



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

OTİSTİK BOZUKLUKLU ÇOCUK HASTALARDA VDR
GEN POLİMORFİZMİ, VDR GEN EKSPRESYONU VE
VDR GENİ PROMOTOR METİLASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Burhan Balta

KAYSERİ-2013



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**OTİSTİK BOZUKLUKLU ÇOCUK HASTALARDA VDR
GEN POLİMORFİZMİ, VDR GEN EKSPRESYONU VE
VDR GENİ PROMOTOR METİLASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

Dr. Burhan Balta

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Munis DÜNDAR**

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TSU-12-4035** no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ –2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince olduğu gibi tezimin her aşamasında da değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen, tezimin neticelenmesi için sınırsız destek veren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Munis Dünder' a,

Eğitimime katkılarından ve gösterdikleri güler yüzden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Yusuf Özkul ve Doç. Dr. Çetin SAATÇI' ye,

Tezimin planlanmasındaki teşvik ve gayretlerinden dolayı Doç.Dr. Hakan Gümüş, Doç.Dr. Didem B.Öztop'a, Çocuk Ve Ergen Ruh Sağlığı A.D ile Çocuk Nöroloji bilim dalı hoca ve çalışanlarına,

Tezimin laboratuvar çalışmalarının yapılmasındaki destek ve gayretlerinden dolayı, Bio. Kezban Korkmaz'a ve bölüme ilk başladığım andan bitirene kadar gösterdikleri yakınlık ve bilgi paylaşımlarından dolayı tüm bölüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme,

En içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ABSTRACT	vii
KISALTMALAR.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Otistik Bozukluk Tanımı.....	4
2.2. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	4
2.3.Epidemiyoloji	5
2.4. Klinik Özellikler	6
2.4.1. Başlangıç Yaşı ve Tanı	6
2.4.2. Sosyal Etkileşim	8
2.4.3.İletişim	8
2.4.4. Davranış Anormallikleri	8
2.5. Eşlik Eden Diğer Bozukluklar	9
2.6.Etyoloji.....	9
2.6.1.Otizm İle İlişki Saptanmış Genetik Etmenler	10
2.6.1.1.OTİZM İLE İLİŞKİLİ GENETİK HASTALIKLARI	12
2.6.1.2.NONSENDROMİK OTİZM NEDENLERİ.....	15

2.7.Otizm Dışındaki Yaygın Gelişimsel Bozukluklar.....	18
2.7.1.Rett Sendromu.....	18
2.7.2. Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu.....	19
2.7.3.Asperger Sendromu	20
2.7.4.Başka Türli Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk.....	21
2.8.Vitamin D.....	22
2.8.1. Vitamin D’ nin Metabolizması.....	22
2.8. 2.Vitamin D Eksikliği.....	23
2.8.3. Vitamin D’ nin Etki Mekanizması	24
2.8.4.Vitamin D’nin Kemik Metabolizması Üzerine Etkileri	25
2.8.5.Vitamin D’nin Kemik Metabolizması Dışındaki Etkileri.....	26
2.8.6.Vitamin D ve İmmün Sistem Üzerine Etkileri.....	26
2.8.6.1.Vitamin D’nin Doğal İmmünite Üzerine Etkileri	27
2.8.6.2.Vitamin D’nin Kazanılmış İmmünite Üzerine Etkileri ...	27
2.8.7.VDR Geni ve Polimorfizmleri	28
2.8.8.Vitamin D ve Beyin.....	29
2.8.9.VDR ve Beyin	30
2.8.10.Vitamin D ve Beyindeki Nörotransmitterler.....	31
2.8.11.Vitamin D’ nin Beyin Gelişimine Etkileri	31
2.8.12.Otizm ve Vitamin D	32
2.8.13.Vitamin D Ve Cinsiyet Farklılığı	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1.HASTA VE KONTROL GRUBU	33
3.1.1.Hasta Grubu	33

3.1.2.Kontrol Grubu	34
3.2.KULLANILAN ALETLER	34
3.3.YÖNTEMLER	36
3.3.1.Kandan DNA izolasyonu	46
3.3.2.DNA saflığı ve konsantrasyonun ölçülmesi	46
3.3.3.SNP ANALİZİ	47
3.3.4.Metilasyon Analizi	49
3.3.5.Kandan RNA İzolasyonu	52
3.3.6.VDR Geni mRNA Ekspresyonunun Araştırılması.....	53
4.BULGULAR	56
4.1.VDR Promoter Bölge rs11568820 Ve rs4516035 SNP Analizi Sonuçları...	56
4.2.VDR promoter bölge Metilasyonu sonuçları	58
4.3.Real-Time PZR metoduyla VDR geni mRNA ekspresyon bulguları.....	58
4.4.Hastalardan Yapılan Biyokimyasal Analiz Sonuçları	61
4.5.Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	61
5.TARTIŞMA.....	62
6.SONUÇLAR.....	70
7.REFERANSLAR.....	72

ÖZET

Yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) içinde sınıflandırılan Otistik Bozukluk (OB), yaşamın ilk yıllarında başlayan, sosyal beceri, sözel ve sözel olmayan iletişim, bilişsel gelişimde özgül gecikmeler ve sapmalar, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize nöropsikiyatrik bozukluktur. OB ile ilgili tanımlanmış çok sayıda lokusta mutasyon, kopya sayısı değişikliği bulunmasına rağmen hastaların büyük kısmında sorumlu patogeneze aydınlatılamamıştır. Vitamin D; steroid yapıda yağda eriyen bir vitamin aynı zamanda hormondur. Kaynağı ultraviyole B güneş ışınları varlığında deride gerçekleşen sentez ve diyet ile alımdır. Aktif formu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'tür. Aktif Vitamin D metabolitleri etkilerini sitoplazma ve çekirdekte yerleşik vitamin D reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirir. OB oluşum mekanizması ile ilgili ortaya atılan hipotezlerden biride doğal immün yanıtta bozukluklardır. Yakın zamanda yapılan çok sayıda ekspresyon array, transkriptom çalışmalarında OSB' da özellikle doğal immün yanıtta görevli genlerin ekspresyonlarında artış gösterilmiştir. Vitamin D ve VDR de doğal immün yanıtta önemli rolü olan antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilen ve yabancı mikroorganizmaları tanıyan Toll-Like-Receptors (TLR) aracılığıyla antimikrobiyal etki gösterir.

Bu çalışmada OB tanısı almış 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrolde Real Time PCR yöntemi ile VDR geninin periferik kandan mRNA ekspresyonu, VDR geni promotor bölgesindeki rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi ve VDR geni promotor bölge 16492 CpG adası metilasyonu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. OB'li bireylerde kontrollere oranla VDR geni periferik kan mRNA ekspresyonunun anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. ($p:0,001$). rs11568820 ve rs4516035 polimorfizmlerinin allel ve genotip dağılımlarında kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Yine VDR geni promotor bölge 16492 CpG adası metilasyon analizinde hasta ve kontrol grubunda metilasyon tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak OB hasta grubunda VDR gen ekspresyonunun artmış olması, OB' de görülen doğal immün yanıtta artışı desteklemektedir. Ayrıca bu çalışma Vitamin D,

VDR, OSB ve doğal imm n te arasındaki ilişkinin aydınlatılması i in yeni bir araştırma alanı a mıştır.

Anahtar Kelimeler: Vitamin D, VDR, Otistik Bozukluk, Doğal İmm n te, Ekspresyon, Real-Time PCR

ABSTRACT

Autistic Disorder (AD) which is classified in Pervasive developmental disorders (PDD) is a neuropsychiatric disorder characterized by stereotyped and repetitive behaviors and specific delays and diversions in social skills, verbal and non verbal communication, cognitive development in the early years of life. Although there are a large number of mutations and copy number variations at various loci identified in AD patients, pathogenesis of AD has not been elucidated in majority of patients. Vitamin D is a fat-soluble steroid vitamin and hormone. Supply is the synthesis that occurs in the skin in the presence ultraviolet B sun rays and dietary intake. Biological effects of active Vitamin D metabolites are exerted through the vitamin D receptor (VDR), located mainly in cytoplasm and nuclei. One possible mechanism for the occurrence of AD is suggested to be through innate immune response disorders. Recently, in AD patients, a large number of expression array and transcriptome studies have shown an increase in the expression of genes especially related to innate immune response. Antimicrobial effects of vitamin D and VDR are exerted through Toll-Like-Receptors (TLR) which have an important role in the innate immun response, are expressed by antigen presenting cells and recognize foreign microorganisms.

In this study, 30 patients diagnosed with AD and 30 healthy controls were comparatively evaluated for the periferic blood VDR gene expression by real time PCR method and for rs11568820 and rs4516035 SNP profile of the promoter region of the VDR gene and for 16492 CpG island methylation of the VDR promoter region. Periperic blood VDR gene expression was significantly higher in AD group compared to control subjects ($p:0,001$). There were no significant differences among allele and genotype distribution of rs11568820 and rs4516035 polymorphisms between AD patients and controls. Methylation was not detected in 16492 CpG island methylation analysis in VDR gene promoter region in patient and control groups.

As a result, the increase of VDR gene expression in patients with AD is in accordance with the increase in the innate immune response in patients with AD. Furthuremore, this

study will stimulate new studies in order to clarify the relationship among AD, vitamin D, VDR, and innate immunity.

Keywords: : Vitamin D, VDR, Autistic Disorder, Innate Immunity, Expression, Real-Time PCR

KISALTMALAR

aCGH : Array comparative genomic hibridizasyon

ACTB : Beta actin

AS: Asperger Sendromu

BTA-YGB: Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk

CNVs : Gen kopya sayısı değişiklikleri

ÇDB: Çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleozid trifosfatlar

DSM-IV-TR: Amerikan Psikiatri Birliği Psikiatrik Hastalıklar El Kitabı 4.baskı düzeltilmiş metni

FRET: Floresan rezonans enerji transferi

PAH: Fenilalanin hidroksilaz

RFLP: Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm

MECP2: methyl CpG binding protein 2

MRI: Magnetic Resonance

OB: Otistik bozukluk

OSB: Otizm spektrum bozukluğu

NF1: Nörofibromatozis 1

NK: Naturel killer

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Taq: Thermus aquaticus

TCR: T hücre antijen reseptör

TLR-L: Toll like reseptör ligand

TS: Tuberoz Skleroz

UPD: Uniparenteral dizomi

UTR: Untransletad region (çevrilmeyen bölgeler)

VDR: Vitamin D reseptörü

YGB: Yaygın gelişimsel bozukluklar

1,25(OH)₂D₃: 1,25-hidroksi Vitamin D

25(OH)D₃: 25-hidroksi Vitamin D

TABLO LİSTESİ

Tablo 1:	Otizm ile ilişkisi olan genetik hastalıklar.....	15
Tablo 2:	Sendromik olmayan otizm ile ilişkili olduğu düşünülen aday genler....	16
Tablo 3:	Sendromik olmayan otizmde rol oynadığı düşünülen genler, proteinler ve fonksiyonları.	17
Tablo 4:	Farklı PZR çeşitlerinin karşılaştırılması.	39
Tablo 5:	Reaksiyon Miksi.	48
Tablo 6:	PZR programı.	48
Tablo 7:	Enzim hariç hazırlanan reaksiyon miksi.	49
Tablo 8:	Enzim kesim reaksiyonu.	50
Tablo 9:	PZR hazırlığı.	51
Tablo 10:	PZR programı.	51
Tablo 11:	Genomik DNA eliminasyon miksi.	53
Tablo 12:	Revers-transkripsiyon miksi.....	54
Tablo 13:	Her bir reaksiyon için PZR miksi.	55
Tablo 14:	PZR programı.	55
Tablo 15:	Otistik bozukluklu bireylerin ve kontrollerde VDR varyantlarının genotip frekansları ve genotiplere yönelik odds oranı.	57
Tablo 16:	Metilasyon analizi sonuçları.....	58
Tablo 17:	Hastaların ve kontrollerin VDR mRNA ekspresyon analiz sonuçları ve p değeri.	59
Tablo 18:	Hasta ve kontrol grupları VDR ve ACTB CT değerleri.	60
Tablo 19:	Hasta grubu biyokimyasal analiz sonuçları.....	61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Vitamin D üretimi ve metabolizması.....	23
Şekil 2:	Vitamin D’ nin etki mekanizması ve hedef gen ekspresyon.....	25
Şekil 3:	Vitamin D üzerindeki gen polimorfizmleri.....	29
Şekil 4:	PZR döngüsünün sıcaklık aşamaları.....	37
Şekil 5:	RT- PZR cevap eğrileri.	40
Şekil 6:	SYBR Green 1 varlığında PZR.	42
Şekil 7:	Taqman prop mekanizması.	43
Şekil 8:	Hibridizasyon problemleri varlığında. PZR.....	43
Şekil 9:	SimpleProb Analizi şematik şekli.....	45
Şekil 10:	SimpleProbe formatı ile SNP tespiti.....	45
Şekil 11:	NanoDrop 2000 cihazı.	47
Şekil 12:	rs11568820 in floresans eğrisi.	56
Şekil 13:	rs4516035’ in floresans eğrisi.	57
Şekil 14:	İncelediğimiz hastalardan 7 nolu hastanın amplifikasyon eğrisi.....	58
Şekil 15:	VDR ve ACTB geni için incelenen hasta ve kontrollerin amplifikasyon eğrilerinin görünümü.	59

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Otizm dil gelişimi, sosyal iletişim ve sosyal etkileşim becerileri, oyun ve davranış alanlarında işlevselliği bozacak düzeyde eksikliklerle seyreden nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizm terimi ilk olarak bir çocuk psikiyatristi olan Leo Kanner tarafından 1943 yılında "bebeklik otizmi" olarak tanımlanmıştır. Yaşam boyu süren, sosyalleşme, dil, iletişim ve diğer birçok etkinlik alanını etkileyen bir sendrom olarak bildirilmiştir. Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4.baskısının düzeltilmiş metninde (DSM-IV-TR) Yaygın Gelişimsel Bozukluklar (YGB) başlığı altında yer almaktadır. Günümüzde otizm; yaşamın ilk dönemlerinde başlayan, sosyal ilişkide ve etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde gerilik, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize, etkileri yaşam boyu devam eden “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar” (YGB) kapsamında nörogelişimsel bir bozukluk olarak değerlendirilir (1). Otistik bozukluğunda (OB) içerisinde bulunduğu diğer YGB’ler arasında; Rett Sendromu, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu (ÇDB), Asperger Sendromu (AS) ve başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (BTA-YGB) yer alır.

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) etyolojisinde çok çeşitli faktörler suçlanmaktadır. Ailesel, çevresel, endokrin, immünolojik ve genetik faktörler ilk akla gelenlerdir. OSB’nin monozigotik ikizlerde % 90, dizigotik ikizlerde % 0-10 konkordans göstermesi bize otizmin genetik yönünün önemine işaret etmektedir (2). Çeşitli kromozomal anormallikler, gen kopya sayısı değişiklikleri (CNVs) ve tek gen hastalıkları bilinen genetik kökenli OSB nedenleridir. CNVs’ den en iyi bilinenler 15q13.3 delesyon Sendromu ve 16p11.2 delesyon Sendromudur. Otizmle ilişkilendirilmiş tek gen

hastalıklarından bazıları ise Rett Sendromu, Frajil X Sendromu, Tuberoskleroz ve NF1'tir. Fakat OB hastalarının büyük kısmını dismorfik bulguların eşlik etmediği hastalar oluşturmaktadır. Ve bu hastalardaki OB oluşum sürecine dair tutarlı bir model henüz oluşturulamamıştır. Fakat son yıllarda hızla gelişen genom teknolojisi ve kullanılmaya başlanan array CGH ve yeni nesil sekans yöntemleri ile yapılan analizlerde nörogelişimle ilgili genlerin downregüle olduğu ve özellikle doğuştan immünite ile ilgili genlerin upregüle olduğu gösterilmiştir.

Vitamin D; steroid yapıda yağda eriyen bir vitamin ve aynı zamanda da hormondur. Kaynağı ultraviyole B güneş ışınları varlığında deride gerçekleşen sentez ve diyet ile alımdır. Aktif formu 1,25(OH)₂D₃'tür. Etkisini vitamin D reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirir. VDR; 12q12' de lokalize, 11 ekzondan oluşan, yaklaşık 75 kb'lik DNA' yı kapsayan bir gendir.

Vitamin D ve VDR'nin beyin gelişiminde görev aldığı daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir. 25OHD₃'ü 1,25(OH)₂D₃'e dönüştüren enzimi kodlayan CYP27B1 primer olarak böbrekte bulunmakla birlikte fetal insan beyinde, serebral kortekste, serebellar purkinje hücrelerinde ve glial hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Yine immünohistokimyasal çalışmalarda VDR'nin tüm santral sinir sistemi boyunca çeşitli bölgelerde varlığı gösterilmiştir. Rat çalışmalarında VDR'nin erken embriyolojik dönemde eksprese olduğu da bildirilmiştir.

Vitamin D ile OB arasında ilişki olabileceğine dair şüpheler epidemiyolojik çalışmalardan ileri gelmektedir. Kış-ilkbahar döneminde doğan çocuklarda otizm sıklığının daha yüksek olduğuna dair yayınlar mevcuttur (3). Yine maternal Vitamin D eksikliğinin OSB ile ilişkili olabileceği iddia edilmiştir.

Yaptığımız literatür taramasında OB hasta grubunda; bu hastalığın fizyopatolojisi ile direkt veya indirekt ilişkili olabileceğini düşündüğümüz VDR geni ile ilişkili sadece bir SNP araştırması haricinde bir çalışma yer almamaktaydı. Bu araştırmaya; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı Hastalıkları ve Çocuk Nöroloji Bilim Dalı'na başvuran DSM IV-TR' ye göre Otistik Bozukluk tanısı alan, 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Olgular klinik ve dismorfolojik açıdan Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde değerlendirilmiştir. Bu araştırmada; OB olan hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda VDR geninin periferik kandaki mRNA ekspresyon farklılıkları, VDR geni promotor

bölgesindeki rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi ve VDR geninin promotor bölgesindeki 16492 CpG adası metilasyonunun değerlendirilmesi ve olası ilişkileri tartışılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Otistik Bozukluk Tanımı

Yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) içinde sınıflandırılan Otistik Bozukluk (OB), yaşamın ilk yıllarında başlayan, sosyal beceri, sözel ve sözel olmayan iletişim, bilişsel gelişimde özgül gecikmeler ve sapmalar, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize nöropsikiyatrik bozukluktur.

2.2. Tarihçe ve Sınıflandırma

19.yüzyıla kadar çocuklarda gelişim basamaklarında bozulma ile ilgili çok sınırlı sayıda bilimsel yayın yapılmıştır. Bleuler 1911 yılında ilk olarak otizm terimini kullanmış ve otizmi; iletişimde yaşanan ciddi zorluklar ile beraber gerçeğe bağın kopması olarak ifade etmiştir (4). Potter tarafından 1933 yılında çocuklukta ortaya çıkan şizofreni ölçütleri ileri sürülmüştür. Heller'in daha önce tanımladığı "Dementia infantinalis" daha sonra "Dezintegratif bozukluk (DB)" olarak DSM-IV' te yerini almıştır. Amerikalı bir çocuk psikiyatristi olan Leo Kanner 1943 yılında ilk kez 11 vakalık bir seri yayınlamış ve "bebeklik otizmi" olarak adlandırmıştır (4,5). Kanner'dan bir yıl sonra 1944 yılında Asperger; otizmi doğumdan sonra ilk 30 ay içerisinde görülen, sıklığı 10 000 çocukta 4 olan davranışla ilgili bir sendrom olarak tanımlamıştır.

Asperger' in tanımladığı olguların Kanner'dan farkı sosyal etkileşim bozuklukları gösteren fakat normal zekâya sahip çocuklar olmasıdır.

Ancak psikiyatri alanında otizm; şizofreninin, hayatın erken dönemlerinde başlayan farklı bir görünümü olarak düşünülmüştür. Bu hastalık 1947 yılında Bender tarafından “çocukluk şizofrenisi” olarak tariflenmiş, Mahler tarafından “sembiyotik psikoz” ve bir süre sonra da Rank “atipik çocuk” kavramını kullanmıştır (6,7). Daha sonra ilk kez 1980 yılında Amerikan Psikiyatri Derneği sınıflamasında yer alan otizm; günümüzde DSM-IV tanı kriterlerine Yaygın Gelişimsel Bozukluklar içerisinde sınıflandırılmaktadır.

Amerikan Psikiyatri Birliğinin sınıflandırmasında son şeklini verdiği DSM-IV, ICD-10 kriterleri ile oldukça benzerlik göstermektedir. Ve bu tanı sınıflandırmasına göre YGB;

1. Otistik bozukluk
2. Rett Sendromu
3. Çocukluğun dezintegratif bozukluğu
4. Asperger Sendromu
5. Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk şeklinde beş hastalığı kapsamaktadır (8).

2.3.Epidemiyoloji

Otistik bozukluk ile ilgili ilk epidemiyolojik çalışmalar 1966 yılında İngiltere’de yapılmış ve prevelans 4.5/10 000 olarak bildirilmiştir (9). Fombonne, 1990’ların sonuna kadar yapılan prevelans çalışmalarını toplamış prevelans ortalamasını 4-5/10 000 (0.7 ila 21/10 000 arasında değişen prevelans bildirimlerinin ortalaması) olarak bildirmiştir (10,11). 2009 yılında yayınlanan bir meta analiz çalışmasında Otizm spektrum bozukluklarının ortalama prevelansı 60-70/10 000; Otistik bozukluk prevelansı ise 20.6/10 000 olarak bildirmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda OSB’nin sıklığının artışı dikkati çekmektedir. Bunun muhtemel sebebi bu hastalığın daha kapsamlı tanımlanması ve tanı ölçütlerindeki değişiklikler olabilir (12).

OB erkeklerde görülme sıklığı kızlara oranla 4 kat fazladır. Fakat zekânın etkilendiği vakalarda erkek/kız oranı neredeyse eşittir (13). YGB’nin Afrika, Çin, Latin Amerika, Hindistan ve Ortadoğu’da daha az sıklıkta görüldüğü iddia edilmekle birlikte; tüm

dünyada prevelansının birbirine yakın olduğunu bildiren yayınlarda mevcuttur (14). Sosyoekonomik düzeydeki farklılıkların OB sıklığını etkilemediği gösterilmiştir (15).

2.4. Klinik Özellikler

Otistik bireyler dış dünyanın gerçekliğinden uzaklaşıp kendine has bir iç dünyada yaşar. Dış uyaranlardan çok kendi iç uyaranlarına göre tepki verirler. Bu durum başkaları tarafından anormal davranış olarak değerlendirilir. Bulgular bireyden bireye farklılık göstermekle birlikte yaş ve gelişim düzeyine göre de değişkenlik gösterebilmektedir. Yaşam boyu devam eden hastalık olduğundan dolayı ergenlik ve erişkin döneme ait tanı kriterlerinin oluşturulması önemlidir.

2.4.1. Başlangıç Yaşı ve Tanı

YGB ve Otistik bozukluk tanısı tüm dünyada DSM-IV tanı kriterlerine göre konur. DSM-IV; 1994 yılında yayınlanmış ve OB, AS, Rett Sendromu, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu ve BTA-YGB hastalıkları OSB/YGB ana tanısı altında yer bulmuştur. 2000 yılında yapılan güncelleştirmede bazı bölümlere eklemeler yapılmıştır ancak tanı kriterlerinde bir değişiklik olmamıştır.

Otizm tanı konulabilmesi için bireyin iletişim, sosyal etkileşim ve davranış olmak kaydıyla üç alanda eksikliği olması gerekir.

Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri (APA 1994)

A. En az ikisi (1)'inci maddeden ve birer tanesi (2) ve (3)'üncü maddelerden olmak üzere (1), (2) ve (3)'üncü maddelerden toplam altı (veya daha fazla) maddenin bulunması:

1. Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren sosyal etkileşimde nitel bozulma:

a. 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.

b. Yaşıtlarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememe.

c. Diğer insanlarla eğlenme, ilgilerini ya da başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örn. ilgilendiği nesneleri göstermeme, getirmeme ya da belirtmeme).

d. Toplumsal ya da duygusal karşılıklar verememe.

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

a. Konuşulan dilin gelişiminde gecikme olması ya da hiç gelişmemiş olması (el, kol ya da yüz hareketleri gibi diğer iletişim yollarıyla bunun yerini tutma girişimi eşlik etmemektedir).

b. Konuşması yeterli olan kişilerde, başkalarıyla söyleşiyi başlatma ya da sürdürmede belirgin bir bozukluğun olması.

c. Basmakalıp ya da yineleyici ya da özel bir dil kullanma.

d. Gelişim düzeyine uygun çeşitli, imgesel ya da toplumsal taklitlere dayalı oyunları kendiliğinden oynamama.

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

a. İlgilenme düzeyi ya da üzerinde odaklanma açısından olağandışı, bir ya da birden fazla basmakalıp ve sınırlı ilgi örüntüsü çerçevesinde kapanıp kalma.

b. Özgül, işlevsel olmayan, alışlageldiği üzere yapılan gündelik işlere ya da törensel davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma.

c. Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örn. parmak şıklatma, el çırpma ya da burma ya da karmaşık tüm vücut hareketleri).

d. Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma.

B. Aşağıdaki alanlardan en az birinde, 3 yaşından önce gecikmelerin ya da olağandışı bir işlevselliğin olması:

1. Toplumsal etkileşim,

2. Toplumsal iletişimde kullanılan dil,

3. Sembolik ya da imgesel oyun.

C. Bu bozukluğun Rett Sendromu ya da çocukluk çağı dezintegratif bozukluğuyla daha iyi açıklanamaması.

2.4.2. Sosyal Etkileşim

OB'li bireylerde sosyal etkileşimde bozulmalar ve dış dünyadan soyutlanma dikkati çeker. Hem sözel hem de sözel olmayan iletişim becerilerinde de problem yaşadıkları için normal bireyleri anlayamaz, genellikle göz teması kurmaktan kaçınır ve onları reddederler. Bundan dolayı yaşlıları ile sağlıklı bir iletişim kuramazlar. Otistik çocuklar çeşitli oyun ve uğraşları paylaşmaktan ziyade kendi başlarına oynamayı tercih ederler. Okul ortamında arkadaşları ile oyunlara katılmaktan ziyade onları uzaktan izlemeyi tercih ederler. Otistik bazı çocuklar iletişim kurmak isteseler de ilk adımı atmaktan çekinirler. Otistik çocukların yaşadıkları bu sosyal ilişki problemleri yaşamın ilk 6 ayından itibaren başlar (16).

2.4.3. İletişim

Konuşma, beden hareketleri, yüz ifadesi ve göz teması eksikliği ile iletişim becerilerinde yetersizlik dikkati çeker. Anne-babaların doktora başvuru nedeni genellikle konuşmadaki yetersizlik ve problemlerdir. Otistik bireylerdeki dil gelişimi hastadan hastaya ciddi farklılıklar gösterebilmektedir. Hastaların dörtte biri anlamlı düzeyde konuşma becerisine sahip değildir. Konuşma yetisini kazanmış bireylerde ise sözel iletişimi başlatma ve devam ettirmede, konuşma hızını, ritmini ve ses tonunu ayarlamakta problemler mevcuttur. Dil bilgisi kurallarının kullanımı da etkilenmiştir. Kendilerinden bahsederken üçüncü tekil şahıs kullanma, zamirleri yanlış kullanma görülür. Dilin basmakalıp ve tekrarlayan şeklinde kullanımı mevcuttur. Anlama ve yorumlama kabiliyetleri de geridir. Söylenenlere geç cevap verebilir ya da hiç vermezler. Ekolali görülebilir. OB hastalar yüz ifadesi, beden dili, selamlaşma ve göz teması gibi sözel olmayan iletişimde de problemler yaşamaktadır (17).

2.4.4. Davranış Anormallikleri

Otizmin kelime anlamı bireyin dış dünyadaki gerçeklikten uzaklaşıp kendi iç dünyasına dönmesidir. Otistik bozukluğun sınırları tam belli olmayan tüm bireylerde görülen bazı ortak özellikleri mevcuttur. Katı, mekanik ve duygusallıktan uzak bir yapıları vardır. Birinci derece yakınlarına dahi kayıtsız kalmakta ve dış dünya ile temel ilişkilerinde cansız nesneleri tercih etmektedirler. Genellikle motor beceriler korunmuştur. Anne-babalar kendilerine tepki vermedikleri için işitme problemlerinden kuşkulansalar da müzik sesi gibi konuşma haricindeki seslere gayet duyarlı olabilmektedirler. Otistik

bozukluklu bireylerde stereotipik hareketler, takıntılar, dönen cisimlere ilgi, kendi eksenini etrafında dönme gibi davranışlar gözlemlenebilmektedir (18).

Oyun alışkanlıkları ile ilgili takıntıları bulunabilir, aynı oyunları tekrar tekrar oynayabilirler. Alışık oldukları düzenden taviz vermeyip, eşyaların yerlerinin değiştirilmesine aşırı tepki verebilirler.

2.5. Eşlik Eden Diğer Bozukluklar

Otistik bozukluğu olan bireylerde mevcut tanı ölçütlerinin yanı sıra uyku ve yeme problemleri, biyolojik ritimde bozukluk, saldırganlık ve öfke nöbetleri gözlenebilir. OB'li bireylerin % 75' inde belirgin zekâ geriliği görülür. Bununla birlikte yüksek işlevli olgular da bulunmaktadır.

Otistik çocukların ortalama olarak %40' ının zekâ bölümü 50-55'in altında (orta ve ileri düzeyde zekâ geriliği); %30' unda 50-70 arasında (hafif düzeyde zeka geriliği); %30' unda ise 70 ya da 70' in üzerindedir. Ve sözel zeka bölümünün performans zeka bölümünden daha düşük olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte otistik bozukluklu çocukların %20' sinin sözel olmayan zekâları normaldir.

2.6.Etyoloji

Yapılan çok sayıda araştırmaya ve kullanılmaya başlanan yeni teknolojilere rağmen hala tam olarak OSB ve otistik bozuklukla ilgili hastaların büyük kısmında etyolojik neden bulunamamaktadır. Günümüzde OSB'nin etyolojisini açıklamada çok sayıda etken suçlanmaktadır.

Uzun yıllar boyunca bu hastalığın nedeni olarak bebeklik döneminde anne-çocuk ilişkisinin yeteri düzeyde kurulamaması suçlanmıştır. Ancak sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bu görüşü desteklememiştir. Sosyoekonomik düzeyi yüksek olan ailelerde bu hastalığın daha sık olduğu gösterilmiş fakat başka bir görüş de bu ailelerin daha fazla tedavi arayışı içinde olmalarının bu veriyi sağlayabileceği yönündedir. Otistik çocukların ailelerinde normal popülasyona kıyasla daha yüksek oranda duygu durum, anksiyete ve psikiyatrik bozukluklara sahip olduğu saptanmıştır (19).

Otizimde mental retardasyonun, epileptik anormalliklerin gibi anormalliklere sık rastlanması; nörokimyasal çalışmalarda, görüntüleme yöntemleri ve otopsi çalışmalarında farklı beyin bölümlerinde çeşitli organik bozuklukların saptanması

biyolojik etmenlerin etkin olduğu bir hastalık olma ihtimalini kuvvetlendirmektedir (20).

Otistik çocuklarda bazı biyokimyasal parametrelerde farklılıklar göze çarpmıştır. Hastaların 1/3'ünde plazma serotonin düzeyleri yüksek bulunmuştur ve plazma oksitosin düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır. Beyin omurilik sıvısında dopaminin yıkım ürünü olan homovalinik asit düzeylerinde artış dikkati çekmektedir. Otizm tedavisinde kullanılan en etkin ilaçların dopamin antagonistleri olduğu ve dopamin agonistlerinin davranış belirtilerini şiddetlendirdiği düşünöldüğünde biyokimyasal değışiklerin önemli olduğu anlaşılmaktadır (21).

OB ile ilgili yapılan nöroanatomik çalışmalarda amigdala ve hipokampusda hücresel değışikler, prefrontal korteks ve temporal lob mini sütun yapılarında bozukluklar saptanmıştır (22,23). Bebeklik döneminde amigdala ve medial temporal loba hasar verilen primatlarda ileri dönemde otistik bozukluk benzeri semptomlar rapor edilmiştir (24). On iki yaşından küçük OB'li çocukların ortalama olarak beyin hacimleri % 5 oranında daha geniş bulunmuştur. Ancak ilerleyen yaşlarda bu fark ortadan kalkmaktadır. Farklı çalışmalarda bir dizi nöroanatomik anormallik rapor edilmekle birlikte sonuçlar birbiri ile kıyaslandığında anlamlı olup olmadığı tartışma konusudur.

Aile ve ikiz çalışmaları otizmin genetik temelini kuvvetli olduğunu ve kalıtım oranının %90' lar civarında olduğunu göstermiştir (2). Günümüzde otizmin genetik nedenlerinin % 20-25' inin tanısı konulabilmektedir. Sınırlı sayıda olguda teratojen maruziyeti bulunabilir. Geriye kalan % 75-80 kadarının nedeni bilinmemektedir.

2.6.1. Otizm İle İlişki Saptanmış Genetik Etmenler

OSB'nin genetik nedenlerini şu şekilde sınıflayabiliriz.

1. Sitogenetik yöntemlerle tespit edilen kromozomal anormallikler: ~% 5
2. Gen kopya sayısı değışikleri (Copy number variations-CNVs); submikroskopik delesyon ve duplikasyonlar; ~%10-20
3. OSB ile ilişkili tek gen hastalıkları; ~% 5

Yüksek rezolüsyonlu kromozom analizi ile OSB' li çocukları yaklaşık %5' inde kromozomal anöploidiler tespit edilir. Diğer %3-5' ine de FISH tekniklerini kullanarak tanı koyulabilir (25,26). Neredeyse tüm kromozomlara ait sitogenetik anormalliklerde

otizm gözlenmesine rağmen; bunların sadece birkaçı otizm için olası lokus olarak tespit edilmiştir.

15q11-q13 bölgesinde yer alan Prader Willi/Angelman kritik bölgesi otizmlili bireylerde görülen en sık kromozom anormalliliğidir. Down Sendromlu bireylerde otizm sık görülen bulgulardan biridir (27). Maternal X kromozomuna sahip Turner Sendromlu hastalar paternal X kromozomuna sahip Turner Sendromlu hastalara nispeten daha zayıf bilişsel becerilere sahip oldukları gösterilmiştir (28). 2q37, 22q13.3, Xp22.3 bölgelerindeki delesyonlar, 47,XXY, 47,XYY, 45,X seks kromozom anöploidilerinde bazı olgularda otizm saptanmıştır.

Array comparative genomic hibridizasyon (aCGH); otizmlili bireylerin değerlendirmesinde yüksek rezolüsyonlu kromozom analizi ve FISH' in yanında yerini almaktadır ve tüm genom boyunca subtelomerik bölgeleride içerecek şekilde delesyon/duplikasyon analizi yapmaya imkan verir. Günümüzde aCGH; nedeni bilinmeyen otizmlili bireylerin %7-10' unda de novo genomik dengesizliği tespit edebilmektedir (29,30). Daha önce rutin sitogenetik incelemelerde normal tespit edilen dismorfik bulguları olan otistik hastalarda 1 mb genişliğinde genomik array kullanılarak yapılan çalışmada %27,5 oranında klinik ile ilişkili CNV tespit edilmiştir (31). Sebat ve arkadaşlarının yaptığı bir oligonükleotid array kullanılarak yapılan bir çalışmada ailede tek otizmlili birey olan vakalarda %10, birden fazla otizmlili vaka olan ailelerde %2 oranında kopya sayısı değişikliği tespit edilmiştir (29). Avrupa kökenli 859 OSB' li birey ve 1409 sağlıklı çocukta 550 000 SNP markırı kullanılarak yapılan genom boyu CNV çalışmasında nöronal hücre adezyon moleküllerini kodlayan genlerde (CNTN4, NLGN1, NRXN1 ve ASTN2) ve ubiquitin yolağıyla ilgili genlerde (UBE3A, PARK2, RFWD2 ve FBXO40) patolojik genomik değişiklikler saptanmıştır (32). Otizmle ilgili tespit edilmiş bazı CNV' ler şunlardır.

15q13.3 delesyon Sendromu; epilepsi ve entelektüel yeteneklerde bozulma, OSB ile seyreder ve kliniği değişkendir. Bu sendromun kliniği CHRNA7 geninin eksikliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir (33).

16q11.2 delesyon Sendromu; genel olarak entelektüel yetersizlik, gelişim geriliği ve OSB ile karakterize bir hastalıktır. Sıklıkla de novo mutasyonlar sonucu oluşur fakat otozomal dominant geçiş gösteren vakalar da bildirilmiştir (34).

2.6.1.1. OTİZM İLE İLİŞKİLİ GENETİK HASTALIKLARI

Frajl X Sendromu

Frajl X Sendromu mental retardasyonun en sık kalıtsal nedenidir. Xq27.3 bölgesinde lokalize FMR1 geninin 5' UTR bölgesindeki üçlü tekrar (CGG)_n sayısındaki artışı sonucu oluşur. Bu üçlü tekrarın normal sayısı 5-45' dir. 45-54 tekrar intermediate, 55-199 tekrar premutasyon ve >200 tam mutasyon olarak tanımlanır.

Klinik bulgular arasında hipotoni, ılımlı motor gelişim geriliği, iletişim problemleri, akıcı olmayan konuşma, hiperaktivite, konsantrasyon problemleri, sesli uyarılara aşırı hassasiyet sayılabilir. Frajl X Sendromlu erkeklerde otizm sıklığı 1.5-3.3/100 arasında değişmektedir. Frajl X Sendromundaki otistik semptomlar göz temasından kaçınma, el çırpma gibi stereotipik hareketler, rutin davranışlardaki değişime karşı direnç ve perseverasyondur (35,36).

Klinik bulguların oluşma sebebi; CGG tekrar sayısındaki artış sonucu FMR1 geni tarafından üretilen Frajl X Mental Retardasyon Proteininin (FMRP) üretilmemesidir. Bu protein sinapslardaki birçok genin ifadesini düzenleyen RNA bağlanma ve transport görevi görür. FMRP' nin regüle ettiği genlerden PTEN, PSD95, NLGN, NRXN1, MAPK1 VE SHANK3' ün otizm ile ilişkisi bilinmektedir.

Rett Sendromu

Otizm dışındaki yaygın gelişimsel bozukluklar bölümünde değinilmiştir.

Prader Willi Sendromu

Prader-Willi Sendromlu hastaların % 75' inde paternal orijinli 15q11-13 bölgesinde delesyon, %24' ünde 15 kromozomun maternal uniparenteral dizomisi (UPD (15)), %1' inde imprinting hatalar patolojiden sorumludur. Genetik nedenli obezitenin en yaygın nedenidir. İnfantil dönemde bebeklerde santral hipotoni ve beslenme güçlüğü dikkati çeker. Çocuklar 1-6 yaş arası hızla kilo alırlar. Karakteristik bulguları hipogonadizm, turunkal obezite, küçük el ve ayaklar, erkeklerde küçük penis ve kısa yapıdır. IQ ortalama 60 civarındadır. Davranış problemleri önemli bir konu olabilir. Hastaların %80' nde ritüelistik davranışlar bulunur (37). Tekrarlayıcı davranışlar ve OSB' nu andıran sosyal defektlerde görülmüştür.

Angelman Sendromu

Angelman Sendromu (AS); 1/20.000-52.000 sıklıkta görülen nörogelişimsel bozukluklardan biridir. Klinik bulgular arasında ciddi gelişim geriliği, dil gelişiminde ve konuşmada şiddetli bozukluk, ataksik geniş adımlı tipik yürüyüş, epileptik nöbetler ve uygunsuz mutlu yüz ifadesi (mutlu kukla) vardır. Diğer bulgular arasında davranış, kişilik ve uyku problemleri, suyla oynamayı sevme vardır. AS' de görülen OB' nin komorbid olduğu düşünülmektedir (38).

AS; 15q11.13 maternal kopyasında ortaya çıkan hatalardan dolayı oluşur. Sitogenetik ve FISH çalışmaları ile tespit edilebilen 15q11-13mat' daki intersitisyel delesyonlar %70' ini; 15.kromozomun paternal uniparenteral dizomisi %2-5' ini; imprinting defektleri %2-5' ini; E3 ubiquitin protein ligaz genindeki (UBE3A) mutasyonlar %20'sini oluşturur (38).

Tuberoz Skleroz

Tuberoz Skleroz (TS); beyin, göz, böbrek, deri ve diğer organlarda tümör benzeri hamartomlarla karakterize sıklıkla epilepsi ve mental geriliğin eşlik ettiği multisistemik bir hastalıktır. Prevelansı 1/10.000' dir (39). En sık görülen prezentasyonu infantil spazmlar ya da erken çocuklukta epileptik nöbetler şeklindedir. Kalıtım şekli otozomal dominanttır ve yüksek oranda (%60) taze mutasyonlar sonucu oluşur. TS; 9q34 bölgesindeki TSC1 ve 16p13.3 lokalize TSC2 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

OSB' yi içeren gelişimsel ve davranışsal anormallikler TS' de sık görülen (% 17-63) bozukluklardandır (40,41).

Joubert Sendromu

Neredeyse tüm çocuklarda hipotoni, gelişim geriliği, serebellar vermis hipoplazisi, beyin MR görüntülemesinde molar diş görünümü, kognitif yetersizlik ve davranış problemleri ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. İnfantil dönemde apne-hiperpne atakları, tipik yüz görünümü, retinal displazi, kolobom, nistagmus gibi göz bulguları, okülomotor apraksi ve mikrositik renal hastalık dikkati çeker. OSB bulguları Joubert Sendromlu hastaların % 40' ında görülebilmektedir (42,43).

Down Sendromu

Down Sendromu; 1/700 sıklıkta görülen, belirgin dismorfik bulgular ile karakterize kromozomal bir hastalıktır. Orta-ileri öğrenme güçlüğünün en yaygın genetik nedenidir. Otizm; Down Sendromlu bireylerde genel popülasyona oranla 10 kat daha sık görülür. Molloy ve ark. yaptıkları çalışmada OSB' nin eşlik ettiği Down Sendromlu çocuklarda eşlik etmeyenlere oranla beyinde daha fazla fonksiyon bozukluğuna rastlanıldığını ve ayrıca epileptik nöbetlerin sıklığının arttığını göstermişlerdir (44).

22q13.3 Delesyon Sendromu

Ciddi neonatal hipotoni, gelişme geriliği, yarı damak, konuşma problemlerinin eşlik ettiği bir mikrolelesyon sendromudur. Otistik davranışlar, göz teması eksikliği, stereotipik hareketler ve kendine zarar verme bulgular arasındadır (45).

Sotos Sendromu

Sotos Sendromu aşırı büyüme sendromlarından biri olup, karakteristik yüz görünümü ve bazen de mental gerilik eşlik eder. Başlıca bulguları; belirgin alın, aşağı dönük palpebral fissürler, sivri çene, makrosefali, aşırı büyüme ve bilişsel bozukluktur. Davranış problemleri, konjenital kardiyak anomaliler, renal anomaliler, skolyoz ve nöbetler görülen diğer sorunlardır. Sotos Sendromu otozomal dominant kalıtılır ve tanımlanmış tek gen NSD1 genidir. Vakaların %80-90' ında NSD1 anormalliği gösterilmiştir (46,47).

Smith-Lemni-Opitz Sendromu

Kolesterol biyosentezindeki 7-dehidrokolesterol redüktaz enzim eksikliği sonucu oluşan multipl konjenital anomali sendromudur (48). Karakteristik bulguları; pre ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, orta-ileri bilişsel yetersizlik, yarı damak, kardiyak defektler, erkeklerde dış genitelyada gelişim anomalileri, ayak 2-3 parmak sindaktili ve postaksiyel polidaktilidir. Otozomal resesif kalıtım gösterir ve DHRC7 genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Otistik davranışlar hastaların %50-86' sında rapor edilmiştir (49).

Fenilketonüri

Fenilalanin hidroksilaz (PAH) enzim eksikliğine bağlı oluşan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Otistik semptomlar görülmekle beraber erken tedavi ile bulgular azalmaktadır.

Diğer sendromik otizm nedeni olan genetik hastalıklar da şunlardır: Duchenne muskuler distrofi, WAGR Sendromu, 22q11.1 delesyon Sendromu, 17p11.2 duplikasyon Sendromu, Williams Sendromu, resiprokal 7q11.23 mikroduplikasyon Sendromu, Cornelia de Lange Sendromu, San flippo Sendromu, Moebius sekansı, Landau Kleffner Sendromu. (Tablo 1)

Tablo 1: Otizm ile ilişkisi olan genetik hastalıklar

Hastalık	Sorumlu Gen-Lokus
Frajil X Sendromu	Fmr1'de CGG Tekrar Artışı
Rett Sendromu	MECP2 Geni
Angelman Sendromu	Del 15q11-13mat
Prader Willi Sendromu	Del 15q11-13pat
Smith-Magenis Sendromu	17p11.2 Delesyonu
Smith-Lemni-Opitz Sendromu	Dhrc7
Tuberoz Skleroz	Tsc1,Tsc2
Williams Sendromu	7q11.23 Delesyonu
Joubert Sendromu	Heterojen,18 Lokus
Noonan Sendromu	PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, NRAS, BRAF
Down Sendromu	Trizomi 21
Turner Sendromu	Monozomi X
Nörofibromatozis	NF1,NF2
Duchenne Muskuler Distrofi	DMD Geni
Sotos Sendromu	NSD1 Geni
De Lange Sendromu	NIPBL,SMC1A,SMC3 Gen
Apert Sendromu	FGFR2
Miyotonik Distrofi	DMPK Geninde CTG Tekrar Sayısı Artışı CNBP Geninde CTCG Tekrar Artışı
Tedavi Edilmemiş Fenilketanuri	Pah Geni

2.6.1.2. NONSENDROMİK OTİZM NEDENLERİ

Otizmin etyolojisine birçok gen ve çevresel faktör katıldığından dolayı, sorumlu genleri bulmak oldukça zordur. 100' e yakın allel tespit edilmiştir, bunların bir kısmı az olmakla birlikte fenotipe katkıda bulunur. Her bir otozomal lokus AUTS, gonozomal lokuslar ise AUTSX olarak adlandırılır (50) (Tablo 2). Otistik bireylerin ikinci ve

üçüncü derece akrabalarında otizm riski azalmaktadır. Bu lokusların bulunmasında haritalama çalışmaları, proteomiks analizlerinden faydalanılmıştır. Nonsendromik otizm etyolojisinde rol oynayan bazı genler, lokusları ve fonksiyonları Tablo 3’ de belirtilmiştir.

Tablo 2: Sendromik olmayan otizm ile ilişkili olduğu düşünülen aday genler

<u>Ad</u>	<u>OMIM</u>	<u>Hedef Gen</u>	<u>Kalıtım</u>
AUTS1	209850		Otozomal
AUTS3	608049	MAB21L1, DCAMKL1, MADH9	Otozomal
AUTS4	608636	GABRB3	Otozomal
AUTS5	606053	NRXN1	Otozomal
AUTS6	609378	SLC6A4	Otozomal
AUTS7	610676	ITGB3	Otozomal
AUTS8	607373		Otozomal
AUTS9	611015	MET, WNT2	Otozomal
AUTS10	61101	EN2	Otozomal
AUTS11	610836	Bilinmiyor	Otozomal
AUTS12	610838	Bilinmiyor	Otozomal
AUTS13	610908	Bilinmiyor	Otozomal
AUTS15	612100	CNTNAP2	Otozomal
AUTS16	613410	SLC9A9	Otozomal
AUTS17	613436	SHANK2	Otozomal
AUTSX1	300425	NLGN3	X-linked
AUTSX2	300495	NLGN4	X-linked
AUTSX3	300496	MECP2	X-linked
AUTSX4	300830	PTCHD1	X-linked
AUTSX5	300847	RPL10	X-linked

Tablo 3: Sendromik olmayan otizmde rol oynadığı düşünülen genler, proteinler ve fonksiyonları.

Protein	Gen Sembolü-Lokus	Fonksiyonu
Neurologin 3	NLGN3-Xq28	Sinaps formasyon ve fonksiyonu
Neurologin 4	NLGN4-Xp22.33	Sinaps formasyon ve fonksiyonu
Neurexin 1	NRXN1-2P16.3	Neurologinler için transsnaptik bağlayıcı
SH3 & multiple ankyrin repeat domains	SHANK3-22q13	Post-sinaptik yoğunluğun düzenlenmesi&neurologin bağlanması
Contactin-associated protein-like 2	CNATNAP2-7q36	Nöronal migrasyon dahil contactin moleküller için sinaptik bağlayıcı ortağı
Deleted in autism	DIA1 (c3orf58)-3q	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Contactin 4 & Contactin 3	CNTN4&CNTN3-6p26-p25	Adezyon kuvvet molekülleri nöronal ekspresyonu
Protocadherin 10	PCDH10-4q28	Cadherin ilişkili nöronal reseptör
Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM-7q31	Nöronal hücre adezyonu
Methyl CpG binding protein 1	MECP2-Xq28	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Ubiquitin protein ligase E3A	UBE3A-15q11-q13	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Ataxin 2-binding protein 1	A2BP1 16p13	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Engrailed 2	EN2-7q36	Orta beyin ve serebellum gelişimi
Homeobox A1	HOX1-17p15.3	Arka beyin gelişimi
Homeobox B1	<i>HOXB1</i> -17q21-q22	Arka beyin gelişimi
Reelin	<i>RELN</i> -7q22	Nöron migrasyonunda sinyal proteini
WNT2	<i>WNT2</i> -7q31	Embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu ve belirlenmesinde
FOXP2	<i>FOXP2</i> -7q31	Embriyogenez ve nöronal işleyişteki transkripsiyon faktörleri
ARX homeobox geni	<i>ARX</i> -Xp22.13	Nöronal gelişimde
Patched domaincontaining 1geni	<i>PTCHD1</i> -Xp22.11	Nöronal gelişimde

Sodium channel, voltage-gated, type VII	<i>SCN7A</i> -2q	Sodyum kanal geni
Na⁺/H⁺ exchanger isoform 9	<i>SLC9A9 (NHE9)</i> -3q24	Sodyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	<i>CACNA1C</i> -12p13.3	Kalsiyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	<i>CACNA1H</i> -16p13.3	Kalsiyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1F	<i>CACNA1F</i> -Xp11.23	Kalsiyum kanal geni
GABA receptor subunits	<i>GABRB3, GABRA5, GABRG3</i> 15q11.2-q12	Beyinde major inhibitor nörotransmitter
Serotonin transporter	<i>SLC6A4</i> -17q11.1-q12	Nörotransmitter
Mitochondrial aspartate/glutamate transporter	<i>SLC25A12</i> -2q24	Mitokondrial fonksiyonu ve ATP düzeyini koruyucu
Oxytocin receptor	<i>OXTR</i> -3p26.2	Diğer
Laminin beta 1	<i>LAMB1</i> -7q31.1	Diğer
RING finger protein 8	<i>RNF8</i> -6p21.3	Ubikitin ligaz ve transkripsiyonel ko-aktivator

2.7. Otizm Dışındaki Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

2.7.1. Rett Sendromu

Yaygın gelişimsel bozukluklar içerisinde değerlendirilen hastalıklar içerisinde genetik bozukluğun tanımlandığı tek hastalıktır. Klasik Rett Sendromlu hastaların %96' sında X kromozomu üzerinde bulunan Methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) geninde mutasyon vardır. Klasik RTT, Varyant RTT ve hafif öğrenme güçlüğü ile giden tipi vardır. MECP2 mutasyonlu erkekler büyük çoğunluğu letal olduğu için hemen hemen daima sadece kız çocukları hastadır. Nadir hayatta kalan erkek hastalarda ise infantil ensefalopati, şizofreni, erken başlangıçlı bipolar bozukluğu olan bireylerin %1-2'sinde bu mutasyon görülebilmektedir. 6 ila 18 aylar arasında kazanılmış kabiliyetlerin gerilemesi, konuşmanın kaybı, özellikle elleri oynama şeklinde stereotipik hareketler, mikrosefali, mental gerilik ve epileptik nöbetleri ile karakterize nörogelişimsel bir hastalıktır (51).

X'e bağılı dominant geçiş gösteren Rett Sendromunda vakaların %99' undan fazlası de novo mutasyonlardan kaynaklanan izole vakalardır. Nadiren X inaktivasyonundan dolayı minimal bulguları veya hiç bulgusu olmayan taşıyıcı annelerden geçişi de görülebilir.

Klasik Rett Sendromlu hastalar yaşamın ilk 6-18 aylık döneminde normal bir psikomotor gelişim gösterirken, takiben kısa bir duraklama periyodu sonra da kazanılmış dil ve motor becerilerde hızlı kayıp göze çarpar. Diğer otistik bulgular ifadesiz yüz, göz teması kuramama, sese aşırı duyarlılık ve çevreye ilgisizliktir. Bulgular 4-7 yaş arasında sabitlenir, bariz kognitif ve motor bozukluk vardır ve sıklıkla epilepsi gelişir.

Rett Sendromunun 5 tane varyantı veya atipik formu tarif edilmiştir.

- 1- Kız çocuklarında 6 aydan önce epileptik nöbetlerin görüldüğü klasik RTT Sendromu formu: Bu formda MeCP2 mutasyonu negatif olmakla birlikte CDKL5 geninde mutasyon görülen vakalar vardır. Bu varyant formu X'e bağılı infantil spazm bulguları ile örtüşebilmektedir.
- 2- Konjenital veya prekoks RTT: Regresyona açık değildir ancak klinik bulgular RTT ile uyumludur. MeCP2 mutasyonu negatif, FOXP1 mutasyonu pozitif vakalar mevcuttur.
- 3- Regresyonun klasik formdan daha yavaş ve geç geliştiği form
- 4- Forme Fruste RTT sendromu: Bulguların daha hafif ve daha geç çıktığı formdur.
- 5- Konuşmanın korunduğu form.

2.7.2. Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu

YGB içerisinde değerlendirilir ve Heller Sendromu ya da dezintegratif psikoz diye de adlandırılır. Ortalama prevalansı 1.7/100 000'dir (52). Genellikle tamamen normal bir gelişim dönemini takiben geç başlangıçlı (<10 yaş) dil, oyun, motor ve sosyal beceriler gibi birçok alanda daha önceden kazanılan becerilerin kaybı ile karakterizedir. Bu becerilerin kaybı bir süre sonra yavaşlayabilir. Prognoz genel olarak iyi değildir. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte beyin ve sinir sistemi problemleri ile ilişkilidir. Bulgular arasında konuşmada gecikme ya da konuşamama, konuşmayı başlatma ve sürdürmede problemler, barsak ve mesane kontrolünde motor ve sosyal becerilerde

kayıp, aile bireyleri ve diğer çocuklarla ilişki kuramama sayılabilir. Bu bulguların bir kısmı OB bulguları ile örtüşür.

Dezentegratif terimi davranış ve kişilik değişikliklerini tanımlayan bir terimdir. Hastaların büyük çoğunluğunda otizme benzer davranış şekli görülür. Stereotipik hareketler, iletişim kurma becerilerin gerilemesi ve kaybı, sosyal etkileşimde problemler, anksiyete, korku, aşırı hareketlilik, dış ve idrar kontrolü gibi öz bakımda giderek kötüleşme görülebilir (53).

ÇDB' ye yönelik kesin ve kalıcı bir tedavi yoktur. Bu çocuklara tekrar dil, davranış ve sosyal becerileri kazandırmak amacıyla davranış terapisi faydalıdır. Hastalığı ortadan kaldıran bir ilaç tedavisi günümüzde yoktur. Fakat yenileyici davranış kalıpları ve saldırganlık sorunları için antipsikotik ilaçlar; epileptik nöbetleri kontrol altına almak için antikonvülsan ilaçlar kullanılır.

2.7.3. Asperger Sendromu

Asperger Sendromu (AS) Avusturyalı bir pediatrist olan Hans Asperger tarafından 1944 yılında tanımlanmıştır. AS sosyal etkileşimde bozukluklar, sınırlı ilgi alanı ile karakterize OSB içerisinde değerlendirilen bir hastalıktır. Dil ve bilişsel becerilerde gecikme olmaması ile diğer OSB'lerden ayrılır. AS 'li bireyler genellikle yalnızdırlar, fazla konuşmazlar, empati yapmazlar, rutin bir yaşantıları vardır, katı kuralları takip ederler. Tanı için gerekli olmamakla birlikte dilin anormal kullanımı ve motor sakarlık gözlenir (54). Tanı için IQ normal sınırlarda olmalıdır. Tanısı DSM-IV ve ICD-10 tanı kriterlerine göre konur. Otizm ile benzer bulguları olmakla birlikte ayırdığı noktalar da bulunmaktadır. AS' nin otizm spektrumunun yüksek fonksiyonlu bir hali mi yoksa farklı bir genetik antite olup olmadığı bilinmezliğini korumaktadır.

AS' nin kesin etiyolojisi henüz aydınlatılamamıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar yaygın gelişimsel bozukluğun nörobiyolojik faktörlerin ön planda olduğu bir hastalık grubu olduğu yönündedir. Yapılan prevelans çalışmalarında sıklığının 3,6-7/1000 arasında olduğu görülmüştür (55). Erkeklerde kız çocuklara oranla 5-15 kat daha sık görülür ve ortalama tanı koyma yaşı sekizdir.

AS olan bireylerde genelde dil gelişiminde problem beklenmemektedir, entelektüel kabiliyetler normal ya da yüksektir. Dilin gramer yapısını normaldir fakat zamirleri kullanmakta hata yaparlar. Bazen yenileyici kelimeler ve kelime türetme görülür.

Yaygın gelişimsel bozukluklarda dil gelişiminde bozukluk tipik olmakla birlikte AS' da dil problemlerinin daha az olduğu dikkati çekmektedir. Yeterli göz teması kurmama, stresli ve üzgün olduklarında diğer kişiler tarafından teselli edilme ve sevgi ihtiyacı duymama, mutluluklarını paylaşmama gibi sosyal etkileşimde bozukluklar göze çarpmaktadır. Aşırı uğraşlar ve ilgi alanlarında sınırlılık, bazı nesnelere aşırı bağlanma, basmakalıp ve yineleyici motor hareketler ve çevre ile ilgili değişikliklere aşırı tepki verme gibi davranış problemleri görülür.

Günümüzde yaygın gelişimsel bozuklukların tedavisine güncel yaklaşım farmakoterapi ile desteklenmiş özel eğitim ve davranış terapisiidir. AS' ye yönelik özgün farmakolojik ajan olmamasına rağmen sosyal uyumu kolaylaştırmak ve kontrolsüz davranışları düzenlemek için önerilmektedir.

2.7.4. Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk

OSB içerisinde kabul edilen Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (BTA-YGB), ilk kez 1980 yılında DSM-III' te kendine yer bulmuştur. BTA-YGB tanısını koyabilmek için bu grup içerisindeki yer alan diğer hastalıkların tanı kriterlerini iyi bilmek gerekir. Çünkü BTA-YGB bunların dışındaki hastaları tanımlamak için kullanılır. DSM IV-TR' de; karşılıklı toplumsal etkileşimde ağır ve yaygın gelişimsel bozukluk olmasının yanı sıra sözel ve sözel olmayan iletişim becerilerinde bozukluk olması veya basmakalıp davranış, ilgi ve etkinliğin bulunmasına rağmen özgül YGB tanı kriterlerini karşılamıyorsa BTA-YGB olarak adlandırılır. Otistik semptomu olan çocukların üç tanısız alanda tüm kriterleri karşılamadığında BTA-YGB olarak sınıflandırılabilir. Tanısız sınırları hakkında tartışmalar sürmektedir (56).

BTA-YGB' da etyolojiye yönelik kesin bir neden saptanamamıştır. OB olduğu gibi biyolojik ve genetik faktörler suçlanmıştır. Otizme oranla 1,5 kat daha sık görülmekte ve ortalama 15/10.000 sıklıkta görülmektedir.

Otizme benzer davranışsal ve gelişimsel problemler vardır, fakat daha geniş ve heterojen bir bozukluk grubudur. Otizmlili çocuklara oranla iletişim ve bilişsel beceriler daha iyidir. Sosyal ilişki esnasında olağandışı davranışlar ve yanıtlar görülebilir. Göz teması, beden duruşu gibi sözel olmayan davranışlarda da problem olabilir. Düşüncede katılık ve ilgi alanı kısıtlılığı sıklıkla görülmektedir. Zekaları sınır düzeydedir.

Otizmden farkı; otizmlı çocuklar daha kısıtlı ilgi alanı olması, hayali oyundan yoksun olmaları, başlangıç yaşının daha erken olması ve sözel olmayan iletişimin olmamasıdır (57). BTA-YGB'nin daha detaylı araştırılması ve diğer YGB' lar ile olan farklarına ve etyolojiye yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.8. Vitamin D

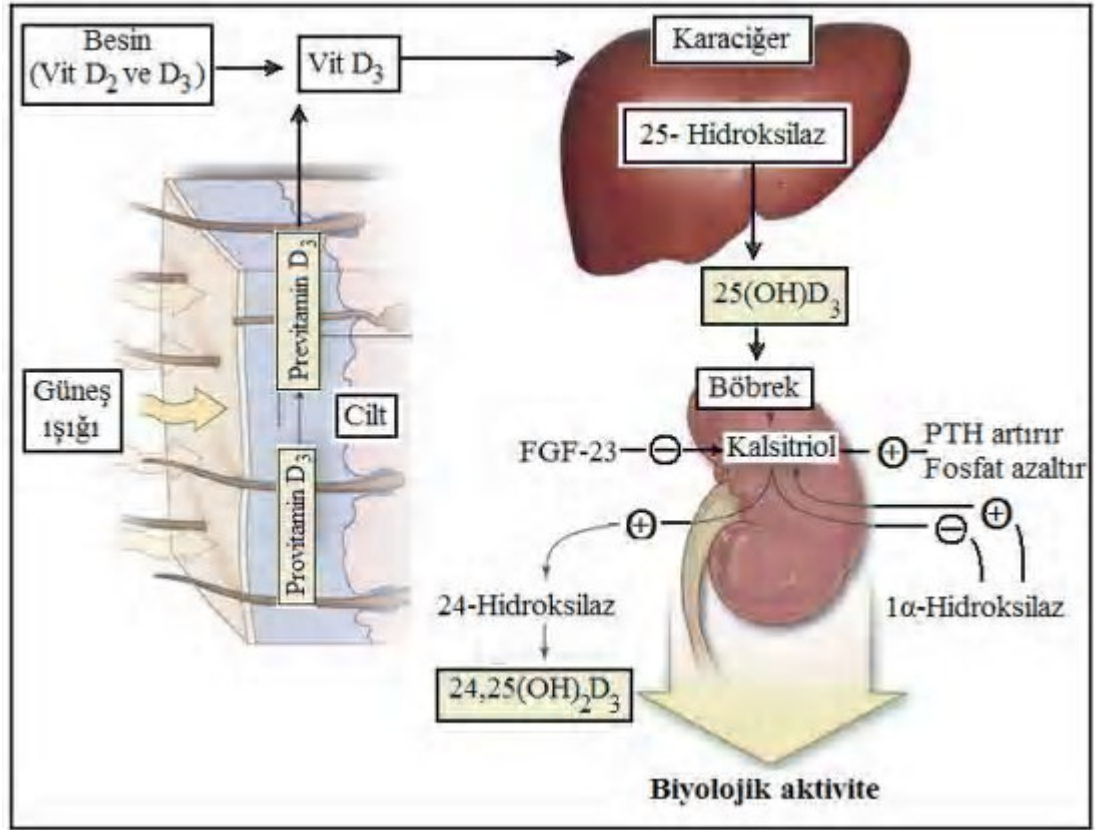
1928 Nobel tıp-fizyoloji ödülü; Vitamin D' nin keşfindeki rolünden dolayı Adolf Windausin' e verilmiştir. Vitamin D' nin kalsiyum hemostazı, hücrelerin farklılaşması gibi farklı dokularda hayati fonksiyonları vardır. Kalsiyum hemostazı ve kemik mineralizasyondaki görevi çok uzun zamandır bilinmektedir. Eksikliğinde bozulmuş kemik formasyonu, hipokalsemi ve büyüme geriliği ile seyreden rikets oluşur. Bunun yanında Vitamin D reseptör genindeki (VDR) mutasyonlara bağlı oluşan Vitamin D bağımlı rikets Tip2 ve PEX gen mutasyonuna bağlı oluşan X' e bağlı hipofosfatemik vitamin D rezistans rikets vardır (58,59). 25-hidroksi Vitamin D₃ ' ü aktif formu olan 1,25 dihidroksi Vitamin D₃ 'e çeviren 1 α -hidroksilaz enzimini kodlayan genin mutasyonlarında ise Vitamin D bağımlı rikets Tip1 oluşur.

2.8.1. Vitamin D' nin Metabolizması

Vitamin D' nin en önemli kaynağı deride gerçekleşen sentezdir. Güneşten gelen 290-310 dalga boyundaki ultraviyole B ışınları varlığında 7-dehidrokolesterolden enzimatik olmayan bir reaksiyonla ilk olarak previtamin D₃' e dönüştürülür. Daha sonra izomerizasyonla vitamin D₃ (3-kolekalsiferol) ' e çevrilir. Derideki melanin pigmentinin varlığı bu süreci olumsuz yönde etkiler. Bundan dolayı artmış deride pigmentasyonlu bireyler yeterli D vitamini sentezi için daha fazla güneş ışınına ihtiyaç duyarlar. Ekvatordan uzak kış güneşine maruz bireylerde D vitamini sentezi efektif değildir. Deriden sentez edilen D vitamini haricinde diyetle balık, balık yağlarından ve yumurtadan alınır.

Vitamin D; Vitamin D-binding protein aracılığıyla karaciğere taşınır ve burada 25-hidroksilaz enzimi 25-hidroksi Vitamin D (25(OH)D₃)'ye çevirir. 25(OH)D₃ dolaşımında en çok bulunan Vitamin D formudur. Yarı ömrü 20 gün olduğundan dolayı Vitamin D seviyesinin en iyi yansıtan parametredir (60). Vitamin D' nin aktif formu olan 1,25 dihidroksivitamin D₃ ' e ise böbrekte bulunan sitokrom P450 CYP27B1 enzimi (1 α -hidroksilaz) aracılığıyla çevrilir. Bu enzim böbrek distal tübülünden kuvvetli şekilde

eksprese edilir ve beyinde de ekspresyonu gösterilmiştir (61). 1α -hidroksilaz; hipofosfatemi ve parathormon varlığında upregule olurken, hiperfosfatemi ve $1,25D_3$ varlığında downregule olur. Eğer vücutta $1,25(OH)_2D$ seviyeleri yeterli ise bir kısmı sitokrom P450, CYP24A1 enzimi ile $24,25(OH)_2D_3$ ' ye çevrilir. Bu Vitamin D' nin daha az aktif olan formudur ve bu enzimin de beyinde varlığı gösterilmiştir (62).



Şekil 1: Vitamin D üretimi ve metabolizması (63).

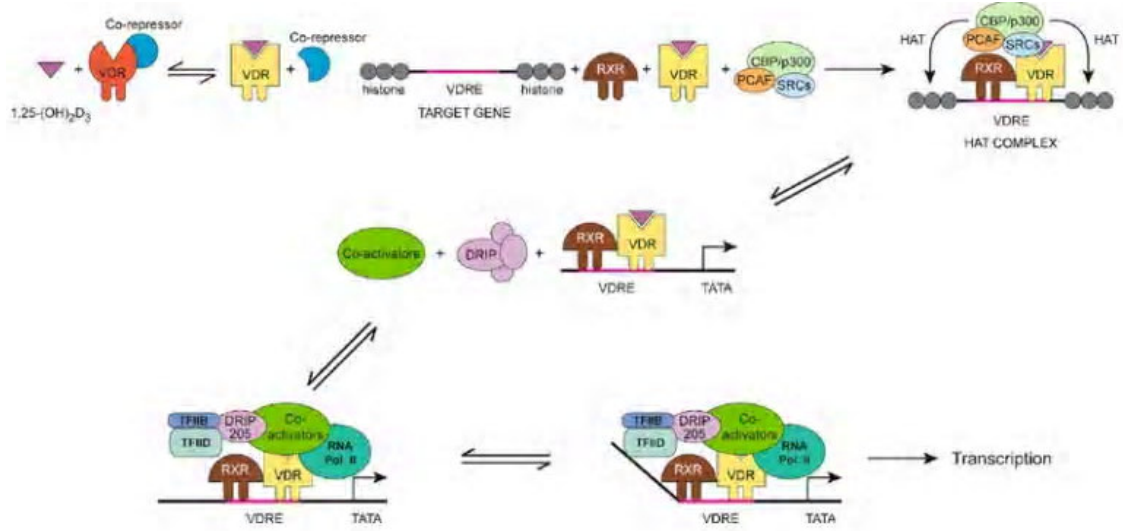
2.8.2. Vitamin D Eksikliği

Vitamin D eksikliği riketsin en yaygın nedenidir ve Vitamin D' nin kaynağı deride gerçekleşen sentez ve diyet ile alım olduğundan predispozan faktörlerden dolayı gelişmiş ülkelerde dahi yaygındır. Hastalara semptomatik hipokalsemi varlığında kalsiyum replasmanı gerekebilir. Akut dönemde tedavide $1,25(OH)_2D_3$ kullanılır. Radyolojik bulguları düzelmesi birkaç ayı bulabilir.

2.8.3. Vitamin D' nin Etki Mekanizması

D vitamini biyolojik etkilerinin çoğunu nükleer Vitamin D reseptörü (nVDR) vasıtasıyla gerçekleştirir. VDR nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesidir ve bağlanma ile indüklenabilir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (64). Bu aile steroid/tiroid hormonları, vitamin A, vitamin D gibi lipofilik ligand görevi gören 60' dan fazla nükleer reseptörden oluşur.

Vitamin D' nin hormonal formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hedef hücreye geldiğinde Vitamin D binding proteinden ayrılır. Hücre çekirdeğine girer ve VDR ile ilişki kurar. Hücre tipine bağlı olarak VDR; retinoik asit reseptörlerinden biriyle ($\text{RXR}\alpha$, $\text{RXR}\beta$, $\text{RXR}\gamma$) homodimer ya da heterodimer oluşturur. VDR homodimer yada VDR-RXR heterodimer spesifik enhancer elementlere (Vitamin D respons elementler olarak bilinir) bağlanır ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hedef genlerin promotörlerinde transkripsiyonu başlatır. VDR yoluyla bağlanma ile indüklenen transaktivasyonda; bağlanmada, bağımsız olarak VDR ile etkileşen koaktivatörler RNA polimeraz-2 ile başlangıç transkripsiyon kompleksi oluşumu için esansiyeldir (65). Bunlar SRC1/TIF2 (160 kDa'lık bir protein ailesi), CBP/p300 protein ailesi, SRA (bir RNA koaktivatör) ve diğerleridir (65,66). Bu koaktivatörler; gen ekspresyonunu aktive eden, kromatin yapısını değiştiren Histon asetilazlardır (HATs). Bunun yanında DRIP/TRAP gibi başka koaktivatör kompleksleri de tanımlanmıştır fakat bunların HAT aktivitesi yoktur (67,68). Koaktivatörlerin aksine, korepresörler SMRT ve NCoR; liganddan bağımsız tiroid reseptörü (TR) ve all trans retinoik asit (RAR) ile ilişkilidir ve bunlar ligandla indüklenen transaktivasyon fonksiyonlarını baskılar. Bununla beraber, bu korepresörlerin liganddan bağımsız VDR ile etkileşimi yoktur (69,70).



Şekil 2: Vitamin D' nin etki mekanizması ve hedef gen ekspresyon (71)

1980'li yılların ortalarında D vitamininin hücre membranında yer alan reseptörü mVDR' ye bağlanarak etkisini gösteren 1,25(OH)₂ D₃ hızlı etkisi keşfedildi. Bu etkinin birçok hücrede bulunan membran vitamin D reseptörü (mVDR) non-genomik sinyal iletimi gerçekleştiği gösterilmiştir (71,72). Kalsiyumun barsaklardan hızlı absorpsiyonu, osteoblastlarda voltaj kapılı Ca ve Cl kanallarının açılması, pankreas beta hücrelerinden insülin sekresyonu buna örnektir. Bu cevaplar oldukça hızlı şekilde nükleer VDR aracılı gen transkripsiyonunun sonucu olan cevaplardır.

VDR ve 1,25(OH)₂ D₃' nin kalp ve kan dolaşımına, insülin sekresyonuna, nöronal gelişimdeki etkileri düşünüldüğünde ilgili hastalıklarla bağlantıların araştırılmasına şiddetle ihtiyaç vardır.

2.8.4. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Üzerine Etkileri

Vitamin D'nin kemik metabolizması üzerine etkilerini şu şekilde özetleyebiliriz. Vitamin D bağırsak kalsiyum ve fosfor emilimini artırır. Bağırsak epitel hücrelerinde VDR' ye bağlanan D vitamini kalsiyum bağlayan proteinin sentezinde artışa neden olur ve kalsiyumun aktif transportunu artırır. Vitamin D'nin eksikliğinde kalsiyumun % 10-15'i emilirken, vitamin D varlığında diyetdeki kalsiyumun % 30-40'ı emilir (73,74).

Ayrıca D vitamini PTH ile birlikte hareket ederek kemik dokusu üzerine etki ederek kalsiyum mobilizasyonunu artırır. Bununla birlikte vitamin D böbreklerden de kalsiyum emilimini artırır ve bu etkisini PTH ile birlikte distal tübül hücrelerine etki ederek etkisini gösterir. Distal tübül hücrelerinden filtre edilen kalsiyumun % 1'i emilir.

Kalsiyum düşüklüğünde ilk olarak vitamin D bağırsaklarda kalsiyum ve fosfor emilimini artırır, eğer bu yeterli olmaz ise PTH kemik kalsiyumunu mobilize etmek amacıyla D vitamini sentezini artırır. PTH ve hipofosfatemi böbreklerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezini arttıran önemli faktörlerdir. PTH böbrek proksimal ve distal tübül hücrelerinde kalsiyum emilimini artırır iken fosfor atılımını artırır (74).

2.8.5. Vitamin D'nin Kemik Metabolizması Dışındaki Etkileri

Pek çok hücre ve dokuda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ varlığının saptanması ile vitamin D'nin farklı fonksiyonları olduğunu göstermiştir. Bağırsaklar, böbrekler ve kemik dokusu vitamin D metabolizmasının esas organları olmakla birlikte; hemen her hücrede (beyin, kalp, mide, pankreas, deri, meme, gonadlar, T ve B lenfositleri, monositler vs.) VDR vardır. Vitamin D'nin VDR aracılık eder. Ayrıca $25(\text{OH})\text{D}$ 'nin böbrek dışı dokularda da $1-\alpha$ hidroksilaz enzimi ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ye dönüşebildiği gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler D vitamininin otokrin ve parakrin düzenleyici görevleri olduğunu göstermektedir (74).

Bununla birlikte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve apoptozisin regülasyonunda görev alan çok sayıda geni kontrol eder. Aynı zamanda kazanılmış immün yanıtta önemli görevleri vardır. Enfeksiyonlara karşı doğal immün cevabın uyarılmasında rol oynar. Kanseri, psöriyazisi, multipl skleroz, tip I diyabet ve metabolik sendrom gelişimi üzerine etkileri yanında diğer bazı otoimmün hastalıkların gelişimi ile de ilgisi olabileceği ileri sürülmektedir (75). Bundan dolayı vitamin D'nin farklı dokulardaki görevleri hakkında yeni araştırmalara ihtiyaç vardır (74).

2.8.6. Vitamin D ve İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Vitamin D'nin sistemik kalsiyum hemeostazı ve kemik mineralizasyonu ile olan ilişkisi çok uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca 1980'den itibaren vitamin D'nin klasik olmayan etkileri aydınlatılmaya başlanmıştır. İmmün sistem hücrelerinde VDR ve CYP27B1 ekspresyonu tanımlanmıştır (76). Bulgular vitamin D'nin hem doğuştan hem de kazanılmış immünitede görevleri olduğunu göstermiştir (77).

Periferik kan hücreleri arasında eritrositler, lökositler ve trombositler yer alır. Lökositler; T ve B lenfositler, NK hücreleri, nötrofil, eozinofil, bazofil ve monositlerden oluşur. VDR yukarıda sayılan tüm lökosit hücrelerinde eksprese edilir.

2.8.6.1. Vitamin D'nin Doğal İmmünite Üzerine Etkileri

Doğuştan immünite patojenlere karşı ilk savunma mekanizması olup etkisi nonspesifiktir. Vücuttaki doğal immüniteden sorumlu hücreler NK (naturel killer), sitotoksik T lenfosit, makrofaj ve onların monosit öncülleridir. Bu hücrelerin görevleri hücre kalıntılarını, patojenleri fagosite etmek ve bunları ortadan kaldırmaktır. Bununla beraber makrofajların T hücrelerine antijen sunarak kazanılmış immün yanıtta da görevleri vardır (78). Makrofajların, dendritik hücrelerin, aktive T ve B lenfositlerin VDR eksprese ettikleri gösterilmiştir.

1986 yılında Rook ve ark. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün mikobakteriyum tuberkulozisin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (79). Ayrıca herediter vitamin D rezistans rikets hastalarından alınan makrofaj ve nötrofillerin etkin olmayan fungusidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (80). Vitamin D'nin doğal immünitedeki rolünün aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalarda Liu ve ark. mikobakteriyum tuberkulozis enfeksiyonunu taklit eden TLR2/1 aktivasyonu oluşturulduğunda makrofaj ve monositlerden VDR ve CYP27B1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (81). Bunun sonucunda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR transkripsiyon kompleksi VDRE ile ilişkiye girerek antimikrobiyal peptidler olan katelesidin ve defensin (DEFB4) ekspresyonuna neden olur. Bu antimikrobiyal peptidler spesifik nötrofil granüllerinde depolanır ve bakteriyel ve viral enfeksiyon varlığında salınır.

VDR; antimikrobiyal peptid olduğu bilinen yüzlerce genin transkripsiyonunu sağlar. Antimikrobiyal peptidler vücudun doğal antibiyotikleridir ve vücudu enfeksiyonlara karşı korur. VDR aynı zamanda mikroglia, schwann hücreleri, monosit, makrofaj gibi hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen ve bakteri, virüs, mantar, endojen inorganik maddeleri tanıyan TLR2 reseptörünün ekspresyonunu sağlar.

2.8.6.2. Vitamin D'nin Kazanılmış İmmünite Üzerine Etkileri

Kazanılmış immün yanıt; makrofajlar ve dentritik hücreler gibi hücreler tarafından sunulan antijenlere karşı T ve B lenfositlerin sitokin ve immünglobülinler üreterek ekzojen ajanlara karşı spesifik olarak savaşma yoluyla görevini icra eder (82). Vitamin D kazanılmış immünite üzerine inhibitör etki gösterir. Aktif D vitamini; B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşmesini inhibe eder, aynı zamanda da immünglobülin üretimini baskılar. Yine D vitamini, T hücre proliferasyonu üzerine baskılayıcı etki gösterir.

VDR'nin timus ve periferik T hücrelerinde eksprese edilmesi D vitamininin T hücre fonksiyonu ve gelişimi üzerine etkisi olduğunu göstermektedir. B hücrelerinde ise VDR ihmal edilebilecek seviyededir. Antijenle uyarılan T hücreleri sitokin üretme durumuna göre iki farklı tip T hücresi bulunur. Bunlar Th1 (enflamatuvar T-hücreler), Th2 (anti-enflamatuvar T-hücreler). Th1 hücreleri; proenflamatuvar sitokinler, IFN- γ , IL-2 ve TNF- α üretirler ve bu sayede kuvvetli hücrel immün cevaptan sorumludurlar. Th2 hücreleri ise anti-enflamatuvar sitokinler olan IL4 ve IL5 üretir ve antikör merkezli immün cevaptan sorumludurlar.

Vitamin D ve immün sistem ile ilgili çalışmalar hem T hem B hücrelerinde VDR ekspresyonunu göstermiştir. Th hücreler 1,25(OH) $_2$ D $_3$ için ana hedeftir ve Th proliferasyonunu inhibe ederek bu hücrelerden sitokin üretimini modüle eder (83,84). 1,25(OH) $_2$ D $_3$ Th1 sitokinlerini inhibe ederken, Th2 sitokinlerini artırır (85,86). Vitamin D' den etkilendiği bilinen üçüncü bir grup Th hücresi ise IL-17 sekrete eden T hücreleridir (Th-17 hücre). 1,25(OH) $_2$ D $_3$ IL-17 üretimini de süprese eder. Vitamin D' den etkilenen bir diğer T hücresi de immün cevabı baskılayan ve aşırı cevabı önleyen regülatör T hücreleridir (Treg) (87). B hücrelerinin VDR eksprese ettiği uzun yıllardır bilinmesine rağmen 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün B hücre proliferasyonunu ve immünoglobulin üretimini süprese etmesi Th aracılığıyla indirekt etki ettiği kabul edilirdi. Fakat çalışmalar B hücre homeostazında 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün direkt olarak plazma hücrelerini inhibe ettiğini teyit etmiştir (88).

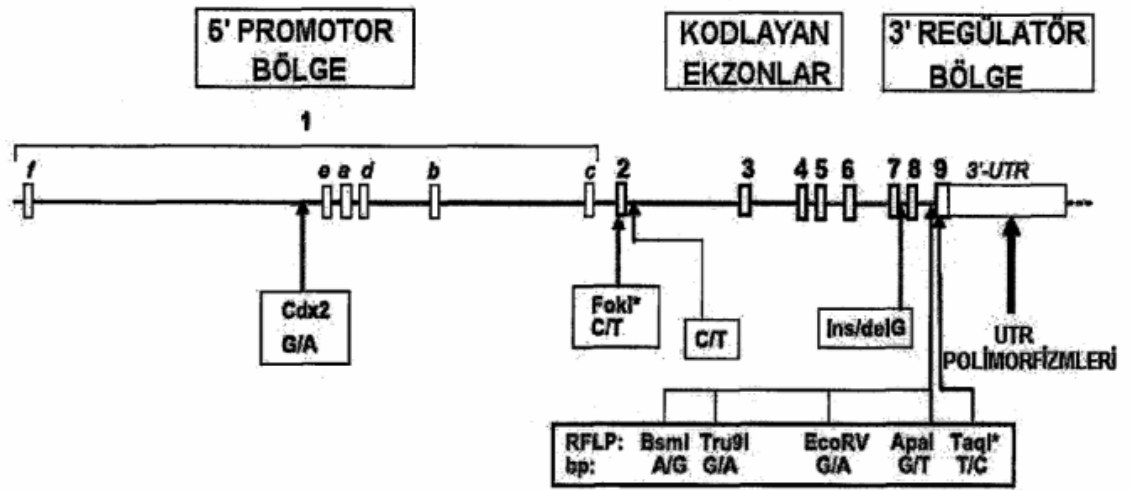
Sonuç olarak; aktif vitamin D'nin kazanılmış immüniteyi baskılaması; dendritik hücrelerin olgunlaşmasının süpresyonu ve böylece CD4 hücrelerine antijen sunumunun azalması, CD4 hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine diferansiyasyon ve proliferasyonunun inhibisyonu ve Th2 ve Treg hücrelerinin üretiminin artması yolu ile gerçekleşmektedir (82).

2.8.7. VDR Geni ve Polimorfizmleri

VDR geni 12q12'de lokalize, 8 translasyona uğrayan (ekzon 2-9) 6 translasyona (1a-1f) uğramayan ekzondan oluşur, 427 aminoasitten oluşan bir proteini kodlar (89,90). Farklı transkriptleri de tanımlanmıştır. Şu ana kadar VDR geninde 450' nin üzerinde polimorfizm tanımlanmıştır. Bunların dağılımı ve sıklığı etnik gruplara göre farklılık göstermektedir. En çok çalışılan SNP' ler; ekzon 2' de Fok1 ya da rs10735810, ekzon

8'de Apal ya da rs7975232, ekzon 9' da Taq1 ya da rs731236, ekzon 8' de Bsm1 yada rs1544410, ekzon 8' de Tru91 yada rs75343 dir (Şekil 3). VDR varyantları; Addison, insülin bağımlı diyabet, Graves hastalığı, multipl skleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (91,92).

VDR gen polimorfizmlerinin etkileri yer aldıkları lokalizasyona göre değişir. Örneğin Fok1 polimorfizmi; Dna binding domainde 5' sonlanma bölgesinin yakınında bulunurken, yukarıdaki diğer SNP' ler ligand binding domainde 3'UTR bölgesinde yer alır.



Şekil 3: Vitamin D üzerindeki gen polimorfizmleri

2.8.8. Vitamin D ve Beyin

Vitamin D ve çeşitlerinin beyinde bulunduğu dair ilk çalışmalar Stumpf ve ark. tarafından otoradyografik yöntemle yapılmıştır (93). Daha önce bahsettiğimiz üç vitamin D metabolitide insan beyin omurilik sıvısında tespit edilmiştir (94). CYP27B1 primer olarak böbrekte bulunur fakat yapılan immunohistokimyasal çalışmalar serebral kortekste, serebellar purkinje hücrelerinde, fetal insan beyinde, glial hücre kültürlerinde de varlığı gösterilmiştir (95). Hipotalamus supraoptik ve para ventriküler nükleusta, substansiya nigra da bulunur.

CYP24A1 mRNA'sı normal beyin dokusunda henüz tespit edilememiştir. Bununla beraber C6 glioma ve rat glial hücre kültürlerinde tanımlanmıştır. Hücre kültüründe

1,25(OH)₂D₃ ilavesi ile ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bütün bu kanıtlar Vitamin D' nin beyinde aktif olarak bulunup elimine edildiğini göstermektedir.

Vitamin D eksikliği göreceli olarak toksisitesine oranla daha sık görülmektedir. Gebelikte fetüs annenin vitamin D depolarını kullanır. Vitamin D' nin prodiferansiyasyon ve anti-apoptotik özellikleri düşünüldüğünde Vitamin D eksikliğin daha az diferansiye beyin ile ilişkili olacağı aşikârdır. Yine D vitamini eksikliği olan ratlarda apoptoz açısından farklı patern izler. 19.embriyonik günde herhangi bir farklılık yokken, 21. embriyonik günde D vitamini eksikliği olan ratlarda apoptotik hücreler kontrollere göre azalmış bulunmuştur (96). Bu azalma gelişen singulat, dentat giruslar, bazal gangliyonlar ve hipotalamusta izlenmiştir. Ve yine bu çalışmada hücre siklusunda ve apoptotik gen ekspresyonunda değişiklikler saptanmıştır (96).

Vitamin D eksikliğine maruz kalmış embriyonik beyinlerin anatomisi incelendiğinde kontrollere oranla daha büyük beyinleri olduğu saptanmış bununda artmış hücre proliferasyonu ve azalmış hücresel eliminasyonla ilişkili olduğu düşünülmüştür (97). Lateral ventrikül volümünde artışla beraber neokorteksin hafif inceliği dikkati çekmiştir. Bütün bunlar vitamin D eksikliği olan beyinlerin farklı bir gelişim paterni oluşturduğunu desteklemektedir.

Vitamin D eksikliği olan yetişkin ratların beyinlerinde yapılan gen ekspresyon ve proteomiks analizlerinde 74 gen ve 36 proteinin ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir. Bu genler ve proteinler kalsiyum hemostazı, nöronal ve sinaptik plastisite, nöronal transmisyon, oksidatif fosforilasyon, redoks dengesi, hücre döngüsü ve post-translasyonel modifikasyonlarda görevlidir (98). Çalışmalar D vitamini eksiklikli rat embriyolarında proliferasyonun arttığını gösterse de, Keilhoff ve ark. yaptığı çalışmada yetişkin hipokampusta nörogenezin azaldığı gösterilmiştir (99).

2.8.9. VDR ve Beyin

VDR beyinde ekspresyonuna ait ilk çalışmalar Alzheimer ve Huntington Koreli postmortem insan beyinlerinde yapılmıştır (100). İnsan Nöroblastoma hücre hatlarında da VDR ekspresyonu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan immunohistokimyasal çalışmalar ile VDR' nin insan beynindeki varlığı teyit edilmiştir (101,102). Eyles ve ark. yaptığı çalışmada VDR ekspresyonunun serebellumda granül hücrelerine sınırlı olduğu, Purkinje hücrelerinde olmadığı, hipokampüste güçlü aktivite gösterdiği ve tüm

santral sinir sisteminde varlığı gösterilmiştir (61). VDR, periferik nöronlarda da bulunur. Yapılan çalışmalar VDR' nin beynin gelişimi esnasında da fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir. Gelişen beyinde; fetal rat dorsal kök gangliyon hücrelerinde VDR ekspresyonu gösterilmiştir. Ratlarda 12.embriyonik günde, farelerde 11,5 günde tespit edilmiştir.

Yapılan knockout fare modelleri ile VDR sinyal yolağının olası etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 4 farklı VDR knockout fare modeli oluşturulmuştur. Bunlar ekzon 1-2 delesyonlu (Leuven grubu), ekzon 2 delesyonlu (Tokyo grubu), ekzon 3-5 delesyonlu (Boston grubu), VDR' nin birinci zinc finger bağlanma domaini (Münih grubu) modellerdir (103,104). Davranışsal çalışmalar Tokyo tipinde yapılmıştır. Oluşan truncated protein hala $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e bağlanabilir fakat gen transkripsiyonunu aktive etmede yetersiz kalır (105). VDR null mutant fareler doğduklarında fenotipik olarak normaldir, emzirmeden sonra büyüme geriliği gözlenir. Hipokalseminin haricinde alopesi, azalmış beden ölçüleri, motor koordinasyonda bozulma görülür. Bununla beraber anksiyete, yeniliklere karşı korku gibi çeşitli davranışsal problemler, vestibular fonksiyonlarda değişiklikler, beyinde kalsifikasyon, işitme kaybı ve erken yaşlanma görülmüştür (106-108).

2.8.10. Vitamin D ve Beyindeki Nörotransmitterler

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direkt ve indirekt olarak beyindeki adrenerjik, noradrenerjik, kolinerjik nörotransmitterleri etkilemektedir. Otizm, şizofreni, depresyon gibi nöropsikiyatrik hastalıklarda da bu nörotransmitterler seviyelerinde değişiklik olduğu düşünüldüğünde bu konuda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

2.8.11. Vitamin D' nin Beyin Gelişimine Etkileri

Vitamin D eksikliği olan beyinlerde yapılan çalışmalar D vitaminin beynin gelişmesi ve farklılaşması için hayati bir role sahip olduğunu göstermiştir. Doğumda beyin boyutlarındaki boyut artışı gibi yapısal değişiklikler atmış hücre proliferasyonu ve azalmış hücre eliminasyonu ile ilişkilidir (96,97).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ' in fizyolojik konsantrasyonlarında glutatyon gibi etkin anti-oksidan maddeleri artırabilir. Yine mezensefalik dokularda H_2O_2 gibi reaktif oksijen radikallerini alımını engellediği gösterilmiştir.

2.8.12. Otizm ve Vitamin D

Otizm ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalarda; monozigotik ikizlerde 40-90%, dizigotik ikizlerde %0-10 konkordans oranı; kız/erkek oranı ~1:4, Afrikalı Amerikalılarda artmış sıklık ve prevelansındaki son 20 yılda artış dikkati çeker.

Vitamin D ile otizm arasında ilişki olabileceğine ait ilk şüpheler epidemiyolojik çalışmalardan ileri gelir. Kış-ilkbahar döneminde doğan çocuklarda otizm sıklığında artış olduğu saptanmıştır (3). Vitamin D düzeyleri mevsimsel farklılık gösterdiği gibi enlemler arasında, siyah ırkta deri pigmentasyonunda artıştan dolayı ırksal olarak da farklılıklar gösterir (109-111). Yüksek enlemlerde doğan çocuklarda otizm prevelansının yüksek olduğu ve kuzey enlemlere göç eden Afrikalı göçmen ailelerde otizm prevelansının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (112,113). Otistik çocuklarda yapılan bir çalışmada metakarpal kemik inceliği saptanmıştır bunun da muhtemelen vitamin D eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür (114).

Meguid ve ark. yaptığı bir çalışmada OSB olan çocukların 25(OH)D₃ ve 1,25(OH)₂D₃ seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (115). İsveç’ te yaşayan Somali göçmeni ailelerde OSB riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (116). Bu hastalarda yapılan 25(OH)D₃ ölçümlerinde hastalar ile sağlıklılar arasında fark yoktu.

2.8.13. Vitamin D Ve Cinsiyet Farklılığı

Daha önce belirtildiği gibi OSB erkeklerde kızlara oranla 4 kat sık görülür. Östrojen ve testosteronun D vitamini metabolizması üzerine farklı etkileri vardır. Östrojen kalsitriol seviyelerini olumlu yönde etkilerken, testosteronun böyle bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bu da Vitamin D eksikliği olan kızların nöronal gelişimdeki eksikliklerden daha az etkilenmesine yola açabilir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.HASTA VE KONTROL GRUBU

Bu çalışmada, DSM-IV tanı kriterlerine göre otistik bozukluk tanısı almış 30 hastada ve sağlıklı 30 kontrolde periferik kandan VDR gen ekspresyon farklılıkları, VDR geni promotor metilasyonu ve VDR geni promotor bölgesindeki rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan çalışma izni alınarak (Karar No:2012/243) hasta ve kontrol grubu üyelerinin her birisine çalışmaya kendi rızaları ile katıldıklarını belgelemek amacıyla gönüllü onam formu doldurulmuş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun TSU-12-4035 onayı ile desteklenen bu araştırma bilim etiği çerçevesinde tamamlanmıştır.

3.1.1.Hasta Grubu

Eylül 2012-Mart 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Nöroloji Anabilim Dalı ve Çocuk Ruh Sağlığı Anabilim Dalında DSM-IV kriterlerine göre OB tanısı almış 4 kadın ve 26 erkek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastaların dismorfik muayeneleri yapılmış Tuberoskleroz, Angelman Sendromu, ciddi epileptik nöbetleri olan hastalar, Frajil X Sendromu düşünülen hastalar çalışmadan dışlanmıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması 7,1' di. Her bir hastanın 5 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.1.2.Kontrol Grubu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, OB hastalığı olmayan bu açıdan sağlıklı, benzer yaş ortalamasına sahip 4 kadın ve 26 erkek kontrol grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması 7,5 idi. Bu kişiler çalışmaya katılmayı onaylamış ve 5 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

VDR geninin kandaki ekspresyon düzeyini değerlendirmek için periferik kandan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Otistik bozukluğu olan çocuklar ile sağlıklı bireylerin VDR gen ekspresyonu RT-PZR yöntemi ile karşılaştırıldı. Kontrol geni olarak ACTB kullanıldı. Periferik kandan elde edilen DNA' lardan VDR geni promotor bölgesindeki rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi, VDR promotor bölge 16492 CpG adası metilasyon analizi yapılmış ve OB olan bireyler ile sağlıklı bireyler karşılaştırılmıştır. SNP' ler seçilirken transkripsiyon üzerine etki eden veya etki etme şüphesi olan SNP'ler seçilmiştir. Genin promotor bölgesinde yer alan rs11568820; transkripsiyon faktörü Cdx2' nin bağlanma bölgesini etkileyerek VDR transkripsiyonuna etki eder. rs4516035 (1A-1012) ' de yine promoter aktivitesini etkiler.

Bu çalışmanın tüm laboratuvar aşamaları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD' da gerçekleştirilmiştir.

3.2. KULLANILAN ALETLER

- LightCycler Real Time PZR Cihazı 480 II sistem
- Thermal Cycler (Corbet Model no:CG1-96,Avustralya)
- Qiagen Rotor Gene Q Real Time PZR Cihazı
- Mikro pipet seti (Gilson 0,5-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl ölçüm aralığında)
- Mikro santrifüj aleti
- Vortex (Heidolph),
- Spektrofotometre (Thermo Scientific Nanodrop 2000)
- Hibridizer (HLC),

- Santrifüj (Hettich Mikro 200R),
- Derin Dondurucu (-20°C) (Arçelik),
- Derin Dondurucu (-80°C) (Sanyo),

Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Sarf Malzemeleri Kitler

- Qiam DNA Blood Mini Kit (Kat. No:51104) (QIAGEN, Dusseldorf, Germany)
- Qiam RNA Blood Mini Kit (Kat. No:52304) (QIAGEN, Dusseldorf, Germany)
- EpiTect Methyl DNA Restriction Kit (Kat. No:335451) (SABiosciences, Frederick, MD)
- EpiTect Methyl qPCR Assay (Kat. No:335001) (SABiosciences, Frederick, MD)
- EpiTect Methyl qPCR VDR primer: MoPH16492-1A (CpG adası 16492) (Kat. No:335001) (SABiosciences, Frederick, MD)
- RT qPCR human VDR primer: PPH02123E (Kat. No:330001)-(SABiosciences, Frederick, MD)
- RT qPCR human ACTB primer:PPH00073G (Kat. No:330001)-(SABiosciences, Frederick, MD)
- RT First Strand Kit: cDNA sentez kiti (Kat. No:330401)-(SABiosciences, Frederick, MD)
- RT SYBR Green qPCR Mastermix (Kat. No:330500) (SABiosciences, Frederick, MD)
- Snpsig Real-time PCR Genotyping Kit (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK)
- Etanol
- Taq DNA polimeraz
- 2-Merkapto etanol
- Eppendorf Tüpler

3.3.YÖNTEMLER

ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN YÖNTEMLERE GENEL BAKIŞ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR); DNA'da yer alan ve dizisi bilinen iki bölge arasındaki 100 ile 600 baz içeren özgün bir segmenti enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan ve DNA dizisinin logaritmik amplifikasyonuna izin veren bir yöntemdir. 1980'li yıllarda yaptığı çalışmalarda bu yöntem Dr.Kary Banks Mullis tarafından keşfedilmiş ve kendisine kimya dalında 1993 Nobel ödülü kazandırmıştır. İn vitro ortamda nükleik asitlerin çoğaltılması, diğer bir deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonunun, bir tüp içinde gerçekleştirilmesidir. DNA molekülünün milyarlarca kopyasını kısa zamanda oluşturan bir tekniktir. Çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği replikasyon için gerekli maddelerle bir tüpe konarak, üç değişik sıcaklıkta çalışan denaturasyon, annealing ve ekstansiyon basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. Denaturasyon safhasında 94-95 °C'ye ısıtılan DNA' nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Annealing (yapışma) safhasında çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (45-60 °C' ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak ekstansiyon safhası primerlerin uzaması safhasıdır. En uygun sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini gerçekleştirir. Bu döngünün her tekrarlanışında özgül DNA bölgesi iki katına çıkarılmış olur. Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapılır (117).

Bir PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler;

-Kalıp DNA

-Oligonükleotidler: Bölgeye özgü ileri ve geri primerler

-Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTP)

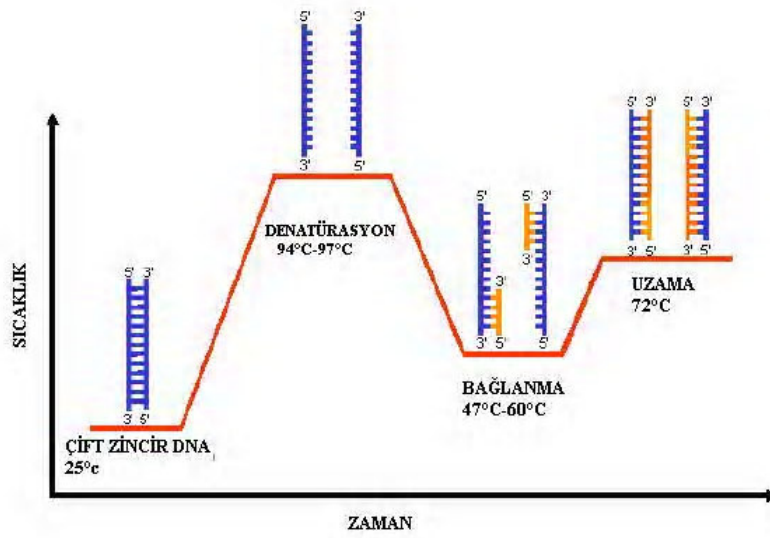
-DNA polimeraz enzimi: İlk ve en sık kullanılanı Taq DNA polimeraz enzimidir.

-Tampon çözelti: Tris-HCL, pH 8.8, (NH₄)₂SO₄, Tween® 20

-MgCl₂

Kullanım Alanları:

Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, adli tıpta, kanser genetiğinin araştırılmasında, problemlerin oluşturulmasında / klonlamada / gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) analizinde kullanılmaktadır.



Şekil 4: PZR döngüsünün sıcaklık aşamaları

PZR Çeşitleri:

Klasik PZR:

Hedeflenen dizisinin her iki ucuna spesifik primerler kullanılarak DNA polimeraz yardımıyla hedef bölgenin çoğaltılmasını sağlayan PZR türüdür.

Real-Time PZR:

Bir DNA örneğindeki bir ya da daha fazla spesifik dizinin hem tespiti hem de quantifikasyonuna olanak veren ve nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesi esasına dayanan bir PZR yöntemidir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR, reaksiyon sırasında her döngü sonunda oluşan ürün miktarının, boya ya da problemlerin hedef bölgeye hibridize olması sonucu oluşan ışımının (floresans) kamera ile tespitiyle gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir.

Multipleks PZR:

Klasik veya Real-time PZR'nin modifikasyonu ile iki veya daha çok farklı PZR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesi esasına dayanır. Klasik PZR ile aynı basamaklarda gerçekleşmesine rağmen her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılmaktadır.

Reverse Transcription PZR:

Viral RNA ve mRNA gibi RNA hedef dizilerinin çoğaltılması amacıyla kullanılır. Burada bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılmaktadır.

Nested PZR:

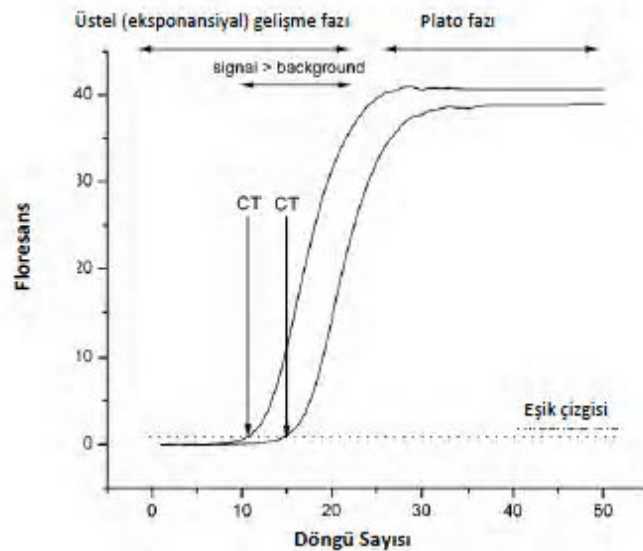
Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu bazen klasik PZR ile mümkün olmadığında Nested PZR yöntemleri uygulanır.

Tablo 4: Farklı PZR çeşitlerinin karşılaştırılması

PZR	HEDEF	UYGULAMA	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
KLASİK	DNA	DNA dizisinin amplifikasyonu ve araştırılması	En kolay uygulanan PZR tipi, düşük maliyetli ve az donanım gereksinimi	Amplifikasyon sonrası analiz gerektirir. Daha fazla zaman, araç/gereç harcanır. İnsan hatası ve kroskontaminasyon riski taşır. Elde edilen ürünün prob hibridizasyonu veya dizileme ile doğrulanması tercih edilir.
MULTİPLEX	DNA	İki veya daha fazla sayıdaki farklı DNA dizisinin aynı anda amplifikasyonu (Klasik ve Real time 'de uygulanır)	Çoklu hedef dizisinin tek bir reaksiyonda amplifikasyonu ile zaman ve araç/gereç tasarrufu.	Primer seçim olanakları sınırlıdır. Önemli ölçüde optimizasyon gerektirir. Çoğunlukla hassasiyeti ve özgünlüğü düşüktür.
REVERSE TRANSKRİPTAZ	mRNA, rRna, viral RNA	RNA'nın amplifikasyonu ve araştırılması	Tüm RNA çeşitlerinin amplifikasyonu	RNA'nın çabuk bozulması. Ek RT aşaması daha fazla zaman ve para gerektirir, kontaminasyon riski taşır.
NESTED	DNA	Eksternal ve internal primer takımları kullanılarak	Daha hassas, nonspesifik amplifikasyonun azaltılması	İlk amplifikasyon sonrası ürünün taşınması nedeniyle yanlış pozitif sonuç ihtimali var. İlk amplifikasyon aşamasından sonra örnek hazırlama için ek oda gereksinimi.
REAL-TİME	DNA	Hedef nükleik asit dizisinin kopya sayısının tespiti ile quantifikasyon	Hızlı, bağlı veya kesin hedef dizi kantifikasyonu. Genellikle amplifikasyon sonrası analize gerek duyulmaz. Prob ve melting curve (erime eğrisi) kullanıldığı için daha kesin sonuç. Daha az kroskontaminasyon riski vardır	Daha pahalı ekipman ve sarf malzeme gerektirir. Primer ve prob seçimi sınırlıdır. Doğrulama analizlerine (dizileme gibi) izin vermez

REAL-TIME PZR:

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç verebilen PZR yöntemidir (118). Bu teknoloji kantitatif Real-time PZR (qPCR), kinetik PZR olarak isimlendirilmektedir. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir (117). PZR sürerken meydana gelen ürünlerin saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. Kullanıldığı alanlar içerisinde; DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, patojen belirleme, tek nokta mutasyonlarını belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon araştırmaları, adli tıp, prenatal tanı, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi alanlar vardır. RT- PZR metodu oluşan ürüne bağlanan ve ışıma veren raportöre ihtiyaç duyar. Bu oluşan ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturur. PZR döngüleri sonunda oluşan kısa dizilere ampikon adı verilir. Başlangıç PZR döngülerinde, RT-PZR' da sinyal zayıftır. Bu sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik değere ulaşması için gereken siklus sayısına CT (threshold cycle = eşik değeri döngü) değeri adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri CT değeri aşmasının ardından logaritmik olarak artar (117).



Şekil 5: RT- PZR cevap eğrileri

Real-time PZR' da floresans raportörler kullanılır. Hedeflenen bölgenin kopyası sayısı arttıkça floresans raportörlerden alınan sinyal miktarında artış başlar. Temel olarak bütün RT-PZR sistemleri floresans boyaları algılar ve sonrasında bu floresans sinyalleri

ile oluşan PZR ürün miktarını korele ederler. En sık kullanılan floresans formatları aşağıda belirtildiğı üzere 2 sınıfa ayrılır.

1-Sekansdan bağımsız tarama analizleri:

-SYBR Green 1

-Ethidium Bromide

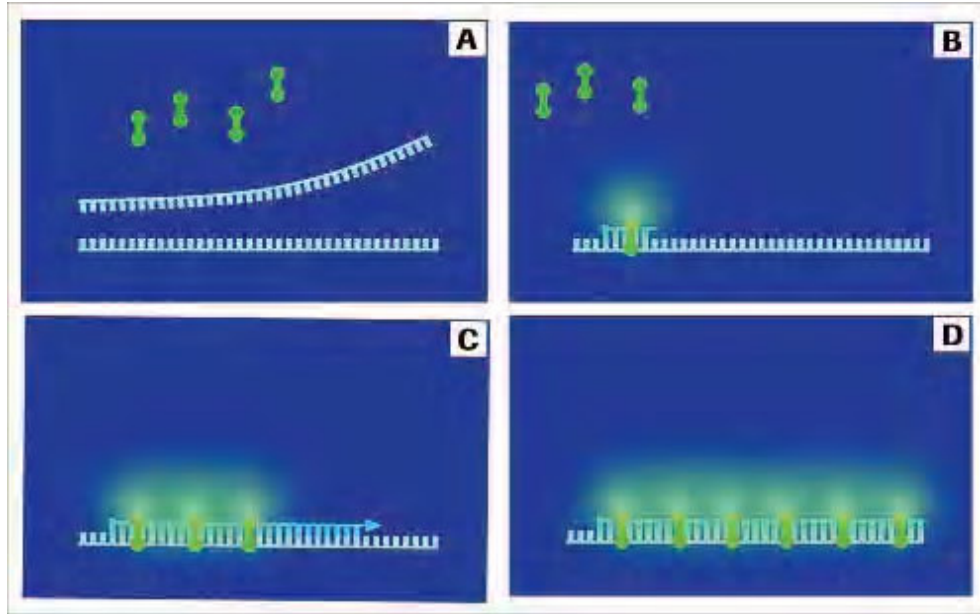
2-Sekans spesifik prob bağlanma analizleri

- TaqMan format (Hidroliz Probe)

-Hibridizasyon Probe

-Simple Probe

SBYR GREEN 1: Sekansa spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green 1 kullanılır. dsDNA'ya bağlanan floresan bir boya olup RT-PZR için basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Solüsyon içinde serbest durumda zorlukla floresans veren SYBR Green 1, DNA'ya bağlandığında ışıma miktarı büyük ölçüde artış gösterir. Sinyal miktarı ile oluşan ürün miktarı doğru orantılı olarak artar. Ve bu yöntem PZR' da kolaylıkla uygulanabilir çünkü ilaveten floresans işaretlenmiş oligonükleotidlere gereksinim duymaz. Ama optimizasyonu iyi yapılmalıdır çünkü hem spesifik hem de spesifik olmayan PZR ürünlerinin algılanması gibi bir durumda yanlış sonuç oluşabilir. Sybr Green herhangi bir dsDNA'ya bağlandığı zaman, boya farklı dsDNA türleri arasında ayırım yapmaz. Spesifik, non-spesifik ürünler, primer-dimerler aynı şekilde algılanır. Herhangi bir PZR artefaktı hedef sekansının konsantrasyonunda abartılı bir oranda artmasına sebep olabilir. Melting Curve analizi ile ürün ve primer-dimer arasında ayırım yapılabilir (117). Biz de ekspresyon analizinde SBYR Green boyasını kullandık.



Şekil 6: SYBR Green 1 varlığında PZR (117)

A-Denatürasyondan sonra DNA tek zincirli hale geliyor.

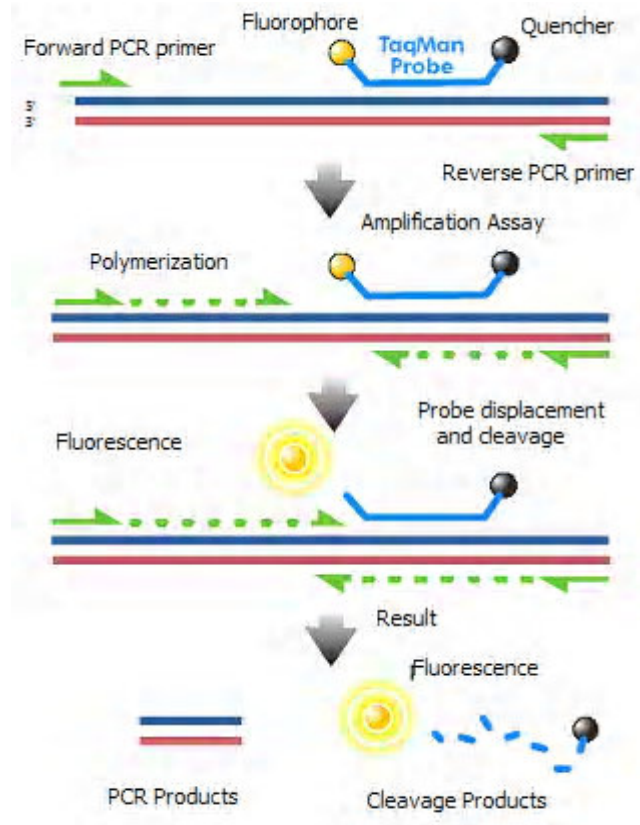
B-Anneling sırasında primerler hedef sekansla hibridize olur, SYBR Green 1 küçük bir bölgeye bağlanır. Bu sayede floresan ışımaya artar.

C-Elongasyon safhasında primerler uzar ve daha fazla boya bağlanır.

D-Elongasyonun sonunda DNA çift zincirli hale gelir ve maksimum boya bağlıdır.

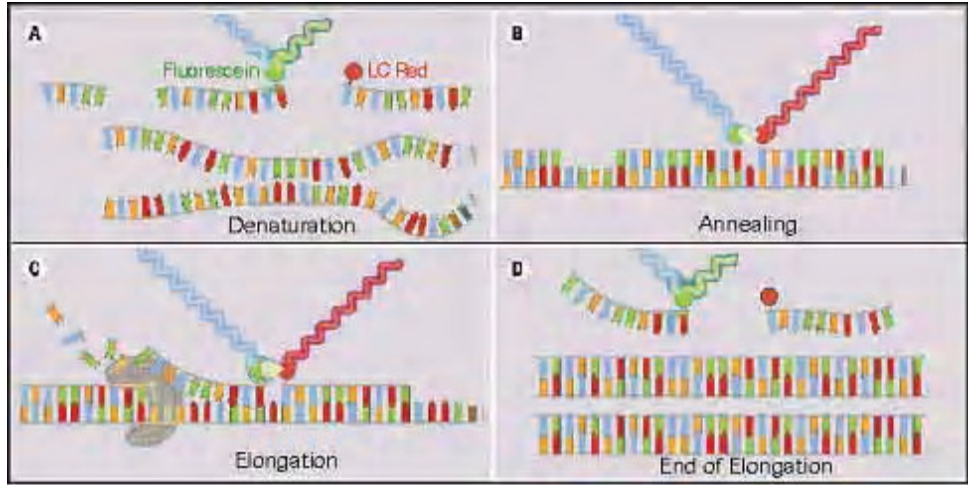
HİDROLİZ PROBLARI:

Hidroliz problemleri ya da Taqman problemleri; cDNA örneğindeki hedef dizinin miktar tayini için Taq polimerazın ekzonükleaz aktivitesini kullanırlar. Taqman yöntemi PZR reaksiyonu ile eş zamanlı gerçekleştirilen ve PZR süresince sonuçların görüntülenebildiği bir yöntemdir. TaqMan problemleri 5' ucunda floresan işaret molekülü (Raportör) ve 3' ucunda quencher yer alır ve probun primerlerden daha uzundur. Floresan molekül uyarıldığında enerji transferi quencher molekülden daha fazla olduğu için ışınım gerçekleşir. Problar PZR ürününün iç bölgesine bağlanırlar. DNA'da replikasyon olurken TaqMan probun 5' ucuna geldiği zaman ekzonükleaz aktivitesi ile probu kırar. Bu sayede raportör molekülü serbestleştiği ve quencher de uzaklaştığı için ışınım gerçekleşir. Işınım miktarı her siklusda kırılan prob sayısı ile orantılı şekilde artar. TaqMan problemleri daha az optimizasyon gerektirir (117).



Şekil 7: Taqman prop mekanizması (117)

HİBRİDİZASYON PROBLARI: Hedeflenen DNA dizisi çoğaltılır (amplifikasyon), oluşan tüm ampikonlar yavaş yavaş ısıtılırken floresan sinyali toplanır. . Bu sayede SNP grupları birbirinden ayrılır. Hidroliz problemlerinin aksine bu problemler amplifikasyon sırasında parçalanmazlar. Bundan dolayı amplifikasyonun hemen sonra ikinci bir işleme gerek olmadan erime eğrisi analizi yapılabilir. Hibridizasyon prob kullanımında, PZR'ın amplifikasyon fazında amplifiye olmuş kısmın spesifik bir dizisine hibridize olması için özel olarak dizayn edilmiş iki tane işaretli oligonükleotid kullanır. Bunlardan biri 3' ucundan floresin ile işaretlenmiş ve donör adı verilen bir prob, ikincisi ise akseptör adı verilen ve 5' ucundan LightCycler Red ile işaretlenen bir probdur. Bu etiketler, sadece oligonükleotidler hedef üzerinde doğru yerlere gelir ise birbirlerine çok yakın bulunurlar ve böylece floresan rezonans enerji transferini (FRET) mümkün kılarlar. Ortaya çıkan floresans miktarı, PZR sonucunda oluşan hedef DNA miktarı ile doğru orantılıdır (117).



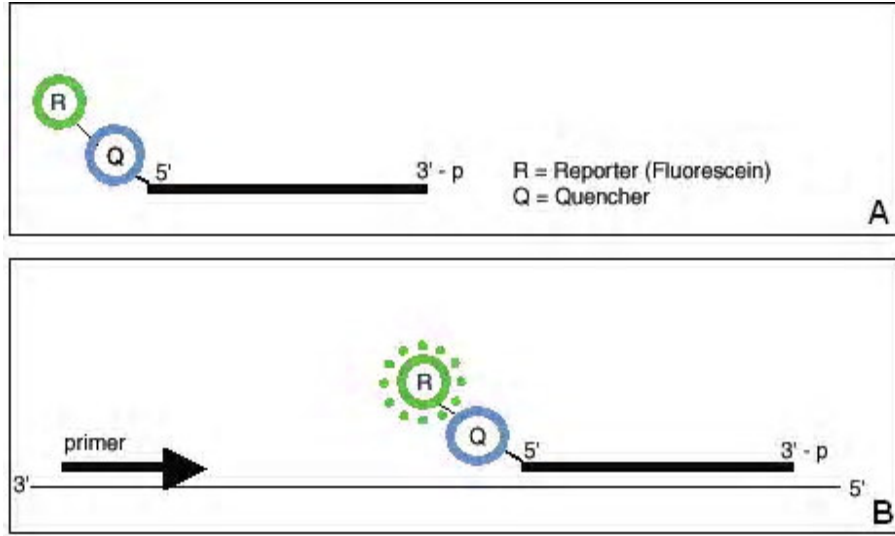
Şekil 8: Hibridizasyon problemleri varlığında. PZR (117)

Donör boya probunun 3' ucunda bir floresan etiketi ve akseptör boya probu 5' ucunda bir LightCycler kırmızı etiket bulundurmaktadır. PZR denatürasyon fazında hibridizasyon görülmemektedir (Şekil 8A). Serbest boyalar arasındaki mesafe enerji transferini engellediği için bu aşamada kırmızı akseptör boyasından floresan alınamayacaktır. Problar amplifiye olan DNA fragmanına baş-kuyruk düzeni içinde bağlanırlar ve hibridizasyon olur ve böylece 2 floresan boyanın yaklaşması sağlanır (Şekil 8B). Fluorescein yeşil floresan ışınım vermesi için LED tarafından uyarılır.

Not: Amplifikasyon sonunda her iki HybProbe problemler değişmemiştir, mutasyon ya da SNP taramalarında melting curve analizi yapılabilir.

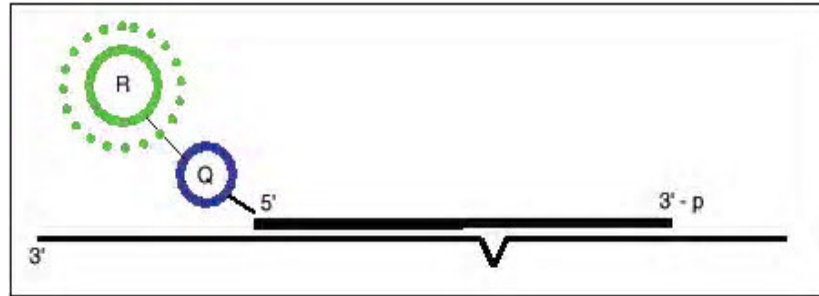
SİMPLEPROBE PROBLARI:

Mutasyon veya SNP'lerin tespitinde kullanılan basitleştirilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir. Bundan dolayı simpleProbe olarak isimlendirilen prob formatı, sekansa özgü olmayı başarmak amacıyla yalnız bir floresans ile etiketli tek bir hibridizasyon probunu içerir. Genellikle bu problemler bilhassa SNP ile ilişkili bölgeyi içeren bir hedef sekansa hibridize olması için tasarlanmıştır. Prob hedef sekans ile hibridize olduğunda SimpleProbe hibridize olmadığı zamankinden çok daha yüksek oranda floresans yayar. Sonuçta floresansdaki değişiklik sadece probun hibridizasyon durumunda ortaya çıkar. SimpleProbe problemleri mutasyon tespiti ve SNP genotiplendirmede mükemmel materyallerdir, çünkü bu problemler kolayca wild-tip, mutant ve heterozigot örnekleri sadece tek iplikli kısa bir prob ile belirlerler (117).



Şekil 9: SimpleProbe Analizi şematik şekli (117)

Şekil 9 SimpleProbe'un nasıl çalıştığını göstermektedir. Bir SimpleProbe probu kendisinin ya 3' ya da 5' sonlarından etiketlenebilir. Eğer SimpleProbe çözelti içinde serbest ise, raportör boyanın floresan yayması non-floresan quencher tarafından baskılanır (Şekil 9A). Probe hedef bölge ile hibridize olduğu zaman yani baskılanma azaldığında ve Lightcycler cihazının LED'i tarafından algılandığında probe yeşil floresans yayar (Şekil 9B). Ayrıca; probe hibridize olmadığı zaman bile, floresan 530 nm'de arka planda tespit edilebilir, bundan dolayı sinyal düşüktür.



Şekil 10: SimpleProbe formatı ile SNP tespiti (117)

SNP analizi için Lightcycler cihazı SimpleProbe'un erime davranışını ekranda gösterir. Sıcaklık arttığı zaman, floresan ölçülerek; probe-hedef hibritlerinin erime sıcaklığı tespit edilebilir. Erime sıcaklığının daha yüksek olması, SimpleProbe ve hedef sekans arasında hibridizasyonun daha karalı olduğunu gösterir. SNP'ler gibi mutasyonlarda SimpleProbe bağlanma stabilitesini zayıflatırlar.

3.3.1. Kandan DNA izolasyonu

Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak periferik kandan aşağıda belirtilen protokole göre DNA izolasyonu yapıldı ve nanospektrofotometre ile miktar tayini yapıldı.

1. 1,5 ml' lik ependorf tüpe 20 µl proteinaz K eklendi.
2. Üzerine 200 µl periferik kan eklendi.
3. 200 µl Buffer AL eklenip 15 saniye vorteks yapıldı. (Not: Proteinaz K, Buffer AL içine direkt eklenmemelidir)
4. 56°C' de 10 dakika inkübe edildi.
5. 200 µl % 96-100' lük Etanol eklenir. 15 saniye vorteks yapılır, kısa santrifüj yapıldı.
6. Miks spin kolona alınır. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpü değiştirildi.
7. 500 µl Buffer AW1 eklenir. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı.
8. 500 µl Buffer AW2 eklenir, 14 000 rpm' de 3 dakika santrifüj yapıldı.
9. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılır, 14 000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
10. 100 µl Buffer AE eklenir, oda sıcaklığında 1 dakika beklendi.
11. 8 000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
12. DNA elde edildi. Nanodrop ile konsantrasyonu ölçülüp -20°C' ye kaldırılırdı.

3.3.2. DNA saflığı ve konsantrasyonun ölçülmesi

İzole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop 2000 cihazında spektrofotometrik ölçümlerle hesaplandı. Spektrofotometrik okuma ~ 260nm ve ~280nm dalga boyunda, TE tamponu ile yapıldı. Nükleik asitlerin saflığı A260/A280 oranı ile de saptanabilmektedir. Bu oran ~1,8 olmalıdır.



Şekil 11: NanoDrop 2000 cihazı

3.3.3. SNP ANALİZİ

Taqman yöntemi PZR reaksiyonu ile eş zamanlı gerçekleştirilen ve PZR süresince sonuçların görüntülenebildiği bir yöntemdir. Taq DNA polimeraz enziminin 5' nükleaz özelliğinden yola çıkılarak geliştirilmiştir. Yöntemde SNP polimorfik bölgeyi içeren DNA dizisine spesifik forward ve reverse primerlere ilave olarak SNP bölgesi için alel-spesifik hibridizasyon problemleri bulunmaktadır. Dual-labelled problemleri olarak da adlandırılan bu tek zincirli oligonükleotitlerin 5' ucunda bir florofor ve 3' ucunda bir baskılayıcı yer almaktadır. Kullanılmakta olan birçok florofor (6-carboxyfluorescein, acronym: FAM, tetrachlorofluorescein) ve baskılayıcı (tetramethylrhodamine, dihydrocyclopyrroloindole tripeptide minor groove binder) mevcuttur. Prob herhangi bir yıkım işlemine maruz kalmadığı sürece florofor ve baskılayıcı birbirine yakın konformasyonda olacağından herhangi bir ışımaya oluşmaz. PZR reaksiyonu ile birlikte forward ve reverse primerler SNP bölgesinin içeren DNA zincirinin amplifikasyonunu başlatmakta ve bu süreç içerisinde alel-spesifik problemlerin spesifik bölgelere (yabanıl, mutant) hibridizasyonu gerçekleşmektedir. Taq DNA polimeraz enziminin forward ve reverse primerlerden başlayarak DNA zincirini uzatması sırasında 5'- 3' ekzonükleaz aktivitesi ile zincire bağlı konumdaki Taqman problemleri degrades olmaya başlamaktadır. Degradasyon sonucu florofor ve baskılayıcı boyaların birbirinden uzaklaşmasıyla floresans ışımaya meydana gelmektedir. Eğer alel-spesifik problemler ile DNA dizilimi arasında %100 eşleşme söz konusu değil ise erime sıcaklığı düşecek buna karşılık PZR reaksiyonu için tanımlanan profil ile gerekli döngü koşulları uymayacağından hibridizasyon gerçekleşmeyecektir (119).

Elde edilen DNA örneklerinden yukarıda belirtilen Taqman SNP propları ve Allelik diskrimnasyon yöntemi ile rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi aşağıdaki protokole göre Rotorgene Q5 (Qiagen, Almanya) cihazı ile yapıldı.

1. Bütün tüpler spin ve kısa santrifüj yapıldı.
2. Primer ve prop içeren reaksiyon miksi aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde her bir hasta ve kontrol için hazırlandı.

Tablo 5:Reaksiyon Miksi

Bileşen	Hacim
2X Precision Mastermix	10 µl
Genotyping primer/prop miks	1 µl
RNAse/DNAse Free water	4 µl
Toplam hacim	15 µl

3. Her bir reaksiyon için 15 µl reaksiyon miksi dağıtıldı.
4. 5 µl DNA örneği eklendi.
5. Pozitif kontrol dilüe edilerek 5 µl eklendi.
6. PZR programı aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde kuruldu.

Tablo 6: PZR programı

	Step	Zaman	Sıcaklık
	qPCR Enzim aktivasyonu	15 dak	95°C
10 siklus	Denaturasyon	10 saniye	95°C
	Ekstansiyon	60 saniye	60°C
35 siklus	Denaturasyon	10 saniye	95°C
	Ekstansiyon (Veri toplama)	60 saniye	68°C

3.3.4. Metilasyon Analizi

VDR geni promoter bölge metilasyonunu değerlendirmek için EpiTect Methyl qPCR kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Bu sistem CpG adalarındaki DNA metilasyonunu hızlı ve güvenilir şekilde tespit etmeye olanak tanır. Tüm insan gen promotorlarının yaklaşık % 60-70' nde GC den zengin CpG adaları yer alır. DNA metilasyonu temel olarak DNA dizisinde herhangi bir değişiklik yapmadan enzimatik olarak Sitozine bir metil gurubu takılması yoluyla CpG adalarında meydana gelir. Spesifik genlerdeki promoter bölgelerinin metilasyon yoluyla susturulması normal hücre diferansiasyonu, gelişim ve kanser gelişimindeki rolü iyi bilinmektedir. DNA metilasyonu transkripsiyonu baskımlarken, unmetilasyonu transkripyon seviyelerini artırır. DNA metilasyonu normal hücre gelişiminde, imprintingte, X kromozomu inaktivasyonunda esansiyel bir mekanizmadır.

EpiTect Methyl II PCR Sistemi; metilasyon sensitif ve metilasyon bağımlı restriksiyon enzimleri ile muamele sonrası DNA' nın değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu enzimler sırasıyla unmetile ve metile DNA' yı keser. Kesimden sonra her bireyin enzim ile muamelesinden kalan DNA promoter bölgeye spesifik primer kullanarak real time PZR yöntemi ile amplifiye edilir.

Hasta ve kontrollerden elde ettiğimiz DNA lardan VDR geni CpG adası 16492' nin metilasyon analizleri LightCycler 480 II Real Time PZR Cihazında yapıldı. Kullanılan yöntem aşağıda belirtildiği şekildedir.

DNA' nın kesilerek parçalara ayrılması

EpiTect Methyl DNA Restriction Kit (kat. no. 335451) kullanılarak yapıldı. Prosedür aşağıdaki şekildedir.

1. Aşağıda Tablo 7'de belirtildiği şekilde enzim hariç reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 7: Enzim hariç hazırlanan reaksiyon miksi

Bileşen	Hacim
Genomic DNA	Değişken
5x Restriction Digestion Buffer	13 µl
RNase-/DNase-free water	Değişken
Toplam Hacim	60 µl

2. Toplam hacim 60 µl olacak şekilde RNase-/DNase-free water eklendi. Miks içeriği vorteks ve santrifüj edildi.
3. Mo, Ms, Md, and Msd şeklinde 4 enzim kesim reaksiyonu aşağıda Tablo 8’de belirtildiği şekilde kuruldu.

Tablo 8: Enzim kesim reaksiyonu.

Bileşen	M_o	M_s	M_d	M_{sd}
Daha önce hazırladığımız reaksiyon miksi	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl
Metilasyon sensitif enzim A	-	0.5 µl	-	0.5 µl
Metilasyon dependant enzim B	-	-	0.5 µl	0.5 µl
RNase-/DNase-free water	1 µl	0.5 µl	0.5 µl	-
Toplam Hacim	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

4. Miksler nazikçe pipetaj yapıldı ve kısa santrifüj (3-5 saniye) edildi.
5. Her bir hasta için 4 tüp 37°C’ de 6 sa inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyondan sonra, 65°C’ de 20 dk enzimler inaktive edilerek reaksiyonlar durdurulur.
7. Ürünlerimiz çalışılmaya hazırdır.

PZR İşlemi

Prosedür

1. Her bir örnek için 4 kesim (Mo, Ms, Md ve Msd) için reaksiyonu miksi hazırlandı. PZR bileşenleri aşağıda Tablo 9’da şekilde ilave edildi.

Tablo 9: PZR hazırlığı

Bileşen	Mo	Ms	Md	Msd
PZR master miks	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
PZR primer miks	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
Mo digest	5 µl	-	-	-
Ms digest	-	5 µl	-	-
Md digest	-	-	5 µl	-
Msd digest	-	-	-	5 µl
RNase-/DNase-free water	6.5 µl	6.5 µl	6.5 µl	6.5 µl
Toplam hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

2. Miksler vorteks ve kısa santrifüj edildi.
3. 96' lık plate kullanıldı ve her bir reaksiyon için 25 µl miks dağıtıldı. Kontaminasyonu engellemek için birer aralıklı yerleştirildi. Seal ile kapatıldı.
4. Thermal cycler PZR protokolü aşağıdaki tablo 10'da belirtildiği şekilde kuruldu.

Tablo 10: PZR program.

Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
95°C	10 min	1
99°C	30 sn	3
72°C	1 dk	
97°C	15 sn	40
72°C	1 dk†	

† SYBR® Green flüoresan boyasının tanınıp kayıt edildiği aralık.

3.3.5.Kandan RNA İzolasyonu

Qiam RNA Blood Mini Kit (Kat. No:52304) (QIAGEN, Dusseldorf, Germany) kullanılarak periferik kandan aşağıdaki protokole göre RNA izolasyonu yapıldı ve nanospektrofotometre ile miktar tayini yapıldı.

1. 15 ml' lik falkon tüplerine 1 ml periferik kan 5 ml Buffer EL eklenir (1'e 5 oranında).
2. 10-15 dakika buzda inkübe edilir. İnkübasyon sırasında 2 kez vorteks yapılır.
3. 400g' de 10 dakika +4°C santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
4. 2 volum Buffer EL (2 ml) eklenir. Kısaca vortekslenir.
5. 400g' de 10 dakika +4°C santrifüj edilir. Süpernatant tamamen alınır ve atılır. Süpernatant iyi uzaklaştırılmazsa RNA' nın kolona tutunmasına engel olur.
6. 1 ml Buffer RLT' ye 10µl β-merkaptotanol eklenir. Bu örnekten 600µl Buffer RLT eklenir. Pipetajla homojenize edilir.
7. Mor renkli spin kolonlu tüpe lizat eklenir ve 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Spin kolon atılır. Homojenize lizat elimizdedir.
8. 1 volum (600µl) % 70' lik etanol eklenir. Pipetaj yapılır.
9. Materyal Qiam spin kolona transfer edilir.15 saniye 10 000 rpm' de santrifüj edilir.
10. Toplama tüpü değiştirilir.700 µl Buffer RW1 eklenir.15 saniye 10 000 rpm' de santrifüj edilir. Toplama tüpü boşaltılır.
11. Toplama tüpünü değiştirip üzerine 500 µl Buffer RPE eklenir. 10 000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilir.
12. Toplama tüpü değiştirilir ve üzerine 500 µl Buffer RPE eklenir.14 000 rpm' de 3 dakika santrifüj edilir.
13. Toplama tüpü değiştirilir, 14 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
14. 1,5 ml ependorf tüpe spin kolon aktarılır, üzerine 30 µl RNAaz free water eklenir.
15. 10 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.

16. RNA elde edildi. Nanodrop ile konsantrasyonu ölçülüp -80°C dolaba kaldırılır.

RNA Örneklerinin Spektrofotometrede Ölçülmesi:

Elde edilen RNA'nın miktarı ve kalitesi aşağıda verilen formüller ile spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm; 10 µl RNA üzerine 490 µl distile su eklenir (dilüsyon oranı 1/50). Elde edilen değer; dilüsyon oranı X 260nm'deki optik dansite değeri X 50 formülü uygulanarak µg/ml olarak konsantrasyon hesaplanır. Kalite için spektrofotometrenin iki dalga boyunda yaptığı ölçümler birbirine oranlanır. $260 / 280 = 1.5 \mu\text{g/ml} - 1.9 \mu\text{g/ml}$ olmalıdır.

3.3.6.VDR Geni mRNA Ekspresyonunun Araştırılması

Her bir hasta ve kontrol grubu için periferik kandan RNA daha sonra cDNA elde edildi. VDR ve housekeeping gen olarak ACTB mRNA ekspresyonu değerlendirildi. Primer olarak RT qPCR human VDR primer: PPH02123E (Kat.No:330001)-(SABiosciences, Frederick, MD) ve RT qPCR human ACTB primer: PPH00073G (Kat.No:330001)-(SABiosciences, Frederick, MD) kullanıldı.

Total RNA' dan cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden RT First Strand Kit: cDNA sentez kiti (Kat. No:330401)-(SABiosciences, Frederick, MD) kullanılarak Thermal Cycler cihazında aşağıdaki protokole uygun şekilde cDNA sentezi yapıldı.

1. RT² First Stand Kit içerikleri kısa (10-15 saniye) santrifüj edildi.
2. Steril PZR tüplerine genomik Dna eliminasyonu için aşağıdaki tablo 11'de belirtildiği şekilde DNA eliminasyon miksi hazırlandı. Pipetaj yapıldı ve kısa santrifüj edildi.

Tablo 11: Genomik DNA eliminasyon miksi

Bileşen	Miktar
RNA	25 ng-5 µg
Buffer GE	2 µl
RNase free water	Değişken
Toplam hacim	10 µl

3. Genomik DNA eliminasyon miksi 5 dakika 42°C inkübe edildi, sonra buz üzerine alındı.
4. Sonra aşağıdaki tablo 12'deki şekilde revers-transkripsiyon miksi hazırlandı.

Tablo 12: Revers-transkripsiyon miksi

Bileşen	1 reaksiyon için gerekli miktar
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Miks	2 µl
RNase-free water	3 µl
Toplam hacim	10 µl

5. Daha önce DNA eliminasyonu yapılmış miske, 10 µl revers-transkripsiyon miksi eklendi. Hafifçe pipetaj yapıldı.
6. 42°C' de 15 dakika sonra 95°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
7. Her bir reaksiyon tüpüne 91 µl RNAase free water eklendi. Pipetaj yapıldı.
8. Elde edilen cDNA' lar Real-time PZR protokolüne devam etmeden önce buz üzerine alındı.

Real-Time PZR Metoduyla Protokolü

Her bir hasta ve kontrolden elde ettiğimiz cDNA' lardan VDR ve beta-ACTN mRNA gen ekspresyonu analizi Real time PZR metodu ile aşağıda belirtilen protokole uygun şekilde yapıldı.

1. RT² SYBR Green Mastemix, RT² qPCR Primer Assay ve cDNA larımız kısa santrifüj edildi.
2. PZR miksimizi her bir hasta için aşağıdaki Tablo 13'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 13: Her bir reaksiyon için PZR miksi

Bileşen	Hacim
RT ² SYBR Green Mastemix	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT ² qPCR Primer Assay	1 µl
RNase free water	10,5 µl
Toplam hacim	25 µl

3. PZR içeriğini Rotorgene Corbet real time cihazına yüklendi.
4. PZR programı aşağıda Tablo 14’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 14:PZR programı.

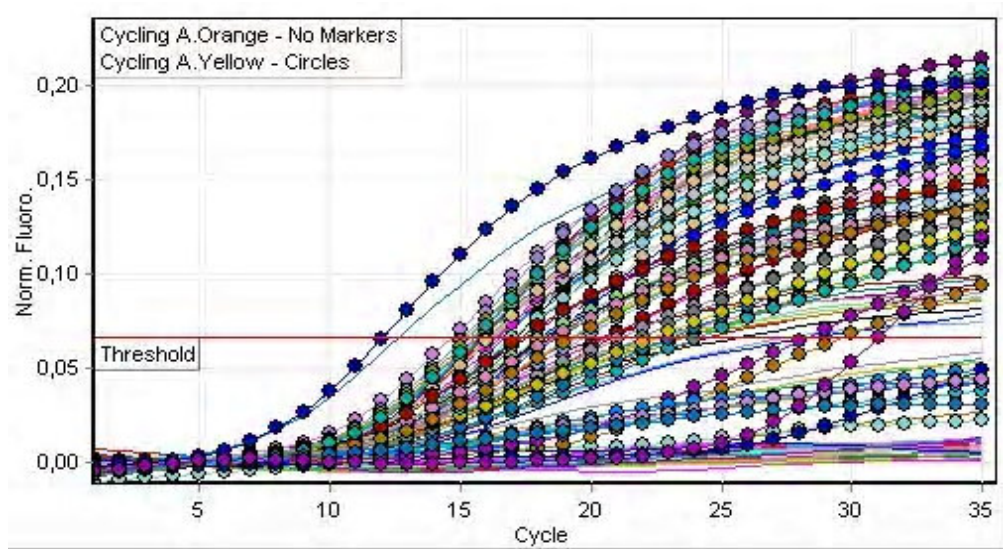
Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı	
95°C	10 min	1	Bu basamakta DNA Taq Polimeraz ısı ile aktive olmaktadır.
95°C	10 sn	45	DNA zincirinin uzaması Floresan ile veri toplama işlemi gerçekleştirilir.
60°C	30 sn		

Ekspresyon düzeyini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodundan yararlanıldı. Her bir örneğin PZR amplifikasyonu sırasında eksponansiyal faza geçtiği siklus tespit edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodundaki formülde yerine konuldu.

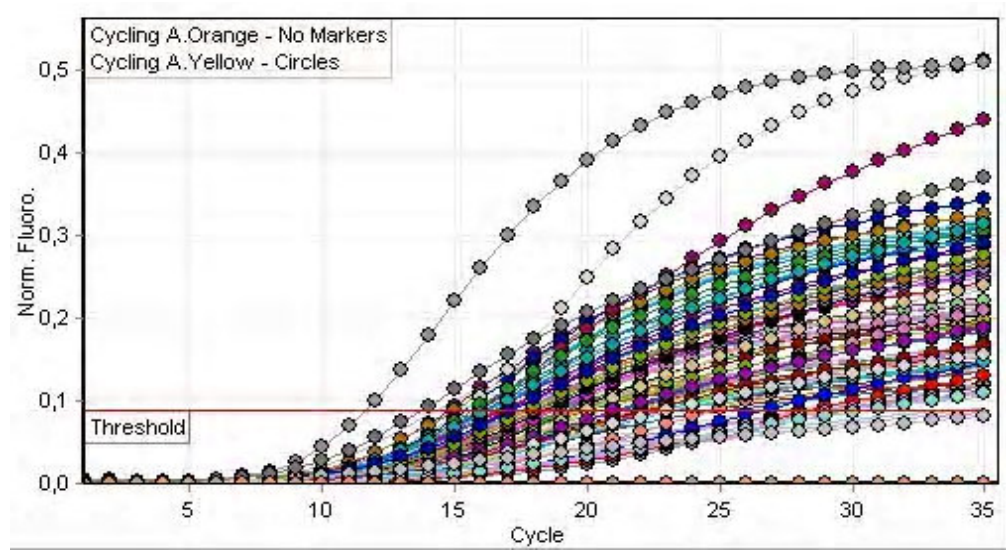
4.BULGULAR

4.1.VDR Promoter Bölge rs11568820 Ve rs4516035 SNP Analizi Sonuçları

Bu çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen floresans eğrilerine göre değerlendirilmiştir (Şekil 11 ve Şekil 12). VDR geni promoter bölgesinde yer alan rs11568820 nolu polimorfizmi GG, AG, AA genotiplerini içerebilmektedir. rs4516035 nolu polimorfizm ise TT, CT, CC genotiplerini içerebilmektedir. rs11568820 ve rs4516035 SNP'lerinin genotip yüzdeleri Tablo 15'te belirtilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 12: rs11568820 in floresans eğrisi



Şekil 13: rs4516035' in floresans eğrisi

Tablo 15: Otistik bozukluklu bireylerin ve kontrollerde VDR varyantlarının genotip frekansları ve genotiplere yönelik odds oranı.

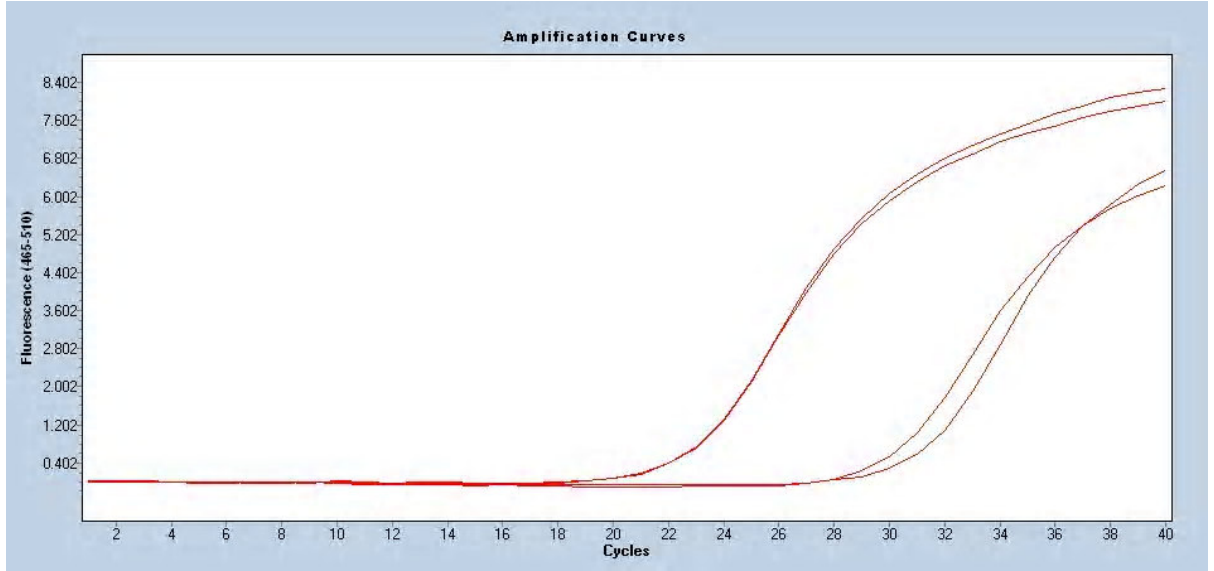
Relatif Pozisyon	Referans Sekans	Lokasyon ¹	Genotip	dbSNP (%) deki sıklığı ²	Vakalar N (%)	Kontroller N (%)	Odds Oranı (95% CI)	P değeri
Promoter	rs11568820	1E-1739	GG	68,3	22 (73,3%)	20 (66,7%)	1	0,61
			AG	30	5 (16,7%)	8 (26,7%)	0,568	
			AA	1,7	3 (10%)	2 (6,7%)	1,364	
Promoter	rs4516035	1A-1012	TT (AA)	30	11 (36,7%)	17 (56,7%)	1	0,11
			CT (GA)	50	17 (56,7%)	9 (30%)	2,919	
			CC (GG)	20	2 (6,7%)	4 (13,3%)	0,773	

¹Nejentsev ve ark (120). ve Fang ve ark (121). göre pozisyonlar.

²HapMap-CEU, AFD_EUR_PANEL yada VDR-LD Caucasian dan elde edilen genotip frekansları.

4.2.VDR promoter bölge Metilasyonu sonuçları

Bu çalışmada 30 OB'lu ve 30 sağlıklı kontrol örneği VDR geni promoter bölge CpG adası 16492 analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları içerisinde CpG adası 16492 unmetile allellere sahipti (Tablo 16).



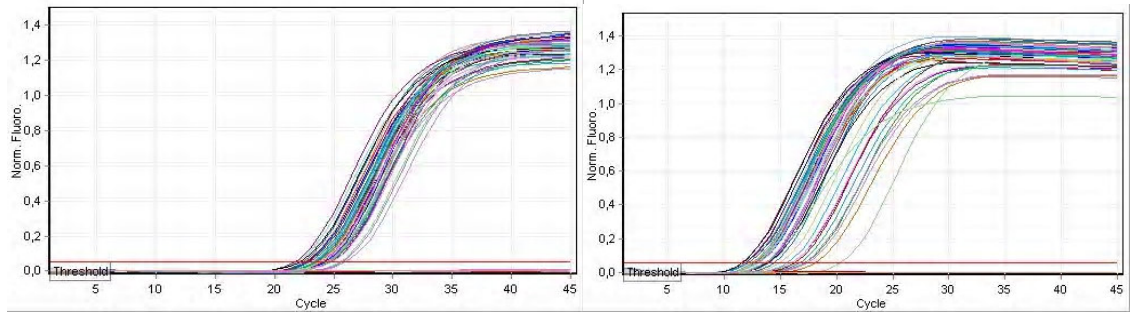
Şekil 14: İncelenen hastalardan 7 nolu hastanın amplifikasyon eğrisi.

Tablo 16: Metilasyon analizi sonuçları

	Unmetile	Metile
Hasta	30	-
Kontrol	30	-

4.3.Real-Time PZR metoduyla VDR geni mRNA ekspresyon bulguları

Bu çalışmada OB hastalığının moleküler patogenezi aydınlatmaya katkı yapmak amacıyla VDR gen ekspresyon düzeyi farklılıklarını bir house keeping gen olan ACTB genini kullanarak sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldı. OB hasta grubunda VDR gen ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı saptandı (Tablo 17). Farklı cinsiyetler arasında yapılan karşılaştırmada grup içi ve gruplar arası ekspresyon farkı saptanmadı.



Şekil 15: VDR ve ACTB geni için incelenen hasta ve kontrollerin amplifikasyon eğrilerinin görünümü.

Tablo 17: Hastaların ve kontrollerin VDR mRNA ekspresyon analiz sonuçları ve p değeri

	Hasta Median (min-max)	Kontrol Median (min-max)	p
VDR	1,2606690 (0,0051902-6,020987)	0,0005143 (0,0003752-0,0005767)	0,001

Not: $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiş ve koyu renkle gösterilmiştir.

Tablo 18: Hasta ve kontrol grupları VDR ve ACTB CT değerleri.

Olgu No	VDR CT	ACTB CT	Olgu No	VDR CT	ACTB CT
H1	22,66	11,87	K1	24,86	13,81
H2	24,56	13,71	K2	21,69	11,6
H3	23,89	12,86	K3	23,87	12,71
H4	23,83	16,1	K4	23,45	12,07
H5	24,11	16,09	K5	23,33	12,57
H6	23,45	14,05	K6	24,57	13,65
H7	24,89	14,46	K7	23,69	12,9
H8	22,7	12,64	K8	24,71	12,59
H9	24,71	17,3	K9	24,15	13,67
H10	23,29	12,78	K10	24,32	13,67
H11	22,46	12,7	K11	24,33	13,12
H12	23,52	13,96	K12	22,9	12,24
H13	22,77	15,67	K13	24,95	13,72
H14	22,5	11,64	K14	23,53	12,18
H15	23,6	15,05	K15	23,08	12,17
H16	25,58	20,44	K16	23,77	12,91
H17	21,15	12,74	K17	23,6	12,77
H18	21,94	12,2	K18	23,99	13,07
H19	21,94	13,14	K19	22,18	11,65
H20	23,37	12,8	K20	23,37	12,65
H21	22,36	12,04	K21	21,75	10,82
H22	23,37	17,17	K22	22,42	10,64
H23	26,09	22,94	K23	23,69	11,66
H24	24,31	17,49	K24	23,46	12,71
H25	23,92	16,33	K25	24,57	13,7
H26	23,95	18,17	K26	24,05	12,97
H27	23,8	12,69	K27	24,49	13,11
H28	24,59	16,79	K28	22,59	11,02
H29	22,46	12,67	K29	25,73	13,73
H30	22,7	11,94	K30	23,31	10,98

4.4.Hastalardan Yapılan Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Yukarıda belirtilen analizlerle eş zamanlı olarak OB hasta grubundan periferik kandan kalsiyum, fosfor, alkaleen fosfataz, 25OH Vitamin D düzeyleri bakıldı. Proje bütçesi sınırlı olmasından dolayı kontrol grubu değerlendirilememiş ve karşılaştırma olanağı bulunamamıştır. Sonuçları tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19: Hasta grubu biyokimyasal analiz sonuçları

	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (u/L)	25-OH Vit D3 (ulg/L)
Ortalama	9,62	4,73	191,4	35,5
Standart deviasyon	0,36	0,55	47,5	13,6
Minimum	8,8	3,8	177	14,8
Maksimum	10,4	6,02	255	80
Referans aralığı	8,4-10,6	2,3-4,7	0-500	Yaz:20-120 Kış:10-60

4.5.Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Bu araştırmada verilerin analizi IBM SPSS Statistics 21.0 (Chicago, ILL, USA) programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası genotip karşılaştırmalar Pearson ki-kare analizi ile ekspresyon karşılaştırmaları Mann-Whitney U testleri ile değerlendirildi. Genotiplere göre ekspresyonların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Veriler frekans ve yüzde, ortanca ve minimum maksimum değerleri ile ifade edildi. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi.

5.TARTIŞMA

Otizm; YGB içerisinde yer alan iletişim ve sosyal etkileşimde bozulma, kısıtlı ilgi alanı ve tekrarlayan stereotipik hareketler ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Mental gerilik, epileptik nöbetler eşlik edebilen bulgular arasındadır. Yaşamın ilk üç yılında hastalar tanı alır ve yaşam boyunca etkileri devam eder.

Yapılan ikiz çalışmaları bu hastalığın genetik komponentinin önemine işaret etmektedir (122). Konkordans oranı monozigotik ikizlerde %40-90 iken dizigotik ikizlerde % 0-10'dur (123,124). Fakat hastaların çoğunun tek gen hastalıklarında olduğu gibi mendel kalıtımına uymaması bize kompleks genetik yatkınlıktan söz edilebileceğini düşündürmektedir. Fakat otizmin biyolojik temeli hastaların büyük kısmında aydınlatılamadığından dolayı aday genlerin araştırılması büyük önem kazanmaktadır. Olası aday genlerin keşfi bizim bu hastalığın fizyopatolojisini, nörogelişimsel süreçleri anlamamızı sağlayacak ve hastalara daha hızlı tanı koyma ve olası tedavi imkanları sunacaktır.

Bu çalışmada sağlıklı kontroller ile OB tanısı almış çocuk hastalarda VDR geninin periferik kandan mRNA ekspresyonu, VDR geni promotor bölgesindeki rs11568820 ve rs4516035 SNP analizi ve VDR geni promoter bölge 16492 CpG adası metilasyonu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Vitamin D₃; etkisini reseptörü olan VDR aracılığıyla gösterir. VDR geninde bulunabilen polimorfizmler VDR'nin ekspresyonu ve proteinin stabilitesini etkileyebilmektedir. 5' regülatör bölgede yer alan Cdx2 VDR'nin transkripsiyonel aktivitesini etkilediği

bilinmekte iken, 3' UTR da yer alan BsmI, ApaI ve TaqI polimorfizmleri VDR mRNA' sının stabilitesi ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. Translasyon başlangıç kodonunda bulunan FokI polimorfizmi ise VDR' de üç aminoasit fazla bir protein oluşturur ve proteinin fonksiyonunu etkiler. VDR'nin promotor bölgesinde bulunan rs11568820 polimorfizmi transkripsiyon faktörü Cdx2'nin bağlanma bölgesini etkileyerek VDR'nin transkripsiyon düzeyine etki eder. rs4516035 de yine promoter aktivitesini etkiler.

Literatürde OB hasta grubunda yapılan Yan ve ark.'nın yaptığı VDR geninin kodlayan bölgelerinin sekans analizi ile değerlendirdiği araştırma haricinde bir çalışma yer almamaktadır. Yan ve ark. 100 şizofreni, 24 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, 24 bipolar bozukluk, 20 alkol bağımlılığı ve 24 Otistik bozukluk hastasında VDR geninin kodlayan bölge varyantlarını araştırmıştır. Fakat 24 OB'lu hastada VDR geninin kodlayan bölgesinde herhangi bir mutasyon ve SNP tespit edilmemiştir (125). Bizim çalışmamızda Yan ve ark. çalışmasından farklı olarak OB'li hastalar ve sağlıklı kontrollerde VDR geni promotor bölge rs11568820 ve rs4516035 polimorfizmlerinin allel ve genotip dağılımları karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca VDR geni promotor bölge 16492 CpG adası metilasyon analizinde hasta ve kontrol grubunda metilasyon tespit edilmemiştir. Her iki SNP genotipleri ile VDR gen ekspresyonları arasında yapılan karşılaştırmada da istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Dolayısıyla bu iki SNP ve VDR 16492 CpG adası metilasyonunun OB fizyopatolojisinde rol oynamadığı düşünülebilir. Hasta sayısı sınırlı olmakla birlikte bu hasta grubunda VDR gen ekspresyonunu yukarıda bahsi geçen SNP'lerin ve promotor metilasyonunun etkilemediği düşünülmüştür.

Gebelikteki düşük maternal Vitamin D seviyelerinin doğacak çocuklarda intrauterin büyüme geriliği, azalmış kemik mineral yoğunluğu ve tekrarlayan hırıltı gibi sağlık sorunları ile ilişki olduğu bilinmektedir (126,127). Bunların yanında maternal Vitamin D eksikliğinin OSB için artmış riskle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bu hipotezi destekleyen bulgular epidemiyolojik çalışmalar ve OSB'nun gebeliğin 1. ve 2. trimesterini kış ve ilkbahar aylarında geçirmiş çocuklarda daha sık gözlenmesidir (128). Gelişen fetus tamamen annenin Vitamin D depolarına bağımlıdır. Birinci ve ikinci trimesterde düşük Vitamin D düzeyleri gelişen beyin ve sinir sistemi için önemli olan bu dönemi etkileyebileceği düşünülmektedir (129,130).

Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda; gebelikte düşük maternal 25(OH)D₃ seviyeleri yavru­larda atipik davranışlar ile ilişkili bulunmuştur (97). İnsanda yapılan çalışmalarda ise; Gale ve ark. 466 gebede üçüncü trimesterde 25(OH)D₃ düzeyleri incelenmiştir. Doğan çocuklar 9 yaşına geldiğinde bu çocukları davranışsal ve verbal IQ açısından değerlendirmiştir ve 25(OH)D₃ düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (130,131).

Whitehouse ve ark. prospektif olarak yaptığı çalışmada 18 haftalık gebelerden maternal 25(OH)D₃ düzeyleri bakılmış ve doğan çocuklar davranışsal, duygusal ve dil gelişimi açısından incelenmiştir. 25(OH)D₃ düzeyleri ile davranışsal ve duygusal gelişme arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Fakat ikinci trimesterde düşük 25(OH)D₃ düzeylerine sahip annelerin çocuklarında, normal 25(OH)D₃ düzeylerine sahip annelere oranla orta çocukluk döneminde 2 kata yakın dil gelişiminde bozukluk saptanmıştır. Dil gelişimindeki bozukluk; OSB'nun önemli bulgularından biridir. Whitehouse ve ark. yaptığı çalışma maternal 25(OH)D₃ dil gelişimi arasında ilişki olabileceğini göstermiştir (132).

Bununla beraber 929 rastgele seçilmiş gebede 18.haftada alınan 25(OH)D₃ seviyeleri ve doğan çocukların 21 yıllık prospektif olarak değerlendirildiği çalışmada doğan 406 çocuktan 3'nde OSB gelişmiştir. Bu 3 hastanın tanıları ve 25(OH)D₃ seviyeleri; 78 nmol/l (Otistik Bozukluk), 63 nmol/l (BTAYGB), 65 nmol/l (Asperger sendromu) şeklindedir. Bu hastaların annelerinden 18.haftada bakılan 25(OH)D₃ seviyeleri düşük değildi ve bu popülasyon ortalamasından yüksekti. Fakat düşük 25(OH)D₃ seviyelerine sahip annelerin çocukları Dikkat eksikliği subskalasında artmış riskle ilişkilendirilmiştir (130). Yani düşük 25(OH)D₃ seviyeleri ile OSB arasındaki olası ilişkinin oldukça karmaşık olduğu davranışsal, sosyal ilişki bozukluğu ve tekrarlayıcı hareketler gibi bulgulara yönelik daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim çalışmamızda OB hasta grubundaki hastaların Ocak-Şubat 2013 aylarında 25OHD₃ düzeylerine bakıldı. Ortalama 25OHD₃ düzeyi 35,5 ulg/L; en yüksek 80 ulg/L; en düşük 14,8 ulg/L olarak tespit edildi. Fakat çalışma bütçesindeki sınırlılıktan dolayı sağlıklı kontrol grubunda 25OHD₃ düzeylerine bakılamadı ve karşılaştırma imkanı bulunamadı.

Vitamin D'nin nöroenez ve sinir iyileşmesinde rolü olduğuna dair çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Chabas ve ark. çalışmada rat peroneal sinir travmalı hayvan modelinde

kolekalsiferolün önemli ölçüde lokomotor ve elektro fizyolojik iyileşme sağladığını göstermiştir (133). Yine bu çalışmada Schwann ve DRG hücre hatlarına $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eklenerek Vitamin D bağımlı yolaklarla ilişkili 40 genin ifadesi mikroyarray yöntemi ile analiz edilmiştir. *Cdw92*, *Kras*, *Metrn*, *Myc*, *Igf1*, *Ulk2* genlerin ifadesinde değişiklikler saptanmıştır. Mesela bunlardan *Igf1* immatur nöronların uzamasını sağlar. IGF-1 KO farelerde azalmış dendritik büyüme, beyin boyutu ve akson çapı ile ilişkili bulunmuştur (134). Yine *Metrn* geni; glial hücre farklılaşması ve aksonların uzamasını provoke eder (135). *ULK2* immatur nöronların uzama ve dallanmasını sağlar. Bu çalışma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile ilişkili genlerin aksonogenez ve myelinizasyonda rol oynayabileceğini ortaya çıkarmışlardır (133,136).

Vitamin D'nin önemli etkilerinden biri de beyin ve diğer dokular üzerindeki diferansiyasyon etkisidir (137). Fakat bu etki kalsiyum ile ilişkili yolaklarla kontrol edilmemektedir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bir sitokrom p450 enzimi olan *CYP24A1* ile inhibe edilir ve bu enzimin varlığı da beyinde gösterilmiştir. Ayrıca VDR'nin immünohistokimyasal olarak varlığı gelişen kemirgen beyinlerinde gösterilmiştir. Bu konudaki ilk çalışmalardan biri Johnson ve ark. yaptığı ve gelişen beyinlerde fetal rat dorsal kök gangliyon hücrelerinde VDR'yi tespit ettiği çalışmadır (111,138).

VDR, ratlarda 12.embriyonik günde farelerde ise 11,5 günde tespit edilmiştir. İnsan beyinde olduğu gibi kemirgenlerde de tüm beyin bölgelerinde VDR ekspresyonunun dağılımı gösterir. VDR'nin hücresel farklılaşmada rol oynadığına dair önemli bir kanıt da VDR'nin tercihen farklılaşma alanlarında ortaya çıkmasıdır (139). Ayrıca neonatal ratlarda lateral ventrikül ependimal yüzeylerinde immünohistokimyasal olarak yoğun VDR ekspresyonu tanımlanmıştır. Bu bölge postnatal beyinde hücre bölünmesinin en yoğun bölgesidir (111,140).

Rat beyinlerinde embriyonik 15-22 günde VDR mRNA ve protein ekspresyonunun belirgin arttığı saptanmıştır. Ve bu ekspresyondaki artış; hücre proliferasyonunda azalma ve programlı hücre ölümünde artışla aynı döneme denk gelir. Bu konuda yeterli araştırma olmamakla beraber Vitamin D ve reseptörü VDR hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümünde direkt ya da indirekt olarak rol oynayabileceğinden dolayı Vitamin D ve sinyal yolağındaki hatalar nörogelişimsel olarak beyin gelişimini etkileme potansiyelindedir (111).

Bu çalışmada OB olan çocuklarda periferik kanda VDR mRNA ekspresyonunun kontrollere oranla belirgin arttığı tespit edilmiştir. Her ne kadar bu sonuç beyindeki VDR mRNA gen ekspresyonunu yansıtmasa da, bize OB’ da Vitamin D ve VDR sinyal yolağının direkt ya da indirekt olarak bozukluğu olabileceğini düşündürmektedir. Bundan dolayı ileriki çalışmalarda OB’lu beyinlerde VDR geni mRNA ve protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi önerilmektedir.

OSB ile ilgili önemli sorulardan biri de kullanılmaya başlanan array CGH, yeni nesil sekans tekniklerine rağmen hastaların büyük kısmının moleküler temelinin aydınlatılamamasıdır. Otizmin etiolojisindeki heterojenite, çok farklı genetik ve çevresel risk faktörleri düşünüldüğünde bu hastalıktaki moleküler yolların aydınlatılması temel sorun olarak karşımıza çıkar. Bu amaçla yakın zamanda otistik ve normal beyinler arasında genom boyu ekspresyon analizleri, network ve transkriptom analizleri yapılmaya başlanmıştır.

Garbett ve ark. yaş ve cinsiyetleri uyumlu 6 OSB ve kontrolün postmortem beyinlerinde superior temporal girus (BA41/42) transkriptom analizi ile değerlendirilmiştir. Çoğu immünite ile ilişkili 130 transkriptin upregüle olduğunu, nörogelişimle ilişkili 22 genin downregüle olduğunu göstermiştir. IL2RB, TH1TH2 ve FAS yollarını içeren T hücre aracılı kazanılmış immün yanıtın koaktivasyonu gösterilmesine rağmen, özellikle doğuştan immün yanıtla ilgili genlerin upregüle olduğu bulunmuştur. Yapılan yolak analizinde ekspresyonu artan gen setlerinin antijen spesifik immün yanıt, inflamasyon, hücre ölümü, otoimmün hastalıklar, migrasyon yolağı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. FGF12, MYT1L ve GAS7 gibi downregüle olan genler nöronal farklılaşma yolları ile ilişkilidir (141,142).

Enstrom ve ark. 52 OSB çocuk ve 27 kontrolden elde edilen ölümsüz lenfoblastoid hücre hatlarında genom boyu ekspresyon paterni değerlendirmiştir. 82 genin upregüle, 544 genin downregüle olduğu tespit edilmiştir. Ekspresyonu artmış genler arasında KIRs (killer hücre immünoglobulin reseptör), inhibitör KIRs ve NK hücre fonksiyonu ile ilgili genler yer almakta iken; downregüle olan genlerin çoğunluğu hücre büyüme ve farklılaşma, hücre biyosentez, ribozomal süreçler, hücre metabolizma ve hücre içi organeller ile ilişkili genlerdir (142,143).

Yine Vargas ve ark. nöroinflamatuvar süreçlerin otizmin moleküler biyolojisinde rol oynadığını ve otistik hastaların beyinlerinde TGF- β 1, IL-6, IL-10’un artmış olduğunu

göstermiştir. Bunun yanında tümör nekroz faktör α (TNF- α), interferon γ (IFN γ), IL-1, IL-8 ve IL-12'nin otistik bireylerin kan mono nükleer hücrelerinde, serum, plazma ve serebrospinal sıvısında arttığını gösteren çok sayıda yayın vardır (144-146).

Yukarıda belirtilen OSB hastalarında yapılan genom boyu ekspresyon çalışmalarında dikkati çeken NK ve CD8+ T hücreleri gibi doğal immün sistem ile ilişkili genlerin upregüle olduğu ve nörogelişim ile ilgili genlerin downregüle olmasıdır.

Garbet ark, Enstrom ve ark. ve Vargas ve ark. yaptığı çalışmalar OSB'nun fizyopatolojisini açıklamak için ileri sürülen mekanizmalardan biri olan doğuştan immünitadaki bozukluk olabileceği iddiasını desteklemektedir. T ve B hücreleri aracılı kazanılmış immün yanıtın aksine, doğuştan immün yanıt hızlı ancak antijen spesifik değildir. Toll like reseptörler (TLRs) için ligand görevi gören mikroorganizmalardaki yaygın korunmuş motifleri (PAMPs) tanıyarak işlev görür (147). Doğal immün hücrelerdeki TLRs tarafından tanınan bu motifler IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine ve salınmasına neden olur. Bu sitokinlerin salınımının nörogelişimsel süreçleri etkileyebileceği bilinmektedir. Mesela neonatal hipoksi durumunda IL-1 salınımının anormal nörolojik sonuçları bildirilmiştir (148,149). Yine bir fare çalışmasında maternal IL-6 uygulaması yavrularda anormal davranış değişikliklerine neden olmuştur. Daha öncede belirtildiği gibi Garbett ve ark. yaptığı otistik bireylerin post mortem beyinlerinde yaptığı çalışmada doğuştan immünite ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış tespit etmiştir (141).

Enstrom ve ark. 17 OSB ve 16 sağlıklı kontrolde yaptığı araştırmada; OSB'li çocuklardan elde edilen monosit hücre kültürlerinde TLR stimülasyonunu takiben sitokin üretiminde kontrollere oranla ciddi değişiklikler tespit etmiştir. IL-1 β 3,3 kat; IL-6 3,1 kat; TNF- α 2,9 kat attığı görülmüştür. Bu çalışma OSB'nde doğuştan immünitada artış olduğu bildiren diğer araştırmaları desteklemektedir (149).

TLR2 mikrogial hücre yüzeylerinde eksprese edilir ve neonatal fare modellerinde TLR2 eksikliğinde mikrogial proliferasyon, sitokinlerin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (150,151). TLR2'nin situmulasyonunun proinflamatuvar sitokinlerin salınmasıyla nöroinflamasyonun başlamasına neden olduğu gösterilmiştir (152). Yine hayvan çalışmaları TLR situmulasyonunu takiben doğuştan immünitenin

aktivasyonunun nörojenezi etkileyerek norönel ve davranışsal değişikliklere neden olduğunu belirten çalışmalar vardır (149).

Yine Enstrom ve ark. OSB ve sağlıklı kontrollerde farklı TLR'lerin indüklenmesinin monositlerde farklı etkilere neden olduğunu göstermiştir. Örneğin Lipoteikoik asit ile TLR2'nin indüklenmesi ile IL-1 β , IL-6 ve TNF- α artarken; Liposakkarit ile TLR4'ün indüklenmesi ile IL-1 β artmıştır. Poli I:C ile TLR3'ün indüklenmesinde OSB ve kontroller arasında sitokin salınımında bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmada spesifik bakteri ve virüsler tarafından eksprese edilen PAMPs'lar farklı TLR'lerin indüklenmesi ile OSB'de doğal immün cevapta farklı sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir (149).

Vitamin D'nin klasik kalsiyum hemostazı, elektrolit regülasyonu üzerindeki bilinen etkilerinin yanı sıra; immün yanıtı regüle eden ve anti-inflamatuvar etkileri de vardır. 25OHD₃ 'den sentezlenen 1,25(OH)₂D₃'ün doğuştan ve kazanılmış immün yanıtta rolü olduğu gösterilmiştir. Von Essen ve ark. naiv T hücrelerinin Fosfolipaz C- γ 1 (PLC- γ 1) eksprese ettiklerini; bununda düşük T hücre antijen reseptör (TCR) yanıtı ile korele olduğunu göstermiştir. Fakat TCR uyarılması PLC- γ 1 ekspresyonunda 75 katlık bir artışa neden olur. PLC- γ 1' in indüksiyonunun Vitamin D ve VDR' ye bağlı olduğu gösterilmiştir. Naiv T hücreleri VDR eksprese etmez fakat alternatif mitojen aktive edici protein kinaz p38 yoluyla TCR sinyalinin başlaması VDR'nin ve klasik TCR sinyali ve T hücre aktivasyonu için gerekli olan PLC- γ 1'in indüklenmesine neden olur. Yani 1,25(OH)₂D₃ 'ün immün sistem üzerine etkisi Th1/Th17 CD4+ hücre ve sitokinleri azaltıcı, regülatör T hücreleri artırıcı; T hücrelerine bağlı Ig G üretimini downregüle edici, dendritik hücrelerin farklılaşmasını inhibe edici yöndedir (153). 1,25(OH)₂D₃; IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi birçok proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu downregüle eder. Makrofaj, dendritik hücreler ve aktive T hücreleri gibi immün sistem hücreleri VDR'yi eksprese ederler ve 1,25(OH)₂D₃'e duyarlıdır. .

1,25(OH)₂D₃'ün immün hücreler üzerine genel immünsüpresif etkisi bilinmektedir. Fakat 1,25(OH)₂D₃'ün kazanılmış immün yanıt üzerine etkisi enflamatuvar süreçleri baskılamak olsa da aynı zamanda doğuştan immünite üzerinde önemli işlevleri vardır. 1,25(OH)₂D₃'ün immünsüpresif etkisi TLR-L (toll like reseptör ligand) gibi moleküller varlığında değişiklik gösterir (81). TLR; antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilir ve doğal immün hücreler için algılama reseptörü olarak görev icra eder. VDR ile ilişkili TLR aktivasyonu ile TNF- α , IL-6 ve doğal immün efektör moleküller gibi

proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ile neticelenecek sinyal yolağını aktive eder (154,155). Daha önceki birçok çalışma TLR-L'in VDR aracılığıyla antimikrobiyal peptidleri artırmak suretiyle antimikrobiyal etki gösterdiğini göstermiştir. 1,25(OH)₂D₃ ve VDR' nin doğal immün yanıtta kritik rol oynadığına dair önemli bir kanıt da ciddi 1,25(OH)₂D₃ eksikliğinin tüberküloz gibi enfeksiyonlara duyarlılığı artırmasıdır (155,156).

Daha önce belirtildiği üzere OSB olan beyinlerde doğal immüniteden sorumlu genlerin ekspresyonunda ciddi artış tespit edilmişti. VDR' nin doğal immünite üzerine etkileri, TLR aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar süreçleri aktive etmesi düşünüldüğünde; bizim çalışmamızda bulunan OB' li bireylerde VDR gen ekspresyonundaki artışın OB' li bireylerdeki moleküler seviyedeki değişikliklerden biri olduğu anlaşılmaktadır. Literatürde OB olan hastalarda VDR gen ekspresyonuna dair periferik kandan ya da beyin dokusundan yapılmış bir ekspresyon çalışması bulunmamaktadır. Fakat bu sonuç Garbet ve ark. Enstrom ve ark. bulduğu doğal immünite ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki artış verisi ile uyumluluk göstermektedir (141,143).

Voineugu ve ark. OSB' da görülen immün sistem transkriptlerindeki değişikliklerin genetik varyasyonlardan kaynaklanmayabileceğini önermiştir (157). Dahası epidemiyolojik çalışmalar çok sayıda bakteriyel ve viral ajanın OSB riskinde artışa neden olduğunu göstermiştir ve daha sonra OSB geliştirmiş gebe annelerin sitokin seviyelerinde artış bildirilmiştir (158,159). Maternal immün aktivasyonun (MİA) gelişen fetüs üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda araştırma mevcuttur. MİA takiben maternal serum ve fetal beyinde sitokin seviyelerinin yükseldiği ve yavrularda OSB' ye benzeyen morfolojik beyin anormallikleri, davranışsal değişiklikler görülmüştür (160,161). Yine benzer şekilde OSB patofizyolojisinde rol oynadığı bilinen maternal viral enfeksiyonları takiben fetüs beyinde kompleks transkript değişiklikleri saptanmıştır (159). Bütün bu veriler maternal immün aktivasyonun OSB patofizyolojisinde rol oynadığını göstermektedir ve bu konudaki yeni araştırmalar bu hastalığın daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

6.SONUÇLAR

Bu çalışmada OB tanısı almış 30 olgu ve sağlıklı 30 kontrolde; OB fizyopatolojisi ve moleküler biyolojisinde rol oynayabileceği düşünülen VDR geninin periferik kan mRNA ekspresyonu, promotor bölge 16492 CpG adası metilasyonu, promotor bölge rs11568820 ve rs4516035 SNP'leri analiz edilmiştir.

Çalışmanın sonunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1.OB'li bireylerde kontrollere oranla VDR geni periferik kan mRNA ekspresyonunun anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Literatürde OB hasta grubunda VDR gen ekspresyonu ile ilgili bir araştırma bulunmamaktadır. Mevcut haliyle bu çalışma literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

2.OB'li hasta grubu ve sağlıklı kontrollerde VDR geni promotor bölge rs11568820 ve rs4516035 polimorfizmlerinin allel ve genotip dağılımları karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile anlamlı fark bulunmamıştır. Bu hasta grubu ve polimorfizmlerle yapılan ilk çalışmadır.

3.Yine VDR geni promotor bölge 16492 CpG adası metilasyon analizinde hasta ve kontrol grubunda metilasyon tespit edilmemiştir.

4. rs11568820 ve rs4516035 SNP'lerinin allelik varyantlarının VDR ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmış ve farklı genotiplerin ekspresyon üzerinde değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler OB ve VDR arasındaki ilişkiyi aydınlatmada ilk adım özelliğini taşımaktadır. Bütün bu sonuçlar Vitamin D ve VDR sinyal yolağının

Otistik bozuklukta ve bulguların oluřumunda rol oynayabileceđini ve bu yolađın daha fazla arařtırılması gerektiđini dűřündürmektedir. Bu çalıřmanın devamında VDR'nin OB' da beyin dokusunda RNA ve protein dűzeyinde arařtırılması ve arařtırmaların vitamin D, VDR ile dođal imműnite arasındaki iliřkiler ve deđiřiklikler űzerinde yođunlařması gerektiđini dűřűnmekteyiz.

7.REFERANSLAR

1. Risch N., Spiker D., Lotspeich L. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. Am. J. Hum. Genet. 65: 493-507, 1999.
2. Monaco AP, Bailey AJ. Autism. The search for susceptibility genes. Lancet 2001;358 Suppl:S3.
3. Hebert KJ, Miller LL, Joinson CJ. Association of autistic spectrum disorder with season of birth and conception in a UK cohort. Autism Res 2010;3:185-90.
4. Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. [Autism and pervasive developmental disorders]. J Pediatr (Rio J) 2004;80:S83-94.
5. Prater CD, Zylstra RG. Autism: a medical primer. Am Fam Physician 2002;66:1667-74.
6. Volkmar F. Predicting outcome in autism. J Autism Dev Disord 2002;32:63-4.
7. Rutter M, Schopler E. Autism and pervasive developmental disorders: concepts and diagnostic issues. J Autism Dev Disord 1987;17:159-86.
8. Koroglu E. DSM-IV Mental Bozuklukların Tanımsal ve Sayımsal El Kitabı,Dördüncü Baskı Yeniden Gözden Geçirilmiş Tam Metin (DSM-IV-TR) ed). Hekimler Yayın Birliği, Wahshington DC 2000.
9. Kielinen M, Linna SL, Moilanen I. Autism in Northern Finland. Eur Child Adolesc Psychiatry 2000;9:162-7.

10. Rutter M. Infantile Autism and other Pervasive Developmental Disorders: In: Rutter M ,Hersov L. (eds) Child And Adolescent Psychiatr ed). Blackwell Scientific Publications, London 1985.
11. Volkmar F. Autism and the Pervasive Developmental Disorders. In: (eds), Child and adolescent Psychiatry A Comprehensive Textbook (3rd ed) Lippincot Willsams & Wilkins, Philadelphia 2002, pp. 587-97.
12. Sykes NH, Lamb JA. Autism: the quest for the genes. Expert Rev Mol Med 2007;9:1-15.
13. Szatmari P, Jones MB. IQ and the genetics of autism. J Child Psychol Psychiatry 1991;32:897-908.
14. Bryson SE. Brief report: epidemiology of autism. J Autism Dev Disord 1996;26:165-7.
15. Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. Annu Rev Public Health 2007;28:235-58.
16. Maestro S, Muratori F, Cavallaro MC, et al. Attentional skills during the first 6 months of age in autism spectrum disorder. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2002;41:1239-45.
17. Rogers SJ. Empirically supported comprehensive treatments for young children with autism. J Clin Child Psychol 1998;27:168-79.
18. Tanguay PE, Robertson J, Derrick A. A dimensional classification of autism spectrum disorder by social communication domains. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1998;37:271-7.
19. Gousse V, Plumet MH, Chabane N, et al. Fringe phenotypes in autism: a review of clinical, biochemical and cognitive studies. Eur Psychiatry 2002;17:120-8.
20. Rutter M. Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium. J Abnorm Child Psychol 2000;28:3-14.
21. McDougle CJ, Erickson CA, Stigler KA, Posey DJ. Neurochemistry in the pathophysiology of autism. J Clin Psychiatry 2005;66 Suppl 10:9-18.

22. Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 2002;58:428-32.
23. Otsuka H, Harada M, Mori K, Hisaoka S, Nishitani H. Brain metabolites in the hippocampus-amygdala region and cerebellum in autism: an ¹H-MR spectroscopy study. *Neuroradiology* 1999;41:517-9.
24. Bachevalier J. Brief report: medial temporal lobe and autism: a putative animal model in primates. *J Autism Dev Disord* 1996;26:217-20.
25. Wassink TH, Piven J, Patil SR. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatr Genet* 2001;11:57-63.
26. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, et al. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A* 2005;135:171-80.
27. Kent L, Evans J, Paul M, Sharp M. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:153-8.
28. Skuse DH. Imprinting, the X-chromosome, and the male brain: explaining sex differences in the liability to autism. *Pediatr Res* 2000;47:9-16.
29. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007;316:445-9.
30. Christian SL, Brune CW, Sudi J, et al. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 2008;63:1111-7.
31. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 2006;43:843-9.
32. Glessner JT, Wang K, Cai G, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 2009;459:569-73.
33. Shinawi M, Schaaf CP, Bhatt SS, et al. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet* 2009;41:1269-71.

34. Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, et al. Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* 2010;2:26-38.
35. Merenstein SA, Sobesky WE, Taylor AK, et al. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet* 1996;64:388-94.
36. Turk J. Fragile X syndrome: lifespan developmental implications for those without as well as with intellectual disability. *Curr Opin Psychiatry* 2011;24:387-97.
37. Holland AJ, Whittington JE, Butler J, et al. Behavioural phenotypes associated with specific genetic disorders: evidence from a population-based study of people with Prader-Willi syndrome. *Psychol Med* 2003;33:141-53.
38. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis* 2010;38:181-91.
39. Firat AK, Karakas HM, Erdem G, Yakinci C, Bcak U. Diffusion weighted MR findings of brain involvement in tuberous sclerosis. *Diagn Interv Radiol* 2006;12:57-60.
40. Wong V. Study of the relationship between tuberous sclerosis complex and autistic disorder. *J Child Neurol* 2006;21:199-204.
41. de Vries PJ, Hunt A, Bolton PF. The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC): a postal survey of UK families. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2007;16:16-24.
42. Ozonoff S, Williams BJ, Gale S, Miller JN. Autism and autistic behavior in Joubert syndrome. *J Child Neurol* 1999;14:636-41.
43. Kumandas S, Akcakus M, Coskun A, Gumus H. Joubert syndrome: review and report of seven new cases. *Eur J Neurol* 2004;11:505-10.
44. Molloy CA, Murray DS, Kinsman A, et al. Differences in the clinical presentation of Trisomy 21 with and without autism. *J Intellect Disabil Res* 2009;53:143-51.
45. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007;39:25-7.

46. Rio M, Clech L, Amiel J, et al. Spectrum of NSD1 mutations in Sotos and Weaver syndromes. *J Med Genet* 2003;40:436-40.
47. Turkmen S, Gillessen-Kaesbach G, Meinecke P, et al. Mutations in NSD1 are responsible for Sotos syndrome, but are not a frequent finding in other overgrowth phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2003;11:858-65.
48. Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta AK. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* 1993;341:1414.
49. Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P. Autism and metabolic diseases. *J Child Neurol* 2008;23:307-14.
50. Caglayan AO. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev Med Child Neurol* 2010;52:130-8.
51. Moog U, Smeets EE, van Roozendaal KE, et al. Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2). *Eur J Paediatr Neurol* 2003;7:5-12.
52. Fombone E. Prevalence of childhood disintegrative disorder. *Autism* 2002;6:149-57.
53. Volkmar FR. Childhood disintegrative disorder: issues for DSM-IV. *J Autism Dev Disord* 1992;22:625-42.
54. Klin A. [Autism and Asperger syndrome: an overview]. *Rev Bras Psiquiatr* 2006;28 Suppl 1:S3-11.
55. Gillberg C. Asperger syndrome and high-functioning autism. *Br J Psychiatry* 1998;172:200-9.
56. Wing L. The autistic spectrum. *Lancet* 1997;350:1761-6.
57. Buitelaar JK, Van der Gaag R, Klin A, Volkmar F. Exploring the boundaries of pervasive developmental disorder not otherwise specified: analyses of data from the DSM-IV Autistic Disorder Field Trial. *J Autism Dev Disord* 1999;29:33-43.
58. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, et al. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 1988;242:1702-5.

59. Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, et al. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med* 1998;338:653-61.
60. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999;69:842-56.
61. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005;29:21-30.
62. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F8-28.
63. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011;364:248-54.
64. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
65. Freedman LP. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 1999;97:5-8.
66. Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, et al. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 1999;283:1317-21.
67. Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, et al. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 1999;398:824-8.
68. Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7939-44.
69. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995;377:397-404.
70. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997;89:373-80.

71. Holick MF. Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications Humana Press, 2010
72. Nemere I, Garbi N, Hammerling GJ, Khanal RC. Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D3-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. J Biol Chem 2010;285:31859-66.
73. Kenneth S. Polonsky HMK, Shlomo Melmed Vitamin D. In: edition (eds), Williams Textbook of Endokrinology (ed) pp.
74. BAYDAR O, 2012. ASTİM GELİŞİMİNDE D VİTAMİNİNİN ROLÜ. s.
75. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004;80:1678S-88S.
76. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, et al. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. Immunology 1987;61:457-61.
77. Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in defense of the human immune response. Ann N Y Acad Sci 2007;1117:94-105.
78. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinol Metab Clin North Am 2010;39:365-79, table of contents.
79. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of Mycobacterium tuberculosis: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. Immunology 1986;59:333-8.
80. Etzioni A, Hochberg Z, Pollak S, et al. Defective leukocyte fungicidal activity in end-organ resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. Pediatr Res 1989;25:276-9.
81. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770-3.
82. Behzat Özkan HD. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2011;54:99-119.

83. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol* 1985;134:3032-5.
84. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;76:315-25.
85. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995;125:1704S-8S.
86. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4 (+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167:4974-80.
87. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 2011;241:260-8.
88. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007;179:1634-47.
89. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11:1165-79.
90. Kostner K, Denzer N, Muller CS, et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009;29:3511-36.
91. Abd El Gawad SS, Abdul Samee ER, Metwali AA, Abd El Gawad MS. Vitamin D receptor gene polymorphism and its association with 1,25-dihydroxyvitamin D (3) in patients with Graves disease in an Egyptian population: a pilot study. *Endocr Pract* 2012;18:132-9.
92. Pani MA, Seissler J, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor genotype is associated with Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 2002;147:635-40.
93. Stumpf WE, O'Brien LP. 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ sites of action in the brain. An autoradiographic study. *Histochemistry* 1987;87:393-406.

94. Balabanova S, Richter HP, Antoniadis G, et al. 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr* 1984;62:1086-90.
95. Zehnder D, Bland R, Williams MC, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d (3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:888-94.
96. Ko P, Burkert R, McGrath J, Eyles D. Maternal vitamin D3 deprivation and the regulation of apoptosis and cell cycle during rat brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 2004;153:61-8.
97. Eyles D, Brown J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience* 2003;118:641-53.
98. Almeras L, Eyles D, Benech P, et al. Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders. *Proteomics* 2007;7:769-80.
99. Keilhoff G, Grecksch G, Becker A. Haloperidol normalized prenatal vitamin D depletion-induced reduction of hippocampal cell proliferation in adult rats. *Neurosci Lett* 2010;476:94-8.
100. Sutherland MK, Somerville MJ, Yoong LK, et al. Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;13:239-50.
101. Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 1999;16:135-45.
102. Walbert T, Jirikowski GF, Prufer K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. *Horm Metab Res* 2001;33:525-31.
103. Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, et al. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 2002;16:1524-37.

104. Li YC, Pirro AE, Amling M, et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9831-5.
105. Bula CM, Huhtakangas J, Olivera C, et al. Presence of a truncated form of the vitamin D receptor (VDR) in a strain of VDR-knockout mice. *Endocrinology* 2005;146:5581-6.
106. Kalueff AV, Lou YR, Laaksi I, Tuohimaa P. Increased anxiety in mice lacking vitamin D receptor gene. *Neuroreport* 2004;15:1271-4.
107. Minasyan A, Keisala T, Zou J, et al. Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;114:161-6.
108. Keisala T, Minasyan A, Lou YR, et al. Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;115:91-7.
109. Kreiter SR, Schwartz RP, Kirkman HN, Jr., et al. Nutritional rickets in African American breast-fed infants. *J Pediatr* 2000;137:153-7.
110. Abrams SA. Nutritional rickets: an old disease returns. *Nutr Rev* 2002;60:111-5.
111. Eyles DW, Burne TH, McGrath JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* 2013;34:47-64.
112. Grant WB, Soles CM. Epidemiologic evidence supporting the role of maternal vitamin D deficiency as a risk factor for the development of infantile autism. *Dermatoendocrinol* 2009;1:223-8.
113. Dealberto MJ. Prevalence of autism according to maternal immigrant status and ethnic origin. *Acta Psychiatr Scand* 2011;123:339-48.
114. Hediger ML, England LJ, Molloy CA, et al. Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2008;38:848-56.
115. Meguid NA, Hashish AF, Anwar M, Sidhom G. Reduced serum levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in Egyptian children with autism. *J Altern Complement Med* 2010;16:641-5.

116. Barnevik-Olsson M, Gillberg C, Fernell E. Prevalence of autism in children of Somali origin living in Stockholm: brief report of an at-risk population. *Dev Med Child Neurol* 2010;52:1167-8.
117. Erdoğan M, 2012. İnfant Ve Erken Çocukluk Döneminde Dirençli Nöbet, Otistik Bozukluk Ve Nöbetin Eşlik Ettiği Otistik Bozukluklu Çocuk Hastalarda Cdk15 Gen Mutasyonlarının Araştırılması. Tıbbi Genetik AD, Kayseri, 52-8 s.
118. Nordgard O, Kvaloy JT, Farmen RK, Heikkila R. Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: the balance between accuracy and precision. *Anal Biochem* 2006;356:182-93.
119. McGuigan FE, Ralston SH. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr Genet* 2002;12:133-6.
120. Nejentsev S, Godfrey L, Snook H, et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum Mol Genet* 2004;13:1633-9.
121. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005;77:807-23.
122. Beaudet AL. Is medical genetics neglecting epigenetics? *Genet Med* 2002;4:399-402.
123. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 1977;18:297-321.
124. Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001;2:943-55.
125. Yan J, Feng J, Craddock N, et al. Vitamin D receptor variants in 192 patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. *Neurosci Lett* 2005;380:37-41.
126. Morley R, Carlin JB, Pasco JA, Wark JD. Maternal 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentrations and offspring birth size. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:906-12.

127. Camargo CA, Jr., Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007;85:788-95.
128. Cannell JJ. Autism and vitamin D. *Med Hypotheses* 2008;70:750-9.
129. Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 3:511-33.
130. Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, et al. Maternal vitamin d levels and the autism phenotype among offspring. *J Autism Dev Disord* 2013;43:1495-504.
131. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:68-77.
132. Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, et al. Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development. *Pediatrics* 2012;129:485-93.
133. Chabas JF, Stephan D, Marqueste T, et al. Cholecalciferol (vitamin d3) improves myelination and recovery after nerve injury. *PLoS One* 2013;8:e65034.
134. Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F. Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 1995;14:717-30.
135. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, et al. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J* 2004;23:1998-2008.
136. Zhou X, Babu JR, da Silva S, et al. Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5842-7.
137. Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 2002;13:252-64.
138. Johnson JA, Grande JP, Windebank AJ, Kumar R. 1,25-Dihydroxyvitamin D (3) receptors in developing dorsal root ganglia of fetal rats. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;92:120-4.

139. Veenstra TD, Prufer K, Koenigsberger C, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res* 1998;804:193-205.
140. Cui X, McGrath JJ, Burne TH, Mackay-Sim A, Eyles DW. Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci* 2007;25:227-32.
141. Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, et al. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis* 2008;30:303-11.
142. Lintas C, Sacco R, Persico AM. Genome-wide expression studies in autism spectrum disorder, Rett syndrome, and Down syndrome. *Neurobiol Dis* 2012;45:57-68.
143. Enstrom AM, Lit L, Onore CE, et al. Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain Behav Immun* 2009;23:124-33.
144. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005;57:67-81.
145. Singh VK. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol* 1996;66:143-5.
146. Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol* 2006;172:198-205.
147. Flier A, Krediet TG. Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. *Neonatology* 2007;92:145-57.
148. Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, El-Sayed O, Hasanein BM. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2006;28:178-82.
149. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 2010;24:64-71.

150. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1013-21.
151. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004;173:3916-24.
152. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 2007;178:6476-81.
153. von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol* 2010;11:344-9.
154. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17:338-44.
155. Gambhir V, Kim J, Siddiqui S, et al. Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement. *Immunobiology* 2011;216:988-96.
156. Berrington WR, Hawn TR. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 2007;219:167-86.
157. Voineagu I, Wang X, Johnston P, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 2011;474:380-4.
158. Ratajczak HV. Theoretical aspects of autism: causes--a review. *J Immunotoxicol* 2011;8:68-79.
159. Michel M, Schmidt MJ, Mirnics K. Immune system gene dysregulation in autism and schizophrenia. *Dev Neurobiol* 2012;72:1277-87.
160. Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005;48:903-17.
161. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010;24:881-97.

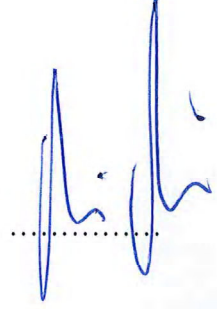
T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Burhan Balta'ya ait "OTİSTİK BOZUKLUKLU ÇOCUK HASTALARDA VDR GEN POLİMORFİZMİ, VDR GEN EKSPRESYONU VE VDR GENİ PROMOTOR METİLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI" adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih 2 / 8 / 2013

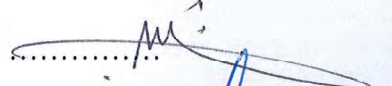
Başkan

: Prof. Dr. Munis Döndar



Üye

: Doç. Dr. Setin Saatçi



Üye

: Prof. Dr. Yusuf Özkul

