamında kullanmıştır (41).

Kanner ve Eisenberg (1956) ‘erken bebeklik otizmi’ için tanı ölçütleri geliştirmiş, davranışsal iki özelliğin tanı için gerekli ve yeterli olduğunu belirtmişlerdir:

- 1) Diğerlerinin farkında olmama ve uzak durma ve
- 2) Rutinlerindeki değişikliğe karşı aşırı direnç. Ayrıca bu belirtilerin en geç 24. ayda olması gerektiğini ifade etmişlerdir (42). Rutter (1978) ise, ‘çocukluk çağı otizmi – childhood autism’ olarak isimlendirdiği durum için 4 temel özellikten söz etmiştir:

- 1) Sosyal gelişimde bozulma,
- 2) Dil gelişimde gecikme ve sapma,
- 3) Aynılıkta ısrar ve
- 4) Belirtilerin 30. aydan önce ortaya çıkması (43).

Wing ve Gould (1979) tanımlamayı genişleterek Otistik Spektrum Bozuklukları ifadesini kullanmış, üç temel alanda yer alan belirtilerin her birinin değişen şiddette ve birçok farklı şekillerde ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir. Örneğin, sosyal alanda bozulmanın sadece Kanner’in tarif ettiği ‘uzak durma’ şeklinde değil, ‘pasiflik’ veya ‘aktif ancak uygunsuz’ ile de olabileceğini ifade etmiş ve buna göre de üç alt grup önermiştir;

- 1) Uzak (aloof), 2) Pasif (passive) ve 3) Aktif fakat tuhaf (active but odd) (7).

Otizm, uluslararası sınıflandırma sistemlerinde ilk olarak ICD-8’de (International Classification of Diseases – 8th edition) (1967), ancak şizofreninin alt gruplarından biri olarak yer almıştır. DSM sistemine ise ilk 1980 yılında girmiş, DSM-III içinde ‘Yaygın Gelişimsel Bozukluklar’ başlığı altında ‘Erken Bebeklik Otizmi’, ‘Çocukluk Başlangıçlı Yaygın Gelişimsel Bozukluk’ ve ‘Atipik Yaygın Gelişimsel Bozukluk’ şeklinde sınıflanmıştır (44). Bu sınıflamada Erken Bebeklik Otizmi ile Çocukluk Başlangıçlı Yaygın Gelişimsel Bozukluk birbirinden, belirtilerin 30 aydan önce ya da sonra başlamasıyla ayrılmıştır.

DSM-III-R'de (1987) Yaygın Gelişimsel Bozukluk altında iki ayrı grup yer almıştır; Otistik Bozukluk ve Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk. DSM-III-R'ye göre Otistik Bozukluk tanısı için üç kategoriye (sosyal ilişkide bozukluk, iletişim alanında bozukluk, kısıtlı aktivite örüntüsü) ait 16 belirtiden 8 tanesinin karşılanması gerektiği belirtilmiştir (45).

DSM-III-R, başlangıç yaşının esas tanı ölçütü olmaktan çıkarılması ve daha geniş içeriği sebebiyle yine yoğun eleştirilere maruz kalmıştır. DSM-IV' de (1994) ise Yaygın Gelişimsel Bozukluk beş alt gruba ayrılmıştır; Otistik Bozukluk, Asperger Sendromu, Rett Sendromu, Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu ve Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk (1). Otistik Bozukluk ICD-10'da Yaygın Gelişimsel Bozukluklar (YGB) başlığı altında sınıflanmış ve DSM-IV' dekine benzer şekilde tanımlanmıştır (25).

5. Etyopatogenez

Kanner otizmin kalıtsal bir bozukluk olduğunu belirtmiş, 1950'lerde ise anormal ebeveynliğe bir tepki olarak ortaya çıktığı iddia edilmiştir. 1960'ların son dönemlerinde otizmin biyolojik temeli daha fazla kabul görmeye başlamış, tıbbi bir hastalık veya obstetrik sorunlardan kaynaklanan beyin hasarı sonucu geliştiği düşünülmüştür. Ancak son 20 yıldır, genetik faktörlerin yanı sıra karmaşık biyolojik ve psikolojik işlevlerin etkileri daha fazla önem kazanmaya başlamıştır (6, 16, 19). Yapılan çalışmaların önemli bir kısmı sadece Klasik Otizm'i, bazıları ise üç grubu (OB, AS, AO) içermektedir. Aşağıdaki açıklamalar sıklıkla Otizm Spektrum Bozukluklarını (OSB) kapsamaktadır.

a. Genetik Faktörler:

Otizmin etiolojisinde genetik faktörlerin önemli rol oynadığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır (50). Otistik spektrumdaki bir çocuğun kardeşinin de etkilenmiş olma olasılığı %2-6 iken, toplumdaki risk oranı %0,1-0,2 arasındadır (6, 19). Bu oranlar da normal popülasyona göre 50-100 kat daha fazla artmış riski ifade etmektedir (16). İkiz çalışmalarında ise konkordans oranı, monozigot ikizlerde %36-96 arasında, dizigot ikizlerde ise %0-24 arasında bulunmuştur (46, 47). Birden fazla bireyin etkilendiği ailelerle yapılan genom taramaları, en az 10 genin karşılıklı etkileşimini göstermiştir. Otizmle ilişkili olduğu düşünülen genler 2, 7, 13, 15, 16 ve 19. kromozomlar üzerinde yer almaktadır (47,48).

2008 yılında, ortak soyağacı olan ebeveynlerin ailelerinde yapılan bir homozigosite kodlama çalışmasında nöronal aktivitenin etkilediği genlerin ekspresyonunda kusurlu ayarlanmanın görünüşte farklı otizm mutasyonlarının ortak bir mekanizması olabileceği saptanmıştır. Neurologin 3 ve 4: NLGN3 - NLGN4/Neurexin: NRXN1 - CNTN3/

Protocadherin 10: PCDH10 (nöronal hücre yapışma molekülleri); Na⁺/H⁺ Exchanger 9: NHE9 (endosomal alışveriş ve protein devir hızını ayarlayan molekül); ve Deleted in Autism1: DIA1 veya c3orf58 (protein yapımında önemli role sahip golgi kompleksinde lokalize olan bir molekül kodlayan bir gen) gibi genlerin kusurlu ekspresyonu tespit edilmiştir (49). HLA bölgesi genlerinin araştırıldığı çalışmada HLA -B44, -B57, -DR4, -DR14 ile otizm arasında ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (187, 188).

b. Nöroanatomik Faktörler:

OSB’de sosyal, dil ve davranış sorunlarının varlığı, farklı ve geniş çaplı nöronal sistemlerin etkilendiğini düşündürmektedir. Nöropatolojik çalışmalarda beyin korteksi, hipokampus, amigdala, mamiller cisimcik, mediyal septal çekirdek ve anterior singulatta gelişimsel anormallikler bildirilmiştir (16, 19). Bu bölgelerde birim başına düşen hücre sayısının arttığı, hücrelerin daha küçük olduğu ve dentritik dallanmaların azaldığı görülmüştür (50, 51). Etkilenen bölgeler çoğunlukla limbik sisteme ait yapılardır. Limbik sistem, özellikle de amigdala, sosyal ve duygusal işlevlerle ilişkili nöronal sistemin merkezidir. Bir hipoteze göre, otizm amigdala – korteks döngüsünün anormalliklerinden kaynaklanmaktadır (52).

Yapılan Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG) çalışmalarında, tüm beynin toplam boyutunda artma (16) (en fazla oksipital, temporal ve pariyetal loblarda olurken frontal lobda bir farklılıktan söz edilmemektedir), sağ anterior singulat girus boyutunda azalma, kaudat nukleus hacminde artma, korpus kallosumun ön, gövde ve arka bölgelerinde ise azalma gösterilmiştir. Fonksiyonel MRG çalışmalarında ise yüzü algılama görevleri sırasında, temporal lobun ventral yüzündeki fuziform girus bölgesinde aktivasyon azalması gösterilmiş, bu bulgunun sosyal alandaki bozukluk ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca sosyal ve duygusal yargı ile ilgili görevler sırasında amigdalada aktivasyon azalması bildirilmiştir (53,54).

c. Nörofizyolojik Faktörler:

OSB olan çocuklarda epileptik nöbetlerin oranı %4–32 olarak belirtilmiş ve genel topluma göre (%0,4–0,6) önemli derecede yüksek bildirilmiştir (6, 19, 50). Epilepsi nöbeti olmayan otistik çocukların % 11’inde ise elektroansefalografide (EEG) subklinik epilepsiyi gösteren epileptiform boşalmaların olduğu bildirilmektedir. Nöbetlerin başlangıcı en sık erken çocukluk ve erken ergenlik dönemlerindedir (55). Otizme özgü olmamakla birlikte, olguların %10-83’ünde EEG anormallikleri gösterilmiş ve en sık görülen anormallikler yaygın ya da fokal diken veya yavaş ve paroksizmal diken ve dalga aktivitesidir (16). Nöbetleri olanlarda

daha düşük ZB olduğu, EEG anormalliğinin ise kötü gidişle ilişkili olduğu bildirilmektedir (52,56).

d. Diğer Tıbbi Durumlar ile Birliktelik:

OSB’de bazı biyolojik ve nörolojik bozukluklarla çok daha sık bir arada bulunduğu gösterilmiştir (16, 19). Bunlar arasında konjenital rubella, tüberoz skleroz, frajil X sendromu ve fenilketonüri en sık olanlardır. Diğer genetik sendromların (Angelman Sendromu, Prader-Willi Sendromu, Williams Sendromu, 22q delesyon sendromu, Sotos Sendromu, Moebius Sendromu), nörokütan hastalıkların (nörofibromatozis, Cornelia de Lange, İto’nun hipomelanozu), lipidozlar ve diğer dejeneratif hastalıkların (infantil nöronal seroid lipofusinoz), metabolik hastalıkların ve çeşitli MSS enfeksiyonlarının (herpes simplex virus, sitomegalovirus, varisella zoster virus) da OSB ile ilişkisi gösterilmiştir (57,58). Otizmle tanı konulabilir tıbbi durumların ilişkisi sıklıkla bildirilmiş olsa da, olguların ancak küçük bir kısmında (%10) bu hastalıklar klinik tabloya eşlik eder (59, 60).

e. Doğum Öncesindeki, Sırasındaki ve Sonrasındaki Faktörler:

Gebelik ve doğuma ait bazı problemler; ileri anne yaşı, gebelikte kanama, travma, ilaç (talidomit, valproat) kullanımı, viral enfeksiyon, kısa gebelik süresi, düşük doğum tartısı, postmatürite, anormal geliş şekilleri, mekonyum aspirasyonu ile yenidoğan döneminde görülebilen bazı sorunların; düşük Apgar skoru, ağlamada gecikme, apne, solunumsal distress sendromu, hiperbilirubinemi gibi otistik belirtileri olan çocuklarda daha sık olduğu belirtilmiştir (50). Günümüzde bu sayılan risk etmenlerin otizme özgül olmadığı ve öngörücü olarak da kullanılamayacağı kabul görmüş bir durumdur (61,62).

f. Biyokimyasal Faktörler:

OSB olan bireylerin %25 – 33’ünde, kandaki serotonin (5 – HT) düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir. Ancak bu durum OSB için özgül değildir (6). Serotonin beyin gelişiminde trofik etkisi olduğu, serotonin sisteminde bozulmaların Merkezi Sinir Sistemi (MSS) nöronlarının olgunlaşmasında (nöronal farklılaşma, nöroblast bölünmesi, hücre göçü, sinaps oluşumu gibi) bozulmaya neden olabileceği öne sürülmüştür (6,19). Ayrıca Seçici Serotonin Gerilim İnhibitörlerinin (SSGİ) stereotipik davranışları azalttığı ve sosyal etkileşimi arttırdığı bildirilmektedir (16).

Otizimde dopamin metabolizmasında da bozukluğun olduğu bildirilmektedir. Beyinde artmış dopaminerjik aktivite, OSB’de görülen aşırı hareketlilik ve stereotipler ile

ilişkilendirilmiştir (38). Dopaminin başlıca metaboliti olan homovalinik asitin (HVA) beyin omurilik sıvısındaki (BOS) yüksekliğinin, artmış içe çekilme ve stereotipik hareketler ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu durum, dopamin düzeyini arttıran ilaçların (metilfenidat) otistik çocuklarda davranışsal sorunları arttırdığına ilişkin genel gözlem ile uyumludur (16). Ayrıca BOS'daki 5-hidroksi-indolasetik asit (5-HIAA; serotonin metaboliti) düzeyinin HVA düzeyine oranının artmasıyla belirti şiddetinde azalma gösterilmiştir (50). OSB'de beta-endorfinler de dahil olmak üzere beyin opiyat peptitlerinin aşırı salgılanmasının önemli olabileceği düşünülmüştür. Ancak otistik bireylerde opiyat antagonisti olan naltrekson ile yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir (19).

Yakın zamanda ülkemizde yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonunun kontrollere göre otistik çocuklarda daha fazla görüldüğü ve lipid peroksidasyonunun oksidatif stresi doğruladığı bildirilmiştir (189). Ülkemizde yapılan otizm ve oksidatif strese ilişkin çalışmalarda otistik çocuklarda kontrollere göre antioksidan enzim aktivitesi, lipid preoksidasyon ürünleri ve NO seviyelerinde anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Patogenezde NO'nun muhtemel rolü olduğunun bir göstergesi olan total nitrat seviyesi dikkate değer biçimde yüksek bulunmuştur. NO seviyesindeki değişikliklerin otizm için anlamlı olabileceğine dair fikirler ortaya atılmıştır. Otizmde kayda değer şekilde artış gösteren nitrit seviyeleri patogenezde NO'nun olası bir rolü olduğunun göstergesidir. Oksidatif hasarlanmaya karşı beynin hassas oluşu da yine NO'nun otizm nöropatofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Söğüt ve ark. yaptığı bir çalışmada OSB tanısı alan çocuklar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında SOD düzeyinde iki grup arasında anlamlı fark yokken NO düzeyi OSB tanılı hasta grubunda yüksek bulunmuştur ve korelasyon analizinde NO ve SOD arasında negatif korelasyon saptanmıştır (190). Zoroglu ve ekibi otistik çocukların plazma nitrat ve nitrit seviyelerini kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (189). Zoroglu ve ekibinin otistik hastalarla yaptığı bir diğer çalışmada serum nitrit ve AM seviyelerinin otistik çocuklarda arttığı, total nitrit seviyelerinin merkezi sinir sistemindeki NO aktivitesinin bir göstergesi olabileceği ve ayrıca AM'nin otizm patogenezinde rol alabileceği belirtilmiştir. (191) Bunun yanında NO ile lipid peroksidasyon ürünleri arasındaki korelasyon, NO ve ardından oluşan diğer moleküllerinin (ONOO gibi) otizm patogenezindeki muhtemel rollerini desteklemekte olduğunu göstermektedir (190, 191).

g. İmmünolojik Faktörler:

OB ile ilgili yapılmış immünolojik çalışmalar nadirdir. Otistik çocuklarda T hücrelerinin aracılık ettiği immünitede eksiklikler ve T lenfositlerin mitojenlere olan proliferatif cevapında düşüklük bildirilmiştir (19,50). Ayrıca otistik grupta total lenfosit, total T hücresi, total CD4+ ve Tsi CD4+ sayılarının önemli derecede düşük; buna karşın Th CD4+, B hücresi ve NK hücresi sayılarının normal sınırlar içinde olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (6,16).

B. OTİZM VE GENETİK

OSB'nun tüm etnik gruplarda ve tüm sosyoekonomik gruplarda görüldüğü belirtilmiştir. Erkeklerde kızlara oranla 4 kat daha fazla görür. (11,15) Diğer tüm kompleks hastalıklar gibi otizmin de genetik kaynaklı olduğu görüşü 1980'lerden önce belirtilmemiştir. Fakat zamanla yapılan epidemiyolojik ve genetik çalışmaların artışı OSB ve genetik ilişkisini kuvvetlendirmiştir. (63)

OSB tanısı almış bireyin ailesinin diğer üyelerinde OSB görülme sıklığının populasyon normallerinden fazla olduğu klasik aile çalışmalarıyla gösterilmiştir. Kardeşlerde OSB tanısı varsa bir sonraki çocukta OSB olma riskinin diğer normal populasyona oranla 25 kat arttığı belirtilmiştir.(64)

Diğer kompleks kalıtım gösteren hastalıklar gibi OSB'nun da hem genetik hem de çevresel unsurların sonucu ortaya çıkabileceği ikiz ve evlat edinme çalışmaları ile açıklanmış olup kalıtılabilirliğinin de yüksek olduğu bildirilmiştir. Bağımsız yapılan ikiz çalışmalarında monozigotlarda otizmin konkordans oranı %60-90 iken dizigotlarda %0-24 oranı şeklinde keskin bir azalma tespit edilmiştir.(65)

Bunların yanında genetik geçişi destekleyecek bir diğer bulgu da OSB tanılı çocukların %10'unun Frajil X, Tuberoskleroz gibi genetik nörolojik ve metabolik hastalıklar ile birliktelik göstermesidir. (66) Fragil X yaklaşık %1, tuberoskleroz yaklaşık %1, nörofibromatozis %1'den azdır (67). Ayrıca otistik bireylerde Prader Willi ve Angelman Sendromunda 15q11-q13 dublikasyonu gibi (maternal allel) sitogenetik anomaliler de görülmektedir ki yapılan çalışmalarda bu oran %1-3 saptanmıştır. Eşlik eden diğer genetik hastalıklar trizomi 21, turner sendromu, 47 XXY, 47XYY'dir. (68,69) Tüm bunlar sonucunda otizmin genetik temelli olabileceği vurgulanmış ve bu alanda birçok genetik çalışma yapılmıştır.

Genel olarak OSB genetik çalışmalarında kullanılan yöntemler şu şekildedir:

1. Genetik çalışmalarda kullanılan yöntemler

Sitogenetik analiz; (cytogenetic analysis) klasik yöntemdir, kromozomal anomalilerin çocukluk çağı hastalıklarına katkıda bulunup bulunmadığını incelemeye yardımcı olur. (70) Ancak bu tür analizler büyük çapta kromozomal anomalilerini test etmek için kullanılmaktadır. Gen düzeyindeki farklılıklar bu tür analizler ile görüntülenememektedir.

Haplotip ve bağlantı analizi; (Linkage ve association) sitogenetikten farklı olarak daha moleküler DNA seviyesindeki değişiklikleri, etkilenmiş bireyleri içeren ailelerde veya popülasyon temelinde irdelenmek için kullanılır. Parametrik ve non parametrik şeklinde ikiye ayrılır. Parametrik analizde hasta allellerin sıklığı veya her genotip için penetrans gibi modeller olması gerekir. Parametrik analiz genellikle tek gen bozukluklarında (single gen disorder) kullanılırken non parametrik analiz için modele gerek yoktur ve rastgele değildir, spesifik bir lokasyonda segregasyon olur. Otizm çalışmalarında genellikle non parametrik metod kullanılır.(71)

Kopya sayısı varyasyon analizi; (Copy number variation, CNV) yeni bir yöntemdir, DNA parçalarında oluşan insersiyon ve delesyonları analiz eder.(72)

Otizimde Genom Haplotip (linkage) Analizleri: 2q, 5, 7q, 15q ve 16p yi içeren birçok kromozomal bölgede anlamlı replikasyonlar bulunmuştur. (63) Her ne kadar 2q kromozomunun haplotipi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve anlamlı kanıtlar saptanmışsa da (73,74) özel aday gen için 2q31-q33 bölgesi analiz edilmiş fakat sonuç negatif çıkmıştır. (75)

Bunun yanında 5. kromozom ile ilgili yapılan üç çalışmada Philippi ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada (76) otizmle ilgili güçlü ilişkiler saptanırken, geniş genom analizleri kullanılan diğer bir çalışmada 5p14.1 ve 5q15 bölgeleri anlamlı derecede otizmle ilişkili bulunmuştur. 2009 yılında, yarım milyon geniş genom kapsamlı tek nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms: SNP) kullanarak, 1031 multipleks otizm aileleri grubunda (1553 etkilenmiş birey) yapılan bağlantı ve ilişki eşleme çalışmasında 5p15 kromozomunda otizm ile ilişkisi anlamlı olan bir SNP (SEMA5A ile TAS2R1 arasında) bulunmuş ve otistik bireylerin beyinlerinde SEMA5A'nın ekspresyonunun azalmış olduğu ve böylece otizm için duyarlı bir gen olduğu tespit edilmiştir (77).

2. Aday Genler

a. Reelin

Extrasetüler matriks glikoproteini olup nöronal göç ve bağlantıdan sorumludur. 1980 yıllarında yapılan çalışmalarda reelinin embriyonel dönemde nöronal hücrelerin oliver kompleksi, serebral korteks ve serebelluma konumlanmasında rol oynadığı saptanmıştır. (78,79) Reelin beyin gelişiminde ve aynı zamanda otizmde meydana gelen nöroanatomik anormalliklerde kritik öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda otizm tanılı kişilerde korteks, serebellum ve periferel kanda reelin düzeyleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur. (80) Ayrıca 2003 yılında yapılan bir çalışmada RELN geninin lokalize olduğu 7q22 bölgesi otizm için kritik bir bölge olarak tanımlanmıştır(81). Yapılan Birçok aile bazlı çalışmalarda otistiklerde RELN geninin polimorfik (GGC) formunun otistiklerde anlamlı olarak daha fazla olduğu, RELN allellerinin otistiklerde beklenenden daha fazla kalıtıldığı saptanırken (82,83,84) yine aile bazlı yapılan bazı çalışmalarda da anlamlı ilişki bulunamamıştır (85, 86, 87).

b. Human serotonin transporter gene (SCL6A4)

Bu gen 17q11.1-q12 kromozomuna lokalizedir (88). Otistiklerde kan serotonin düzeyinin yüksek oluşuna ve serotonin transporter inhibisyonu sonucu rutin ve rituellerin azalmasına dayanılarak aday gen olarak düşünülmüştür. (89,90) Yapılan birçok aile bazlı ve vaka kontrol çalışmalarında SLC6A4 polimorfizmi ile otizm arasında ilişki saptanırken (91, 92, 93, 94, 95) bazı çalışmalarda anlamlı sonuç bulunamamıştır (96, 97, 98, 99, 100, 101).

c. Gama aminobutrik asid reseptör gen (GABR)

GABA, inhibitör nörotransmitterlerin başlıcasıdır, GABA reseptörüne bağlanarak aktive olur. GABA reseptörünün 3 tane alt ünite geni (GABRB3 GABRA5 GABRG3) genomların birçok işlevinden sorumlu 15q11-q13 kromozomuna lokalizedir. (102) 15q11-q13 bölgesi daha önceleri OSB ile ilişkili bulunmuş ve yapılan birçok çalışmada OSB tanılı bireylerde duplikasyon saptandığı (103, 104, 105, 106) ve bu duplikasyonun otistik özellikleri geliştirdiği bildirilmiştir (107, 108). Birçok çalışmada GABRG3 (109), GABRB3 ve GABRA5 (110) genleri OSB ile ilişkilendirilirken yine bazı çalışmalarda be genler ve OSB arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (111, 112).

d. Nöroligin gen (NLGN)

OSB'da cinsiyet oranında bu kadar göze çarpan bir fark olması sebebiyle seks kromozumdaki genler daha fazla araştırılmıştır ve belki de Nöroligin geni en geniş en çok çalışılan genlerden biridir. 5 tane NLGN geni tanımlanmıştır lokalizasyonları şu şekildedir; 3q26(NLGN1), 17p13 (NLGN2), Xq13 (NLGN3), Xp22.3 (NLGN4) ve Yq11.2 (NLGN4Y).

Nöronal sinaps ve adezyonda görev almaktadırlar (113, 114). Yapılan birçok çalışmada NLGN ve otizmin kuvvetli bir ilişkisi olduğu saptanamamıştır. (115, 116, 117,118, 119)

e. Human oksitosin reseptör gen (OXTR):

Oksitosin, dokuz aminoasid peptitten oluşur ve hipotalamusta sentezlenir. Laktasyon ve uterin kontraksiyonların yanı sıra aynı zamanda merkezi sinir sisteminde nöromodulatör olarak görev yapmaktadır (120, 121). Hem hayvan deneylerinde hem de yapılan klinik çalışmalarda oksitosinin sosyal ve tekrarlayıcı davranışlarda rol oynadığı bildirilmiştir (122). Bu yüzden oksitosin sisteminin OSB patogeneze dahil olabileceği düşünülmüş ve ‘human oxytocin receptor’ (OXTR) geni OSB için aday gen olarak sunulmuştur. OXTR ve otizm ilişkisinin araştırıldığı aile bazlı ve toplum bazlı çalışmalarda OXTR geni farklı etnik gruplarda OSB açısından risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (123, 124, 125). Ayrıca Lerer ve ekibinin yaptığı bir çalışmada OXTR ile IQ ve adaptif davranış skorları ilişki bulunmuştur (123).

f. MET:

İnsan MET geni hepatosit büyüme faktörünün transmembran reseptör tirozin kinazını kodlar (126). Her ne kadar ilk olarak bir onkogen olarak tanımlanmış olsa da MET nöronal gelişimde ciddi bir rol oynar (126). MET sinyalinin bozulması kortekste anormal nöron migrasyonuna ve büyümesine ve ayrıca granül hücrelerinin proliferasyonuna sebep olur ki otistik beyinlerde de bu bulguların gözleendiği belirtilmiştir (127). Yapılan çalışmalar otizmle MET anlamlı ilişkisini desteklerken (128, 129) ; Campbell ve ekibinin yaptığı çalışmada MET geninin C alelinin otizmdeki davranışlar üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (130).

C.COX ve GENETİK

Prostaglandin(PG)H sentaz olarak da bilinen siklooksigenaz(COX) geniş bir aile olan araşidonik asit metabolitleri PG'ler, prostasiklin ve tromboksanların yani prostanoidlerin sentezindeki ilk ortak basamağı katalizler (131).Non steroid anti-inflamatuar ilaçların (NSAIDs) anti-inflamatuar özelliklerini, COX enzimatik aktivitesinin inhibisyonu ve bu yolla PG sentezinin engelleyerek kazandığının anlaşıldığı 1971 yılından bu yana, COX enzimi popüler hale gelmiştir (132). COX benzersiz bir enzimdir. Öncelikle enzim iki katalitik aktivite gösterir, birincisi bis-oksigenaz(siklooksigenaz) aktivitesiyle araşidonik asitten PGG₂ sentezi, ikincisi peroksidaz aktivitesiyle PGG₂den spesifik ürünlerin öncülü olan PGH₂ sentezidir. Her iki enzimatik aktivite ayrı ayrı çalışır ve COX molekülü üzerindeki enzimatik fonksiyonla ilişkideki alanlar ve eksternal faktörler her birini bağımsız olarak ayrı ayrı etkileyebilir (133). İkinci olarak siklooksijenaz aktivitesi sürerken COX er ya da geç inaktif enzimatik özellik sergileyecek bir şekil değişikliğine uğrar. Bu süreç “suisidal” inaktivasyon olarak bilinir ve hem in vitro hem de in vivo olarak prostanoidlerin sentezinin sınırlayıcı bir faktörüdür (134).

COX her iki enzimatik aktivitesiyle ilişkili bir hem grubu içeren homodimerden ibaret integral membran glikoproteinidir (133). Neredeyse bütün hücre tiplerinde yaygın olarak dağılmış olan ve fizyolojik cevaplara aracılık ettiği düşünülen esas isoform COX-1'den başka ikinci ve indüklenebilir bir isoform olan COX-2 1990'ların başında tanımlanmıştır (135). COX-2 çeşitli hücre tiplerinde growth faktörlere, sitokinlere ve proinflamatuar moleküllere cevap olarak hızlıca sentezlenen ve akut ve kronik inflammatuar hastalıklara cevaben sentezlenen prostanoidlerin yapımından sorumlu isoformdur.

COX-1 ve COX-2 insanlarda sırasıyla 9. ve 1. kromozomda lokalize olmuş iki ayrı gende kodlanır. COX-2 geni bir TATA box varlığıyla karakterizedir ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanabileceği birçok alanı barındıran ve ekspresyonunun neden kompleks olarak düzenlendiğini açıklayan bir promoter bölgeye sahiptir. Ayrıca çoğu hızlı eksprese edilen gende bulunan ve mRNA instabilite belirteci olarak görev aldığı ya da COX-2 ekspresyonunun post-transkripsiyonel kontrolünü sağladığı sanılan translasyon inhibitör elemanı olan translasyona uğramayan uzun bir 3' bölgesi bulunmaktadır. Aksine COX-1 geni promoter bölgesinde bir TATA box olmayan klasik bir “house-keeping” gen görüntüsü sergilemektedir.

İki isoform arasındaki önemli bir fark spesifik antikor üretilmesini sağlayan ve COX-1 de bulunmayan COX-2 C-terminal bölgesinde bulunan 18 aminoasit insersiyonudur (136). İnsanlarda ve sıçanlarda iki COX isoformunun doku dağılımları kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Midenin sitoproteksiyonu ve platelet agregasyonu gibi fizyolojik fonksiyonlarda da görüldüğü gibi dokuların çoğunda COX-1 esas olarak eksprese edilen tek isoformdur. Ancak beyin, testisler ve böbrek makula densa hücrelerinde hem COX-1 ve hem de COX-2 fizyolojik durumlarda eksprese edilmektedir (133). Sıçan beyinde serebral korteks ve hipokampüsün farklı alanlarına dağılmış farklı nöron popülasyonlarında COX-1 ve COX-2 immünoreaktivitesi vardır. Mezensefalon, pons ve medulla gibi diğer bölgelerde COX-1 immünoreaktivitesi hüküm sürmektedir (137,138). Benzer şekilde COX-1 ve COX-2 mRNA'ları insan beyininin çeşitli bölgelerinde mevcutken, özellikle hipokampüste belirgin olan isoform COX-2'dir (139,140).

COX-1 ve COX-2 aktivitesinin beyin patolojisi ve fizyolojisindeki nispi katkıları son zamanlarda sorgulanır olmuştur (141,142). Bir taraftan, COX-1'in beyin hastalıklarındaki aktivitesinin göz ardı edildiği iddia edilirken; diğer taraftan, zorunlu kanıtlar normal nöronal fonksiyon ve nörotoksitede COX-2nin özel bir rolünün olduğunu öne sürmektedir (131).

Son zamanlarda, COX-3 adı verilen üçüncü bir COX varyantı ve iki kısmi COX-1 proteini (PCOX-1 protein) köpek ve insan serebral korteks cDNA'larından tanımlanmıştır (143). COX-3 ve PCOX-1'lerden biri COX-1 geninin ürünleridir, ancak bunların mRNA'ları intron1'i de bulundurmaktadır. Her iki protein de dokuya spesifiktir ve en yüksek miktarda ekspresyon beyinde olur, kalp beyni takip eder. Beyinde yüksek miktarlarda serebral kortekste eksprese edilen COX-1 varyant geni toplam COX-1'in %5'i olarak hesaplanmaktadır. COX-1'in muadili gibi olan COX-3 akut inflamatuvar stimuluslarla indüklenmez (144). PCOX-1 değil ama COX-3 glikozilasyon bağımlı enzim aktivitesi sergiler ve asetaminofenin inhibitör aktivitesine özellikle hassastır. Böylece, birkaç dekat önce periferik dokulardaki zayıf COX inhibe etme gücüne karşın parasetamolün potent analjezik ve antipiretik özelliklerini açıklamaya çalışan hipotezlerin varlığıyla da COX-3'ün beyne özel COX izoformu olduğu söylenebilir (143). Bununla birlikte, COX-3'ün işlevsel rolü büyük ölçüde bilinmemektedir ve COX-3'ün beyindeki genel PG üretimine katkısını aydınlatmak için daha yoğun araştırma gereklidir.

Beyin hastalıklarında COX izoformlarının ve PG'lerin potansiyel rolü geçmiş yıllarda kapsamlı olarak gözden geçirilmiştir (145,147). PGE2'nin vasküler geçirgenlik ve lökosit ekstravazasyonu üzerine klasik pro-inflamatuvar rolüne rağmen; makrofaj ve mikrogliaların aktivasyon sürecini downregüle eder ve birçok bağışıklık fonksiyonlarını düzenler ve böylece

inflamatuvar süreç kendini sınırlar (146, 159). COX-2'nin over-ekspresyonu hipoksi, iskemi ve nöbetler gibi akut hastalıklardaki nörotoksisite ile ilişkilidir. Bununla birlikte COX-2'nin inflamatuvar ve nörodejeneratif beyin patolojilerinde oynadığı rolün yararlı mı olduğu ya da zararlı mı olduğu hala tartışmalıdır (131).

1. COX-2nin Beyindeki İşlevleri

Memeli beyinde normal fizyolojik koşullar altında belirli nöron topluluklarında COX-2 yapısal bir bileşen olarak eksprese edilir. Sıçan beyinde, COX-2 mRNA'sı ve immunoreaktivitesi dentat girus granüllü hücrelerinde, hipokampusta piramidal nöronlarda, piriform kortekste, neokorteks yüzeysel hücre tabakasında, amigdalada ve düşük seviyelerde striatum, talamus ve hipotalamusta tespit edildi (137,138). Daha kesin olarak kabul edilmelidir ki normal sinaptik aktivitenin dinamik olarak düzenlenmesi bu "yapısal" nöronal COX-2 ekspresyonuna bağlıdır ve COX-2 ekspresyonu iskemi ve nöbet sırasında hızlıca artar ve glukokortikoidler tarafından downregüle edilir (137). Doğal eksitatör sinaptik aktivitenin COX-2 ekspresyonuna bağımlılığı COX-2 immunoreaktivitesinin distal dendrit ve dendritik dikenlerdeki varlığı ve sinaptik sinyalizasyona katılması ve glutamaterjik eksitatuvar nöronlardaki özel lokalizasyonu ile desteklenir(145).

Sinaptik aktiviteye COX-2 katılımının da olduğu COX-2 ekspresyonunun gelişimsel profili tarafından daha da desteklendi. Sıçan beyinde, COX-2 ekspresyonu gelişimsel süreçleri izler ve kortikal gelişimin kritik dönemiyle de bu çakışır (148). Mental retardasyon, kortikal nöronların kusurlu gelişimi, dendritik dallanma anormallikleri ile ilişkili nörolojik bir bozukluk olan Rett sendromunda kortikal COX-2 immünreaktivitesinin laminer paterni bozulur ve böylece COX-2 pozitif nöronlarının sayıca azaldığı ve rasgele dağıldığı görülür (149).

Bazal ön beyin bölgelerindeki kolinerjik nöronlar post-natal birinci haftada seçici olarak destrükte edilen sıçanların erişkin çağda hipokampuslerinde azalmış COX-2 düzeyleri gösterilmişken, COX-1 düzeylerinde bu azalma gösterilemedi. Bu etkiye sosyal bellekteki yetersizliğin de eşlik etmesi öyle düşündürmektedir ki , hipokampal kolinerjik uyarımın erken kaybı hipokampal nöronlardaki COX-2 ekspresyonunu ve sinaptik aktivitede PG'lerin fonksiyonel rolünü etkileyebilmektedir (150).

Sinaptik plastisitede COX-2 varlığının dolaylı kanıtları son yıllarda in vivo ve in vitro sinaptik plastisite modellerinde COX inhibitörlerinin kullanımıyla elde edilmiştir. COX-1 seçici inhibitörleri değil ama COX-2 inhibitörlerinin, sistemik olarak uygulanan kısa süreli bir eğitimle öğrenilen Morris su labirenti (hipokampal-bağımlı öğrenme görevi) görevinde

sıçanların uzamsal belleklerini bozduğu gösterilmiştir (151). Benzer şekilde COX inhibitörleri ile intrakranial enjeksiyon yapılmış civcivlerde pasif kaçınma görevi için zayıflatılmış anımsama oluşmuştur (152). Buna ek olarak, çalışma öncesi hipokampus bölgesine spesifik bir COX-2 inhibitörü (selekoksib) infüzyonu yapılan erişkin sıçanlarda Morris su labirenti görevinin öğrenilememesi, sıçanlarda hipokampustaki COX-2 aktivitesininin hem bellek ve hem de uzaysal öğrenmenin her ikisi için de gerekli olduğunu düşündürmektedir (153). Bu bulgulara uygun olarak non-selektif bir COX inhibitörü ibuprofenin sistemik kullanımı ile su labirentini uzaysal-mekânsal öğrenmede ve sinaptik plastisitenin önemli bir modeli olan long-term potansiyalizasyonun (LTP) indüksiyonunda defisitler oluşmuştur (154). Davranışsal görevin veya elektrofizyolojik prosedürlerin 1 saat öncesinde uygulanan ibuprofen hipokampal olmayan görevleri veya bazal sinaptik iletimi etkilememiştir. Buna ek olarak, ilaç LTP ve uzaysal-mekansal öğrenme sonrasında görülen PGE2 ve beyin-kaynaklı büyüme faktörü (BDNF) düzeylerindeki artışı ortadan kaldırmıştır. İbuprofenin LTP ve uzaysal-mekansal öğrenme üzerindeki inhibitör etkisi geri döndürüldüğünde ortaya çıkan ve büyük olasılıkla BDNF düzeyindeki artış vasıtasıyla COX aktivitesinin sinaptik plastisitede ve BDNF ile ilişkili mekanizmalarla uzaysal-mekansal öğrenmede seçici bir rol oynadığı hipotezini desteklemektedir (154). Bu hipotez çerçevesinde PGE2 değil ama PGE2 COX-2 inhibitörü tarafından in vitro olarak hipokampal dentat granüllü nöronlarında indüklediği LTP supresyonunu tersine çevirmiştir (155). COX-1'den ziyade COX-2'nin enzimatik etkinliği sırasında ortaya çıkan PGE2 adrenerjik, noradrenerjik ve glutamaterjik nörotransmisyon yollarının düzenlenmesi, hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesi ile dentrit ve dikenlerinin şeklinin değiştirilmesi ve membran eksitabilitesinin düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla sinaptik plastisite yer alıyor olabilir (156). Ayrıca, bir COX-2 inhibitörü olan NS398 titrasyonuna cevaben neokortikal kan akışında artışın olmaması COX-2 türevli PG'lerin sinaptik plastisitede gerekli serebral kan akımını sağladıklarını düşündürmektedir. Ayrıca COX-2'den yoksun mutant farelerde hiperemik yanıt da bozulur (157).

Beyin gelişimi ve işlevlerinde COX-2'nin fizyolojik rolüne ilişkin kanıtlara rağmen, COX-2 knockout farelerin beyinde makro düzeyde hiçbir anatomik anormallik görülmemiştir. Bununla birlikte, bu farelerde gerekli davranışsal analizi engelleyen erken ve ilerleyici böbrek yetmezliği gelişmiştir (158). Buna ek olarak, COX-1 ve muhtemelen COX-3'ün önemli ölçüde kompensatuar etkileri tam olarak ekarte edilemez (131).

2. COX-2 ve Otizm

Birçok epidemiyolojik ikiz ve aile çalışmalarından elde edilen veriler kromozom anomalileri ve genetik polimorfizmin bir rol oynadığı ve birkaç genin birbiri ile etkileşiminin klinik fenotipini oluşturduğu düşünülen otizm spektrum bozukluklarının (ASD'ler) en kalıtsal kompleks hastalıklar arasında yer aldığı gerçeği hakkında bariz kanıtlar sunmaktadır (160). Bu yüzden, ASD'lerin kalıtımı epistasis ile multi-lokus model sergiler (161). Cox-2 ve nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklar arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Alzheimer hastalığı riskinin azalması ve hastalığın gelişiminde koruyucu bir rolü olduğuna ilişkin Cox-2 C allelinin (prostaglandin-endoperoxid sentaz 2; PTGS2) -765 promoter polimorfizmi ile ilişkili bazı çalışmalar bildirilmiştir (162). ASD'lerin COX-2 ile ilişkisine dolaylı olarak kanıt sağlayan üç yol vardır (166). İlk olası ilişki ASD'lerin bir varyantı olan Rett sendromunda, kortikal COX-2 immunoreaktivitesi laminar paterninin bozulması ve Cox-2 pozitif nöronların sayısının azalması ve rastgele dağılmasıdır (163). İkincisi, sinaptik plastisite ve sonraki öğrenme ve hafıza oluşumunda önemli bir model olan long-term potensiyalizasyonda Cox-2 bir rol oynuyor olabilir. Post-natal birinci haftasında bazal önbeyin kolinerjik nöronlarının selektif destrüksiyonuna maruz kalan sıçanların, erişkin hayatlarında hipokampal Cox-2 düzeylerinin azalması ve buna insanlarda ASD'lerde kritik bir defisit olan sosyal bellek bozukluğunun eşlik ettiğinin gösterilmesi bu kavramı ortaya çıkarmıştır (164). Üçüncüsü, ASD'lerin bazı formlarının düzensiz veya anormal bir immün yanıt ile ilgili olduğunu varsayan hipotezlerdir. Sitokinler ve diğer immün aktivasyon ürünlerinin nöronal yollar üzerindeki yaygın etkileri ve mood ve uyku gibi davranışları değiştirebiliyor olması, ASD'lerde Cox-2'nin bu anormal immün süreçler ile ilişkili olmasını mümkün kılmaktadır (165).

YÖNTEM VE GEREÇLER

İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına daha önce başvurmuş ve halen kliniğimizde takip edilen 2-18 yaş arası Otizm spektrum Bozukluğu tanısı konulmuş çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babaları çalışma grubu olarak alınmıştır. Katılım gönüllülük esasına dayalı olmuştur. Toplam 101 çocuğun araştırmaya katılması planlandı. Kanlar, İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalına ulaştırıldı. ve bu kanlardan DNA izole edildi. DNA izolasyonu için 10 cc'lik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alındı ve en geç bir gün içinde çalışılmak üzere oda ısısında saklandı. Alınan kan örneklerinden DNA izole edilerek COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G gen polimorfizmleri çalışıldı.

A. GEREÇLER

1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), dNTP seti (MBI Fermentas), Dietileter (Merck), EDTA (dihidrat)(Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merck K- 22035097), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodyum bisülfid (Sigma S- 9631), Sodyum doedasil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Potasyum dihidrojen fosfat (Merck A-741071), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taq polimeraz (Fermentas), Metaphor agaroz (FMC 50182), Xylene cyanol (Sigma X-4126), DNA marker (50-100 bp DNA size marker; MBI Fermentas), Proteinaz K (Merck), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767), Amonyum sulfat (Sigma A 5132), restriksiyon enzimleri (PvuII, BsaBI) , primer dizileri (MBI Fermentas)

2. Kullanılan Gereçler

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıticılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifuj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifuj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV

transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis).

3. Kullanılan Çözeltiler

a. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- **Eritrosit Parçalama Tamponu**

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat , 200 µl 0.5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre ddH₂O eklendi ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120 °C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra +40 °C 'de saklanmıştır.

- **0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)**

186.1 gram Etilen diamin tetra asetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı sodyum hidroksid çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

- **Molar Sodyum Klorür (NaCl)**

233.6 gram Sodyum klorür tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

- **Lokositleri Parçalama Tamponu**

25 mililitre 4 molar sodyum klorür ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre Etilen

diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktarilarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

- **1 Molar Tris tamponu (stok)**

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit ile yaklaşık 800 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

- **9,5 Molar Amonyum asetat**

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +40 °C 'de saklandı.

- **%10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)**

10 gr sodyum dodesil sülfat tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

- **Proteinaz K (20 mg/ml)**

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 militreye tamamlandı. -20 °C 'de saklandı.

b. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

- **Etidyum Bromür(10 mg/ml)**

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

- **Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)**

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 molarlık Etilen diamin tetra asetat, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom fenol blue, 200 miligram Xylen cyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

- **50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu**

242 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Uzerine 57,1 mililitre Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetat ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

- **5X Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu**

54 gram Tris baz ve 27,5 gram Borik asit tartılarak beher içine aktarıldı.Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanan çözelti oda ısısında saklandı.

B. YÖNTEMLER

1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmış ve en geç bir gün içinde çalışılmak üzere oda ısısında saklanmıştır. 10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4 °C'de 15 bekletildi. +4 °C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen suspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +40C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkubasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifuj sonrası supernatant kısmı temiz bir falkona aktarılarak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolu alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çöktürüldü. DNA örnekleri +4 °C'de muhafaza edildi.

2. DNA Saflık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbands Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü. 260 nm'de okunan absorbands / 280 nm'de okunan absorbands oranından DNA saflığı saptandı. O.D.260 / O.D.280 oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. Bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

3. DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbands 50 µg/ml (50ng/µl)' dir. Bu temel bilgiden faydalanarak DNA formulu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A ₂₆₀ x 50

Genomik DNA EDTA'lı kandan tuzla çöktürme yöntemiyle izole edildikten sonra COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G polimorfizimleri yapıldı. COX-2-765 G→C için forward: 5'-TATTATGAGGAGAATTACTCGC-3' ile reverse 5'-GCTAAGTTGCTCACAGAGAT-3' ve COX-2-1195A→G polimorfizimi için ise forward: 5'-CCCTGAGCACTACCCATGAT-3' ile reverse: 5'-GCCTTCATAGGAGATACTGG-3' primerleri kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapıldı. PCR ile çoğaltılan COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G DNA bölgeleri sırasıyla AclI ve HpyCH4IV restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesilen örnekler uygun size marker ile birlikte etidyum bromürle boyanan %3'lük agaroz jelde yürütüldükten sonra UV transilluminatör altında değerlendirildi.

4. COX-2-765 gen Polimorfizmini Saptamak için Kullanılacak PCR-RFLP Yöntemi

PCR karışımı; 500ng DNA, her bir primerden 10pmol/μl, 1.25mM dNTP, 10x PCR tamponu (100mM of Tris-HCl, 500 mM of KCl, 15 mM of MgCl₂) ve 0,5 ünite Taq DNA polimeraz'dan oluşacaktır. PCR amplifikasyon koşulları 94°C'de 3 dakika, 94°C'de 15sn, 58°C'de 30sn ve 72°C'de 1 dakika olmak üzere 33 siklus olarak yapılacak ve 72°C'de 7 dakika son uzama ile PCR tamamlanacaktır. Elde edilecek PCR ürünü restriksiyon enzimi ile kesilerek %2'lik agaroz jel elektroforezinde genotipler tanımlanacaktır.

Kullanılacak primer dizileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo:4 COX-2-765 geninin polimorfizminde kullanılacak primer diziler

Primerler (5'→ 3')	
İleri Primer	5'-TATTATGAGGAGAATTACTCGC -3'
Geri Primer	5'-GCTAAGTTGCTCACAGAGAT -3'

5. COX-2-1195 gen Polimorfizmini Saptamak için Kullanılacak PCR-RFLP Yöntemi

PCR karışımı; 500ng DNA, her bir primerden 10pmol/μl, 1.25mM dNTP, 10x PCR tamponu (100mM of Tris-HCl, 500 mM of KCl, 15 mM of MgCl₂) ve 0,5 ünite Taq DNA polimeraz'dan oluşacaktır. PCR amplifikasyon koşulları 94°C'de 3 dakika, 94°C'de 15sn, 58°C'de 30sn ve 72°C'de 1 dakika olmak üzere 33 siklus olarak yapılacak ve 72°C'de 7 dakika son uzama ile PCR tamamlanacaktır. Elde edilecek PCR ürünü restriksiyon enzimi ile kesilerek %2'lik agaroz jel elektroforezinde genotipler tanımlanacaktır.

Kullanılacak primer dizileri Tablo5'te verilmiştir.

Tablo:5 COX-2-1195 geninin polimorfizminde kullanılacak primer diziler

Primerler (5' → 3')	
İleri Primer	5'-CCCTGAGCACTACCCATGAT -3'
Geri Primer	5'-GCCTTCATAGGAGATACTGG -3'

6. Klinik teşhisler ve hasta grupları:

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na daha önce başvurmuş ve halen takip edilen, 2–18 yaş arasındaki OSB tanısı almış çocuk ve ergenler ve bu çocukların biyolojik anne ve babaları dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan olgular için işleme ölçütleri:

- 2 – 18 yaş arasında olmak
- DSM – IV tanı kriterlerine göre Otistik Bozukluk, Atipik Otizm (BTA-YGB) veya Asperger Bozukluğu tanısına sahip olmak
- Araştırmaya katılmayı kabul etmiş olmak
- Biyolojik anne ve babalarının hayatta olmaları

Çalışmanın dışlama ölçütü: Kronik sistemik hastalığı olan, akut ve kronik inflamatuvar hastalığı olan, doğumsal metabolik hastalığı olan ve ciddi kafa travması olan hastalar olarak belirlendi.

İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda OSB ön tanısı ile takip edilen hastaların dosyaları incelenmiş, işleme ölçütlerini karşılayan olgular görüşmeye alınmış. Görüşme sırasında ebeveynlere araştırmanın içeriği ve amacı açıklanmış, çalışmaya katılmayı kabul eden aileler değerlendirilmiştir. Ön görüşmede ebeveynlerden alınan bilgi ve olguların gözlemi ile DSM-IV Otizm Spektrum Bozuklukları Ölçütleri kullanılarak OSB tanısı doğrulanmış ve belirtilerin dağılımı saptanmıştır. Daha sonra derecelendirme için Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ) uygulanmış ve yapılan değerlendirmeler sonucunda bütün aileler çalışmaya alınmıştır (n:101).

a. Veri Formu:

Veri Formu ebeveynlerden ve tıbbi dosyadan alınan bilgilere göre araştırmacı tarafından hazırlanmış ve doldurulmuştur. Veri Formu üç b3l3mden oluşmaktadır:

- Sosyodemografik ve adres bilgileri (çocuğun adı, soyadı, doğum tarihi, cinsiyeti, iletişim bilgileri, kardeş sayısı, eğitim durumu, 3zel eğitim s3resi, anne ve babanın her birinin yaşı, mesleği ve eğitim durumu),
- Çocuğun psikon3romotor gelişimi (hamilelik, doğum şekli, motor gelişimi, dil gelişimi, ilk klinik başvurunun zamanı ve şikâyeti, aldığı diğer psikiyatrik tanılar, daha 3nceki ilaç kullanımları, başvuru sırasındaki ilaç kullanımı)
- Eşlik eden tıbbi durumlar, 3zgeçmiş, soy geçmiş bilgileri, tıbbi dosyalardan edinilen tetkik sonuçlarına dair bilgiler (epilepsi, EEG, MRG, ZG, işitme testi, metabolik inceleme)

b. Çocukluk Otizmi Değerlendirme 3lçeği (ÇOD3):

Çocukluk Otizmi Değerlendirme 3lçeği otizm tanısında ve otistik bozukluğu olan çocuğun diğer gelişimsel bozukluğu olan çocuklardan ayırdedilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 3lçek aile ile görüşme ve çocuğun gözlemlenmesi sonucunda elde edilen bilgiler temel alınarak doldurulmaktadır. Schopler ve arkadaşları tarafından 1971'de geliştirilen ÇOD3'nin Türkçe uyarlaması Sucuoğlu ve arkadaşları tarafından 1996'da yapılmıştır. Görüşmeci 3lçeğin doldurulmasıyla çocukta otizmin derecesini belirleyebilmektedir. 3lçek 15 maddeden oluşmuştur ve 1 normal sınırlarda, 4 çok anormal olmak üzere yarım derecelik puanlama sistemiyle 3ykü ve görüşmedeki gözlemler doldurulmaktadır. 3lçekte yer alan maddeler insanlarla ilişki, taklit, duygusal tepkiler, bedenin kullanımı, nesne kullanımı, değişikliğe tepki, görsel tepkiler, dinleme tepkileri, tat, koku ve dokunmanın kullanılması, korku/sinirlilik, sözel iletişim, sözel olmayan iletişim, davranışların etkinlik düzeyi, zihinsel tepkilerin düzeyi ve genel izlenimler başlıkları altında toplanmaktadır. 30 ve üzerinde puan alan çocukların otistik bozukluğu olduğu düşün3lmektedir. 30-36.5 puan arası hafif-orta şiddette otizmi, 37-60 puan arası ise ağır şiddette otizmi göstermektedir. ÇOD3'n3n otistik bozukluğu olan çocukların zeka geriliği, gelişimsel geriliği ya da başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklardan ayırt edilmesinde 3zgüllük ve duyarlılığının yüksek olduğu gösterilmiştir (199).

C. İSTATİSTİKSEL UYGULAMALAR:

1. P (Anlamlılık Değeri) :

Değerlerin istatistiksel olarak kıyaslanmasında kullanılan anlamlılık değeri (P), bu tezde araştırılan farklılıklar aşağıda verilen derecelerde kabul edildi:

- Önceden bir hipotez varsa P'nin bir kuyruklu (iki kuyrukluğunun yarısı) dağılımı
- Önceden bir hipotez yoksa P'nin iki kuyruklu dağılımı
- $P > 0.05$ anlamlı fark yok
- $P < 0.05$ anlamlı fark var
- $P < 0.01$ ileri düzeyde anlamlı fark
- $P < 0.001$ çok ileri düzeyde anlamlı fark (200)

2. Ki Kare Testi (X^2)

Nitel sayısal verilerin karşılaştırılmasında kullanılan nonparametrik X^2 (Chi square) testi bu tezde, risk alellerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımlarının anlamlılığını, ikiye iki kontenjans tabloları ile 1 serbestlik derecesinde (sd) test etmek amacı ile kullanılmıştır. Bununla birlikte hasta çocukların CARS puanları, IQ skoru, cinsiyet, klinik özellikler (komorbite, gelişim süreçleri), aile özellikleri gerek genotiplerine bağlı olarak gerekse bağımsız olarak test etmek için uygulanmıştır. Testlerin bir kısmı SPSS yazılım programı içinde bir kısmı da GraphPad yazılım programını kullanılarak uygulanmıştır (200).

3. t Testi

İki aritmetik ortalama arasındaki farkın anlamlılığını test etmede kullanılır.

İki ölçüm birbirinden farklı mıdır?

1) Bir grubun bir niteliğe ait ölçümlerinin ortalaması önceden bilinen bir değerden farklı mıdır? (One-Sample t test)

2) İki ayrı grubun aynı niteliğe ait ölçümlerinin ortalamaları farklı mıdır? (Independent-sample t test)

3) Bir grubun iki ayrı niteliğe ait ölçümlerinin ortalamaları farklı mıdır? (Paired-sample t test)

Bağımlı değişken eşit aralıklı veya eşit oranlı olmalıdır. Bu test SPSS yazılım programında kullanılmıştır (200).

4. ANOVA (varyans analizi)

Varyans analizi veya ANOVA, gözlenen varyansı çeşitli kısımlara ayırma yöntemiyle bazı değişkenlerin başka bir değişken üzerindeki etkisini incelemeye yarayan bir grup modelleme türü ve bu modellerle ilişkili işlemlere verilen genel isimdir. Bu tür modeller gözlenen varyansın çeşitli açıklayıcı değişkenlerin etki parçalarına bölmesini incelerler. ANOVA, anakütle ortalamaları arasında farkın olup olmamasını sınar. Anlamlı olarak fazla kalıtılmış aleller ile CARS skoru, IQ skoru, anne yaşı, konuşma zamanı gibi kantitatif analizlerin korelasyonu yani çoklu karşılaştırmalar ANOVA ile yapılmıştır.

5. Risk Hesapları

a. Relatif Risk

Relatif Risk hesapları, bir faktörüm hasta grubunda kontrol grubuna oranla görülme sıklığı hesaplayarak test edilen faktör ile hastalık arasındaki ilişkinin gücünü açıklamaya yarar. Bu çalışmada aday genin Otizmdeki relatif riski, Haplotip Relatif Risk tablolarından yararlanarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (201).

$$\text{Relatif Risk(RR)} = \left[\frac{a}{a+c} \right] / \left[\frac{b}{b+d} \right]$$

a= Risk aleli kalıtılmış hastanın sayısı

b= Risk aleli kalıtılmamış hastanın sayısı

c= Diğer aleli kalıtılmış kontrollerin sayısı

d= Diğer aleli kalıtılmamış kontrollerin sayısı

Relatif risk bir diğeri, iki grupta, yani aleli taşıyan ve taşımayanlar gruplarında hastalığın görülme sıklığının eşit; birden fazla ise, hastalığın riskinin aleli taşıyanlarda arttığını; birden küçük ise; riskin azaldığını işaret eder. Relatif Risk için Güven Aralığı (G.A.), ki kare (karekökü) değeri üzerinden %95 doğruluk düzeyi kabul edilerek, aşağıdaki formülle hesaplanır (201).

$$\%95 \text{ G.A} = \text{RR}^{(1 \pm 1.96/x)}$$

RR= Relatif Risk X= Ki

b. İhtimal Oranı

Hasta grubundaki risk aleli taşıyanların taşımayanlara, kontrol grubuna oranla kontrol grubundaki risk aleli taşıyanların taşımayanlara ihtimalidir (201).

$$\text{İhtimal Oranı} = ad / bc$$

c. Yüklenen Kesit

Risk unsurunun araştırılan fenotipin, populasyon geneline oranındaki etkisi yüklenen kesit olarak tanımlanır. Bu kesit, artmış risk hakkında relatif riskden daha anlamlı bilgi verir. Çünkü risk unsurunun populasyon üzerindeki etkisi bu risk altında olan grubun frekansına bağlıdır. Diğer bir deyişle, populasyon temelinde az relatif riskle ilişkilendirilmiş fazla sıklıkta görülen bir hastalık, yüksek relatif riskle ilişkilendirilmiş nadir görülen bir hastalıktan, neden olduğu ölümler açısından daha ciddi olabilir. Yükselen kesit aşağıda verilen formülden hesaplanmıştır (201).

$$\text{Yüklenen Kesit (Y.K)} = [f (R.R-1)] / [1+f (R.R-1)]$$

f = İlişkilendirilmiş allelin kontrol grubundaki frekansı
R.R = Relatif Risk

6. Aile temelli ilişki analizleri

Bir genin alleli hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha sık bulunuyorsa bu gen hastalıkla ilişkilidir denir. Populasyon tabakalaşmasının analizleri etkilememesi , daha ziyade yalancı pozitif anlamlılıkların önüne geçmek için bu tezde aile temelli ilişki analizleri uygulandı. Bu tezde analizlerde dışarıdan seçilmiş bir kontrol grubu yerine akrabalarından oluşmuş bir kontrol grubu kullanıldı. Bu çalışmada aday genlerin OSB ile olan ilişkileri iki tip analizle irdelenmiştir. a. Haplotip relatif risk, b. Kalıtılabilme eşitsizliği testi (transmission disequilibrium test).

a. Haplotip temelli haplotip relatif risk analizi

Haplotip Relatif Risk (HRR) analizi en az bir etkilenmiş çocuğu olan çekirdek ailelerden veri elde ederek anne baba ve hasta çocuk üçlülerini irdeler. Her aile içinde hasta grubu etkilenmiş çocuğun genotipi, kontrol grubu ise de anne babadan çocuğa kalıtılmamış genotipten oluşan yapay bir gruptur. HRR'nin bu çalışmada kullanılan haplotip temelli olanıdır ki bu genotipler yerine allelleri karşılaştırılır. Böylece her anne baba çocuk üçlüsünde kalıtılmış iki allellerin ve kalıtılmamış iki allellerin frakansları karşılaştırılır. Sonuçta her üçlü iki ayrı hasta grubu gibi değerlendirilir. İstatistiksel olarak anlamı 2'ye 2 kontenjans tablosu oluşturularak ki kare testi ile 1 sd'de test edilir. Eğer test edilen polimorfizm iki allelli ise birinin kalıtılabilirliği diğeriyle karşılaştırılır, ikiden fazla ise teki diğer tüm allellerden oluşan gruba karşı test edilir.

b. Kalıtılabilme eşitsizliği testi (KET) (TDT)

HRR analizi anne babadan kalıtılmış ve kalıtılmamış allellerin ikili gözlemler olduğunu varsaymaz. Kişisel geçişi göz önünde tutan McNemar testleri ile gerçek ilişkinin daha emin ortaya çıkartılabileceği öne sürülmektedir. Bu yöntemi uygulayan kalıtılabilirlik eşitsizliği testleri bu çalışmada kullanılmıştır. Burada test edilen ünite yine üçlülerdir. Sadece aday gen heterozigot olan anne veya babadan kalıtılmış ve kalıtılmamış genlerin sayısı karşılaştırılır. Ortaya çıkan KET istatistiği, HRR gibi, ki kare dağılımı gösterir ve p değeri 1 sd'de bulunur.

$$\text{Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (KET)} = (b - c) / (b + c)$$

b = Heterofizot anne-babadan kalıtılmış alellerin sayısı

c = Heterofizot anne-babadan kalıtılmamış alellerin sayısı

KET : ki kare, 1 sd

KET'in en önemli özelliği ilişkinin yanında bağlantıyı da test etmesidir. Çünkü aday allelin kalıtılabilirlik ihtimali göz önünde bulundurulur. Sıfır Hipotezi (Ho), Mendel ayırışım yasasına göre, heterozigot anne babadan hasta çocuğa her allelin aynı ihtimalle geçmesidir. Eğer gen ile hastalık arasında ilişki veya bağlantı varsa, risk allelinin kalıtılabilirliği %50'den fazla olur (202, 203).

c. Genişletilmiş Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (GKET)

Çok çeşitli allelleri olan polimorfizmlerin ilişkileri KET temelli Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT) analizlerinde yapılabilmektedir. Burada  ana hipotez test edilir:

- 1) Her allel için KET heterozigot anne-babadan hasta çocuğa kalıtılabilirlik ihtimalini hesaplar. Böylece her allelin diğer allel gruplarına karşı kalıtılabilme farklılıkları görülür. Burada istatistiksel düzeltme önerilir.
- 2) Allellerin kalıtılma eşitsizliği her heterozigot anne-baba genotipi göz önünde bulundurularak hesaplanır. Bu da ki kare testi olup sd gözlenen genotip sayısına eşitir.
- 3) Allel temelli analiz ise lojistik regresyonla allellerin kalıtılmasında sapmayı hesaplar (203).

BULGULAR

Çalışmaya 16 (%15,8) kız, 85 (%84,4) erkek, toplam 101 kişi alındı. Olguların 61'i (%60,4) sağ elini, 21'i (%20,8) sol elini ve 19'u (%18,8) de her iki elini kullanmaktaydı. 19(%18,8) çocuğun hiç kardeşi yokken, 40 (%36,9) çocuğun bir kardeşi,,29 (%28,7) çocuğun iki kardeşi, 8 (%7,9) çocuğun üç kardeşi ve 5 (%5) çocuğun dört kardeşi mevcuttu. Anne baba arasındaki akrabalık 82 (%80,2) olguda yokken, 19(%18,8) olguda mevcuttu. Olguların 86'sı (%85,1) normal gebelik sürecinden geçmişken, 15'inde (%14,9) problem saptanmıştı. Olguların 58'i (%57,4) normal doğumla dünyaya gelmişken, 43'ünün (%42,6) sezeryanla doğduğu tespit edildi. Olguların 66'sı (%65,3) ilk sekiz ayda desteksiz oturmuşken, 28'i (%27,7) sekiz ile on beş ay arasında desteksiz oturmuştur ve 7'si (%6,9) on beş aydan sonra desteksiz oturmuştur. Olguların 62'si (%61,4) ilk onbeş ayda, 28'i (%27,7) onbeş yirmidört ay arasında ve 10'u(%9,9) da yirmidört aydan sonra yürürken, 1'i (%1) hiç yürüyememektedir.

Olguların 12'sinin (%11,9) kelimelerinin ilk 15 ayda, 23'ü (%22,8) 2 yaşına kadar, 45'i (%44,6) 2 yaştan sonra ortaya çıktığı ve 21'inin (%20,8) hiç kelimesi olmadığı tespit edilmiştir. Olguların 2'sinin (%2,0) ilk 2 yaşında cümle kurabildiği, 10'unun (%9,9) 2-3 yaş arası, 39'unun (%38,6) 3 yaştan sonra cümle kurduğu ve 50'sinin (%49,5) hala cümle kuramadığı tespit edilmiştir. Olguların 67'sinde (%66,3) ek tanı mevcutken, 34'ü (%33,7) ek tanı almamıştır. Olguların 20'si (%19,8) ilaç kullanmazken, 81'i (%80,2) ilaç kullanmaktaydı. Olguların 75'inin (%74,3) özgeçmişinde özellik yokken, 26'sında (%25,7) özellik mevcuttur, bunun yanında olguların 69'unun (%68,3) soygeçmişinde özellik yokken, 32'sinde (%31,7) özellik vardı.

Olguların 7'sinde (%6,9) normal IQ değeri, 8'inde (%7,9) sınır mental kapasite, 30'unda (%29,7) hafif derecede mental retardasyon, 34'ünde (%33,7) orta derecede mental retardasyon, 20'sinde (%19,8) ağır derecede mental retardasyon ve 2'sinde (%2,0) çok ağır derecede mental retardasyon tespit edilmiştir. CARS değerleri minimum 30 puan çıkmışken, maksimum 54,5 puan hesaplanmıştır ve ortalama CARS puanı 38.995'tir.

Tablo:6 Zeka Düzeyleri

IQ	Sayı	Yüzde %
normal	7	6,9
sınır	8	7,9
hafif	30	29,7
orta	34	33,7
ağır	20	19,8
çokağır	2	2,0
Total	101	100,0

Tablo:7 CARS skoru ve yaş dağılımı

N=101	yaş	CARS	anne yaşı	baba yaşı
Ortalama	9,86	38,995	27,52	31,32
Minimum	3	30,0	17	21
Maximum	18	54,5	41	59

cinsiyet	kadın	16	%15,8
	erkek	85	%84,2
dominant	sağ	61	%60,4
el	sol	21	%20,8
	herikisi	19	%18,8
kardeş	0	19	%18,8
sayısı	1	40	%39,6
	2	29	%28,7
	3	8	%7,9
	4	5	%5,0
akrabalık	yok	82	%81,2
	var	19	%18,8
gebelik	normal	86	%85,1
	anormal	15	%14,9
doğum	normal	58	%57,4
	sezeryan	43	%42,6
oturma	8ay	66	%65,3
	8-15ay	28	%27,7
	15 ay >	7	%6,9
yürüme	15ay	62	%61,4
	15-24ay	28	%27,7
	24 ay >	10	%9,9
	yok	1	%1,0
kelime	15ay	12	%11,9
	15-24ay	23	%22,8
	24 ay>	45	%44,6
	yok	21	%20,8
Cümle	24ay	2	%2,0
	24-36ay	10	%9,9
	36 ay >	39	%38,6
	yok	50	%49,5
Ek tanı	yok	34	%33,7
	var	67	%66,3
ilaç	yok	20	%19,8
	1 adet	34	%33,7
	1'den fazla	47	%46,5
Özgeçmiş	yok	75	%74,3
	var	26	%25,7
Soygeçmiş	yok	69	%68,3
	var	32	%31,7

Tablo:9
Sosyodemografik
Veriler

COX-2-765 geni için tüm örnekler sadece heterozigot anne babadan hasta çocuğa geçişi sayan ve bu bağlantıyı da test eden TDT ile incelendiğinde hasta çocuklara kalıtımının anlamlılık derecesine ulaşmadığı görülmüştür (p:0,2248). Aynı örneklem HHRR ile incelendiğinde COX-2-765 geni için anlamlı bir geçiş bulunamamıştır (p:0,3348).

Tablo 9: COX-2-765 gen polimorfizminde heterozigot geçişte TDT analizi

COX-2-765	C	G	
Tdt			TOPLAM
KALITILMIS	26	30	56
KALITILMAMIS	30	26	56
TOPLAM	56	56	112
P : 0,2248			

Tablo 10: COX-2-765 gen polimorfizminde HHRR analizi

COX-2-765	HASTA	KONTROL	
HRR			TOPLAM
C	28	31	59
G	154	151	305
TOPLAM	182	182	364
P: 0,3348			

Tablo 11: COX-2-765 geni için genotiplerin saptanan sayıları

COX-2-765	HASTA	KONTROL	
HRR			TOPLAM
CG	22	25	47
CC	3	3	6
GG	66	63	129
TOPLAM	91	91	182

COX-2-1195 geni için tüm örnekler sadece heterozigot anne babadan hasta çocuğa geçişi sayan ve bu bağlantıyı da test eden TDT ile incelendiğinde hasta çocuklara kalıtımının daha fazla olduğu ve bunun anlamlılık derecesine ulaştığı görülmüştür (p:0,0262). Aynı örneklem HHRR ile incelendiğinde COX-2-1195 geni için anlamlı bir geçiş bulunamamıştır (p:0,1064).

Tablo 12: COX-2-1195 gen polimorfizminde heterozigot geçişte TDT analizi

COX-2-1195	G	A	
TDT			TOPLAM
KALITILMIS	21	13	34
KALITILMAMIS	13	21	34
TOPLAM	34	34	68
P : 0,0262			

Tablo 13: COX-2-1195 gen polimorfizminde HHRR analizi

COX-2-1195	HASTA	KONTROL	
HRR			TOPLAM
A	142	150	292
G	28	20	48
TOPLAM	170	170	340
P : 0,1064			

Tablo 14: COX-2-1195 geni için genotiplerin saptanan sayıları

COX-2-1195	HASTA	KONTROL	
HRR			TOPLAM
AG	26	18	44
AA	58	66	124
GG	1	1	2
TOPLAM	85	85	170

TARTIŞMA:

COX-2 ile ilgili yapılmış çalışmaları gözden geçirdiğimizde araştırmacıların farklı nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda COX-2'nin olası rolü üzerinde durduğunu yazında görmekteyiz.

Multiple Sklerozda(MS) COX-2'nin rolü ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Çok yaygın bir hayvan modeli olarak kullanılan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelitde(EAE) COX-2 immunoreaktivitesi tespit edilmiştir (131). Farklı bir EAE modelinde, miyelin temel protein(Myelin Basic Protein=MBP) adlı başka bir miyelin protein peptidi ile immünize Lewis sıçanlarda, COX-2 immünreaktivitesi özellikle nöronlar ve endotelyal hücreler ile ilişkili olarak bulunmuştur (167). Rose JW ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu (iNOS) ve siklooksijenaz (COX-2) arasındaki etkileşim immün aracılı inflamatuvar yanıt ve oligodendrositlerin glutamat-aracılı eksitotoksitesisi ile ilişkili olabilir denmiştir. Her iki enzim sıkı bir şekilde eksitotoksik nöronal ölüm ile ilişkilendirilir (168). Sogut ve ekibinin yaptığı bir çalışmada otizm tanısı alan çocuklarda NO seviyeleri yüksek bulunmuştur ve NOS'un otizmde etkili olabileceği öne sürülmüştür (190). Zoroglu (192), Akyol (193) ile Yanık (194) ve ekibinin yaptığı üç ayrı çalışmada şizofreni hastalarının serum ve plazma örneklerinde NO seviyeleri yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda sadece NO değil o yolak da yer alan diğer moleküller de araştırılmıştır. Arginin ve NO döngüsü şizofreni ile ilişkilendirilmiştir. Periferal total nitrit seviyesi şizofrenik beyinlerdeki NO aktivitesini gösterebilir mi diye bakıldığında yapılan çalışmalarda daha çok multipl skleroz , inflamatuvar nörolojik hastalıklar ve AIDS gibi demiyelinizan hastalıklarda serum nitrit düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir (195). NO nöradrenalin dopamin salınımı, hafıza ve öğrenme, serebrovaskular sistemdeki regülasyon, yeme, içme, uyanıklık gibi birçok fizyolojik fonksiyonun yanında şizofreni, bipolar bozukluk, major depresyon, otizm, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, alkol ve madde bağımlılığı ve serebral iskemi gibi birçok patolojik durumla da ilişkilendirilmiştir (196, 197,198).

Rose JW ve arkadaşları yaptıkları çalışmada COX-2 ve iNOS ekspresyonu boyutunu belirlemek için iki kontrol ve kronik aktif lezyonlu yedi MS hastasından alınan dokuları incelemişlerdir. Kontrollerdeki ekspresyon yokluğunun tersine, tüm MS lezyonlarında COX-2 de belirgin bir indüksiyon olduğunu belirten araştırmacılar aynı zamanda COX-2'nin sıklıkla iNOS ile bağlantılı olarak ifade edildiğini belirtmişlerdir. COX-2 en son demiyelinizasyon gösteren, miyelin temel protein katabolitlerinin bulunduğu

bölgelerde bulunmuştur. COX-2 ekspresyonu hasar görmüş oligodendrositlerin yakınında bulunan makrofaj/mikroglia işaretleyici CD64 pozitif hücrelerde tespit edildi ki; bu lezyonlardaki COX-2 ekspresyonunun önemli bir bölümünün immün-derive hücreler tarafından eksprese edildiğini gösteriyordu (168). Bununla birlikte Khoury SJ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise MS fare modelinde PGE2'nin koruyucu bir etkisi olduğunu düşündüren hastalığın iyileşme aşamasında PGE2 düzeylerinde artış gösterilmiştir (169). Yine tersine, Reder ve arkadaşları bir NSAID olan indometazin aktif EAE'yi baskıladığı belirtmişlerdir (170). Literatürde MS hastalarında PG'ler ve daha genel olarak araşidonik asit metabolitleri ilgili tartışmalar mevcuttur (171).

Amyotrofik Lateral Skleroz(ALS) patogenezinde COX-2 tutulumunun bulunabileceği hipotezinin temeli COX-2'nin inflamasyonda ve glutamat bağımlı nörotoksisitede iyi bilinen rolü ile ilişkilendirilmiştir (131). Yapılan iki ayrı çalışmada ALS hastalarının postmortem bakılan spinal kordlarında (172) ve transgenik mutasyona uğramış Cu/Zn Süperoksit Dismutaz(SOD1) farelerin omuriliklerinde COX-2 mRNA'sı ve proteininin arttığı gözlemlenmiştir (173). İki farklı çalışmada ALS hastalarının beyin omurilik sıvılarında(BOS) artmış PGE2 düzeyleri ile ilgili olarak birbirleriyle tutarlı sonuçlar bildirilmiştir (174, 175). Maihofner C. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ALS hastalarının postmortem spinal kordlarındaki COX-2 ekspresyonunun belirgin olarak yükseldiği ve hem nöronlar ve hem de glial hücrelere lokalize olduğu görülmüştür. Buna karşılık, COX-1 immünoaktivitesi bazı mikroglial hücreler ile sınırlı bulunmuş ve ALS hastaları ve kontrol grubu örnekleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (175).

Günümüzde, Parkinson hastalığında(PH) çeşitli NSAİİ'lerin nörodejenerasyonu azalttığı ile ilgili hücre ve hayvan modellerinde çelişkili sonuçlar vardır (176). Bazı vakalarda NSAİİ'lerin nöroprotektif serbest radikal süpürücü etkilerinin COX inhibisyonundan veya inflamasyonu zayıflatıcı etkilerinden daha ziyade ilgili olabildiği söylenmiştir (177, 178). İki çalışmada postmortem PH örneklerinde ya da PH deneysel modellerinde COX izoformlarının ekspresyonu araştırılmıştır (131). İlk çalışmada 11 idiyopatik Parkinson hastalarının substantia nigradaki ameboid veya aktive mikroglial hücrelerinde artan bir COX-2 ekspresyonunu rapor edilmişken, nöronal ve astroglial COX-2 ekspresyonu, kontrol ve PH gruplarında farklı değildi. Her iki grupta da bazı nöron somalarında ve birkaç glial hücrede orta düzeyde COX-1 immünoaktivitesi gözlemlendi ki; bu PG sentezinin büyük bir potansiyelinin COX-2 ve mikroglial hücreler ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (179). Buna karşılık, ikinci ve daha yeni çalışmada postmortem PH örneklerde ve 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) fare modelinde COX-2'nin spesifik olarak substantia

nigradaki dopaminergic nöronlarda indüklendiği gösterilmiştir (178). Astrositlerde ve aktif mikroglialarda belirgin bir boyanma olmadığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, insan ve fare dokularının her ikisinde de PGE2 seviyeleri artmıştır (178).

Her ne kadar aynı koruyucu etkisi her araştırmada kanıtlanmış değilse de, Alzheimer hastalığında(AH) COX'un patojenik bir rol oynadığı kavramı, uzun süreli NSAİİ kullanımı ile düşük AH riski arasında derin bir ilişki bildiren epidemiyolojik çalışmalara dayanmaktadır (180). AH'ların postmortem beyin dokularında yapılan incelemelerde COX-2 mRNA düzeyleri azalmış ya da artmış olarak rapor edilmiştir ki (140, 181, 182); bunun muhtemel nedenleri, COX-2 transkriptlerinin kısa bir yarılanma ömrüne sahip olmaları veya inflamatuvar süreçlerle ilgili bireysel değişkenlikler olabilir (183). Bazı çalışmalarda hastaların beyin dokularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nöronal COX-2 immünoaktivitesinin artmış olduğu rapor edilmiştir (140,162). Ancak, COX-2 ekspresyonunu hastalığa özgü ve ayırt edici klinik demans derecelendirme ve hastalığın Braak evresi ile ilişkilendiren diğer çalışmalarda, COX-2 pozitif nöronların sayısının demans şiddeti ile azaldığı belirtilmiştir. Son dönem AH'da, COX-2 pozitif nöronların demansı olmayan kontrollere oranla anlamlı olarak daha az olduğu görülmüştür (162, 184).Alzheimer hastalığının gelişiminde koruyucu bir rol oynadığı söylenen COX-2-765 geninin C alleli (prostaglandin endoperoksit sentaz 2; PTGS2) promoter polimorfizminin AH riskinde azalma ile ilişki olduğu bildirilmiştir (162).

Yoo HJ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PTGS2 (cox-2'yi kodlayan gen) polimorfizmleri çocuklarında otizm spektrum bozukluğu olan 151 Koreli aile triosunda (anne, baba ve çocuk) değerlendirilmiştir. Bu çalışmada rs2745557nin A alleli Otizm spektrum bozukluğunda tercihen iletildiği bulunmuş ($p<0.01$) ve GAAA haplotipi Otizm spektrum bozukluğuyla anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (5). Ayrıca bu çalışmada ADOS ve ADI-R testlerinin iletişim, karşılıklı sosyal etkileşimde kalitatif anormallikler ve overaktivasyon/ajitasyon spesifik alanlarının skorlarıyla her gen arasında anlamlı istatistiksel ilişki gözlenmiştir(5).

Psikiyatrik hastalıkların genetiğinin araştırılmasında farmakolojik ve nörolojik bulgulardan yola çıkarak aday genlerin belirlenmesi ve bu genlerin farklı topluluklarda ilişki veya bağlantı analizleri ile irdelenmesi önemli yer tutmaktadır. Diğer karmaşık kalıtım gösteren hastalıklar gibi psikiyatrik hastalıkların da özelliği olan çok unsurlu kalıtım, genetik ve klinik heterojenite, düşük penetrans, epistatik etkileşimler bu analizlerin açıklanmasında karışıklığa yol açmaktadır. Kalıtımı tanımlanmış ve aday genleri çok daha fazla araştırılan şizofreni ve depresyon gibi hastalıklarda bile hala hangi genlerin yatkınlığa neden olduğu ve bu genler arasında etkileşimler tam olarak bilinmemektedir. Bu tezdeki bulguların

değerlendirilmesinde öne sürülen genetik ve klinik heterojenitenin varlığının göz önünde bulundurulmasının yanısıra, kullanılan analitik yöntemlerin varsayımlarının da tartışılması gerekmektedir. Bir çalışmada gösterilen pozitif ilişki, eğer gerçek ilişki ise, başka çalışmalarla da doğrulanmalıdır (185). İlişki analizlerinde bulguların doğrulanması, hastalık allelinin genelde kabul edilen %80 doğruluk aralığı içinde, relatif riskine ve görülme sıklığına bağlıdır.

Bu bağlamda, ilişki analizlerinde anlamı yakalayabilmek için gereken örnek sayısı önemli yer tutmaktadır. Risch ve Merikangas hastalık geninin tanımlanmasında bağlantı ve ilişki analizlerinde gereken örnek sayılarını hesaplamışlardır (185). İlişki analizlerinde orta sıklıkta görünen (0.5 sıklıkta) ve relatif riski 1.5 olan bir alel için yaklaşık 950, relatif riski 2 olan için 340, relatif riski 4 olan için 103 hasta ve kontrol çiftinin taranması gerektiğini önermiştir. Bu bulgular çerçevesinde genelde gereken sayıdan daha az sayıda örnek alındığından negatif bulguların tip 2 hatalarından (ilişki varken reddetmek) ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (186). Bunun yanısıra farklı allel frekansları ve epistatik ilişkiler, değişik etnik topluluklarda yapılan ilişki analizlerinde ortaya çıkan uyumsuz sonuçların nedeni olabilmektedir. Ayrıca öne sürülen ilişki bir başka alel ile olan bağlantı dengesizliğinden dolayı ortaya çıkabileceğinden, farklı topluluklarda aday alleller farklı alt tipleri belirleyebilir. Bu sebeple aday gen ile yapılan çalışmaların tamamen aynı olmasını beklemek yanlış bir varsayımdır.

Ayrıca çalışmamızdaki kontrol grubu anne-babalardan kalıtılmamış alel ve genotiplerden oluşmaktadır. Bu kontrol grubu gerçek bir kontrol grubu olmamakla beraber sağlam ebeveynlerin çocuklarına katılmadıkları alel ve genotipleri içerdiğinden dolayı yapay bir kontrol grubu sayılmaktadır. Sağlıklı çocukların bulunduğu kontrol gruplarıyla yapılan çalışmaların bulunması ve daha objektif verilerin elde edilme ihtimali açısından çalışmamızda sağlıklı çocukların bulunduğu kontrol grubunun olmaması bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. Yukarıda da bahsedildiği gibi çalışmaya katılan hasta sayısı da önemli bir kriter sayılmaktadır. Bu açıdan çalışmamızdaki hasta sayısı (N=101) ve kontrol grubundaki sayı (N=202) yeterli sayılmamaktadır. Destekleyici veya benzeri diğer çalışmalarda daha fazla hasta ve kontrol popülasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Yaptığımız çalışmada COX-2-765 geni için tüm örnekler sadece heterozigot anne babadan hasta çocuğa geçişi sayan ve bu bağlantıyı da test eden TDT ile incelendiğinde hasta çocuklara kalıtımının anlamlılık derecesine ulaşmadığı görülmüştür (p:0,2248). Aynı örneklem HHRR ile incelendiğinde COX-2-765 geni için anlamlı bir geçiş bulunamamıştır (p:0,3348).

COX-2-1195 geni için tüm örnekler sadece heterozigot anne babadan hasta çocuğa geçişi sayan ve bu bağlantıyı da test eden TDT ile incelendiğinde hasta çocuklara kalıtımının daha fazla olduğu ve bunun anlamlılık derecesine ulaştığı görülmüştür (p:0,0262). Aynı örneklem HHRR ile incelendiğinde COX-2-1195 geni için anlamlı bir geçiş bulunamamıştır (p:0,1064).

Yoo HJ ve arkadaşlarının Koreli triolarda PTGS2 (COX-2'yi kodlayan gen) ve OSB fenotipi arasındaki ilişkiyi incelemek için yapmış oldukları çalışma bu alanda yapılan ilk çalışmadır. Bizim çalışmamız da Yoo HJ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen pozitif sonuçları desteklemektedir. Her iki çalışmada da OSB ve COX-2 geni arasında anlamlı ilişki bulunduğu tespit edilmiştir. Fakat bununla birlikte bu çalışmanın daha geniş populasyonlarda tekrarlanması gerekir ve daha fazla genetik belirteçler kullanılmalıdır. OSB fenotipleri ve COX-2 geni arasındaki ilişkiyi test edecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ, Nations L, Beecham GW, Kozhekbaeva ZM, Butler BL, Cukier HN, Whitehead PL, Ma D, Jaworski JM, Nathanson L, Lee JM, Hauser SL, Oksenberg JR, Cuccaro ML, Haines JL, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci. *Mol Autism*. 2012 Apr 2;3(1):2. [Epub ahead of print]
2. Rutter M: Genetic influences and autism, in handbook of autism and pervasive developmental disorders, vol. 1. Volkmar FR, Klin A, Paul R, Cohen DJ. (eds): Hoboken, Wiley, pp.425-52, 2005
3. Veenstra-VanderWeele J, Cook EH, Jr. Molecular genetics of autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry* 9(9):819-32, 2004
4. Andres Martin, Fred R. Volkmar: Lewis's Child and Adolescent Psychiatry Fourth Edition, Section 5.1.1 Autism and The Pervasive Developmental Disorders Fred R. Volkmar, Catherine Lord, Ami Klin, Robert Schultz, and Edwin H. Cook: pp.384-401, 2007
5. Yoo HJ, Cho IH, Park M, Cho E, Cho SC, Kim BN, Kim JW, Kim SA. Association between PTGS2 polymorphism and autism spectrum disorders in Korean trios. *Neurosci Res*. 2008 Sep;62(1):66-9. Epub 2008 Jun 5.
6. Volkmar FR, Lord C, Bailey A, Schultz RT, Klin A. (2004): Autism and pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 45: 135–170.
7. Wing L, Gould J. (1979): Severe impairments of social interaction and associated abnormalities. *J Autism Dev Disord* 9: 11–29.
8. De Bruin EI, Ferdinand RF, Meester S, de Nijs PFA, Verheij F. (2007): High rates of psychiatric comorbidity in PDD-NOS. *J Autism Dev Disord* 37: 877–886.
9. Volkmar FR, Lord C, Klin A, Schultz R, Cook EH. (2007): Autism and the Pervasive Developmental Disorders. In: A. Martin and F. Volkmar (eds): *Lewis's Child and Adolescent Psychiatry: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 384–400.

- 10.** Lord C, Bailey A. (2002): Autism Spectrum Disorders. In: M. Rutter, E. Taylor (eds): Child and Adolescent Psychiatry, 4th edition. Oxford, Blackwell Publishing, pp. 636-663.
- 11.** Fombonne E. (2005): Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 66 (suppl 10): 3-8.
- 12.** Chakrabarti S, Fombonne E. (2001): Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA* 285: 3093-3099
- 13.** Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsop M, Decoufle P. (2001): Prevalence of autism in a United States population. *Pediatrics* 108: 1155-1161.
- 14.** Yeargin-Allsop M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. (2003): Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA* 289: 49-55.
- 15.** Wing L, Potter D. (2002): The epidemiology of autistic spectrum disorders: Is the prevalence rising? *Men Retard Develop Dis Res Rev* 8: 151–161.
- 16.** Gillberg C, Coleman M. (2000): *The Biology of the Autistic Syndromes*. 3d edition. London, UK: Mac Keith Press, Cambridge University Press.
- 17.** Gillberg C (2005): The Epidemiology of Autism. In: Mary Colman (ed): *The Neurology of Autism*. Oxford University Press, pp. 119-136.
- 18.** Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, Singh GK, Strickland BB, Trevathan E, van Dyck PC (2009): Prevalence of Parent-Reported Diagnosis of ASD Among Children in the US, 2007. *Pediatrics* [Epub ahead of print]
- 19.** Volkmar FR, Lord C, Klin A, Schultz R, Cook EH. (2007): Autism and the Pervasive Developmental Disorders. In: A. Martin and F. Volkmar (eds): *Lewis's Child and Adolescent Psychiatry: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 384–400.
- 20.** McPartland J, Klin A (2006): Asperger's syndrome. *Adolesc Med Clin.* (3):771-788
- 21.** Klin A (2006): Autism and Asperger syndrome: an overview. *Rev Bras Psiquiatr Suppl* 1:S3-11.
- 22.** Asperger H (1944): Die âoeautistischen Psychopathenâ im Kindersalter. *Archive fur psychiatrie und Nervenkrankheiten* 117: pp. 76-136.
- 23.** Wing L (1981): Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychol Med* 11(1): 115-119.
- 24.** American Psychiatric Association. (1994): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th edition. Washington, DC: APA Press.
- 25.** World Health Organization (1994): *International Classification of Diseases*. 10th edition. WHO, Geneva.

26. Volkmar F, Klin A (2005): Issues in classification of autism and related conditions. In: Volkmar F, Klin A, Paul R, Cohen D (eds): Handbook of autism and pervasive developmental disorders, vol. 1: New York, Wiley, pp. 5-41
27. Miller JN and S Ozonoff (1997): Did Asperger's cases have Asperger disorder? A research note. *Child Psychol Psychiatry* 38(2): pp. 247-251.
28. Klin A, J McPartland, and FR Volkmar (2005): Asperger syndrome. In: Volkmar F, Klin A, Paul R, Cohen D (eds): Handbook of autism and pervasive developmental disorders, vol. 1: Hoboken, Wiley, pp. 88-125.
29. Baron-Cohen S. (2000): "Is Asperger syndrome/high-functioning autism necessarily a disability? *Dev Psychopathol.*12(3):489-500.
30. Kasari C, Rotheram-Fuller E (2005): Current trends in psychological research on children with high-functioning autism and Asperger disorder. *Curr Opin Psychiatry* 18: 497–501.
31. Witwer AN, Lecavalier L (2008): Examining the validity of autism spectrum disorder subtypes. *J Autism Dev Disord.* 38(9):1611-1624.
32. Fombonne E (2005): Epidemiological studies of pervasive developmental disorders. In: Volkmar FR, Klin A, Paul R, Cohen DJ (eds): Handbook of autism and pervasive developmental disorders, vol. 1:Hoboken, Wiley, pp. 42-69.
33. Fombonne E, Tidmarsh L (2003): Epidemiologic data on Asperger disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 12: 15–21.
34. Fombonne E (2007):Epidemiological surveys of pervasive developmental disorders. In: Volkmar FR (ed): *Autism and Pervasive Developmental Disorders*, 2nd ed: Cambridge University Press, pp. 33–68.
35. Landgren M, et al. (1996): ADHD, DAMP and other neurodevelopmental/psychiatric disorders in 6-year-old children: Epidemiology and comorbidity. *Developmental Medicine & Child Neurology* 38(10): pp. 891-906
36. Cohen DJ, et al. (1994): Developmental psychopathology of multiplex developmental disorder. In: SL Friedman and HC Haywood, (eds.): *Developmental follow-up: Concepts, domains, and methods.* San Diego, Academic Press, Inc. pp. 155- 179
37. Volkmar FR, Klin A, Siegel B, Szatmari P, Lord C, Campbell M, et al. (1994): Field trial for autistic disorder in DSM-IV. *American Journal of Psychiatry* 151(9):1361 1367
38. Ghaziuddin M. (2005): *Mental Health Aspects of Autism and Asperger Sendrome.* London, U.K: Jessica Kingsley Publishers.
39. De Bruin EI, Ferdinand RF, Meester S, de Nijs PFA, Verheij F. (2007): High rates of psychiatric comorbidity in PDD-NOS. *J Autism Dev Disord* 37: 877 886.

- 40.** Howlin P (1995): Outcomes in autism spectrum disorders. In: Volkmar FR, Klin A, Paul R, Cohen DJ (eds): Handbook of autism and pervasive developmental disorders, vol. 1. Hoboken, Wiley, 2005, pp. 201-222.
- 41.** Kanner L. (1943): Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2: 217-250.
- 42.** Kanner L, Eisenberg L. (1956): Early infantile autism 1943–1955. *Am J Orthopsychiatry* 26: 55-65
- 43.** Rutter M. (1978): Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Schizophr* 8: 139-161
- 44.** American Psychiatric Association. (1980): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd edition. Washington, DC: APA Press.
- 45.** American Psychiatric Association. (1987): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd edition. Revised. Washington, DC: APA Press
- 46.** Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. (2004): The genetics of autism. *Pediatrics* 113:472–486.
- 47.** Veenstra-VanderWeele J, Cook EH, Jr. (2004): Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 9: 819–832.
- 48.** Gillberg C. (1998): Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord* 28: 415-425.
- 49.** Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A, Al-Saad S, Ware J, Joseph RM, Greenblatt R, Gleason D, Ertelt JA, Apse KA, Bodell A, Partlow JN, Barry B, Yao H, Markianos K, Ferland RJ, Greenberg ME, Walsh CA. (2008): Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 11;321(5886):218-223
- 50.** Lord C, Bailey A. (2002): Autism Spectrum Disorders. In: M. Rutter, E. Taylor (eds): *Child and Adolescent Psychiatry*, 4th edition. Oxford, Blackwell Publishing, pp. 636-663.
- 51.** Courchesne E, Redcay E, Kennedy DP (2004): The autistic brain: Birth through adulthood. *Current Opinion in Neurology* 17: 489–496.
- 52.** Minshew NJ, Sweeney JA, Bauman ML, Webb SJ (2005): Neurologic Aspects of Autism. In: Handbook of autism and pervasive developmental disorders, Vol. 1. Volkmar FR, Klin A, Paul R, Cohen DJ. (eds): Hoboken, Wiley, pp. 453–472.
- 53.** Schultz RT (2005): Developmental deficits in social perception in autism: The role of the amygdala and fusiform face area. *Int J Develop Neuroscience* 23: 125–141.
- 54.** Mukaddes NM. (2000): Yaygın Gelişimsel Bozukluklar. In: Çocuk ve ergen psikiyatrisi. Ö. Polvan (ed): İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, pp. 52–64.

- 55.** Steffenburg S, Steffenburg U, Gillberg C. (2003): Autism spectrum disorders in children with active epilepsy and learning disability: comorbidity, pre- and perinatal background, and seizure characteristics. *Develop Med Child Neurol* 45: 724-730.
- 56.** Volkmar FR, Nelson DS. (1990): Seizure disorders in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 29: 127–129
- 57.** Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna S-L, Moilanen I. (2004): Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorder. *Autism* 8: 49-60.
- 58.** Gillberg C, Coleman M. (1996): Autism and medical disorders: A review of the literature. *Develop Med Child Neurol* 38: 191-202
- 59.** Fombonne E, Mazaubrun C, Cans C, Grandjean H. (1997): Autism and associated medical disorders in a French epidemiological survey. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr* 36: 1561-1569.
- 60.** Barton M, Volkmar F. (1998): How commonly are known medical conditions associated with autism? *J Autism Dev Disord* 28: 273–278
- 61.** Juul-Dam M, Townsend J, Courchesne E. (2001): Prenatal, perinatal, and neonatal factors in autism, pervasive developmental disorder-not otherwise specified, and the general population. *Pediatrics* 107: 1-6.
- 62.** Bolton PF, Murphy M, Macdonald H, Whitlock B, Pickles A, Rutter M. (1997): Obstetric complications of autism: Consequences or causes of the condition? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr* 36: 272-281.
- 63.** Xiaohong Li, Hua Zou, W. Ted Brown (2012) Genes associated with autism spectrum disorder. *Brain research bulletin*
- 64.** Abraham B S, Geschwind D H (2008) Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature review genetics* 341-355
- 65.** Bailey A., et al (1995) Autism is as a strongly genetic disorder : evidence from a British twin study. *Psychological medicine* 63-71
- 66.** Caglayan A.O, (2010) Genetic cause of syndromic and non-syndromic autism. *Developmental Medicine and Child Neurology* 52(2), 130-138
- 67.** Devlin B, Scherer S, (2012) Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current opinion in genetics and development* 22: 229-237
- 68.** Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S: (1994) Duplication of chromosome 15q11-q13 in two individual with autistic disorder. *24: 529-535*
- 69.** Miles JH, McCatheren RB, Stichter J, Shinawi M: (2011) Autism spectrum disorders

- 70.** Hoffman E,J, State M.W., (2010) progress in cytogenetics: implications for child pscopathology. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 49(8),736-751
- 71.** Kumar R.A., Christian S.L., (2009) Genetics of autism spectrum disorder. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 9(3),188-197
- 72.** Piggot J et al (2009) Neural systems approaches to the neurogenetics of autism spectrum disorders. *Neuroscience* 164(1) 247-256
- 73.** Buxbaum J.D. et al (2002) Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Molecular Psychiatry*
- 74.** Shao Y. , et al (2003) Fine mapping of autism disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. *American journal of Human genetics* 72 (3) 539-548
- 75.** Rabionet R. , et al (2004) Analysis of the autism chromosome 2 linkage region: GAD1 and another candidate genes. *Neuroscience Letters* 372(3) 209-214
- 76.** Philippi A. , et al (2007) Association of autism with polymorphisms in the paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1) on chromosome 5q31: a candidate gene analysis. *BMC Medical Genetics* 8,74
- 77.** Weiss LA, Arking DE; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A. (2009): A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 8; 461(7265):802-808.
- 78.** Goffinet A.M. , (1983) The embryonic development of the inferior olivary complex in normal and reeler mutant mice. *Journal of V comparative Neurology* 219 (1) 10-24
- 79.** Goffinet A.M. , (1984) Events governing organization of postmigratory neurons; studies in brain development in normal and reeler mice. *Brain Research* 319(3) 261-296
- 80.** Fatemi S.H. , et al (2005) Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry* 57(7),777-787
- 81.** Scherer S.W. ,et al (2003) Human chromosome 7:DNA sequence and biology. *Science* 300,767-772
- 82.** Ashley- Koch A.E. ,et al (2007) Investigation of potential gene-gene interactions between APOE and RELN contributing to autism risk. *Psychiatric Genetics* 17(4), 221-226
- 83.** Dutta S. , et al (2007) Glutamate receptor 6 gene polymorphisms in indian population: a genetic association study on autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Neurobiology* 27(8), 1035-1047
- 84.** Skaar D.A. , et al (2005) Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor of autism *Molecular Psychiatry* 10(6), 563-571

- 85.** Krebs M.O. et al (2002) Absence of association between a polymorphic GGC repeat in the 5' untranslated region of the reelin gene and autism. *Molecular psychiatry* 7(7) 801-804
- 86.** Li J, et al (2004) Lack of evidence for an association between WVT2 and RELN polymorphism and autism. *American Journal of Medical Genetics part B: Neuropsychiatric Genetics* 126B (1), 51-57
- 87.** Devlin B. , et al (2004) Alleles of a reelin CGG repeat do not convey liability to autism in a sample from CPEA network. *American Journal of Medical Genetics part B: Neuropsychiatric Genetics* 126B (1), 46-50
- 88.** Ramamoorthy, S., et al., 1993. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (6), 2542–2546
- 89.** Kim, S.J., et al., 2002. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Molecular Psychiatry* 7 (3), 278–288.
- 90.** McDougle, C.J., et al., 1996. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Archives of General Psychiatry* 53 (11), 1001–1008.
- 91.** Sutcliffe, J.S., et al., 2005. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *American Journal of Human Genetics* 77 (2), 265–279.
- 92.** McCauley, J.L., et al., 2004. Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 127B (1), 104–112.
- 93.** Cho, I.H., et al., 2007. Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Research* 1139, 34–41.
- 94.** Coutinho, A.M., et al., 2004. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Molecular Psychiatry* 9 (3), 264–271.
- 95.** Coutinho, A.M., et al., 2007. Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Human Genetics* 121 (2), 243–256.
- 96.** Ma D.Q. , et al. , 2010. Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B (2), 477–483

- 97.** Persico A.M. , et al., 2000. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *American Journal of Medical Genetics* 96 (1), 123–127.
- 98.** Wu S. , et al. , 2005. Lack of evidence for association between the serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and autism in the Chinese trios. *Neuroscience Letters* 381 (1-2), 1–5.
- 99.** Ramoz N. , et al. , 2006. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biological Psychiatry* 60 (2), 186–191
- 100.** Tordjman S. , et al. , 2001. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. *Molecular Psychiatry* 6 (4), 434–439.
- 101.** Koishi S. , et al. , 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain and Development* 28 (4), 257–260.
- 102.** Martin E.R. , et al. , 2000. Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *American Journal of Medical Genetics* 96 (1), 43–48.
- 103.** Kwasnicka-Crawford D.A. , Roberts, W. , Scherer, S.W. , 2007. Characterization of an autism-associated segmental maternal heterodisomy of the chromosome 15q11–13 region. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 37 (4), 694–702.
- 104.** Bolton P.F. , et al. , 2004. Chromosome 15q11–13 abnormalities and other medical conditions in individuals with autism spectrum disorders. *Psychiatric Genetics* 14 (3), 131–137
- 105.** Cai G. , et al. , 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Medical Genomics* 1, 50
- 106.** Depienne C. , et al. , 2009. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11–q13 region in autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry* 66 (4), 349–359.
- 107.** Nakatani J. , et al. , 2009. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11–13 duplication seen in autism. *Cell* 137 (7), 1235–1246.
- 108.** Takumi, T., 2010. A humanoid mouse model of autism. *Brain Development* 32 (9), 753–758
- 109.** Menold M.M. , et al. , 2001. Association analysis of chromosome 15 gabaa receptor subunit genes in autistic disorder. *Journal of Neurogenetics* 15 (3-4), 245–259.

- 110.** McCauley J.L. , et al. , 2004. A linkage disequilibrium map of the 1-Mb 15q12 GABA(A) receptor subunit cluster and association to autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 131B (1), 51–59.
- 111.** Martin E.R. , et al. , 2000. Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *American Journal of Medical Genetics* 96 (1), 43–48.
- 112.** Curran S. , et al. , 2005. An association analysis of microsatellite markers across the Prader-Willi/Angelman critical region on chromosome 15 (q11–13) and autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 137B (1), 25–28.
- 113.** Jamain S. , et al. , 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics* 34 (1), 27–29.
- 114.** Talebizadeh Z. , et al. , 2004. Do known mutations in neuroligin genes (NLGN3 and NLGN4) cause autism? *Journal of Autism and Developmental Disorders* 34 (6), 735–736.
- 115.** Zhang C. , et al. , 2009. A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *Journal of Neuroscience* 29 (35), 10843–10854.
- 116.** Yan J. , et al. , 2008. Analysis of the neuroligin 4Y gene in patients with autism. *Psychiatric Genetics* 18 (4), 204–207.
- 117.** Ylisaukko-oja T. , et al. , 2005. Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *European Journal of Human Genetics* 13 (12), 1285–1292
- 118.** Wermter A.K. , et al. , 2008. No evidence for involvement of genetic variants in the X linked neuroligin genes NLGN3 and NLGN4X in probands with autism spectrum disorder on high functioning level. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147B (4), 535–537.
- 119.** Talebizadeh Z. , et al. , 2006. Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *Journal of Medical Genetics* 43 (5), e21.
- 120.** Yamasue H. , et al. , 2009. Oxytocin: sexually dimorphic features of the social brain, and autism. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63 (2), 129–140
- 121.** Lucht M.J. , et al. , 2009. Associations between the oxytocin receptor gene (OXTR) and affect: loneliness and intelligence in normal subjects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33 (5), 860–866.
- 122.** Green J.J. , Hollander, E. , 2010. Autism and oxytocin: new developments in translational approaches to therapeutics. *Neurotherapeutics* 7 (3), 250–257

- 123.** Lerer E. , et al. , 2008. Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and autism: relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition. *Molecular Psychiatry* 13 (10), 980–988
- 124.** Liu X. , et al. , 2010. Association of the oxytocin receptor (OXTR) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD) in the Japanese population. *Journal of Human Genetics* 55 (3), 137–141.
- 125.** Jacob S. , et al. , 2007. Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. *Neuroscience Letters* 417 (1), 6–9
- 126.** Powell E.M. , Mars, W.M. , Levitt, P. , 2001. Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30 (1), 79–89.
- 127.** Levitt P. , Eagleson, K.L. , Powell, E.M., 2004. Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends in Neurosciences* 27 (7), 400–406.
- 128.** Jackson P.B. , et al. , 2009. Further evidence that the rs1858830C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Research* 2 (4), 232–236.
- 129.** Sousa I. , et al. , 2009. MET and autism susceptibility: family and case–control studies. *European Journal of Human Genetics* 17 (6), 749–758.
- 130.** Campbell, D.B. , et al. , 2010. Association of MET with social and communication phenotypes in individuals with autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B (2), 438–446
- 131.** Minghetti L. , 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 901–910.
- 132.** Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232–35
- 133.** Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157–60
- 134.** Marshall PJ, Kulmacz RJ, Lands WEM. Constraints of prostaglandin biosynthesis in tissues. *J Biol Chem* 1987;262:3510–17
- 135.** Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2–10 years later. *J Pharm Exp Ther* 2002;300:367–75
- 136.** Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996;384:644–48

- 137.** Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371–86
- 138.** Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995;355:296–315
- 139.** O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993;330:156–60
- 140.** Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res* 1999;830:226–36
- 141.** Graham SH, Hickey RW. Cyclooxygenases in central nervous system diseases: A special role for cyclooxygenase 2 in neuronal cell death. *Arch Neurol* 2003; 60: 628–30
- 142.** Schwab JM, Schluesener HJ. Cyclooxygenases and central nervous system inflammation: Conceptual neglect of cyclooxygenase 1. *Arch Neurol* 2003; 60: 630–32
- 143.** Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13926–31
- 144.** Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK. COX-3: A splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;119:213–15
- 145.** Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 1997; 54: 601–24
- 146.** Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: Focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 99–125
- 147.** O'Banion MR. Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 1999; 13: 45–82
- 148.** Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ;93: 2317–21
- 149.** Kaufmann WE, Worley PF, Taylor CV, Bremer M, Isakson PC. Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev* 1997; 19: 25–34

- 150.** Riccieri L, Minghetti L, Moles A, et al. Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats. *Exp Neurol* 2004; in press.
- 151.** Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem* 2002; 9: 41–47
- 152.** Holscher C. Inhibitors of cyclooxygenase produce amnesia for passive avoidance task in the chick. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1360–65
- 153.** Rall JM, Mach SA, Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res* 2003;968:273–76
- 154.** Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broadspectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2438–46
- 155.** Chen C, Magee JC, Bazan NG. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandinE2 signaling in hippocampal long-term synaptic activity. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2851–57
- 156.** Bazan NG. Synaptic lipid signaling: Significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 2003; 44: 2221–33
- 157.** Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci* 2000; 20: 763–70
- 158.** Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995;378:406–9
- 159.** Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, et al. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 1996;271:5976–79
- 160.** Sebat J. , Lakshmi, B. , Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamron, B., Yoon, S.,Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang,R., Lee, Y.H., Hicks, J., Spence, S.J., Lee, A.T.,Puura, K., Lehtimaki, T.,Ledbetter, D., Gregersen, P.K., Bregman, J., Sutcliffe, J.S., Jobanputra, V.,Chung,W.,Warburton, D., King, M.C., Skuse, D., Geshwind, D.H., Gilliam,T.C., Ye, K., Wigler, M., 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316 (5823), 445–449.
- 161.** Folsteinl S.E. , Rosen-Sheidley, B., 2001. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.* 2, 943–955.
- 162.** Yermakova A.V. , O'Banion, M.K. , 2001. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 823–836.

- 163.** Kaufmann W.E. , Worley, P.F. , Taylor, C.V. , Bremer M. , Isakson P.C. , 1997. Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev.* 19, 25–34.
- 164.** Ricceri L. , Minghetti L. , Moles A. , Popoli P. , Confaloni A. , De Simone R. , Piscopo P. , Scattoni M.L. , di Luca M. , Calamandrei G. , 2004. Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats. *Exp. Neurol.* 189, 162–172.
- 165.** Ashwood P. , Wills S. , Van deWater J. , 2006. The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1–15.
- 166.** Hee Jeong Yoo, In Hee Cho, Mira Park, Eunchung Cho, Soo Churl Cho, Bung Nyun Kim, Jae Won Kim, Soon Ae Kim, 2008. Association between PTGS2 polymorphism and autism spectrum disorders in Korean trios. *Neurosci Res.* 2008 Sep;62(1):66-69.
- 167.** Deininger MH, Schluesener HJ. Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J Neuroimmunol* 1999; 95: 202–8
- 168.** Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 2004; 149: 40–49
- 169.** Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E. *J Exp Med* 1992;176:1355–64
- 170.** Reder AT, Thapar M, Sapugay AM, Jensen MA. Prostaglandins and inhibitors of arachidonate metabolism suppress experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 117–27
- 171.** Fretland DJ. Related potential role of prostaglandins and leukotrienes in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992;45:249–57
- 172.** Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: Implication for therapy. *Neurology* 2001; 57: 952–56
- 173.** Almer G, Guegan C, Teismann P, et al. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2001;49:176–85
- 174.** Almer G, Teismann P, Stevic Z, et al. Increased levels of the proinflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 2002; 58: 1277–79

- 175.** Maihofner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundorfer B, Heuss D. Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1527–34
- 176.** Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:395–401
- 177.** Sairam K, Saravanan KS, Banerjee R, Mohanakumar KP. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res* 2000;966:245–52
- 178.** Teismann P, Tieu K, Choi DK, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl AcadSci USA* 2003;100:5473–78
- 179.** Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 724–39
- 180.** Aisen PS. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 2002; 1: 279–84
- 181.** Chang JW, Coleman PD, O'Banion MK. Prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) mRNA expression is decreased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 801–8
- 182.** Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 1998; 87: 319–24
- 183.** Lukiw WJ, Bazan NG. Cyclooxygenase 2 RNA message abundance, stability, and hypervariability in sporadic Alzheimer neocortex. *J Neurosci Res* 1997; 50: 937-45
- 184.** Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T. Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 678–88
- 185.** Risch N, Merikangas K (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- 186.** O'Donovan MC, Owen MJ (1999). Candidate-Gene Association Studies of Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics* 65: 587-592.
- 187.** Behiye A ve ark (2002). Otistik bozuklukta doku uyumu antijenleri (HLA) dağılımı ile klinik bulguların ilişkisinin araştırılması. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 65(1): 18-23.

- 188.** Behiye A ve ark (2002). Otizm ile ilişkili HLA allellerinin PCR-SSP yöntem ile araştırılması. İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası 65(2): 110-114.
- 189.** S.Salih Zoroglu , Ferah Armutcu , Sakir Ozen , Ahmet Gurel , Ercan Sivasli , Ozer Yetkin , Iclal Meram (2004). Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 254 : 143–147
- 190.** S. Sogut , S.S. Zoroglu, H. Ozyurt , H.R. Yilmaz, F. Ozugurlu, E. Sivasli, O. Yetkin , M. Yanik, H. Tutkun, H.A. Savas, M. Tarakcioglu, O. Akyol (2003). Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism, Clin. Chim. Acta. 331:111–117.
- 191.** Zoroglu SS, Yurekli M, Meram I, Sogut S, Tutkun H, YetkinO, Sivasli E, Savas HA, Yanik M, Herken H and Akyol O (2003). Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. Cell Biochem Funct 21: 55-60.
- 192.** Zoroglu SS , Herken H , Yurekli M , Uz E, Tutkun H , Savas HA , Bagci C , Ozen ME , Cengiz B, Cakmak EA, Dogru MI and Akyol O: (2002) The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. J Psychiatric Res 36: 309-315
- 193.** Akyol O. , Herken H. , Uz E. , Fadillioglu E. , Unal S. , Sogut S. , Ozyurt H. , Savas H.A. (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: the possible role of oxidant/antioxidant imbalance. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 26, 995– 1005.
- 194.** Yanik M, Vural H, Kocyigit A, Tutkun H, Zoroglu SS, Herken H, Savas HA, Koylu A and Akyol O: (2003) Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? Neuropsychobiology 47: 61-65
- 195.** Akyol O. , Zoroglu S.S. , Armutcu F. , SahinS. , Gurel A. (2004). Nitric Oxide as a PhysiopathologicalFactor in Neuropsychiatric Disorders in vivo 18: 377-390.
- 196.** Herken H, Uz E, Ozyurt H, Söğüt S, Virit O, Akyol O, Özyurt H (2002). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. Mol Psychiatry. 2001 Jan;6(1):66-73.
- 197.** Herken H, Uz E, Ozyurt H and Akyol O (2001). Red blood cell nitric oxide levels in patients with schizophrenia. Schizophr Res 52: 289-290;6
- 198.** Savas HA, Herken H, Yurekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroglu SS, Ozen ME, Cengiz B and Akyol O (2002). Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. Neuropsychobiology 45: 57-61

- 199.** Perry A, Condillac RA, Freeman NL ve ark. (2005) Multi-site study of the Childhood Autism Rating Scale (CARS) in five clinical groups of young children. *J Autism Dev Disord*, 35:625-34.
- 200.** Şenocak M. (2009). *Klinik Biyoistatistik*. İstanbul Nobel Tıp Kitapevi.
- 201.** Kirkwood BR (1988). *Essentials of Medical Genetics*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- 202.** Sham P (1998). *Statistics in Human Genetics*. Londra: Arnold.
- 203.** Sham PC ve Curtis D (1995). An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multiallele marker loci. *Annals of Human Genetics* 59: 323-336.

EKLER**EK 1-ÇOCUKLUK OTİZMİ PUANLAMA ÖLÇEĞİ**

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ ÇOCUK RUH SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
OTİZM BİRİMİ

ÇOCUKLUK OTİZMİ PUANLAMA ÖLÇEĞİ

Yönergeler: ölçeğin her bir maddesi ile ilişkili davranışları puanlayın. 15 puan ekleyin ve sondaki ölçeği kullanın.

1. İnsanlarla İlişki	
2. Taklit	
3. Duygusal Tepki	
4. Vücut Kullanımı	
5. Nesne Kullanımı	
6. Değişikliklere Uyum Sağlama	
7. Görsel Tepki	
8. Dinleme Tepkisi	
9. Tad, Koku Ve Dokunma Tepkileri Ve Kullanımı	
10. Korku Veya Ürkeklik	
11. Sözel İletişim	
12. Sözel Olmayan İletişim	
13. Etkinlik Düzeyi	
14. Entellektüel Yanıtın Düzeyi Ve Uygunluğu	
15. Genel İzlenimler	
<u>TOPLAM</u>	

15-29 Otizm yok

30-36 Hafif-Orta Derecede Otistik

37-60 Aşırı Derecede Otistik

Motor Gelişim: Oturma:
Yürüme:
Dil Gelişimi: Kelime:
Cümle:

İlk Klinik Başvuru Yaşı:

Başvuru Şikayeti:

Psikiyatrik Ek Tanılar:

Şuan Kullandığı ilaçlar:

Özgeçmiş:

Soygeçmiş:

Zeka Puanı:

EK 3-BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Araştırmanın Adı / Protokol Numarası: Otizm spektrum bozukluğunda COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G genlerinin incelenmesi

Araştırmanın Konusu Otizm spektrum bozukluğunda COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G genlerinin incelenmesi

Araştırmanın Amacı: Bu araştırmada kliniğimize başvuran Otizm spektrum bozukluğu tanılı çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babalarının kan örneklerinde COX-2-765G→C ve COX-2-1195A→G genlerinin incelenmesi planlanmıştır.

Araştırmanın Süresi: 1 yıl

Araştırmada İzlenecek Yöntem:

Çalışma grubu:

İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına daha önce başvurmuş ve halen kliniğimizde takip edilen 2-18 yaş arası Otizm spektrum Bozukluğu tanısı konulmuş çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babaları çalışma grubu olarak alınacaktır. Katılım gönüllülük esasına dayalı olacaktır. Toplam 150 çocuğun araştırmaya katılması planlanmıştır.

Kan örnekleme; çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına daha önce başvurmuş ve halen kliniğimizde takip edilen 2-18 yaş arası Otizm spektrum Bozukluğu tanısı konulmuş çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babalarından alınan kan örnekleme kullanılacaktır.

- Gönüllüden 10cc EDTA'lı kan örneği alınacaktır.
- Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılacaktır.
- Polimorfizm çalışmaları direkt hastalık sonucunu belirtmemekte olup, kişiye söz konusu hastalığa yatkınlıkla ilişkili genetik yapıya sahip olup olmadığını göstermektedir.
- Çalışmada gönüllünün sadece kan örneği alınacaktır ve gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.
- Alınan kan örneklerinden DNA elde edilecek ve bu DNA örnekleri bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.
- Diğer bir çalışmada gönüllü DNA'sının kullanılması gerektiğinde kendisinden izin alınacak gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlık ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı 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 katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.

- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkiye bulunmayacaktır.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece gönüllüden kan örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırmacının isteği ile çıkarılabilirsiniz.

Alternatif Tedavi veya Girişimler: Yok.

Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler: Uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlık ve risk söz konusu değildir.

Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri: Gönüllüye herhangi bir ilaç verilmeyecektir.

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:

Dr. İlyas Kaya 0533 263 13 34

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

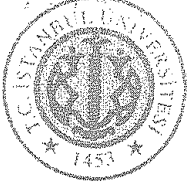
Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

EK 4-ETİK KURUL ONAYI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1010

Tarih : 19.06.2012

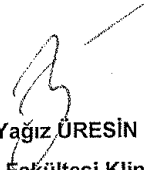
Konu : Prof. Dr. Süleyman Salih ZOROĞLU hk,

Sayın Prof. Dr. Süleyman Salih ZOROĞLU
Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi :Anabilim Dalınızın 21.05.2012 tarihli 495 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. İlyas KAYA'nın yürüteceği 2012/910-1094 dosya numaralı "Otizm spektrum bozukluğunda cox-2 765g→c ve cox-2-1195a→g genlerinin incelenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 31.05.2012 tarihli 10 sayılı toplantısında uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

EK 5-ÖZGEÇMİŞ**Dr.ilyas KAYA’NIN Özgeçmişı**

Adı Soyadı : İlyas Kaya
Doğum Tarihi : 22.10.1984
Doğum Yeri : Hakkari
Ünvanı : Dr.
Medeni hali : Evli,bir çocuk sahibi
Ev Adres :Kızılelma cad. Hasekisultan Mah. Paydas Apt. 45/6 Fatih istanbul
Tel : 0533 2631334
İş Adresi: : İ.Ü. İTF Çocuk Psikiyatrisi AD Şehremini 34280 Çapa/İstanbul
E-mail :kayailyas@ymail.com

MEVCUT AKADEMİK DURUMU

İ.Ü. İTF Çocuk Psikiyatrisi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Öğrencisi

ÖĞRENİM DURUMU

Lisans : İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi 2002-2008

Uzmanlık Eğitimi: İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD 2008-2013