

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

**Otizm Spetrum Bozukluğu Tanılı Çocuklar ve Ebeveynlerinde
MCP-1(Monocyte chemotactic protein1) /CCR2(chemokine (C-C
motif) receptor 2) Gen Polimorfizmi Araştırılması.**

Uzmanlık Tezi
Dr. Ceyhun Caferov

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Osman Abalı

**Bu uzmanlık tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25843**

İSTANBUL
2012

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde verdiği destek ve gösterdiği ilgiden, bana kazandırdığı bilgi ve deneyimden dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Salih Zoroğlu'na,

Uzmanlık tezi dahil bir çok bilimsel çalışmalarda verdiği destekten vede anlayışlı, samimi ve sevecen tutumundan dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Osman Abalı'ya,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, pratik ve teorik anlamda birçok şey öğrendiğim çok değerli hocalarım Prof. Dr. Ülkü Göktürk, Prof. Dr. Nahit Motavallı Mukaddes, Doç. Dr. Behiye Alyanak, Doç. Dr. Ayşe Kılınçaslan ve Uzm. Dr. Murat Coşkun'a,

Tez çalışmam süresinde değerli vakitlerini ayırarak gösterdikleri ilgi ve yardımlarından dolayı değerli bilim insanları Prof Dr. Bedia Ağaçhan ve Doç. Dr. Eda Tahir'e,

Tezim için gerekli maddi desteği sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım ve çok şey öğrendiğim değerli asistan arkadaşlarıma,

Oluşturdıkları samimi ortamdan ve bana gösterdikleri yardımdan dolayı bütün hemşire, psikolog, pedagog, sosyal çalışmacı ve sekreter arkadaşlara,

Psikiyatri ve Çocuk Nörolojisi rotasyonlarında katkılarından dolayı beraber çalıştığım değerli hocalarım, asistan arkadaşlarım, hemşire ve diğer personellere,

Çalışmama katılan, ayrıca eğitim hayatı boyunca mesleğimde gelişmeme katkıda bulunan tüm çocuklara ve ailelerine,

Büyük fedakarlıklarla bana destek olan ve her zaman yanımda olan canım aileme,

Sonsuz minnettarlık, sevgi ve saygılarımla...

Dr. Ceyhun Caferov

İÇİNDEKİLER

Resimlemeler Dizini

Kısaltmalar

Özet

Summary

1. Giriş

2. Genek Bilgiler

- **2.1. Otizm Spektrum Bozukluk (Yaygın Gelişimsel Bozukluk)**
 - ✓ 2.1.1 Genel bakış, Tarihçe
 - ✓ 2.1.2 Tanı Kriterleri
 - ✓ 2.1.3 Yaygın gelişimsel bozukluk tipleri
 - ✓ 2.1.4 Epidemiyoloji
 - ✓ 2.1.5 Etiyoloji
 - ✓ 2.1.6 Davranışsal özellikler ve Klinik
 - ✓ 2.1.7 Sık görülen problem davranışlar ve komorbid ruhsal sorunlar
- **2.2. Genetik**
 - ✓ 2.2.1. Genel Bakış
 - ✓ 2.2.2. Kemokinler ve genetik
 - ✓ 2.2.3. MCP-1
 - ✓ 2.2.4. CCR2
 - ✓ 2.2.5. MCP-1/CCR2 gen polimorfizminin hastalıklarla ilişkisi

3. Gereç ve Yöntemler

- **3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı**
- **3.2. Ölçek ve Formlar**
 - ✓ 3.2.1. CARS
 - ✓ 3.2.2. Sosyodemografik form
- **3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**
- **3.4. Kullanılan Çözeltiler**
 - ✓ 3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler
 - ✓ 3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

- **3.5. Kullanılan Yöntemler**
 - ✓ 3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu
 - ✓ 3.5.2. DNA Saflık Tayini
 - ✓ 3.5.3. DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması
 - ✓ 3.5.4. PCR ile MCP-1 A-2518G Polimorfizminin Tanımlanması
 - ✓ 3.5.5. PCR ile CCR2 Gen Polimorfizminin Saptanması
- **3.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler**
 - ✓ 3.6.1. P (Anlamlılık Değeri)
 - ✓ 3.6.2. Ki Kare Testi (χ^2)
 - ✓ 3.6.3. t Testi
- **3.7. Risk Hesapları**
- **3.8. Aile Temelli İlişki Analizleri**
 - ✓ 3.8.1. Haplotip Temilli Haplotip Relatif Risk Analizi (HRR)
 - ✓ 3.8.2. Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (KET)
 - ✓ 3.8.3. Genişletilmiş Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (GKET)

4. Sonuçlar

5. Tartışma

6. Kaynaklar

7. Ekler

- I. CARS
- II. Sodemografik Form
- III. Gönüllü Bilgilendirme Formu
- IV. Etik Kurul Onayı
- V. Özgeçmiş

RESİMLEMELER DİZİNİ

Tablo1: MCP-1 PZR ve kesim ürünleri

Tablo 2: CCR2 PZR ve kesim ürünleri

Tablo 3: Sosyodemografik veriler

Tablo 4: Yaş ve CARS puanlarının dağılımı

Tablo 5: Zeka düzeyleri

Tablo 6: MCP-1 genotip ve alel dağılımı

Tablo 7: MCP-1 KET sonucu

Tablo 8: MCP-1 HRR sonucu

Tablo 9: CCR2 genotip ve alel dağılımı

Tablo 10: CCR2 KET sonucu

Tablo 11: CCR2 HRR sonucu

Tablo 12: Genotiplerin kalıtılma ve kalıtılmama değerleri

KISALTMALAR

OSB: Otizm Spektrum Bozukluk

YGB: Yaygın Gelişimsel Bozukluk

YGB-BTA: Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk

DSM-IV: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı, IV. baskı

MCP-1: Monosit Kemoatraktan Protein-1

CCL2: (C-C) motifli Kemokin Ligandı 2

CCR2: (C-C) motifli Kemokin Resöptörü 2

DEHB : Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu

OKB : Obsesif Kompulsif Bozukluk

DNA: Deoksi Ribo Nükleik Asit

MCPIP : MCP-1'in indüklediği proteinin

CARS: Childhood Autism Rating Scale

AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrome

IQ: Intelligence Quotient

EDTA: Etilen diamin tetra asetat

SDS: Sodyum dodesil sülfat

µl: Mikrolitre

PCR (PZR): Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu

HRR: Haplotip Relatif Risk

KET: Kalıtlılabılme Eşitsizliği Testi

RKET: Genişletilmiş Kalıtlılabılme Eşitsizliği Testi

A: Adenin G: Guanin

ÖZET

Otizm Spektrum Bozukluğunda Monocyte chemotactic protein 1 ve chemokine (C-C motif) receptor 2 Gen Polimorfizmi Değerlendirilmesi.

Giriş ve Amaç: Otizm sosyal yetersizlik, verbal ve nonverbal iletişimde gerilik, sınırlı ve basmakalıp ilgi alanı ve davranışlar ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizmin etiyoloji tam olarak aydınlatılmamıştır. Etiyolojide genetik, çevresel, otoimmün vb birçok faktörün rol alabileceği düşünülmektedir. Otizm spektrum bozukluğunun inflamatuvar bileşenleri olduğu birçok çalışmada tanımlanmıştır. Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda kemokin düzeyleri ile iletişim bozukluğu arasında da bağlantı olduğu gösterilmiştir. Anormal immün yanıtın otizm için biyolojik belirleyici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada çocuk psikiyatrisi kliniğinde takip edilen ve OSB tanısı alanlarda Monosit Kemoatraktan Protein-1(MCP-1) ve (C-C) motifli Kemokin Resöptörü 2 (CCR2) gen polimorfizmi incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalında takip edilen, DSM-IV Tanı Ölçütlerine göre OSB'li olan, 2 – 18 yaşları arasındaki 101 çocuk ve biyolojik anne babaları alınmıştır. Ayrıca DSM–IV Ölçütleri ve Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (Childhood Autism Rating Scale-CARS) kullanılarak OSB tanısı doğrulanmış ve belirtilerin dağılımı ve sorunların şiddeti saptanmıştır. Anne baba ve çocuk üçlüsünde DNA izolasyonu için 10 cc'lik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmıştır, Kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde MCP-1 ve CCR2 polimorfizmleri saptamak için PCR (Polimeraz zincirleme reaksiyonu), RFLP (Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır.

Bulgular: Anne baba ve çocuk üçlüsünden alınan kanların incelenmesi ve aile temelli kalıtılabilme eşitsizliği testleri sonucunda CCR2 geni otizm (p:0,0029) ve buna eşlik eden ek tanı ile (p:0,031) anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. MCP-1 geninde istatistiksel anlamlılık sağlanmamıştır(p:0.196).

Sonuç: CCR2 genindeki G190A polimorfizminde G aleli taşımanın OSB ve buna eşlik eden ek tanı açısından risk teşkil edebileceği ancak konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

SUMMARY

Research of Monocyte chemotactic protein 1 and chemokine (CC motif) receptor 2 gene polymorphism in Autism Spectrum Disorder

Background and Aim: Autism is a neurodevelopmental disorder that is characterized by social deficiency, retardation of verbal and non-verbal communication and restricted stereotyped interests and behaviors. Etiology of autism has not been elucidated clearly yet. Considered that is genetic, environmental, autoimmune and any other factors may play a role in etiology of autism. Many studies have been defined that, Autism spectrum disorder include inflammatory components. It was shown that children with autism spectrum disorder have correlation between chemokine levels and communication deficit. Abnormal immune response, can be used as a biological marker for autism. In this study we aimed to investigate monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and (C-C) motif chemokine receptor 2 (CCR2) gene polymorphism in patients follow-up at child psychiatry clinic with ASD diagnose.

Method: All cases were taken from children and adolescents who consecutively referred to Istanbul Faculty of Medicine, Department Child and Adolescent Psychiatry, Autism Unit. Participants were 106 children, aged 2–18 year-old, who met DSM-IV criteria for ASD. Childhood Autism Rating Scale-CARS was used to assess the severity of symptoms. 10cc blood sample of 106 mother father and affected child trios are taken to sterile EDTA test tube for DNA isolation. Polimerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (RFLP) and agarose gel electrophoresis are used to asses MCP-1 and CCR2 genes polimorphism in DNA samples.

Results: After analysing trio blood sample and using family based approaches like transmission disequilibrium test (TDT) we found significant association between CCR2 gene and autism($p: 0,0029$) , also an accompanying diagnosis ($p: 0.031$). MCP-1 gene wasn't found statistically significant.

Conclusion: Possession of G allele in CCR2 gene G190A polymorphism may pose a risk in terms to ASD and additional diagnostic however, concluded that more studies are need.

I.GİRİŞ

Otizm spektrum bozuklukları (OSB) sosyal iletişim ve davranışsal alanlardaki bir dizi sorunlarla karakterize bir grup nörogelişimsel bozukluklardır (1). Etkilenmiş bireyler çeşitli gelişimsel dil ve kognitif problemler için yüksek risk altındadırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sıklığının arttığına dair verilere rastlanmıştır. Bu artışta çevresel faktörlerin (hava kirliliği, zararlı kimyasallara maruz kalma, radyasyon vs) rol aldığı düşünülmektedir (2). Bununla beraber otistik bozukluğu olanların kardeşlerinde genel popülasyondan 22 kat ve daha üstü otizm görülme riski genetik mekanizmaların rolünün de ön planda olduğunu düşündürmektedir. Monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılan çalışmalar monozigotik ikizlerde otizm için artmış bir konkordans olduğunu göstermiştir (3,4). Genom bölgeleri tanımlanmış olmasına rağmen, kesin sorumlu genler bilinmemektedir ve çok gen ile çevresel etkileşimlerin sonucunda ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (5).

Kemokinler, 8-14kDa'luk küçük proinflamatuvar kemotaktik sitokinlerdir. Kemokinlerin lökosit migrasyonunda, embriyogeneizde, anjiogeneizde, hemopoietik homeostazda, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde, doku morfogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir (6,7,8,9). Kemokinler, amino ucundaki ilk iki sisteine göre ve herhangi bir aminoasidi temsil eden X formülü ile CXC, CC, C ve CX3C olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (10). Birçok kanser türünde kemokin ve reseptörlerinin eksprese edildiği bildirilmektedir (11,12). Yaklaşık 50 kemokinden C-C motifli kemokin ligandı 2(CCL2) aynı zamanda monosit kemoatraktan protein-1(MCP-1) olarak bilinmekte ve sistein motifinin içinde aminoasit rezidüsü içermemektedir. MCP-1, monositler, hafıza T lenfositleri ve natural killer hücreler için güçlü kimyasal çekici görevi üstlenmektedir (13). MCP-1'in A2518G polimorfizmi, inflamatuvar yanıtı karşı olan MCP-1 ekspresyonunu düzenlemektedir (14). MCP-1 reseptörü CCR2'ye bağlanarak ve böylece intrasellüler sinyal mekanizmasını uyararak etkisini gerçekleştirmektedir. MCP-1 çeşitli nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı, Mutple Skleroz vs.), inme, depresyon, manik bozukluk, şizofreni ve OSB gibi bir çok nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda analiz edilen 29 sitokin

seviyesinden 8'inde otizm tanısı olan çocuklarda tanı almayan çocuklara oranla belirgin düşüklük saptanmıştır. Amniotik sıvıda kemokin düzeylerini incelendiği bir çalışmada MCP 1 seviyesi yüksekliği ile otizm arasında ilişki saptanmıştır. Otizm spektrum bozukluğunun inflamatuvar bileşenleri olduğu birçok çalışmada tanımlanmıştır. Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda kemokin düzeyleri ile iletişim bozukluğu arasında da bağlantı olduğu gösterilmiştir. Anormal immün yanıtın otizm için biyolojik belirleyici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (15).

Bütün bu bilgiler ışığında biz çalışmamızda kliniğimize başvuran Otizm spektrum bozukluğu tanılı çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babalarının kan örneklerinde MCP-1 A2518G ve CCR2 G190A gen polimorfizminin hastalık riski ve özelliklerine olabilecek etkisi araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otizm Spektrum Bozukluk (Yaygın Gelişimsel Bozukluk)

2.1.1 Genel bakış, Tarihçe

Otizm Spektrum Bozukluk (OSB) veya diğer ismiyle Yaygın Gelişimsel (YGB) hayatın ilk yıllarında sosyal etkileşim, iletişim ve kognitif gelişimde spesifik kayıplarla giden nöropsikiyatrik hastalıklar grubudur (16). Sıklıkla mental retardasyonla ilişkilidir fakat davranışsal özellikleri oldukça farklı olup diğer gelişimsel geriliklerden kolaylıkla ayırt edilmektedir (17).

“Yaygın” terimi, otizmde geniş ve farklı alanlarda sorun olduğunu, “Gelişimsel” terimi ise, sosyal ilişki ve iletişim alanlarını da kapsayan çoklu gelişimsel yetersizlikleri belirtir. Bu bozukluklar yaşamın ilk yıllarından başlayarak gelişimin her aşamasını etkiler (18,19).

İlk kavramlar yetişkin psikiyatrisinden alındığından bu gibi bozukluklar psikoz olarak tanımlana gelmiştir. 1930 yılında Heller ağır gelişimsel problemler, stereotipiler ve konuşma kaybının eşlik ettiği bebeklik demansını tanımlamıştır. 1933 yılında Potter “Çocukluk Şizofrenisi” ölçütlerini önermiştir. Otizm tanımına ilk kez Leo Kanner isimli araştırmacının 1943 yılında 11 vaka serisi (3 kız, 8 erkek) yayınında rastlanmaktadır. Kanner ilk defa çocukluğa özgü tanı ölçütlerini vererek bu durumdan “infantil otizm” diye söz etti. Vakaların ortak özelliği insanlarla iletişim kurma güçlüğü, ekolali, zamirlerin tersten kullanımı, tekrarlayıcı amaçsız hareketler ve aynılıkta ısrar etme, değişime dirençti. Daha sonraları, 1944 yılında Asperger “Otistik Psikopati”, 1947 yılında Bender “Çocukluk Şizofrenisi”, 1955 yılında Rank “Atipik Çocuk” gibi kavramları kullanılagelmiştir. Uzun yıllar bu durum şizofreninin erken belirtisi olarak söz edilmiştir. 1970 yılına gelindiğinde bebeklik döneminde başlayan bu durumun, çocukluğun daha sonraki dönemlerinde veya ergenlikte başlayan psikozlardan farklı olması nedeniyle ikisini ayırt etme gereksinimi duyulmaya başlanmıştır. Otizm tanısı ilk kez 1980 yılında DSM III’te “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar” başlığı altında, ayrı bir hastalık olarak tanı sınıflamasında yerini aldı. 1987 DSM III-R ‘de YGB genel başlığı adı altında “Otistik Bozukluk”, “Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel bozukluk” (YGB-BTA) tanıları yer almıştır (20). Klinik tablonun 30 aydan önce

başlanması şartı vurgulandı (21). 1994 yılında DSM IV te tanı genişletilerek 3 temel alan ve toplam 12 belirti sıralandı ve diğer OSB alt gruplarından “Rett Bozukluğu”, “Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu” ve “Asperger Bozukluğu” ilave edildi (20, 22).

2.1.2 Tanı Kriterleri

Hastalığın tanı ve sınıflanmasında DSM-IV tanı kriteri kullanılmaktadır. Son dönemlerdeki çalışmalar tanı kriterlerinin yeniden oluşturulması yönündedir ve bu yeni tanı kriterleri DSM-V yer alacağı düşünülmektedir.

DSM-IV Tanı Ölçütleri

I. Aşağıdakilerden en az 6 semptomun varlığı ve bunlardan ikisinin A, birinin de B ve C’den olması.

A. Sosyal etkileşimde kalitatif yetersizlik, aşağıdakilerden en az ikisinin görülmesi

1) Sözel olmayan davranışlarda yetersizlik (göz ilişkisi, yüz ifadesi, beden postürü ve sosyal etkileşim için gerekli jestler)

2) Gelişim düzeyine uygun arkadaş ilişkisi geliştirememesi

3) Başkalarının sevincini-duygularını paylaşmakta eksiklik

4) Sosyal-duygusal karşılık verememe

B. İletişimde kalitatif yetersizlik

1) Konuşma dilinin gelişmesinde gecikme ya da tam yokluğu ve bunun sözel olmayan (jest, mimik) yollardan, alternatif iletişim yolları ile telafi edilmemesi

2) Konuşması gelişen bireylerde, konuşmayı başlatma ve sürdürmede eksiklik

3) Dilin tekrarlayıcı ya da idiyosenkratik kullanımı

4) Gelişim düzeyine uygun, kendiliğinden oluşabilecek taklide dayalı senaryolu oyunların olmayışı

C. Kısıtlayıcı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ve etkinlikler

- 1) Bir ya da daha fazla kısıtlayıcı tekrarlayıcı ilgi alanı ile uğraş (ister yoğunluk isterik içerik tuhaf olsun)
- 2) Bariz değişmez tutkulu, işlevsel olmayan rutin ya da ritüellere bağlılık
- 3) Tekrarlayıcı, stereotipik el, parmak ve ya tüm bedeni kapsayan motor mannerismler
- 4) Nesnelerin bir bölümü ile ilgilenme

II. Tanı için bu belirtilerin en az bir grubunun 3 yaş öncesi başlangıç olması gerekir.

III. Ayrıca Rett bozukluğu ve dezintegratif bozukluk tanısı almamalıdır (22).

2.1.3 Yaygın gelişimsel bozukluk tipleri

Kanner'in otizmi tanımlamasından kısa bir süre sonra Avusturyalı doktor Hans Asperger dil gelişiminde herhangi bir bozukluk olmaksızın, normal zeka işlevine sahip fakat, karşılıklı sosyal etkileşim ve işlevsellikte bozulmaların olduğu Otistik Psikopati olarak adlandırdığı bu bozukluğu tanımlamıştır. Fakat hastalık ancak elli yıl sonra tanı sınıflandırılmasında yerini alabilmiştir (23). Asperger bozukluğu Yaygın Gelişimsel Bozukluklar grubunun en iyi bilinen alt tiplerinden biridir. Asperger bozukluğu DSM IV-TR tanı sınıflandırılmasında toplumsal etkileşimde bozulma (A tanı ölçütü), sınırlı basmakalıp ilgi alanı ve davranışları (C tanı ölçütü) içermesine rağmen dil ve bilişsel gelişimde bozukluğun olmaması (B tanı ölçütü) ile ayırt edilir (22). Diğer bir alt grup olan Yaygın Gelişimsel Bozukluk- Başka Türü Adlandırılmayan (YGB-BTA) belirtileri daha hafif ve diğer YGB şemsiyesi altında olan, ancak belirgin bir klinik tabloya uymayan, fakat başka herhangi bir tanıyla da açıklanamayan OSB hastalarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu bireylerde toplumsal etkileşimde bozulma kriterlerinden en az biri bulunsada otizm tanısı için aranan diğer kriterler tam karşılanmamaktadır (19, 22).

YGB-BTA terminolojisi yeni bir tanım olsa da arada kalan ve belirli bir tanı grubuna girmeyen hastaların olduğu eskiden beri bilinmekteydi. 1943 yılında Kanner otizmi tanımladıktan sonra, benzer özellikler gösteren, fakat Kanner'in tanımına uymayan sayısız olgu bildirimi mevcuttur. DSM –IV-TR'de

belirtilen YGB-BTAüzerinde daha fazla araştırmaların yapılması gerektiği, çalışmaların halen sürdüğü bir tanısal kategori olarak gösterilmektedir (24,25). OSB içerisinde yer alan Rett Sendromu ve Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu son dönemdeki sınıflandırmada etiyolojideki ve klinik seyirdeki farklılıklardan ayrı tutulmaktadır.

1966 yılında Andreas Rett yirmi iki olguluk vaka serisini yayınlarak sadece kız çocuklarından görülen, stereotipik el hareketleri, demans, otistik belirtiler, ataksi, kortikal atrofinin eşlik ettiği tablodan “serebroatrofik hiperamonemi” olarak söz etti. Sadece kız çocuklarında görülen, X’e bağlı gelişen, ilerleyici nörogelişimsel bozukluk olan Rett Bozukluğu normal bir gelişimi takiben, gelişimde duraklama, toplumsal etkileşimin ortadan kalkması, kazanılmış becerilerin kaybı ve basmakalıp el hareketlerinin olduğu bir durumdur.

Bozukluğa X kromozomunda bulunan metil-CpG bağlayan protein 2’yi kodlayan MECP2 geninde ortaya çıkan yeni mutasyonun neden olduğu düşünülmektedir. Homozigot erkek bireyler yaşamla bağdaşmaz, intrauterin abortusla sonuçlanır. Bozukluk 0.44-2.1/10.000 sıklığında gözükmetedir (26). Malnutrisyon, kardiyak sorunlar, solunum problemleri, artmış nöbetler gibi komplikasyonlar nedeniyle hayatın ilerleyen dönemlerinde kaybedilmektedir. En önemli ayırıcı tanı ölçütü baş çevresi gelişiminde duraklama olmasıdır.

1908 yılında Theoder Heller yaşamın ilk 3 yılında normal gelişimi takiben “infantil demans” ismini verdiği gelişimsel gerilemelerin gözüktüğü bozukluk tanımlamıştır. Oldukça nadir görülmekte olan (0.11/10.000) geç başlangıçlı Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu için tanı kriterleri doğumdan sonra iki yıl içinde yaşına uygun normal gelişimi takiben toplumsal etkileşimde, iletişimde ve sınırlı basmakalıp davranışların olması ayrıca hastanın daha önceden kazanılmış becerilerin kaybı ve bağırsak, mesane kontrolü ve motor becerilerinde kayıplar olması şartı aranmaktadır. Bu bozukluğun tanısını koyabilmek için durumu açıklayan herhangi başka tıbbi bir durum ile ilişkisi olmaması gerekmektedir (22, 26). Olguların çoğunda progressif nörolojik kötüleşme çok ileriye gidebilmekte ve diğer otizm olgularında gözlenenden daha fazla zeka geriliği ve epilepsi oranı görülmektedir.

2.1.4 Epidemiyoloji

Otizm uzun yıllar nadir bir hastalık olarak bilinmekteydi ve son yıllarda yapılan çalışmalar hastalığın o kadar da nadir olmadığını gündeme getirdi. En son yapılan çalışmalarda hastalığın prevalansı % 1.1 olarak gösterilmektedir. Bu durum 40 yıl önceki verilerle kıyaslanınca 20-100 kat artmış olarak görülmektedir. Bu artış kullanılan tanı ölçütlerindeki değişim ve sosyal duyarlılıkta artış ile ilgilidir (2, 21). Otistik bozukluk erkeklerde kızlara göre 4-5 kat daha fazla görülmekle birlikte kız çocuklarında durumun daha ağır seyrettiği ifade edilmektedir (27).

Asperger Bozukluğu ile ilgili son on beş yılda yapılan çalışmalarda bu hastalığın prevalansının arttığı bildirilmektedir. Tüm çalışmalarda erkeklerde görülme oranı artmış olmakla birlikte, yaklaşık olarak 10-36/10.000 sıklığında görüldüğü bildirilmektedir (26).

YGB-BTA ile ilgili çalışmalar otizme göre oldukça azdır. Çalışmalarda kullanılan işlemler, tanı değerlendirmeleri ve ölçümlere göre sonuçlar değiştiğinden çalışmalar arasında karşılaştırma yapmak olası değildir (19, 28). Son on yılda yapılan çalışmalarda otizme göre 1,5 kat daha sık görüldüğü ve 10.94-36.1/10.000 sıklığında görüldüğü tahmin edilmektedir. Rett sendromu sadece kız çocuklarında görülmekte ve 12 yaş itibarıyla yapılan bir çalışmada 0.6-1.0/10.000 sıklığında görüldüğü bildirilmektedir (29, 30). Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu ile ilgili olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalar oldukça azdır. Genel olarak erkeklerde kızlara göre 3-8 kat daha fazla görülmekle birlikte, toplum prevalansının 1.1-6.4/100.000 arasında değiştiği ileri sürülmektedir (31, 32).

2.1.5 Etiyoloji

Otizmin etiyolojisi karmaşıktır ve birçok olgunun altında yatan patoloji netlik kazanmamıştır. Otizmin etiyolojisinin anlaşılması için yapılan epidemiyolojik çalışmalarda otizmin kompleks bir etiyolojisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber tıbbi bozuklukların (tuberoskleroz, infantil spazm, serebral libidozis, frajil X sendromu, epilepsi) görülme sıklığının artmış olduğu bilinmektedir. Otizm spektrum bozukluklarda tıbbi bozuklukların görülme sıklığı ile ilgili çelişkili sonuçlar olmakla birlikte, ağır ve çok ağır zekâ geriliği eşlik ediyorsa tıbbi bozuklukların daha yaygın bulunabileceği bazı yazarlar tarafından ifade edilmiştir (1, 19).

Son yıllarda otizm prevalansında artış, kalıtsal olmayan risk faktörlerinin üzerinde önemli tartışma başlatmıştır. Yapılan çalışmalarda bu risk faktörlerinin önemli bir kısmının prenatal dönemde etkili olduğu saptanmıştır (33, 34). Prenatal dönemde; maternal infeksiyonların (sifiliz, su çiçeği, herpes, kızamık, influenza gibi), maternal hastalıkların (diabet, venöz trombüs, hipotroidi gibi), intrapartum ilaç kullanımının (thalidomide, valproik asit gibi), genel anestezi ilaçlarının kullanımının, postnatal dönemde de hipoksik iskemik durumların, kafa travmalarının, geçirilen infeksiyonların (herpes, su çiçeği, kızamık, kızamıkçık, kabakulak gibi), kimyasal maddelerin, civa ve thimerosal içeren aşıların kullanımının otizm için risk faktörleri olduğu saptanmıştır (35, 36). Ayrıca natural killer ve T hücre fonksiyonlarında azalma, immünglobulin düzeylerinde farklılaşma gibi immunolojik faktörlerin, kemokin, nöropeptit ve nörotropin seviyelerinde farklılaşma, serotonin artışı, endojen opioidlerde (enkefalin, endorfin) ve dopamin düzeylerindeki değişkenliklerin ve de başta amigdala ve serebellum olmak üzere hipokampus, singulat, parietal lop, beyin sapı, talamus ve frontal lop yapı değişikliklerinin hastalığın gelişmesinde önemli olduğu saptanmıştır (37, 38,100).

Aile ve ikiz çalışmaları otizmi olan ailelerde artmış otizm riskinden söz etmektedir. Otizmin kardeş eşhastalanma oranı %4.5'e ulaşmaktadır. Monozigot ikizlerde konkordans %36- %91 olarak bildirilmektedir.

Bu oran dizigotik ikizlerde %5-10 şeklindedir. Bununla birlikte pek çok kromozomal bozukluğa otizmin eşlik ettiği bildirilmektedir ve sıklığı %10- %37 arasında değişmektedir. Kromozomal anomaliler delesyonla birlikte ve üç önemli alan vardır: 15q 11q13, 22q, X kromozomu. Ayrıca 1p, 2q, 3, 5p, 5q, 7q, 13p, 16p, 17q, 19p, X kromozomlarında çeşitli varyasyonlar tespit edilmiştir (21).

Bazı olgularda kromozom fragil bölgelerinde sayısal artış ve submikroskopik delesyonlar saptanmıştır. Multipleks otistik ailelerde ise oldukça az sitogenetik anomali bildirilmiştir. Ashley-Koch ve ark. 3 kardeşin, annelerinden kalıtılan 7q da parasentrik inversiyon taşıdıklarını bildirmiştir (39). Bu ailede iki erkek çocukta otizm, kız çocukta ise dil sorunu saptanmıştır. Bu tür aileler aile bağlantı analizi için oldukça yararlı bir grubu oluşturmaktadırlar. 15. kromozom anomalili otistik hastaların çoğunda mental

gerilik ve epilepsi saptanmıştır. En sık 15q11-13 bölgesinin interstisyel duplikasyonu ve delesyonu saptanmıştır. Bu bölge aynı zamanda Prader Willi ve Angelman sendromları için de kritik bölgedir.

Serotonin üzerinden gidilen çalışmalar sonunda, 17. kromozomda yer alan serotonin transporter geni ve serotonin 2A reseptör geni promotor bölge polimorfizmleri ve çeşitli mutasyonlar saptanmıştır (40, 41). Yapılan diğer çalışmalarda 3. kromozomda, GAT ve OXTR geni, X kromozomunda MeCP2, NLG3, NLG4 genlerinin otizmden sorumlu genler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca adenylosuccinate lyase, adenosine deaminase, engrailed 2, HLA bölgesi genleri, HRAS1, mitokondrial lysine tRNA ve NF 1 genleri ile bireysel çalışmalarda bağlantı gösterilmiştir (42, 43). HLA bölgesi genlerinin araştırıldığı çalışmada HLA -B44, -B57, -DR4, -DR14 vs ile Otizm arasında ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (98, 99).

2.1.6 Davranışsal özellikler ve Klinik

OSB bireylerde hastalığın şiddetine göre göreceli olarak sosyal etkileşimde bozulmalar görülmektedir. Sosyal davranışları garip ve uygunsuz olmaktadır, arkadaş edinme güçlükleri ve yaşlılarıyla oyun oynamada belirgin sorunlar görülür.

Asperger bozukluğu hariç diğer OSB tanısı olan bireylerde dil gelişimi etkilenmektedir. Zamirlerin tersten kullanımı, tonlama problemi, neolojizm ve ekolali görülebilmektedir. Nesnelerle yineleyici biçimde uğraşırlar. Daralmış bir ilgi alanları vardır, belirli oyuncaklarla tekrar-tekrar oynarlar, çok az sembolik özellikleri vardır. Aynılıkta ısrar ederler, ufak değişiklik ve farklılıklara oldukça aşırı tepki verirler. İşlevsel olmayan rutin ve ritüelleri vardır. Rutinin dışındaki davranışlara kontrol edilemez tepkiler verebilmektedirler (44, 45).

2.1.7 Sık görülen problem davranışlar ve komorbid ruhsal sorunlar

Hareketlilik sık görülen davranış problemlerinden biridir. İhtiyaçlara veya değişikliğe bağlı olarak agresyon ve öfke nöbetleri gözlenebilir. Kafa vurma, ısırma gibi kendine zarar verici davranışlar otistik çocuklarda sıklıkla gözlenmektedir. Öz bakım becerilerinde problem, duyuşal hiposensitivite ve hipersensitivite, uyku sorunları, yeme reddi, yemek seçme ve pika gibi yeme sorunları da otistik çocuklarda siktir (21, 45).

Komorbid psikiyatrik rahatsızlıklardan Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB), Obsesif Kompulsif Bozukluk (OKB), tik bozukluğu sık rastlandığı, kaygı bozukluğu ve depresyon özellikle yüksek işlevsellikli otizm ve asperger bozukluğunda başta olmak üzere OSB bireylerde görülebilmekte ve okul başarısı ile sosyal uyumunu bozabilmektedir. Araştırmalar otizmlili çocukların büyüdükçe daha çok depresyon ve kaygı gibi durumların arttığını göstermiştir (21, 46).

2.2. Genetik

2.2.1 Genel Bakış

Moleküler Genetik genlerin yapı ve işlevlerini moleküler düzeyde incelemektedir. Bu bağlamda DNA'dan oluşan genler hücre çekirdeğinde bulunmakta ve taşıdıkları genetik bilgileri aktarılmasını sağlamaktadır. Her bir gen paternal ve maternal kaynaklı iki alelden oluşmaktadır. Genom organizmadaki tüm DNA'dır. İnsan genomunda 3 milyar baz çifti bulunmaktadır. Genotip bireyin sahip olduğu tüm genlerin tamamıdır. Gözlenen bir özelliğe fenotip denir. Bu bir hastalık, bir protein çeşidi ya da gözlem ile belirlenebilen herhangi bir diğer nitelik olabilir. Fenotip büyük ölçüde gözlem yöntemine ve doğruluğuna bağlıdır. Bir gen ya da gen topluluğunun herhangi bir derecede fenotipi belirlemesine penetrans denir ve %0-100 arasında değişir. Yani çevresel faktörler değişken değilse her bir genotip bir fenotipe karşılık gelecektir.

Doğada aynı türde organizmalar genellikle bazı görünüşleri ile farklıdır. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilir. Birçok gen lokusunda iki ya da daha fazla allel yer alabilir ve az görülen alel popülasyonda %1'den fazla görülüyorsa buna genetik polimorfizm adı verilir. Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir (47). Proteinleri kodlayan insana gen lokuslarının en az 1/3'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır (48, 49). Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşikliklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm),

kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomsal polimorfizm), veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizm) şeklinde görülebilir (48, 50).

Bir gen lokusundaki aleller arasında en sık görülen alel popülasyonda 0.95'den az sıklıkta görülüyorsa o lokus (gen) polimorfik olarak tanımlanır (51). Çeşitli farmakolojik, nörolojik veya biyokimyasal veriler doğrultusunda bir hastalığın oluşmasında aday olarak gösterilen genin hastalıkla ilişkilendirilmesinde aday genlerdeki polimorfizmlerin belirlenmesi önemli yer tutar. Polimorfizmler gen üzerindeki sıklığı, yerleri, işlevleri gibi kategorilerle çeşitli gruplara ayrılmıştır (52). Bu anlamda restriksiyon enzimleri kesim yerlerine göre farklı parçalar üreten 'Restriksiyon Parçaları Uzunluğu Polimorfizmi' (53), farklı sayılarda tekrarlayan ardışık parçalardan oluşan 'Değişken Sayılı Tekrar Takımı' (54), sitozin-adenin gibi çeşitli sayıda basit dizi tekrarlarından oluşan mikrosatellitler veya tek bir nükleotid farklılığından ortaya çıkan iki alelli polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism) (55), aday genler ile hastalık arasındaki ilişkiyi araştırmak için kullanılmaktadır.

Kompleks hastalıkların genetik araştırmalarında hastalığın fenotipinin genetik göstergelerler (marker) ilişkilendirilmesi (association) önemlidir (56).

Rekombinasyon fraksiyon temelli genetik bağlantı (linkage) kısa kromozom bölgelerinin anne babadan çocuğa değişmeden kalıtılabilirliği olarak tanımlanır (57). Sonuçta bu bölgeler üzerindeki alel kombinasyonları (örn. Haplotipler), çoğu kuşaklar boyunca özelliğini koruyarak popülasyonda sık görülür hale gelirler. Bu aynı gamet üzerinde alellerin çeşitli kombinasyonlarının normalden fazla kalıtılmasına alelik ilişki diğer bir deyişle bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) denir (58).

Popülasyonda alelik ilişkiler oluşmasında çeşitli mekanizmaların rol aldığı öne sürülmektedir. Bunlar arasında 'rastlantısal genetik birikim' (random genetic drift), sınırlı popülasyonda alel veya haplotip alel frekanslarında bir kuşaktan diğerine geçerken oluşan rastlantısal değişiklikler tanımlar (59). Bir kuşaktaki gen havuzu öncekinin rastlantısal kesiti olarak düşünülür. Bu nedenle alelik ve haplotip frekanslar varyasyona açıktır ve mutasyonlar aracılığıyla değişebilir. Değişme popülasyonun büyüklüğüne bağlıdır ve popülasyon büyüdükçe çeşitliliğin ve mutasyonların etkileri ve

aleller/haplotipler üzerindeki rastlantısal birikimler azalır. Benzer diğer fenomen de 'başlangıç etkisi' (founder effect) olarak tanılanan, ufak bir grup bireyden, genelde izole şekilde, hızlıca büyüyen populasyonlarda görülür (60). Sonuçta belli bir rekombinasyon fraksiyonunda aleller arasında normalden fazla ilişki ortaya çıkabilir. Alelik ilişkinin oluşumunda diğer bir mekanizma da populasyon karışımı veya tabakalaşmasıdır. Populasyonun alt gruplarında iki alelin frekansları pozitif eşilişki gösteriyorsa bu aleller populasyonun tümünde de aynı ilişkiyi gösterebilmektedir. Bu durum 'sahte ilişki'(spurious association) fenomenine işaret eder (58). Bu bağlamda, araştırmacılar bir hastalıkla bir gen arasında üç şekilde ilişki ortaya çıkabileceğini öne sürmüşler (60). Birincisi gerçek ilişkidir; yani polimorfizmi ilişkilendirilen gen hastalığın oluşmasında rol oynar ve eğer böyle sadece bir tane gen varsa bu bulgunun farklı etnik populasyonlarda tekrarlanması beklenir. İkinci bağlantı dengesizliğidir; ilişkilendirilmiş polimorfizm aynı gen üzerinde gerçekten hastalığın oluşumunda rol oynayan başka bir polimorfizmle bağlantılıdır. O zaman aynı gen üzerindeki diğer polimorfizmlerin de irdelenmesi gerekmektedir. Üçüncüsü, populasyon tabakalaşması yüzünden pozitif ilişki ortaya çıkmasıdır. Bu nedenlerden ilk ikili, ampirik olarak irdelenebilir. Yani aynı gen üzerindeki farklı polimorfizmler test edilebilir ve farklı etnik topluluklarda aynı ilişkiler araştırılabilir. Sahte ilişki fenomeninin önüne geçebilmek için ise aile temelli ilişki analizlerinin metodolojik olarak kullanılması yaygınlaşmıştır. Bu tür analizlerde örnekler çekirdek ailelerden gelir ve anne-babadan hasta çocuğa geçmiş aleller 'hasta grubunu', geçmemiş aleller ise 'kontrol grubunu' oluşturur (61). Çeşitli uygulama yöntemleri olan bu analizlerin, en sık kullanılan ve bu tezde de uygulanan biçimleri Haplotip Temelli Haplotip Relatif Risk (HRR)(Haplotype Relative Risk) Analizi ve Kalılabilme Eşitsizliği Testleridir (KET) (Transmission Disequilibrium Test). İki analizin de temel özelliği kontrol grubunun aile içinden gelmesi ve böylece hasta ve kontrol grubundaki alel frekansları farklılığından ortaya çıkabilecek anlamlı yanlış pozitif bulguların önüne geçmesidir. HRR analizi anne-babadan çocuğa kalıtılmış aleller ile kalıtılmamış alellerin sayılarını istatistiksel olarak ki kare testleri ile inceler (62). Bunun yanı sıra, KET temelli analizler ise ailelerde sadece aday alele heterozigot anne-babadan çocuğa katılmasında normalde beklenen %50

sapmasını irdelediğinden, aday gen ile hastalık arasındaki bağlantıyı da saptadığı öne sürülmektedir (63).

2.2.2 Kemokinler ve genetik

Kemokinler Kemotaktik sitokinlerin ailesinin üyesi olup protein yapıdadır. Bu yapılarında bulunan sistein rezidüelerinin bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre dört alt gruplara (C,CC,CXC ve CX3C) ayrılmaktadırlar. Kemokinler başlıca enflamasyon, doku hasarı, enfeksiyon, kardiyovasküler hastalıklar, allerji, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol oynarlar. Kemokinlerin lökosit migrasyonu, embriyogenez, angiogenez, hemopoietik homeostaz, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, doku morfogenezi gibi bir çok olayda rol oynadığı da belirtilmektedir. Ayrıca Kemokinler, lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitinin oluşumunda, T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın olumasında, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immünitede ve HIV-1 virüsünü de içeren çeşitli virüsler tarafından konakçı immün cevabı baskılayan olaylarda rol oynamaktadırlar. Kemokin genleri spesifik lokuslarda yer almaktadırlar. CC kemokin genleri 17q11.2-12 ve CXC kemokin genleri de 4q13 lokusunda bulunurlar(64, 65, 66).

2.2.3 MCP-1

MCP-1 monosit/makrofaj migrasyon ve infiltrasyonunu düzenleyen CC alt grubundaki önemli ve ilk keşfedilen kemokindir. 17'ci kromozomda (17q11.2) yerleşen insan MCP-1'ini kodlayan Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL 2) geni 76 amino asitten oluşur ve boyut olarak 13 kDa'dur. MCP-1 geninin regülatör özellikleri promotor bölgesinin bileşimi ve yapısıyla bağlantılıdır. MCP-1 geninin promotor bölgesinin distal kısmı dimetilsülfat hipersensitif bölgenin (HS) etrafında κB -1 ve κB -2 olarak isimlendirilen NF- κB bağlanma bölgesi içerir. MCP-1 glikozilasyonu kemotaktik potansiyelinde anlamlı azalmaya neden olmaktadır. MCP-1 doku hasarı ve enfeksiyona bağlı oluşan enflamasyonun kenarına monosit, memory T hücreleri ve dendritik hücrelerin toplanmasına yol açar. MCP-1 monositler ve bazofiller için bir kemotaktik aktivite sergiler, ancak nötrofil veya eozinofillerin çekmez. N terminalindeki

rezidüellerin delesyonu bazofillerin duyarlılığının kaybolması, eozinofiller için ise kemotaksis oluşmasına neden olur. MCP-1 ile etkileşen bazofil ve mast hücreleri içerdikleri granülleri hücrelerarası alana boşaltırlar. IL-2 veya diğer sitokinlerin önetkileşimi bu etkiyi güçlendirir. MCP-1 monositlerin anti-tümör etkinliğini artırmaktadır ve bu granülom oluşumu için gereklidir. MCP-1 dış oluşumu ve kemik yıkım yerlerinde bulunabilir. Kemikte MCP-1 olgun osteoklastlar ve osteoblastlar tarafından ekspese edilmektedir ve nükleer faktör kB (NFkB) kontrolü altındadır. MCP-1 nöronlarda, astrositler ve mikrogliyalarda bulunmaktadır. MCP-1 Merkezi Sinir Sisteminde hem nöroimmüniteden sorumludur, hem de nöronal aktivitede rol almaktadır. Nöronlarda MCP-1 ekspesyonu esas olarak serebellum serebral korteks, globus pallidus, hipokampus, paraventriküler supraoptik hipotalamik çekirdekleri, lateral hipotalamus, substantia nigra, facial çekirdekler, motor ve spinal trigeminal nükleus, gigantocellular retiküler nukleus ve purkinje hücrelerinde bulunmuştur (64, 67, 68).

Yüksek MCP-1 düzeyi OSB'lu çocuklarda davranış bozukluğu, bilişsel faaliyetlerde gerilik, ekspresif dilde gerilik ve kötü sosyal iletişim ile ilişkili bulunmuştur (15). Amniyotik sıvıdaki MCP-1 düzeyinin yüksekliği ile OSB açısından risk teşkil ettiği ve MCP-1'in OSB patofizyolojisinde rol alabileceği öne sürülmüştür (100).

Ayrıca Majör Depresyon, Bipolar Bozukluk ve Şizofrenide de MCP-1 rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (69, 70, 71).

MSS'de çeşitli nörodejeneratif hastalıklarındaki nöroinflamasyonda MCP-1 yer aldığı bilinmektedir. Deneysel otoimmün ensefalomyelit, epilepsi, beyin iskemisi, inme, Multiple Skleroz, Alzheimer hastalığı ve travmatik beyin hasarında glial hücrelerinin MCP-1 ekspresyonu artar (67, 72, 73, 74, 75).

MCP-1 monositik infiltrasyon ile karakterize birçok hastalığın (ateroskleroz, romatoid artrit, psöriyazis vb) patogenezi sorumlu tutulmuştur (76).

Glomerülonefrit modelinde anti-MCP-1 antikor uygulaması, makrofajlar ve T-hücrelerinin infiltrasyonunu baskılar, aynı zamanda kresentik oluşumu, skar ve böbrek bozukluğu azaltır (77). MCP-1'in glioma, ovaryum, meme ve özafagus kanserleri de dahil bir çok tümörde fazlaca eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücrelerinde MCP-1'in ekspresyonunun tümör vaskülarizasyonu ve makrofaj infiltrasyonu ile bağlantılı olduğu tespit

edilmiştir . Bazı araştırmacılar MCP-1'in tümör neovaskülarizasyonu ve ilerlemesi, hastalığın erken tekrarlama ve tümör ilerlemesiyle ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir (64, 78). MCP-1'in anjiyogeneze de ilişkisi vardır. MCP-1 ya direkt yada büyüme faktörleri ve VEGF, FGF gibi anjiyogenik faktörler salan tümörlerle ilişkili makrofajlar gibi ajanlarla anjiyogenezi indükleyebilir. Son zamanlarda MCP-1'in indüklediği proteinin (MCP-1) sadece insan periferik kan monositlerinde değil endotel hücrelerinde de arttığı ve bu transkripsiyon faktörünün MCP-1 tarafından indüklenen anjiyogeneze aracılık ettiği gösterilmiştir. İnsan kordon kanı endotel hücrelerindeki MCP-1 ekspresyonu hücre proliferasyonu ve göçünü teşvik ettiği ve VEGF'yi indükleyebildiği bildirilmiştir (64, 78, 79).

2.2.4 CCR2

MCP-1 reseptörü olan CCR2 protein yapıdadır ve CCR2 geni tarafından kodlanmaktadır. CCR2 immün yanıtın bileşeni olarak monosit, aktiv T hücreleri ve dendrit hücrelerinden eksprese edilmektedir. Çeşitli hayvan deneylerinde CCR2'nin nöronal ekspresyonu esas olarak anterior olfaktör çekirdek, serebral korteks, hipokampal formasyon, kaudat putamen, globus pallidus paraventriküler supraoptik hipotalamik çekirdekler, amigdala, substantia nigra, ventral tegmental alan, beyin sapı ve beyincikte tespit edilmiştir. CCR2'nin dopaminerjik ve kolinerjik nöronlarda diğer klasik nörotransmitterlerle birlikte yerleştiği gözlenmiştir. Seçici beyin yapılarındaki konstitütif nöronal CCR2 ekspresyonu bu reseptörün nöron iletimine dahil olduğunu ve muhtemelen dopaminerjik ve kolinerjik nörotransmisyon ve bunlarla ilgili bozukluklar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli çalışmalar CCR2'nin sadece nöroinflamatuvar olaylarda iştirak etmediğini, aynı zamanda glial ve nöron hücrelerin bileşeni olduğunu göstermiştir (64, 67). Reseptörler, Ca bağımlı agonistler aracılığı ile adenilat siklazı mobilize ve inhibe eden bu gen tarafından kodlanır. CCR2 geni 3. kromozomun p21-p24 bölgesinde CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 genlerinin yakınında bulunan CC kemokin reseptör kümelerindeki yerleşmiş bir gendir. Bu gen 6.7 kb uzunluğundadır ve 3 ekzona sahiptir. Gen tarafından iki farklı transkript bağlanma variantı eksprese edilmektedir.

CCR2'nin C terminalindeki farklılığa bağlı CCR2A ve CCR2B olmak üzere iki formu vardır. CCR2A mononükleer hücreler ve vasküler düz kas hücrelerinde, CCR2B ise monositler ve aktif NK hücrelerinde baskın izoformlardır (64, 80, 81).

CCR2A ve CCR2B'nin farklı sinyal yollarını etkinleştirmesi ve farklı eylemler yol açması olasıdır. Örneğin, CCR2A-pozitif hücrelerinin MCP-1 kemotaksisi Ca mobilizasyonu olmadan gerçekleşirken, CCR2B-pozitif hücrelerinde Ca akışı meydana gelir. MCP-1 romatoid artrit hastalarında elde edilen sinoviositlerde CCR2A ekspresyonunu artırabilirken CCR2B için bu söz konusu değildir (82). CCR2'nin hem proenflamatuar, hem de antienflamatuar etinliğe sahip olduğu bilinmektedir. Proenflamatuar etki antijen sunan hücreler ve T hücrelerine bağliyen antienflamatuar etki regülatör T hücrelerindeki ekspresiyonuna bağlıdır . CCR2 için yedi kadar tek nükleotid polimorfizmleri bildirilmiştir (64). CCR2 eksikliği olan farelerde duysal nöropatilerin başlamasına dirençli olduğu gösterilmiştir (83). İnsanlardaki kan lökositlerinin gen ekspresyonunu gözlemleyen çalışmada CCR2 ve bilişsel fonksiyonu (mini-mental durum muayenesi ile değerlendirilme) ekspresyonu arasındaki ilişkinin olduğu bulunmuştur. Yüksek CCR2 ekspresyonu olanlarda bilişsel fonksiyondanda belirgin gerilik tespit edilmiştir (84).

2.2.5 MCP-1/CCR2 gen polimorfizminin hastalıklarla ilişkisi

MCP-1 ve onun reseptörü CCR2 çeşitli hastalıkları tetiklediği ve katkıda bulunduğı gösterilmiştir. Bunlar arasında Diabetes Mellitus, AIDS, aterosikleroz, meme kanseri, romatoid artrit, glomerülonefrit, allerjik astım, Psöriyazis, ve bir çok nöropsikiyatrik hastalıklar bulunmaktadır (67, 72, 73, 74, 75, 76).

MCP-1 bir çok polimorfizme sahiptir. Fakat en çok çalışılanı MCP-1'in düzenleyici bölgesinde bir tek nükleotid polimorfizmi, A-2518G'dir. Bipolar bozukluğu olan hastalarda yapılan çalışmada MCP-1 A2518G polimorfizminin manik epizotlarla ilişkili olabileceğı anlaşılmıştır. (70) Bir diğ er çalışmada MCP-1 A2518G polimorfizminin depresyona eğilimi artırdığını, dolayısıyla depresif atak geçirme riskini yükselttiğı tespit edilmiştir. Ayrıca A aleli taşıyan duygudurum hastalarının G aleli taşıyanlara oranla psikotik belirtiler daha sık görülmüştür.(69)

MCP-1 A2518G polimorfizminin şizofreni hastalarında antipsikotik ilaçlara karşı dirençte rol oynadığı bulunmuştur.(71)

MCP-1 ve CCR2 polimorfizminin Alzheimer hastalığındaki rolünü araştırmak için yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilse dahi, güçlü destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.(85, 86)

Diğer hastalıklara baktığımızda bir çok anlamlı sonuç elde edildiğini görmekteyiz. MCP-1 geninin -2518 GG genotipinin koroner arter hastalığına yatkınlıkla ilişkisi olduğu bildirilmiştir. 3000'den fazla birey baz alınarak yapılan Framingham Kalp çalışmasında G alleli ve MI sıklığı arasında bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir (87).

Bir başka çalışmada MCP-1 -2518 G allelini homozigot olarak taşıyanların koroner arter hastalarında sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (88). MCP-1 -2518 GG homozigotlarının yüksek prevelansı felç ve miyokard infarktüs öykülü hastalarda da bildirilmiştir. Bununla birlikte MCP-1 -2518 polimorfizminin iskemik kalp hastalığıyla ilişkisi olmadığını gösteren bir bildirde vardır (89).

CCR2'nin değişik polimorfik bölgeleri tanımlanmıştır. En kapsamlı çalışılan polimorfizm ekzon 2'de CCR2 proteinini kodlayan genin 190. pozisyonundaki G'nin A'ya dönüşümüne neden olanıdır. Bu nükleotid değişimi proteinin transmembran bölgesindeki valin-64 (V) in izoleusin (I)' e (V64I) değişimiyle sonuçlanır. Fonksiyonsuz mutant bir proteinle sonuçlanan bu polimorfizmin reseptör ekspresyonunu değiştirmesiyle ilişkisinin olup olmadığı hala bilinmemektedir. Bazı olgu-kontrol çalışmalarının CCR2-64I genotipine sahip olan bireylerin inflamatuvar hastalıklar için düşük bir risk taşıması gerektiğini bildirmesine rağmen bu polimorfizmin KAH'la ilişkisine dair çelişkili raporlar vardır (90).

Değişik etnik gruplardaki 64I allel varyantı sıklığı % 10 ile % 30 arasında değişen bir çeşitlilik gösterir. Ayrıca genotipdeki bu allelin varlığının AIDS başlamasını geciktirdiği, diyabetes mellitusla ve bronşiyal astımla bağıntılı riskleri arttırdığı gösterilmiştir (91).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmadaki örnek grubu İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında takip edilen 2-18 yaş arası Otizm Spektrum Bozukluğu tanılı 101 çocuk ve anne-babalarında oluşmaktadır. Hasta seçimi poliklinikte çalışan hekimler tarafından yapılmış olup, kan örnekleri sorumlu hemşireler tarafından alınmış ve sınıflandırılarak İ.Ü.DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'na gönderilmiştir. Hastaların seçiminde izlenen kriterler aşağıda özetlenmiştir.

Steril EDTA'lı tüplere alınmış periferik kan örnekleri DNA saflastırılması için en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır.

Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri:

- 1.DSM-IV tanı kriterlerine göre Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı alma
- 2.2-18 yaş arası olmak
- 3.Biyolojik anne ve babalarının hayatta olmaları
4. Kronik sistemik,akut ve kronik inflamatuvar,doğumsal metabolik hastalıkları olan ve ciddi kafa travması olmaması.

Hastalar anne-babaları eşliğinde klinik görüşme eşnasında Childhood Autism Rating Scale (CARS) ile değerlendirilmiş ve sosyodemografik form doldurulmuştur. IQ puanı hastaların dosyalarından alınmıştır.

3.2. Ölçek ve Formlar

3.2.1. CARS

Bu ölçek tanısal değerlendirme ölçeği olup çeşitli kriterlere göre 1'den 4'e kadar puan vererek yapılmaktadır. Toplam alınan puana göre non-otistik, hafif otistik, orta otistik ve ağır otistik olarak derecelendirme yapılır. CARS'da değerlendirilen kriterler aşağıdaki gibidir.

- İnsanlara ilişkisi
- Taklit yeteneği
- Duygusal tepki
- Vücut kullanımı

- Nesne kullanımı
- Değişime adaptasyon
- Görsel tepki
- Dinleme yanıtı
- Tat-koku-dokunmaya yanıt
- Korku ve sinirlilik
- Sözel iletişim
- Sözel olmayan iletişim
- Aktivite düzeyi
- Entelektüel seviye ve tepki tutarlılığı
- Genel izlenim

Toplam puan 15 ile 60 arasında değişebilmektedir. 30 ve üzeri puan alanlar OSB tanısı almaktadır. (ek 1)

3.2.2. Sosyodemografik form

Yarı-yapılandırılmış görüşme çizelgesi kullanılarak hastaların yaşı, cinsiyeti, kardeş sayısı, dominant eli , okul ve özel eğitim durumu, anne-baba yaşı ve akrabalığı, gebelik ve doğum şekli, gelişim süreçleri, özgeçmiş, soygeçmiş, kliniğe başvuru yaşı, ek psikiyatrik tanı ve ilaç kullanımı gibi sosyodemografik verileri değerlendirildi.(ek 2)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

(PvuII, BsaBI) , primer dizileri (MBI Fermentas) MCP-1 geninde A-2518G polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.

İleri primer: 5'- TCT CTC ACG CCA GCA CTG ACC-3'
--

Geri primer: 5'- GAG TGT TCA CAT AGG CTT CTG-3'.
--

CCR2 geninde G190A polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.

İleri primer: 5'- CAT TGC AAT CCC AAA GAC CCA CTC-3'
--

Geri primer: 5'- TTG GTT TTG TGG GCA ACA TGA TGG-3'

3.4. Kullanılan Gereçler

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifuj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis).

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu

8.74 gram Amonyum klorur, 1 gram Potasyum bikarbonat , 200 µl 0.5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre ddH2O eklendi ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktararak 1200C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra +40C'de saklanmıştır.

3.4.1.2. 0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)

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

3.4.1.3. Molar Sodyum Klorür (NaCl)

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

3.4.1.4. Lokositleri Parcalama Tamponu

25 mililitre 4 molar sodyum klorür ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre Etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120^oC 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 Molar Tris tamponu (stok)

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

3.4.1.6. 9,5 Molar Amonyum asetat

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

3.4.1.7. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

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

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

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

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. Etidyum Bromür(10 mg/ml)

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

3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

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

3.4.2.3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

242 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mililitre Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetat ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.2.4. 5X Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu

54 gram Tris baz ve 27,5 gram Borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanan çözelti oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmış ve en gec bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır.

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4 °C'de 15 bekletildi. +4 °C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen suspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +40°C'de 15 dakika

bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. Inkubasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşca karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası supernatant kısmı temiz bir falkona aktararak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolu alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çöktürüldü. DNA örnekleri +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.2. DNA Saflık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.260 / O.D.280 oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. Bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

3.5.3. DNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

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

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

3.5.4. PCR ile MCP-1 A-2518G Polimorfizminin Tanımlanması

Genomik DNA örneklerinde MCP-1 -2518 lokusuna ait alleller polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için toplam 25 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı 100-200 ng DNA, herbir primerden 0.5µl, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂ ve 1.0 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon reaksiyonları Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

MCP-1 polimorfimine ait amplifikasyon koşulu:

95 °C		3 dakika	Başlangıç denaturasyonu
95 °C		45 saniye	Denaturasyon
55 °C	35 döngü	45 saniye	Bağlanma
72 °C		45 saniye	Uzama
72 °C		5 dakika	Son uzama

PCR ürünleri PvuII restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve % 2 'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülenip ve genotipleme yapılmıştır. A alleli 234 bc, G alleli 159 bc ve 75 bc'de bant vermektedir. AA genotipinde olanlar 234 bc, GG olanlar 159 bc ve 75 bc'de AG genotipinde olanlar ise 234 bc, 159 bc ve 75 bc'de bant vermektedir.

Elde edilmesi beklenen PZR ve kesim ürünleri Tablo 1' de verilmektedir.

PZR ürünleri	
Elde edilecek PZR ürünü	234 bp
Kesim ürünleri	
AA	234 bp
AG	234bp, 159bp, 75bp
GG	159bp, 75bp

Tablo1: MCP-1 PZR ve kesim ürünleri

3.5.5. PCR ile CCR2 Gen Polimorfizminin Saptanması

Bireylere ait genomik DNA örneklerinde CCR2 lokusuna ait alleller polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için toplam 25 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımı 100-200 ng DNA, herbir primerden 0.5µl, 0.1mM dNTP, 1.5mM MgCl₂ ve 1.0 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı Amplifikasyon reaksiyonları Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

CCR2 polimorfimine ait amplifikasyon koşulu:

95 °C		5 dakika	Başlangıç denaturasyonu
94 °C		30 saniye	Denaturasyon
56 °C	33 döngü	30 saniye	Bağlanma
72 °C		30 saniye	Uzama
72 °C		10 dakika	Son uzama

PCR ile çoğaltılan CCR2 lokusuna ait fragman BsaBI restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve daha sonra % 3 luk agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV altında görüntülenip ve genotipleme yapılmıştır. G alleli 173 bc, A alleli 149 bc ve 24 bc da bant vermektedir.

GG genotipinde olanlar 173 bc'de, AA genotipinde olanlar 149 bc ve 24 bc'de GA genotipinde olanlar ise 173 bc, 149bc ve 24 bc'de bant vermektedir. Elde edilmesi beklenen PZR ve kesim ürünleri Tablo 2' de verilmektedir.

PZR ürünleri	
Elde edilecek PZR ürünü	173 bp
Kesim ürünleri	
wt/wt	173 bp
wt/64l	173 bp, 149 bp, 24 bp
64l/64l	149 bp, 24 bp

Tablo 2: CCR2 PZR ve kesim ürünleri

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler

3.6.1. P (Anlamlılık Değeri)

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

- Önceden bir hipotez varsa P'nin bir kuyruklu (iki kuyruklunun yarısı) dağılımı
- Önceden bir hipotez yoksa P'nin iki kuyruklu dağılımı
- $P > 0.05$ anlamlı fark yok
- $P < 0.05$ anlamlı fark var
- $P < 0.01$ ileri düzeyde anlamlı fark
- $P < 0.001$ çok ileri düzeyde anlamlı fark (92).

3.6.2. Ki Kare Testi (X^2)

Nitel sayısal verilerin karşılaştırılmasında kullanılan nonparametrik X^2 (Chi square) testi bu tezde, risk alellerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımlarının anlamlılığını, ikiye iki kontenjans tabloları ile 1 serbestlik derecesinde (sd) test etmek amacı ile kullanılmıştır. Bunun bitlikte hasta çocukların CARS puanları, IQ skoru, cinsiyet, klinik özellikler (komorbite,gelişim süreçleri), aile özellikleri gerek genotiplerine bağlı olarak gerekse bağımsız olarak test etmek için uygulanmıştır. Testlerin bir kısmı SPSS yazılım programı içinde bir kısmı da GraphPad yazılım programını kullanılarak uygulanmıştır (92).

3.6.3. t Testi

İki aritmetik ortalama arasındaki farkın anlamlılığını test etmede kullanılır.

İki ölçüm birbirinden farklı mıdır?

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

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

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

Bağımlı değişken eşit aralıklı veya eşit oranlı olmalıdır. Bu test SPSS yazılım programında kullanılmıştır (92).

3.7. Risk Hesapları

A) Relatif Risk: Relatif Risk hesapları, bir faktörüm hasta grubunda kontrol grubuna oranla görülme sıklığı hesaplayarak test edilen faktör ile hastalık arasındaki ilişkinin gücünü açıklamaya yarar. Bu çalışmada aday genin Otizmdeki relatif riski, Haplotip Relatif Risk tablolarından yararlanarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (93).

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

a= Risk aleli kalıtmış hastanın sayısı

b= Risk aleli kalıtmamış hastanın sayısı

c= Diğer aleli kalıtmış kontrollerin sayısı

d= Diğer aleli kalıtmamış kontrollerin sayısı

Relatif risk bir değeri, iki grupta, yani aleli taşıyan ve taşımayanlar gruplarında hastalığın görülme sıklığının eşit; birden fazla ise, hastalığın riskinin aleli taşıyanlarda arttığını; birden küçük ise; riskin azaldığını işaret eder. Relatif Risk için Güven Aralığı (G.A), ki kare (karekökü) değeri üzerinden %95 doğruluk düzeyi kabul edilerek, aşağıdaki formülle hesaplanır (93).

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

RR= Relatif Risk **X**= Ki

B) İhtimal Oranı: Hasta grubundaki risk aleli taşıyanların taşımayanlara, kontrol grubuna oranla kontrol grubundaki risk aleli taşıyanların taşımayanlara ihtimalidir (93).

$$\text{İhtimal Oranı} = ad / bc$$

C) Yüklenen Kesit: Risk unsurunun araştırılan fenotipin, populasyon geneline oranındaki etkisi Yüklenen Kesit olarak tanımlanır. Bu kesit, artmış risk hakkında relatif riskden daha anlamlı bilgi verir. Çünkü risk unsurunun populasyon üzerindeki etkisi bu risk altında olan grubun frekansına bağlıdır. Diğer bir deyişle, populasyon temelinde az relatif riskle ilişkilendirilmiş fazla sıklıkta görülen bir hastalık, yüksek relatif riskle ilişkilendirilmiş nadir görülen bir hastalıktan, neden olduğu ölümler açısından daha ciddi olabilir. Yükselen Kesit aşağıda verilen formülden hesaplanmıştır (93).

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

f = ilişkilendirilmiş alelin kontrol grubundaki frekansı

R.R = Relatif Risk

3.8. Aile Temelli İlişki Analizleri

Bir genin aleli hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha sık bulunuyorsa bu gen hastalıkla ilişkili denir. Populasyon tabakalaşmasının analizleri etkilememesi , daha ziyade yalancı pozitif anlamlılıkların önüne geçmek için bu tezde aile temelli ilişki analizleri uygulandı. Bu analizler dışardan seçilmiş bir kontrol grubu yerine, akrabalarından oluşmuş kontrol grubunu kullanılır. Bu çalışmada aday genlerinin alellerinin Otistik Spektrum Bozukluğu ile olası ilişkileri iki ana tip analizle irdelenmiştir. 1) Haplotif Relatif Risk, 2) Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (Transmission Disequilibrium Test TDT)

3.8.1. Haplotip Temelli Haplotip Relatif Risk Analizi (HRR)

Haplotif Relatif Risk (HRR) analizi en az bir etkilenmiş çocuğu olan çekirdek ailelerden veri elde ederek, anne-baba ve hasta çocuk üçlülerini inceler. Her aile içinde hasta grubu etkilenmiş çocuğun genotipi kontrol grubu ise de anne-babadan çocuğa kalıtılmamış genotipten oluşan yapay bir gruptur. HRR'in bu çalışmada kullanılan haplotip temelli olanıdır ki bu genotipler yerine alelleri karşılaştırır. Böylece her anne-baba çocuk üçlüsünde, kalıtılmış iki alelin ve kalıtılmamış iki alelin frekansları karşılaştırılır. Sonuçta her üçlü iki ayrı hasta-kontrol grubu gibi değerlendirilir. İstatistiksel olarak anlamlı 2'ye 2 kontenjans tablosu oluşturarak, ki kare testi ile 1 sd'de test edilir. Eğer test edilen polimorfizm iki aleli ise birinin kalıtılabilirliği diğeriyle karşılaştırılır, ikiden fazla ise teki diğeri tüm alelerdenoluşan gruba karşı test edilir (94).

3.8.2. Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (KET)

HRR analizi anne-babadan kalıtılmış ve kalıtılmamış alelleri ikili gözlemler olduğunu varsaymaz. Kişisel geçişi göz önünde McNemar testleri ile gerçek ilişkinin daha emin ortaya çıkartabileceği öne sürülmektedir. Bu yöntemi uygulayan KET bu çalışmada kullanıldı. Burada test edilen ünite yine üçlülerdir ; sadece aday gene heterozigot olan anne veya babadan kalıtılmış ve kalıtılmamış alelerin sayısı aşağıda verilen hesapla karşılaştırılır. Ortaya çıkan KET istatistiği, HRR gibi, ki kare dağılımı gösterir ve p değeri 1 sd'de bulunur.

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

b = heterofizot anne-babadan kalıtılmış alellerin sayısı

c = heterofizot anne-babadan kalıtılmamış alellerin sayısı

KET : ki kare, 1 sd

KET'in en önemli özelliği ilişkinin yanında bağlantıyı da test etmesidir. Çünkü aday alelin katılabilirlik ihtimali göz önünde bulundurulur. Sıfır Hipotezi (Ho), Mendel ayırışım yasasına göre, heterozigot anne babadan hasta çocuğa her alelin aynı ihtimalle geçmesidir. Eğer gen ile hastalık arasında ilişki veya bağlantı varsa, risk alelinin kalıtılabilirliği %50'den fazla olur (58, 65).

3.8.3. Genişletilmiş Kalıtılabilme Eşitsizliği Testi (GKET)

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

- 1) Her alel için KET heterozigot anne-babadan hasta çocuğa kalıtılabilirlik ihtimalini hesaplar. Böylece her alelin diğer alel gruplarına karşı kalıtılabilme farklılıkları görölür. Burada istatistiksel düzeltme önerilir.
- 2) Alellerin kalıtılma eşitsizliği her heterozigot anne-baba genotipi göz önünde bulundurularak hesaplanır. Bu da ki kare testi olup sd gözlenen genotip sayısına eşittir.
- 3) Alel temelli analiz ise lojistik regresyonla alellerin kalıtılmasında sapmayı hesaplar (95).

4. SONUÇLAR

Çalışmaya katılan populasyon 16 kız 85 erkek olmak üzere 101 çocuk ve onların biyolojik anne-babaları oluşmak üzere toplam 303 kişiden oluşmaktadır.

Çocukların yaşları en küçüğü 3, en büyüğü 18, ortalaması ise 9.86 olarak hesaplanmıştır. Çocukların 61'i (%60.4) sağ, 21'i (%20.8) sol, 19'u (%18.8) ise her iki elini kullandığı tespit edilmiştir. Anne-babaları arasında arkbalık ilişkisi olan 19 çocuğ karşın olmayanların sayısı 82'dir. Gebelik sürecinde herhangi bir sorun yaşamamış anne 86 iken 15 anne çeşitli hastalıklarla (travma, enfeksiyon, depresyon, preeklampsi vs.) karşılaşmıştır. Çocukların 58'i normal (vajinal) yolla doğarken, 43 çocuk sezeryan ile gözlerini dünyaya açmıştır. Gelişim aşalarından desteksiz oturma, yürüme, kelime ve cümle kurma da değerlerdirilmiştir. Oturma süreci normal olan çocuk sayısı 66 iken 8-15 aylar orasında desteksiz oturmaya başlayanlar 28, 15 aydan sonra ise 7'dir. Yürümeye 15 aya kadar başlamış 65, 15-24 ay arası 28, 24 aydan sonra ise 10 çocuk mevcutmuş. Bir çocuğun hiç yürüyemediği öğrenildi. Verbal beceri gelişimindeki gerilik daha belirgindir. Böyle ki, çocuklardan sadece 12'si 15 aya kadar kelime söylelemelemeğe başlamış. 23 çocuk 15-24 ay arası, 45 çocuk 2 yaşından sonra kelime çıkarırken 21 çocuk hiçbir kelime söyleyememekteydi. Konuşmada da benzer tablo izlendi. 2 yaşına kadar cümle kurabilen çocuk sayısı 2 iken, 2-3 yaş arası bu sayı 10, 3 yaş sonrası ise 39'du. Maalesef 50 çocuğun non-verbal olduğu tespit edildi. Çocukların 34'de sadece OSB tanısı varken 67 çocukta ek tanılar (Dikkat dağınıklığı Hiperaktivite Bozukluğu, Obsesif Kompulsif Bozukluk, Davranış Bozukluğu vs.) mevcuttu. 20 çocuk hiçbir psikotrop ilaç kullanmazken, 34'ü tek ilaç, 47'si ise birden fazla ilaç kullanmaktaydı.

Özgeçmişinde özellik (hastalık, ameliyat gibi) olan çocukların sayısı 26 iken 75 çocukta hiçbir özellik yoktu. Soygeçmişinde psikiyatrik hastalıklar olan çocuk sayısı 32, olmayanların ise 62 idi. Çocukların doğumu esnasında anne ve babalarının yaş ortalamaları sırasıyla 27,52 ve 31,32 olarak bulunmuştur. CARS puanları değerlendirildiğinde en düşük 30, en yüksek 54.5, ortalama 38,995 olduğu belirlenmiştir. (Tablo 3,4)

Sayı % Yüzde

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

Tablo 3

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

Tablo 4: Yaş ve CARS puanlarının dağılımı.

Zeka puanlarının değerlendirmesinde IQ skoruna göre normal (>90), sınırda mental retardasyon (MR) (70-90), hafif MR (50-69), orta MR (35-49), ağır MR (20-34) ve çok ağır MR (<20) olarak sınıflandırılmıştır. Normal zekaya sahip çocukların sayısı 7(%6.9) iken, diğerleri sırasıyla sınır MR 8 (%7.9), hafif MR 30 (%29.7), orta 34 (%33.7), ağır MR 20 (%19.8) ve çok ağır MR 2 (%2) olarak bulunmuştur. (Tablo 5)

MR	Sayı	Yüzde %
Normal	7	6,9
Sınır	8	7,9
Hafif	30	29,7
Orta	34	33,7
Ağır	20	19,8
Çokağır	2	2,0
Total	101	100,0

Tablo 5: Zeka düzeyleri.

Çocuk ve anne-babalarında MCP-1 A2518G genotip ve alel dağılımı aşağıdaki tabloda verilmiştir. Burada görüldüğü gibi A aleli 96 (%65), G aleli 52 (%35) çocukta mevcuttur. Annelerde 95 (%66.5) A aleli, 48 (%33.5) G aleli, babalarda 91 (%63) A aleli, 54 (%37) G aleli mevcuttur. Aynı

değerlendirmede genotip olarak çocuklarda 49 (%48.5) AA bulunurken 47 (%46.5) AG, 5 (%5) GG mevcutmuş. Annelerde 53 (%52.5) AA, 42 (%41.5) AG, 6 (%6) GG genotipi varken, babalarda bu sayılar 47 (%46.5) AA, 44 (%43.5) AG ve 10 (%10) GG şeklindedir. (Tablo 6)

N=101	A aleli	G aleli	AA	AG	GG
Çocuk	96 (%65)	52 (%35)	49 (%48.5)	47 (%46.5)	5 (%5)
Anne	95 (%66.5)	48 (%33.5)	53 (%52.5)	42 (%41.5)	6 (%6)
Baba	91 (%63)	54 (%37)	47 (%46.5)	44 (%43.5)	10 (%10)

Tablo 6: MCP-1 genotip ve alel dağılımı.

MCP-1 geni için anne-babalarından birinin veya her ikisinin heterozigot genotipe sahip olanların çocukların sayısı 63 iken 38 çocuğun ebeveynleri homozigot genotip taşımaktaydı. Dolayısıyla KET için 63 aileyi değerlendirmeye alırken HRR analizine bütün aileler dahil edilmiştir. KET için MCP-1’de alel bazında kalıtılma ve kalıtılmama durumu değerlendirildi ve A aleli 80 çocuğa anne-babadan kalıtılmışken 4 çocuk anne-babalarından A alelini kalıtmamış. G alelinin kalıtılma sayısı 78 iken 8 çocukta kalıtılma olmamış. MCP-1 A2518G’de alellerin kalıtılmış ve kalıtılmamış olma durumuna göre KET ile yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (p: 0.196, X^2 : 0.733) (Tablo 7)

Alel	Kalıtılmış	Kalıtılmamış	Toplam
A	80	4	84
G	78	8	86
Toplam	158	12	138
p= 0.196 (tek kuyruk), X^2 =0.733			

Tablo 7: MCP-1 KET sonucu.

MCP-1 geni HRR analizinde hasta (çocuklar) grubun taşıdığı alellerin sayısı ile kontrol (anne-babalar) grubun taşıdığı alellerin sayısı hesaplanır.

Bizim çalışmadaki çocuklar 144'ü A aleli taşıırken, 58 G aleli taşımaktaydılar. Ebeveynlerde ise 141 A, 61 G aleli mevcuttu.

MCP-1 A2518G'de alellerin taşıma durumuna göre HRR analizi için yapılan değerlendirmede de istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. (p: 0.416, χ^2 : 0.048) (Tablo 8)

Alel	Hasta (%)	Kontrol (%)
G	58 (%29)	61 (%30)
A	144 (%71)	141 (%70)
Toplam	202	202
p= 0.416 (tek kuyruk), χ^2 = 0.048		

Tablo 8: MCP-1 HRR sonucu.

Çalışma grubundaki CCR2 G190A polimorfizinin genotip ve alel dağılımı aşağıdaki gibidir. Bura göre A aleli 25 (%19.8), G aleli 101 (%80.2) çocukta mevcuttur. Annelerde 31 (%24) A aleli, 98 (%76) G aleli, babalarda 33 (%25.2) A aleli, 98 (%74.8) G aleli mevcuttur. Ayrıca genotip olarak çocuklarda hiç (%0) AA bulunmazken 25 (%24.8) GA, 76 (%75.2) GG mevcutmuş. Annelerde 3 (%3) AA, 28 (%27.7) GA, 70 (%69.3) GG genotipi varken, babalarda bu sayılar 3 (%3) AA, 30 (%29.7) GA, 68 (%67.3) GG olacak şekilde bulunmuştur. (Tablo 9)

N=101	A aleli	G aleli	AA	GA	GG
Çocuk	25 (%19.8)	101(%80.2)	0 (%0)	25 (%24.8)	76 (%75.2)
Anne	31 (%24)	98 (%76)	3 (%3)	28 (%27.7)	70 (%69.3)
Baba	33 (%25.2)	98 (%74.8)	3 (%3)	30 (%29.7)	68 (%67.3)

Tablo 9: CCR2 genotip ve alel dağılımı.

CCR2 için istatistiksel değerlendirme yapıldığında 49 çocuğun ebeveynlerinin heterozigot genotip taşıdığı görüldü. Buda demek oluyor ki, KET'ne 49 aile katılmıştır. KET'i için yapılan hesaplamalarda G alelini kalıtmış çocukların sayısı 80'e denk gelirken, kalıtılmamış hiçbir G aleli olmamış. A aleli 60 kez kalıtılmışken, 4 kez kalıtılmamış.

CCR2 G190A'de alellerin kalıtılmış ve kalıtılmamış olma durumuna göre KET ile yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

(p:0.0418, X^2 : 2.993) (Tablo 10)

Alel	Kalıtmış	Kalıtmamış	Toplam
G	78	0	78
A	60	4	64
Toplam	138	4	142
P= 0.0418 (tek kuyruk) X^2 = 2.993			

Tablo 10: CCR2 KET sonucu.

CCR2 geni HRR analizinde hasta (çocuklar) grubun taşıdığı alellerin sayısı ile kontrol (anne-babalar) grubun taşıdığı alellerin sayısı hesaplanmıştır.

Buna göre çalışmadaki çocuklar 178'ü G aleli taşıırken, 24 A aleli taşımaktaydılar. Ebeveynlerde ise 156 G, 46 A aleli mevcuttu.

CCR2 G190A'de alellerin mevcudiyet durumuna göre HRR ile yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p:0.0029, X^2 : 7.62) (Tablo 11)

Alel	Hasta (%)	Kontrol (%)
G	178 (%88)	156 (%77)
A	24 (%12)	46 (%23)
Toplam	202	202
P= 0.0029 (tek kuyruk), X^2 = 7.62		

Tablo 11: CCR2 HRR sonucu.

MCP-1 A2518G ve CCR2 G190A'nın genotiplerin kalıtılma ve kalıtılmama durumuna göre MCP-1 A2518G'de 49 AA genotipi çocuğa kalıtılmışken 51 AA kalıtılmamış. AG genotipi 47 çocukta kalıtılmış, 41'de kalıtılmamış. GG genotipi için kalıtılanların sayısı 5, kalıtılmayanlarınki ise 9'dur. CCR2 G190A'da AA çocuğa hiç kalıtılmazken, 6 AA genotipi kalıtılmamış. GA genotipi 25 kalıtılma ve 33 kalıtılmama, GG ise 76 kalıtılma 62 kalıtılmama şeklinde hesaplanmıştır. (Tablo 12)

	MCP 1			CCR 2		
	AA	AG	GG	AA	GA	GG
Kalıtılan	49(%48.5)	47(%46.5)	5 (%5)	0 (%0)	25(%24.8)	76(%75.2)
Kalıtılmayan	51(%50.5)	41(%40.5)	9(%9)	6 (%6)	33(%32.7)	62(%61.3)

Tablo 12: Genotiplerin kalıtılma ve kalıtılmama değerleri.

Her ik gen polimorfizmi ile cinsiyet, dominant el, akraba ilişkisi, gebelik ve doğum süreci, gelişim öyküsü, özgeçmiş, soygeçmiş, ek psikiyatrik tanı, ilaç kullanımı, CARS değeri ve IQ puanı gibi datalar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Kolerasyon analizinde sadece CCR2 gen polimorfizmi ile ek tanı arasında istatistiksel anlamlılık mevcuttur ($p:0.031$). Diğer bütün verilerle gen polimorfizmleri arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. ($p>0.05$)

5. TARTIŞMA

Öncelikle belirtmek gerekir ki, bu çalışma OSB’da MCP-1 ve CCR2 polimorfizmi açısından yapılmış bilinen ilk çalışmadır. Daha önce yapılmış MPC1 ve resöptörü olan CCR2’nın OSB ve diğer nöropsikiyatrik hastalıklardaki rolünü inceleyen çalışmalar baz alınarak çalışmamızın değerlendirilmesini yapmaya çalışacağız.

Bu bağlamda Ashwood ve ark. 80 OSB tanılı çocuklarla yaptıkları çalışmada MCP-1, RANTES ve Eotaksi düzeyleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca yüksek MCP-1 düzeyi, OSB’lu çocuklarda davranış bozukluğu, bilişsel faaliyetlerde gerilik, ekspresif dilde gerilik ve kötü sosyal iletişim ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada farklı kemokin seviyelerinin OSB’nun patofizyolojisinde rol alabileceği hipotezi öne sürülmüştür (15).

Morsi W. Abdallah ve ark.’ı amniyotik sıvıdaki MCP-1, MIP-1α ve RANTES düzeylerini araştırdıkları çalışmada amniotik sıvıda MCP-1 düzeyinin yüksekliği OSB açısından yüksek risk teşkil ettiğini ve MCP-1’in OSB patofizyolojisinde rol alabileceğini öne sürülmüşler (100).

Başka bir çalışmada 191 şizofreni ve şizoafektif bozukluğu olan hastada MCP-1 A2518G polimorfizmi açısından değerlendirilmiş. MCP-1 A2518G polimorfizmi ile antipsikotik ilaçlara karşı direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur. (71)

Korede Bipolar bozukluğu olan hastalarda yapılan çalışmada ise MCP-1 A2518G polimorfizminin manik epizotlarla ilişkili olabileceği anlaşılmıştır. Bu çalışmada A alelinin sıklığı ile manik alt grup arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur. (70)

Korede yapılan bir diğer çalışmada MCP-1 A2518G polimorfizminin depresyona eğilimi artırdığını, dolayısıyla depresif atak geçirme riskini yükselttiği tespit edilmiştir. Ayrıca A aleli taşıyan duydu-durum hastalarının G aleli taşıyanlara oranla psikotik belirtiler daha sık görülmüştür.(69)

Bizim çalışmada MCP-1 A2518G polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Hem KET (p: 0.196), hem de HRR

analizinde (p: 0.416) istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Bu MCP-1 genindeki A2518G polimorfizminin OSB açısından ne koruyucu olduğu, nede ki risk teşkil ettiği anlamına gelir. Bu sonucu bütün OSB tanılı çocuklar için söylemek doğru olmamakla beraber en azından bizim çalışma grubumuza şamil etmek mümkündür. Ayrıca MCP-1 A2518G polimorfizminin diğer verilerle (CARS skoru, IQ puanı, cinsiyet, ek tanı, akrabalık öyküsü vs) karşılaştırılması sonuçları da istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaşamamıştır.

CCR2 G190A polimorfizminde sonuçlar farklılık arz etmektedir. CCR2'nin KET'i ile yapılan analizinde istatistiksel anlamlılık bulunmuştur (p:0.0418).

Aynı genin HRR analiziyle değerlendirilmesinde de istatistiksel anlamlılık mevcuttu. (p:0.0029) Üstelik bu anlamlılık ileri düzeyde anlamlılık ifade ediyor. Yani hasta grup (çocuklar) kontrol grubuna (kalıtılmamış aleller) göre daha fazla G aleli taşımaktadır. Buradan CCR2 G190A polimorfizminde G alelini taşıyan çocukların OSB açısından riskli grup içinde yer alabilecekleri sonuca varılabilir. Aynı şekilde A aleli taşımanın koruyucu özelliğe sahip olabileceği istisna edilmemektedir.

Ayrıca kolerasyon analizleri sonucu CCR2 gen polimorfizmi ile ek tanı arasındaki anlamlı ilişkinin bulunması (p:0.031), bizlere G aleli taşımanın ek tanı açısından risk teşkil edebileceğini düşündürür. Bu sonuç daha evvelden bahsedilen MCP-1 ve onun reseptörü olan CCR2'nin gen polimorfizminin nöropsikiyatrik hastalıklar üzerindeki risk artırıcı rolünü dolaylı yoldan desteklemektedir.

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

bile hala hangi genlerin yatkınlığa neden olduğu ve bu genler arasında etkileşimler tam olarak bilinmemektedir. Bu tezdaki bulguların değerlendirilmesinde öne sürülen genetik ve klinik heterojenitenin varlığının göz önünde bulundurulmasının yanısıra, kullanılan analitik yöntemlerin varsayımlarının da tartışılması gerekmektedir. Bir çalışmada gösterilen pozitif ilişki, eğer gerçek ilişki ise, başka çalışmalarla da doğrulanmalıdır (96). İlişki analizlerinde bulguların doğrulanması, hastalık alelinin genelde kabul edilen %80 doğruluk aralığı içinde, relatif riskine ve görülme sıklığına bağlıdır.

Bu bağlamda, ilişki analizlerinde anlamı yakalayabilmek için gereken örnek sayısı önemli yer tutmaktadır. Risch ve Merikangas hastalık geninin tanımlanmasında bağlantı ve ilişki analizlerinde gereken örnek sayılarını hesaplamışlardır (96). İlişki analizlerinde orta sıklıkta görünen (0.5 sıklıkta) ve relatif riski 1.5 olan bir alel için yaklaşık 950, relatif riski 2 olan için 340, relatif riski 4 olan için 103 hasta ve kontrol çiftinin taranması gerektiğini önermiştir. Bu bulgular çerçevesinde genelde gereken sayıdan daha az sayıda örnek alındığından negatif bulguların tip 2 hatalarından (ilişki varken reddetmek) ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (97). Bunun yanısıra farklı alel frekansları ve epistatik ilişkiler, değişik etnik topluluklarda yapılan ilişki analizlerinde ortaya çıkan uyumsuz sonuçların nedeni olabilmektedir. Ayrıca öne sürülen ilişki bir başka alel ile olan bağlantı dengesizliğinden dolayı ortaya çıkabileceğinde, farklı topluluklarda aday aleller farklı alttipleri belirleyebilir. Bu sebeple aday gen ile yapılan çalışmaların tamamen aynı olmasını beklemek yanlış bir varsayımdır.

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

Destekleyici veya benzeri diğ er çalışmalarda daha fazla hasta ve kontrol populasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak CCR2 genindeki G190A polimorfizminde G aleli taşımanın OSB ve buna eşlik eden ek tanı açısından risk teşkil edebileceği ancak konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır. Bu  alışmanın OSB’da MCP-1/CCR2 gen polimorfizmi ve diğ er gen polimorfizmlerinin araştırılması için ışık tutacağı ve iyi bir referans teşkil edeceği umudu taşımaktayız.

6. Kaynaklar

1. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci.Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ, Nations L, Beecham GW, Kozhekbaeva ZM, Butler BL, Cukier HN, Whitehead PL, Ma D, Jaworski JM,Nathanson L, Lee JM, Hauser SL, Oksenberg JR, Cuccaro ML, Haines JL, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Mol Autism. 2012 Apr 2;3(1):2. [Epub ahead of print]
2. Dramatic Increase in Autism Prevalence Parallels Explosion of Research Into Its Biology and Causes Geraldine. Dawson, PhD Arch Gen Psychiatry. 2012 :1-2. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.488
3. Rutter M:Genetic influences and autism,in handbook of autism and pervasive developmental disorders,vol. 1. Volkmar FR, Klin A,Paul R,Cohen DJ. (eds):Hoboken, Wiley, pp.425-52,2005.
4. Veenstra-VanderWeele j ,Cook EH ,Jr.: Molecular genetics of autism spectrum disorders.Molecular Psychiatry 9(9):819-32,2004
5. Andres Martin , Fred R. Volkmar:Lewis's Child and Adolescent Psychiatry Fourth Edition , Section 5.1.1 Autism and The Pervasive Developmental Disorders Fred R. Volkmar,Catherine Lord,Ami Klin,Robert Schultz, and Edwin H.Cook:pp.384-401,2007
6. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis.Breast Dis. 2006-2007;26:75-85.
7. Luster AD. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 1998 Feb 12;338(7):436-45.
8. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Adv Immunol. 2003;81:1-44.
9. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett. 2008 Aug 28;267(2):226-44.

10. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):540-50.
11. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.
12. Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Apr;13(2):143-54.
13. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 May;41(5):998-1001.
14. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jun 7;259(2):344-8.
15. Paul Ashwood¹, Paula Krakowiak², Irva Hertz-Picciotto², Robin Hansen³, Isaac N. Pessah⁴, and Judy Van de Water⁵ Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders *J Neuroimmunol*. 2011 March ; 232(1-2): 196–199. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.10.025.
16. Rutter M: Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Shizpohr* 8(2); 139-61 1978
17. Fred R. ve ark. Autism and Pervasive Developmental Disorders. *Lewis's Child and Adolescent Psychiatry* 2007; 384-399
18. Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK. The autistic spectrum: subgroups, boundaries, and treatment. *Psychiatr Clin North Am*. 2002 Dec;25(4):811-36.
19. Melda Akçakın: Başka Türlü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk. *Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı HYB* 2008: 256-263
20. Leeanne Green: Autism and Pervasive Developmental Disorders, *Neuropsychiatry* 2. edition 2003:503-536

21. Nahit Motavallı Mukaddes: Otistik Bozukluk, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı HYB 2008: 242-255:100
22. Amerikan Psikiyatri Topluluğu DSM IV 2000
23. Dilşad Ö. Asperger Bozukluğu. Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı 2008; 281-291
24. Towbin KE (1997) Autism and Asperger's Syndrome. Current Opinion in Pediatrics 9:361-366
25. Rondeau E ve ark. Is pervasive developmental disorder not otherwise specified less stable than autistic disorder? A meta-analysis. J Autism Dev Disord. 2011 Sep;41(9):1267-76
26. Dorothy Stubbe: Child and Adolescent Psychiatry, A Practical Guide 2007: 48-56
27. Fombonne E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. J Autism Dev Disord. 2003 Aug;33(4):365-82.
28. Baykara B ve Miral S. Diğer yaygın gelişimsel bozukluklar. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları 2007: 291-304
29. Leonard H ve Bower C. The prevalence and incidence of Rett syndrome in Australia. European Child and Adolescent Psychiatry 1997 (6): 8-10
30. Haliloğlu G ve Topçu M. Rett sendromu. Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı 2008: 264-273
31. Fombone E. Prevalance of childhood disintegrative disorder. Autism 2002 (6): 149-157
32. Özgür Yorbik: Dezentegratif Psikoz, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı HYB 2008: 274-280
33. Deykin EY, MacMahon B. Pregnancy, delivery, and neonatal complications among autistic children. Am J Dis Child 1980; 134: 860–4.

34. Burd L, Severud R, Kerbeshian J, et al. Prenatal and perinatal risk factors for autism. *J Perinat Med* 1999; 27: 441–50.
35. Deykin EY, MacMahon B. Viral exposure and autism. *Am J Epidemiol* 1979; 109: 628–38.
36. Bernard S, Enayati A, Redwood L, et al. Autism: A novel form of mercury poisoning. *Med Hypotheses* 2001; 56: 462-71.
37. Zimmerman AW. The immune system in autism. *J Dev Learn Disord* 1999; 3:3-15.
38. Nelson KB, Grether JK, Croen LA, et al. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol* 2001; 49: 597-606.
39. Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, et al. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics* 1999; 61: 227–36.
40. Maestrini E, Lai C, Marlow A, et al. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Am J Med Genet* 1999; 88: 492–6.
41. Persico AM, Militeri R, Bravaccio C, et al. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *Am J Med Genet* 2000; 96: 123–7.
42. Beyer KS, Blasi F, Bacchelli, Klauch SM, Maestrini R, Poustka A. Mutation analysis of the coding sequence of the MECP2 gene in infantile autism. *Hum Genet* 2002; 111: 305-9
43. Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 886-97

44. Sadock B ve Sadock V. Pervasive developmental disorders Kaplan& Sadock's Concise Textbook of Clinical Psychiatry 10. Edition 2008: 605-615
45. Melda Akçakın: Otistik Bozukluk, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları 2007: 279-290
46. Paula J ve ark. Autism. Biological Child Psychiatry. Recent trend and development 2008 (24): 21-32
47. Neşe Perdahlı Fiş, M. Yankı Yazgan: Moleküler Genetik, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı HYB 2008: 38-43
48. Cavalli-Sforza LL., Bodmer WF.: The genetics of human populations. WHFreeman, San Francisco, 1971.
49. Levin B.: GEnes VII. Oxford University Pres, New York, 2000.
50. Passarge M. Passarge E.: Color Atlas of Genetics. TMP, New YORK, 1995.
51. King RC ve Stansfield WD (1990). A Dictionary of Genetics 4.Basım.Oxford.
52. Strachan T ve Read AP (1996). Human Molecular Genetics. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
53. Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES ve ark. (1987). A genetic linkage map of the human genome. Cell 51: 319-337.
54. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E ve ark. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers of human gene mappin. Science 235: 1616-1622.
55. Wang DG ve ark. (1998). Large scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in human genome. Science 280: 1077-1082.
56. Lander ES. The new genomics: global views of biology. Science 274: 536-539.

57. Ott J (1974). Estimation of recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *American Journal of Human Genetics* 26: 588-597.
58. Sham P (1998). *Statistics in Human Genetics*. Londra: Arnold.
59. Klitz W, Thompson G, Borot T, Cambon-Thomsen A (1992). *Evolutionary Biology*. MK Hecht (editör). New York: Plenum.
60. Lander ES ve Schork NJ (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2047.
61. Thompson G (1995). Mapping disease genes: family based association studies, *American Journal of Human Genetics* 57: 487-498.
62. Terwilliger JD ve Ott J (1992). A haplotype based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Human Hered* 42: 337-346.
63. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics* 52: 506-516.
64. Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini ve Bassel E. Sawaya (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1):An Overview. *Journal of Interferon&Cytokine Research* 29: 313-321
65. Rollins BJ. (1997) Chemokines. *Blood*. 90: 909-928.
66. Baggiolini M. Loetscher P. (2000).Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*; 21: 418-420.
- 67.Gregory C, Nicolas B, Alice G, Jean-Louis N ve Carole R.(2010) The Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP/CCL2) in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neuroimmunology* 224: 93-100.
68. Banisadr, G.; Gosselin, R. D.; Mechighel, P.; Kitabgi, P.; Rostène, W.; Parsadaniantz, S. P. M. L. (2005). "Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: Evidence

for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides". *The Journal of Comparative Neurology* 489 (3): 275–29

69. Chi-Un Pae, Hye-Sook Yu, Tae-Suk Kim, Chang-Uk Lee, Soo-Jung Lee, Tae-Youn Jun, Chul Lee, Alessandro Serretti, In-Ho Paik. (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) promoter -2518 polymorphism may confer a susceptibility to major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatry Research* 127: 279–281

70. Chi-Un Pae, Jung-Jin Kim, Hye-Sook Yu, Chang-Uk Lee, Soo-Jung Lee, Tae-Youn Jun, Chul Lee, In-Ho Paik. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promoter–2518 Polymorphism May Have an Influence on Clinical Heterogeneity of Bipolar-I Disorder in the Korean Population *Neuropsychobiology* (2004); 49:111–114

71. Emanuela M, A. Carlo A, Serena V, Roberta Z, Stefano B, Roberto R, Claudio M, Massimo G. MCP-1 Gene (SCYA2) and Schizophrenia: A Case-Control Association Study. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*; (2005) 132B: 1–4

72. Gerard, C.; Rollins, B. J. (2001). "Chemokines and disease". *Nature Immunology* 2 (2): 108–115

73. Fabene, P. F.; Bramanti, P.; Constantin, G. (2010). "The emerging role for chemokines in epilepsy". *Journal of Neuroimmunology* 224 (1–2): 22–27.

74. Foresti, M. L.; Arisi, G. M.; Katki, K.; Montañez, A.; Sanchez, R. M.; Shapiro, L. A. (2009). "Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus". *Journal of Neuroinflammation* 6: 40.

75. Hickman, S. E.; El Khoury, J. (2010). "Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease". *CNS & neurological disorders drug targets* 9 (2): 168–173.

76. Xia, M.; Sui, Z. (2009). "Recent developments in CCR2 antagonists". *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19 (3): 295–303

77. Lloyd, C. M.; Minto, A. W.; Dorf, M. E.; Proudfoot, A.; Wells, T. N.; Salant, D. J.; Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). "RANTES and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Play an Important Role in the Inflammatory Phase of Crescentic Nephritis, but Only MCP-1 is Involved in Crescent Formation and Interstitial Fibrosis". *The Journal of experimental medicine* 185 (7): 1371–1380.
78. Melgarejo E. Medina MA. Jimenez FS. Urdiales JL. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41: 998–1001.
79. Chandrakala, A. N.; Sukul, D.; Selvarajan, K.; Sai-Sudhakar, C.; Sun, B.; Parthasarathy, S. (2011). "Induction of Brain Natriuretic Peptide and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Expressions by Oxidized Low-density Lipoprotein-Relevance to Ischemic Heart Failure". *AJP: Cell Physiology* 302 (1): C165–77.
80. Jemaa R. Rojbani H. Kallel A. Ali S.B. Feki M. Chabrak S. ve ark. (2008) Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clinica Chimica Acta* 390: 122–125.
81. Samson M, Soularue P, Vassart G, Parmentier M (1997). "The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3". *Genomics* 36 (3): 522–6.
82. Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK, Cho CS, Kim HY. 2007. Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med* 39:499–507.
83. Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* 105: 838–847.

84. Harries LW, Bradley-Smith RM, Llewellyn DJ, Pilling LC, Fellows A, Henley W, Hernandez D, Guralnik JM, Bandinelli S, Singleton A, Ferrucci L, Melzer D (May 2012). "Leukocyte CCR2 Expression Is Associated with Mini-Mental State Examination Score in Older Adults". *Rejuvenation Res.* 2012 Aug;15(4):395-404
85. Reale, M., Iarlori, C., Feliciani, C., Gambi, D., 2008. Peripheral chemokine receptors, their ligands, cytokines and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 14, 147–159.
86. Combarros, O., Infante, J., Llorca, J., Berciano, J., 2004. No evidence for association of the monocyte chemoattractant protein-1 (–2518) gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 360, 25–28.
87. McDermott DH. Yang Q. Kathiresan S. Joseph LA. (2005) CCL2 Polymorphisms Are Associated With Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels and Myocardial Infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 112: 1113-1120.
88. Szalai C. Duba J. Proha'szka Z. Kalina A. Szabo' T. Nagy B. Ve ark. (2001) Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 –2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis.* 158: 233–239
89. Navratilova Z. (2006). Polimorphisms in CCL2&CCL5 chemokines& chemokines receptors and their associations with diseases *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 150 (2): 191–204.
90. Apostolakis S. Baritaki S. Kochiadakis G. E. Igoumenidis N. E. Panutsopulos D. Spandidos D.A. (2007) Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease *Thrombosis Research* 119: 63-71.
91. Voevoda MI. Ustinov SN. Yudin NS. Dolgikh MM. Kuznetsova TN Maksimov VN. (2002) Association of the CCR2 Chemokine Receptor Gene

Polymorphism with Myocardial Infarction *Doklady Biological Sciences*. 385: 367–370.

92. Şenocak M. (2009). Klinik Biyoistatistik. İstanbul Nobel Tıp Kitapevi.

93. Kirkwood BR (1988). Essentials of Medical Genetics. Oxford: Blackwell Science Ltd.

94. Falk CT and Rubinstein P (1987). Haploty relative risk: an easy reliable way to construct a proper contol sample for risk calculations. *Annals of Human Genetics* 51: 227-233.

95. Sham PC ve Curtis D (1995). An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multiallele marker loci. *Annals of Human Genetics* 59: 323-336.

96. Risch N, Merikangas K (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.

97. O'Donovan MC, Owen MJ (1999). Candidate-Gene Association Studies of Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics* 65: 587-592.

98. Behiye A ve ark (2002). Otistik bozuklukta doku uyumu antijenleri (HLA) dağılımı ile klinik bulguların ilişkisinin araştırılması. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 65(1): 18-23.

99. Behiye A ve ark (2002). Otizm ile ilişkili HLA allellerinin PCR-SSP yöntem ile araştırılması. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 65(2): 110-114.

100. Morsi W. A, Nanna L, Jakob G, Bent N.P, Poul T, Erik L.M, David M.H (2012). Amniotic fluid chemokines and autism spectrum disorders: An exploratory study utilizing a Danish Historic Birth Cohort. *Brain, Behavior and Immunity* 26: 170-176.

7.Ekler

Ek I

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

ÇOCUKLUK OTİZMİ PUANLAMA ÖLÇEĞİ

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

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

15-29 Otizm yok

30-36 Hafif-Orta Derecede Otistik

37-60 Aşırı Derecede Otistik

Ek II

VERİ FORMU

1.Sosyodemografik Özellikler

Hastanın Adı ve Soyadı:

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi:

Dosya Numarası:

Cinsiyet: ☐ Kadın ☐ Erkek

El Dominansı: ☐ Sağ ☐ Sol ☐ Her İki El

Okul:

Özel eğitim:

Kardeş Sayısı:

Akraba Evliliği ☐ Var ☐ Yok

Adres:

Annenin Yaşı:

Annenin Eğitim Durumu:

Annenin Mesleği:

Telefon:

Babanın Yaşı:

Babanın Eğitim Durumu:

Babanın Mesleği:

Telefon:

2.Gelişimsel Özellikler:

Hamilelik Süreci:

Doğum Şekli:

Anne Sütü Süresi:

Motor Gelişim: Oturma:

Yürüme:

Dil Gelişimi: Kelime:
Cümle:

İlk Klinik Başvuru Yaşı:

Başvuru Şikayeti:

Psikiyatrik Ek Tanılar:

Şuan Kullandığı ilaçlar:

Özgeçmiş:

Soygeçmiş:

Zeka Puanı:

Ek III

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Araştırmanın Adı / Protokol Numarası: Yaygın gelişimsel bozukluklar grubu hastalık tanısı alan 2-18 yaş arası çocuklar ve ebeveynlerinde MCP1/CCR2 gen polimorfizmi değerlendirilmesi.

Araştırmanın Konusu Otizm spektrum bozukluğunda MCP1/CCR2 genlerinin incelenmesi

Araştırmanın Amacı: Bu araştırmada kliniğimize başvuran Otizm spektrum bozukluğu tanılı çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babalarının kan örneklemelerinde MCP1/CCR2 genlerinin incelenmesi planlanmıştır.

Araştırmanın Süresi: 1 yıl

Araştırmada İzlenecek Yöntem:

Çalışma grubu:

İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına daha önce başvurmuş ve halen kliniğimizde takip edilen 2-18 yaş arası Otizm spektrum Bozukluğu tanısı konulmuş çocuklar ve bu çocukların biyolojik anne ve babaları çalışma grubu olarak alınacaktır. Katılım gönüllülük esasına dayalı olacaktır. Toplam 100 çocuğun araştırmaya katılması planlanmıştır.

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

- Gönüllüden 10cc EDTA'lı kan örneği alınacaktır.
- Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılacaktır.
- Polimorfizm çalışmaları direkt hastalık sonucunu belirtmemekte olup, kişiye söz konusu hastalığa yakınlıkla ilişkili genetik yapıya sahip olup olmadığını göstermektedir.
- Çalışmada gönüllünün sadece kan örneği alınacaktır ve gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.
- Alınan kan örneklerinden DNA elde edilecek ve bu DNA örnekleri bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.
- Diğer bir çalışmada gönüllü DNA'sının kullanılması gerektiğinde kendisinden izin alınacak gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlık ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.

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

Alternatif Tedavi veya Girişimler: Yok.

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

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

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

Dr. Ceyhun Caferov 05425271775

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

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

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Ek IV



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



Sayı : 1159

Tarih : 19.07.2012

Konu : Doç.Dr. Osman ABALI hk,

**Sayın Doç.Dr. Osman ABALI
Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı**

İlgi :Çocuk Ruh Sağ ve Hast Anabilim Dalının 15/06/2012 gün 576 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Jeyhun JAFEROV'ın yürüteceği 2012/1056-1142 dosya numaralı "Yaygın gelişimsel bozukluklar grubu hastalık tanısı alan 2-18 yaş arası çocuklar ve ebeveyyelerinde MCP1 (Monocyte chemotactic protein-1)/CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor 2) gen polimorfizmi değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 29.06.2012 tarihli 12 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

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

Eki: Tutanak

EK V

Özgeçmiş

Adı Soyadı : Ceyhun Caferov
Doğum Tarihi : 13.10.1983
Doğum Yeri : Azerbaycan
Ünvanı : Dr.
Medeni hali : Bekar
Ev Adres : Şehremini Mah. Günaydın sok. Aydar Apt. 70/9 Fatih İstanbul

Tel : 05425271775
İş Adresi: : İ.Ü. İTF Çocuk Psikiyatrisi AD Şehremini 34090
Çapa/İstanbul
E-mail: dr_ceyhunc@yahoo.com

MEVCUT AKADEMİK DURUMU

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

ÖĞRENİM DURUMU

Lisans : O.M.Ü Tıp Fakültesi 2000-2008
Uzmanlık Eğitimi: İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD 2009-2013