

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA MİR-135A-5P’NİN İFADE DEĞİŞİKLİĞİNİN İNCELENMESİ

Duygu BANDIRMALI

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güvem GÜMÜŞ AKAY

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Otizm Spektrum Bozukluğunda miR-135a-5p'nin ifade değişikliğinin incelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Duygu Bandırmalı

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Duygu BANDIRMALI tarafından hazırlanan “Otizm Spektrum Bozukluğunda miR-135a-5p’nin İfade Değişikliğinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

19.06.2023

İmza

Prof. Dr. Canan KALAYCIOĞLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Güvem GÜMÜŞ AKAY
Ankara Üniversitesi
Rapotör

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Meltem SEVGİLİ
Gazi Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	2
1.1. Otizm Spektrum Bozukluğu	2
1.2. Etiyopatogenez	4
1.2.1. Genetik faktörler	4
1.2.2. Çevresel Faktörler	6
1.2.3. Epigenetik Mekanizmalar	7
1.3. miRNA'lar	9
1.3.1. Otizm Spektrum Bozukluğunda miRNAlar	11
1.3.2. miR-135a-5p	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Çalışma Grubu	18
2.1.2. Klinik Değerlendirme	19
2.1.2.1. Klinik Değerlendirme Formları	20
2.2. Plazmada miR-135a-5p'nin ifade analizi	21
2.2.1. Kandan Plazma eldesi	21
2.2.2. Total RNA izolasyonu	22
2.2.3. cDNA Sentezi	23
2.2.4. qRT-PCR amplifikasyonu	23
2.3. miRNA ifade analizi, ekspresyon oranı ile klinik verilerin ilişkilendirilmesi	24
3. BULGULAR	26
3.1. Katılımcıların demografik Verileri	26
3.2. OSB Grubunun Klinik Özellikleri	29
3.3. miRNA İfade Düzeyi	31
3.4. miR-135a-5p ifade düzeylerinin sosyodemografik ve klinik verilerle ilişkisi	34
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45
EKLER	56
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	56
Ek 2. Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği	57

Ek 3. Biyobanka Gönüllü Bilgi Formu Ve Onam Formu	63
Ek 4. Sosyodemografik Veri Formu	68
Ek 5. Otistik Davranışları Kontrol Listesi	76
Ek 6. Tekrarlayıcı Davranışlar Ölçeği -Revize	78
ÖZGEÇMİŞ	82



ÖNSÖZ

Son yıllarda önemi giderek anlaşılan mikro RNA'ların otizm spektrum bozukluğundaki rolünü araştırmak üzere gerçekleştirilen bu tez çalışması; Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Merkezi (AUBAUM) Moleküler Nörobilim Laboratuvarı ve Biyobankası'nda gerçekleştirilmiştir ve TÜSEB tarafından (proje numarası 24322) desteklenmiştir.

Yüksek lisans yolcuğum boyunca çalışma disiplini, azmi, bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, her koşulda öğrenmemi ve büyümemi sağlayan çok değerli danışman Hocam Prof. Dr. Güvem GÜMÜŞ AKAY'a;

Çalışmalarımızda bize klinik alanda destek veren, her durumda özveriyle yardım sağlayan değerli Hocam Doç. Dr. Merve ÇIKILI UYTUN'a ve Ankara Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. çalışanlarına;

Eğitim sürecim boyunca bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren tüm Hocalarıma, değerli asistan arkadaşlarıma ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. teknik ve idari personeline;

Eğitim hayatı dışında bana çok kıymetli katkıları olan değerli Hocam Prof. Dr. Gülfem Elif ÇELİK'e, her türlü çalışmamda bana bilgi ve deneyimi ile destek olan değerli Hocam Doç. Dr. Nuray VAROL'a, hem ekip arkadaşı olarak hem de bir ablam olarak her zaman bana destek olan Filiz ÇETİNKAYA'ya,

Hayatın her koşulunda yanımda olan sevgili dostum Hatice TOPRAK'a; bana her zaman güvenen, gitmek istediğim yola inanan ve destek olan annem, babam ve

kardeşime; hayatımı sevimli kılan kedim Mırmır'a ve merhum anneanneme
teşekkürlerimi sunuyorum.

Duygu BANDIRMALI

Mayıs 2023



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
ANOVA	Analysis of Variance
APT1	Acyl-protein thioesterase 1
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
MSS	Merkezi sinir sistemi
CNV	Kopya sayısı varyantları (copy number of variation)
ÇODÖ	Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği
DGCR8	Di George Critical Region 8
dk	dakika
DLGAP1	DLG Associates Protein 1
DROSHA	Drosha Ribonuclease III
EXP5	eksportin-5
FMR1	Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1
GWAS	Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları
MECP2	Methyl-CpG Binding Protein 2
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
MZ	Monozigot
ncRNA	Kodlanmayan (non-coding) RNA
NGS	Yeni nesil dizileme
NLGN	Neurologin
NRX	Neurexin
ODKL	Otizm Davranış Kontrol Listesi
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
pre-miRNA	öncü miRNA
pri-miRNA	primer miRNA
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA-induced silencing complex
SERT	serotonin transporter
SHANK3	Prolin açısından zengin sinapsla ilişkili protein 2
sn	saniye
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SS	Standart Sapma
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitors
TEDÖ-R-TV	Tekrarlayıcı Davranışlar Ölçeği-Revize-Türkçe Versiyonu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. OSB’de genetik düzensizlikler (Tremblay ve Jiang, 2019) uyarlanmıştır	5
Şekil 1.2. miRNA biyogenez aşamaları	11
Şekil 3.1. miR-153a-5p ve U6 genlerinin ifadelene düzeyini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	32
Şekil 3.2 OSB ve sağlıklı kontrol örneklerinde miR-135a-5p ve U6 genlerine ait erime eğrileri	32
Şekil 3.3. OSB ve Kontrol gruplarında miR-135a-5p ifade düzeyi dağılım grafiğı	33
Şekil 3.4. OSB düzey grupları ile miR-135a-5p ifade düzeyi dağılımı arasındaki ilişki grafiğı	34
Şekil 4.1. KEGG analizinde öne çıkan “Kanserde miRNA’lar” (hsa05206) yolağında miR-135’in rolü	38

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. MEB Özel Eğitim ve Rehberlik Hizmetleri Genel Müdürlüğünün 18.11.2019 tarihli yazısından uyarlanmıştır	3
Çizelge 2.1. Her bir örnek için gerekli reaksiyon karışımı	23
Çizelge 2.2. cDNA örnek karışımı (Mir-X™TB Green® qRT-PCR kiti)	24
Çizelge 2.3. miR-135a-5p qRT-PCR döngüsü	24
Çizelge 3.1. Katılımcıların Demografik Verileri Bakımından Tanımlayıcı İstatistikleri Gruplar Arası Karşılaştırmalar	27
Çizelge 3.2. Demografik verilerin Frekans değerleri ve gruplar arası İstatistiksel analizleri	28
Çizelge 3.3. OSB grubunda klinik özelliklere ait tanımlayıcı istatistikler ve normalite test sonuçları	30
Çizelge 3.4. OSB grubu klinik verilerinin Frekans ve Shapiro-Wilk Normalite testi değerleri	31
Çizelge 3.5. miR-135a-5p ifade seviyelerinin OSB ve kontrol gruplarında değerlendirilmesi	33
Çizelge 3.6. Klinik ve Sosyodemografik verilere göre miR-135a-5p ifade düzeyi değerlendirme tablosu	34
Çizelge 3.7. Klinik ölçek ve veriler ile miR-135a-5p ifade düzeyleri arasında korelasyon değerlendirme tablosu	35

1. GİRİŞ

1.1. Otizm Spektrum Bozukluğu

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), erken dönem zihinsel gelişimin etkilendiği, motor koordinasyon bozukluğu, sosyal iletişim kusurları, tekrarlayan ve kısıtlı davranışlar ile karakterize edilen karmaşık bir nörogelişimsel bozukluklar grubudur (Ristori vd., 2020). Otizm terimi ilk defa 1911'de İsviçreli psikiyatrist Eugen Bleuler'in şizofreni vakalarında gözlemlediği ve kişinin içene kapanarak gerçek dünyadan kendisini soyutlama durumunu tanımlamak için kullanılmıştır. Tanısal anlamda otizm terimi ise ilk kez 1943 yılında Kanner tarafından çevresiyle temas kurma eksikliği olan çocukları tanımlamak için erken çocukluk otizmi olarak kullanılmıştır (Verhoeff, 2013). Bu dönemde, şizofreni ve otizm arasındaki belirsiz tanım devam ederken Kolvin tarafından 1971 yılında yapılan çalışmada, otizm ve şizofreni arasındaki ayrımı açık bir şekilde ifade eden bulgular ortaya konmuştur. 1980 yılında DSM III kategorisinde “çocukluk otizmi” yaygın bir gelişimsel bozukluk olarak kabul edildi (Kolvin, 1971). Mental hastalıkların tanı ve tedavisi için önerilen “Ruhsal Bozuklukların Teşhis ve İstatistik El Kitabı”, 1987’de revize edilerek DSM-III-R olarak tekrar yayımlanmış ve “çocukluk otizmi” kavramı “otistik bozukluk” olarak değiştirilmiştir. Böylelikle, otizmin yalnızca çocukla sınırlı olmadığı gelişimsel açıdan ileriki yaşlarda da etkisini sürdürdüğü vurgulanmıştır. DSM-V’te ise otizm kategorik olarak tek başlık altında toplanmış ve “spektrum” olarak tanımlanmıştır (Rosen ve ark., 2021). DSM-V kriterlerine göre OSB; tekrarlayan/takıntılı davranışlar, sınırlı ilgili alanları, sosyal etkileşimde ve iletişimde sorunlarla kendini göstermektedir. OSB’de en belirleyici tanı belirteçleri ise şöyle özetlenebilir;

- Eşlik eden zihinsel yetersizlik,
- Eşlik eden dil yetersizliği,
- Bilinen bir tıbbi, genetik veya çevresel faktör,
- İlişkili diğer nörogelişimsel, zihinsel veya davranışsal bozukluk,
- Katatoni (A. P. Association, 2013).

OSB'nin tüm dünyada nüfusun yaklaşık %1-2'sini etkilediği bilinmekle beraber, önceleri prevalansı her 1000 çocukta 1 ile nispeten nadir kabul edilirken (Masini ve ark., 2020), günümüzde bu oran tahmini 100'de 1'dir ve önümüzdeki yıllarda artması öngörülmektedir (Zeidan ve ark., 2022). Milli Eğitim Bakanlığı'nın 2019 yılında yaptığı çalışma sonucunda Tohum Otizm Vakfı'nın internet sitesinde yayınlamış olan verilere göre Çizelge 1.1'de de gösterildiği gibi Türkiye'deki OSB'li birey sayısı 2-6 yaş aralığında 9,436 (%24,10) olarak bildirilmiştir (TBMM Komisyonu, 2019).

Çizelge 1.1. MEB Özel Eğitim ve Rehberlik Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 18.11.2019 tarihli yazısından uyarlanmıştır (TBMM Komisyonu, 2019)

YAŞ ARALIĞI	OSB'Lİ BİREY YÜZDESİ (%)
0-3	2,62
3-6	24,10
6-10	37,35
10-14	16,95
14-18	11,12
18-99	7,86
TOPLAM	100

Nüfusun geneline bakıldığında otizmin cinsiyete göre eşit olmayan bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Epidemiyolojik ve toplum-temelli çalışmalara göre tüm ırk, etnik ve sosyoekonomik gruplarda otizm erkeklerde kadınlara nazaran daha sık (4:1) görülmektedir (Lord vd., 2020; Tremblay ve Jiang, 2019). Bu durumun, erkeklerde bulunan tek X kromozomunda herhangi bir genetik bozukluk meydana geldiğinde kadınlardaki gibi ikinci bir X kromozomu ile telafi edilememesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Aynı zamanda erkeklerde yüksek testosteron seviyesinin daha sık inflamatuvar yanıt oluşumunu indüklediği ve bu durumun da nöronal değişimlerden erkeklerin daha fazla etkilenmesine neden olduğu da ileri sürülmektedir (Masini vd., 2020).

Geçmişten bugüne OSB'nin davranışsal ve gelişimsel belirtileri ile ilgili birçok bilişsel teori ortaya atılmıştır. Bunların birçoğunun OSB'ye özel olmaktan ziyade nörogelişimsel hastalıkların bütününe kapsadığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar OSB'nin daha kompleks gelişimsel evreleri kapsayan, sinaptik iletim ve genetik özellikleri kapsayıcı bir yaklaşımla açıklanabileceğini ortaya koymuştur (Nelson ve ark., 2002)

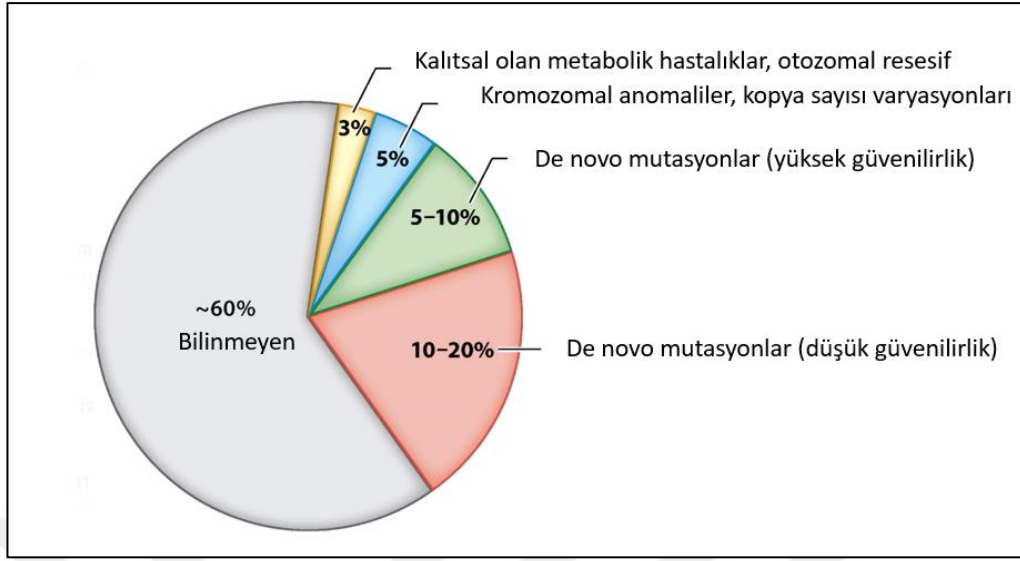
1.2. Etiyopatogenez

OSB etiyojisinde genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalara göre genetik faktörler arasında kromozom anomalileri, kopya sayısı varyantları, tek gen mutasyonları sayılabilirken, çevresel risk faktörleri arasında ise ileri ebeveyn yaşı, gebelikte ilaç ve kimyasal madde kullanımı, stres maruziyeti gibi etmenler sayılabilir (Modabbernia ve ark., 2017)

1.2.1. Genetik faktörler

OSB'nin genetik etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, monozigotik (MZ) ikizlerle yapılan çalışmalarda gözlenen %60-90 gibi yüksek konkordans oranları OSB'de genetik bileşenlerin önemini desteklemektedir. Son yirmi yılda ortaya konan genetik bulgular OSB'deki genetik kusurların etiyojik rolüne dair kuvvetli kanıtlar sağlamıştır (Tremblay ve Jiang, 2019).

OSB'li vakaların büyük bir çoğunluğunda neden bilinmemekle birlikte, vakaların yaklaşık %40'ı genetik anomaliler ile ilişkilidir. Bu genetik anomalilerin yaklaşık %3'ünü bir ebeveyninden kalıtılan otozomal resesif mutasyonlar oluştururken, %5'ini daha geniş ölçekli kromozomal anomaliler ve kopya sayısı varyantları ve geri kalanını ise genomun kodlayıcı dizisine denk gelen de novo mutasyonlar oluşturmaktadır. De novo mutasyonların %5-10'u iyi tanımlanmış mutasyonlardır ve bu oranın yakın gelecekte artması beklenmektedir. (Tremblay ve Jiang, 2019) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. OSB’de genetik düzensizlikler (Tremblay ve Jiang, 2019) uyarlanmıştır

OSB ile ilişkili genetik faktörlerin aydınlatılmasında aday gen yaklaşımı, ikiz çalışmaları, genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi yüksek çıktılı omik teknolojilerle yapılan çalışmalar büyük öneme sahiptir (Grove ve ark., 2019). 10.000’den fazla hasta üzerinde yapılan geniş ölçekli genomik çalışmalarda, OSB’de penetransı yüksek yaklaşık 100 kadar gende ve genetik lokusta tek nükleotid varyantları (SNV) ve kopya sayısı varyantları (CNV) keşfedilmiştir (De Rubeis ve ark., 2014; Iossifov ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2014; Willsey ve State, 2015). Bu tür genetik değişimler tek bir baz boyutunda olabileceği gibi milyonlarca bazı içeren DNA segmentlerinde kopya sayısı varyantları (CNV) şeklinde de bulunabilmektedir (Devlin ve ark., 2012; Sanders ve ark., 2011; Sanders ve ark., 2012). Söz konusu genetik değişiklikler proteinlerin amino asit dizilimini veya üretilen protein miktarını etkileyebilmektedir (Sebat ve ark., 2007).

Gerçekleştirilen çok sayıdaki çalışmanın sonucunda belirlenen genetik varyasyonları anlamlandırmak için yapılan biyoinformatik analizler, bu varyasyonların tespit edildiği proteinlerin beyin gelişimi, nöral ağ yapılanması, sinaptik iletim, kromatin yeniden düzenlenmesi gibi fizyolojik işlevlerle ilişkili olduklarına dikkati çekmektedir. OSB ile ilişkilendirilmiş genleri iki farklı işlevsel sınıfa ayırmak mümkündür: i) sinapsların gelişimi ve işlevinde doğrudan yer alan proteinleri kodlayan genler (*NRX1*, *SHANK3*, vb.) ve ii) kromatin yapılanmayı ve

epigenetik mekanizmayı düzenleyen enzimleri veya proteinleri kodlayan genler (*EHMT1*, *MECP2*, vb.) (De Rubeis ve ark., 2014; Iossifov ve ark., 2012).

OSB'nin genetik etyolojisini aydınlatmak üzere gerçekleştirilmiş çalışmalarda aday olarak öne çıkan (Saxena ve ark., 2020) bu genetik değişiklikler bile yüksek kalıtılabilirlik oranlarının küçük bir kısmını açıklayabilmektedir. Aynı zamanda, benzer genetik yapıya sahip MZ ikiz çalışmalarında bildirilen OSB bakımından diskordans da OSB'de "kalıtılabilirlik boşluğuna" işaret etmektedir (Zhou ve ark., 2019) Söz konusu boşluğun çevresel faktörlerin etkisiyle açıklanabileceği düşünülmektedir.

1.2.2. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörlerin OSB'ye etkisinin olası mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda nedensel olmayan bazı etmenler ortaya konmuştur. Örneğin, OSB'nin depresyon ile yüksek bir komorbidite oranına sahip olması nedensellikten ziyade paylaşılan bir risk mekanizmasını yansıtabilir denilmektedir (Ghaziuddin ve ark., 2002). Bununla beraber, son yıllarda artan OSB vakaları çevresel faktörlerin etkisi ve nörogelişimsel bozuklukların ayırt edici bir özelliği olan klinik heterojenite ile tutarlıdır. Bu alanda ortaya atılan alternatif bir hipotez, genetik altyapının normal nörogelişime etki eden çevresel faktörlere karşı artan duyarlılık kazandırmasıdır. Bireysel OSB riskini belirleyen etme, klinik fenotipini ve/veya tedavi sonucunu belirleyen etmen genler ve çevre arasındaki etkileşimdir (Saxena ve ark., 2020).

Özellikle annenin hamilelik döneminde maruz kaldığı bazı çevresel koşulların OSB gelişimini tetiklediği yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu çevresel koşullar; pestisit ve böcek ilaçları gibi nörotoksinler, civa ve kurşun gibi ağır metaller veya düşük seviyede elektromanyetik radyasyon olabileceği gibi, annenin geçirdiği viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, psikolojik stres faktörleri, B9 ve folat seviyesi ile kullanılan valproik asit gibi bazı anti-epileptik ilaçlar olabilmektedir (Saxena ve ark., 2020) . Bunun yanı sıra, maternal obezite ve uyuşturucu kullanımı, özellikle hipoksi

ile ilişkilendirilen doğum travması (Wu ve ark., 2017), gebelik sıklığı, ileri ebeveyn yaşı (Modabbernia ve ark., 2017) gibi çeşitli çevresel faktörlerin artmış OSB riski ile ilişkilendirilmiştir (Keil ve Lein, 2016). Bununla birlikte, bu faktörlerin direkt olarak OSB ile ilişkili olmadığını, yalnızca etiyopatolojisine katkı sunabilen durumlar olduğunu da göz önünde bulundurmak gerekir (Lord ve ark., 2020). Tüm bu çevresel faktörlerin, genetik ve epigenetik faktörler gibi kompleks moleküler mekanizmalar, inflamasyon, oksidatif stres, hipoksi ve iskemik hasar ile birlikte OSB'nin tetiklenmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Modabbernia ve ark., 2017).

Yapılan pek çok çalışma çevresel etmenlerin olumsuz etkilerini vurgulasa da bazı koşullar OSB'yi önleyici etki yapabilmektedir. Örneğin, doğuma yakın dönemde alınan vitamin takviyesinin, özellikle folat kullanımının çocuklarda OSB riskini azaltabileceğine dikkat çekilmektedir (Castro ve ark., 2016). Omega-3 grubu da dahil olmak üzere yağ asitlerinin ise erken çocukluk dönemindeki nörogelişimde ve yaşam boyu bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını ve alınan takviyelerin nöronal işlevlere fayda gösterdiğini desteklemektedir (Bauer ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalar, çevresel etmenlerin OSB'yi epigenetik değişimler üzerinden etkilediğini desteklemektedir (Grafodatskaya ve ark., 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalar OSB prevalansındaki beklenmedik artışların, çevresel faktörler sonucunda meydana gelen anormal DNA metilasyonu ve mikroRNA (miRNA) ifade düzeylerindeki değişimler gibi genetik olmayan faktörlerin beyin gelişimine etkisiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Tremblay ve Jiang, 2019).

1.2.3. Epigenetik Mekanizmalar

Kelime anlamıyla "genetiğin üstünde" anlamına gelen epigenetik, genetik kodu değiştirmeden fenotipte gözlenen farklılıkları açıklamak için kullanılan bir terimdir. Bir başka ifade ile epigenetik değişiklikler, DNA'nın baz diziliminde herhangi bir değişim olmaksızın gen ifadesinde stabil ve kalıtılabilen değişimleri ifade eder (Skinner, 2011). Epigenetik mekanizmalar başlıca DNA metilasyonu (Ziller ve ark.,

2013), histon modifikasyonları (Hnisz ve ark., 2013), mikroRNA'lar (Lee ve ark., 1993) ve nükleozom pozisyonlama (Kaplan ve ark., 2009) gibi farklı mekanizmaları içermektedir. Bu mekanizmaların son yıllarda OSB'nin moleküler patofizyolojisindeki rolünü aydınlatmaya yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Heyn, 2014).

OSB epigenetiği çalışmaları, ilk olarak epigenetik düzenleyicileri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların neden olduğu ve sıklıkla OSB bulgularının eşlik ettiği bir grup nörogelişimsel bozukluk ile başlamıştır. 15q11-q13'te lokalize "imprinting"e uğrayan *UBE3A* geninde büyük maternal delesyonlar Angelman sendromuna neden olurken; aynı genin paternal delesyonu Prader-Willi sendromuna neden olmaktadır (Delahanty ve ark., 2011; Hogart ve ark., 2008; Jiang ve ark., 2004; Samaco ve ark., 2005). Her iki sendromda da sıklıkla OSB bulguları gözlenmektedir. Diğer bir örnek ise epigenetik düzenleyici proteini kodlayan *MECP2* genindeki mutasyonun neden olduğu, kadınları etkileyen X'e bağlı dominant bir hastalık olan Rett sendromudur (Nagarajan ve ark., 2006; Nagarajan ve ark., 2008). Bu tipik tek gen hastalıklarına ilave olarak bazı aday genlerdeki DNA metilasyon değişiklikleri ve son yıllarda da epigenom boyu ilişkilendirme çalışmaları OSB ile ilişkili bir çok epigenetik düzensizliğin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (LaSalle, 2023). Örneğin, Aref-Eshghi ve ark. 2019 yılında geliştirdikleri "EpiSign" isimli klinik DNA metilasyon panelini (Aref-Eshghi ve ark., 2019) 2020 yılında yaptıkları bir çalışmalarında da kullanarak 42 nörogelişimsel hastalıktan 34'ünde belirgin epigenomik işaretler tanımlamışlardır. Bu epigenomik işaretlerden çoğunun, OSB aday genlerinden olan *ADNP*, *ATRX*, *CHD8*, *KDM6A*, *KTM2B* gibi kromatin düzenleyici genler ya da *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* gibi DNA metilasyonuyla ilişkili genler olduğu belirtilmiştir (Aref-Eshghi ve ark., 2020).

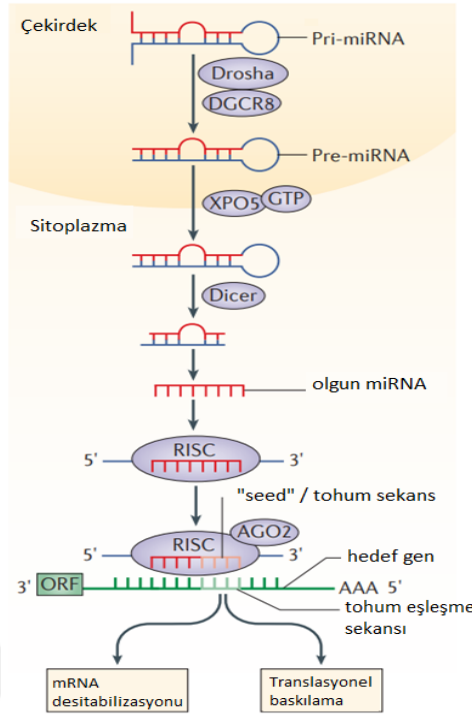
Yukarıda da belirtildiği üzere farklı epigenetik düzenlenme mekanizmaları söz konusu olmakla birlikte bu tez çalışması özelinde esas olarak OSB'de bir epigenetik düzenleyici olarak miRNA'lara odaklanıldığı için sadece bu mekanizma açıklanmıştır.

1.3. miRNA'lar

Lee ve ark. tarafından 1993 yılında *C. elegans*'da keşfedilmesiyle büyük çığır açan miRNA'lar, translasyonel seviyede gen ifadesini düzenleyen ~22 nükleotit (nt) uzunluğunda, protein kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar alglerden insanlara kadar uzanan çok çeşitli yaşam formlarında evrim süresince korunmuştur (Lee ve ark., 1993). Çünkü miRNA'lar hücre gelişimi, farklılaşması, çoğalması, hematopoez, apoptoz vb. çok önemli fizyolojik işlevlerde role sahiptir. Biyoinformatik verilerden elde edilen bilgiler doğrultusunda, miRNA'ların protein kodlayan tüm genlerin üçte birinin ifade edilmesini kontrol ettiği düşünülmektedir. Tek bir miRNA'nın, genomda yaklaşık 400 mRNA hedefine bağlanabildiği ve ifadesini düzenlediği öngörülmektedir (Alles ve ark., 2019). Örneğin, miR-15a/16-1 gen demetleri, doğrudan veya dolaylı bir biçimde, insan genomunun yaklaşık olarak %14'ünün ifadelenmesini kontrol edebilmektedir (Fabbri ve Calin, 2010; Yendamuri ve Calin, 2009).

Son verilere göre (www.mirbase.org - Release 22.1), insanda 4690 olgun miRNA tanımlanmıştır (Kozomara ve ark., 2019). Daha önceki çalışmalarda sadece hücrelerde ve dokularda eksprese edildiği düşünülen miRNA'lar, serum, plazma, tükürük ve idrar gibi hücre dışı vücut sıvılarında da tespit edilebilmektedir (Lu ve Rothenberg, 2018). Bununla birlikte, vücuttaki ifade edilen tüm miRNA'ların yaklaşık %70'i MSS'de ifade olur (Fineberg ve ark., 2009). Beyindeki miRNA'ların ekspresyonu çocukluk çağı boyunca ve farklı beyin bölgelerinde değişebilmektedir (Ziats ve Rennert, 2014). Hücresel anlamda etkilerinin hastalık patolojisine katkı sağlayabilmesi ve pek çok farklı biyolojik materyalden çalışılabilir olması nedeniyle miRNA'ların biyobelirteç olma potansiyeli yüksektir. Nitekim bu durum, miRNA ifade değişikliklerinin bir dizi nöropsikiyatrik bozuklukta görülen davranış ve bilişsel değişikliklerle ilişkili olduğunu gösteren pek çok çalışma ile desteklenmiştir (Schratt, 2009). Örneğin, Siegel ve ark. tarafından fare hipokampal nöronlarında yapılan fonksiyonel görüntüleme çalışmasında, mir-138'in protein depalmitoilasyonunu katalizleyen APT1 enzim genini hedefleyerek sinaptik morfogenezin düzenlenmesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Siegel ve ark., 2009).

Şekil 1.2’de miRNA’ların biyogenezi ve gen ifadesini nasıl düzenledikleri şematik olarak gösterilmiştir. miRNA genleri, RNA polimeraz II ve RNA polimeraz III tarafından birincil miRNA’lara (pri-miRNA) transkribe edilir. Pri-miRNA’lar ya kendilerine ait genlerden ya da diğer genlerin intronlarından bireysel miRNA’lar veya miRNA kümeleri olarak transkribe edilirler ve karakteristik ikincil saç tokası yapıları oluştururlar. Bu pri-miRNA daha sonra DROSHA (ribonükleaz 3 olarak da bilinir) ve Di George sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) mikroişlemci kompleksinin alt birimleri tarafından kesimlenir. DROSHA, pri-miRNA saç tokasının 5' ve 3' kollarını ayırır. DGCR8, doğrudan pri-miRNA ile etkileşir ve onu stabilize ederek kesimleme bölgesini belirlemek için moleküler bir cetvel görevi görür. RNA molekülünün kırılması ile boyutu 70-110 nükleotide kadar küçülür ve öncü miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılır. Bu işlemi takiben pre-miRNA, exportin 5 (EXP5) adı verilen nükleer bir reseptör ile sitoplazmaya taşınır. EXP5, hem kargo molekülüne hem de GTP-bağlı Ran kofaktörüne bağlanır. EXP5, kargo molekülü ile sitoplazmaya geldiğinde GTP’nin GDP’ye hidrolizi sonucunda miRNA sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya salınan pre-miRNA, sitoplazmadaki diğer bir RNaz III enzimi olan “Dicer” tarafından tanınır ve terminal halka bölgesinden kesimlenerek olgun miRNA meydana getirilir. Dicer, hem pre-miRNA’nın işlenmesi hem de RISC (RNA-uyartılı sessizleştirme kompleksi) için çift iplikçikli RNA-bağlanma proteinleri TRBP (TAR RNA-bağlanma proteini) veya PACT (PRKRA olarak da bilinir)’ye ihtiyaç duyar. Olgun miRNA’nın bir ipliği Ago (Argonaute) proteini tarafından alıkonulurken (rehber iplik veya miRNA), diğer iplikçik (yolcu iplik veya miRNA*) parçalanır. miRISC (miRNP veya miRgonaute) olarak isimlendirilen ve miRNA içeren RISC kompleksi, ilgili miRNA’nın hedef mRNA’sını bularak bağlanmasına ve translasyonel düzeyde gen ifadesinin baskılanmasına neden olur. Olgun miRNA’nın 5' ucunda yer alan yaklaşık 8 nükleotidlik “çekirdek bölge (seed bölge)” ile hedef mRNA’nın 3' ucu arasında Watson-Crick baz eşleşmesi olur ve böylece hedef gen/genler düzenlenir (Issler ve Chen, 2015; Varol ve ark., 2011)



Şekil 1.2. miRNA biyogenez aşamaları (Issler ve Chen, 2015)

1.3.1. Otizm Spektrum Bozukluğunda miRNAlar

Son yıllarda epigenetik ve OSB ilişkisine dair çalışmalar katlanarak artmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan biri olan miRNA ile OSB ilişkisi özellikle büyük ilgi görmektedir. Garrido-Torres ve ark. (2023) tarafından gerçekleştirilen bir meta-analiz çalışmasında konuyla ilgili bulunan 133 makale arasından miRNA'larla ilişkili olan 16 makale analiz için seçilmiştir. Bu analizler sonucunda tüm çalışmalarda yaşları 2 ila 81 arasında değişen kişilerden alınmış postmortem cerebral korteks dokusu, olfaktör mukoza hücreleri, serum, tükürük örneklerinde yapılan analizler sonucunda ifade değişikliği gösteren toplam 218 miRNA öne çıkmıştır (Garrido-Torres ve ark., 2023). 2022 yılında yapılan bir başka çalışmada özellikle mir-151a, mir146a ve mir27a-30'un OSB'de birçok dokuda disregüle olabildiği gösterilmiştir. Postmortem beyin dokusu, serum ve tükürük gibi farklı biyolojik örneklerde ifadesinin anlamlı şekilde değiştiği tespit edilen mir-451'nin sosyal etkileşim ile ilişkili olduğu bilinen oksitosin reseptör geni *OXRT*'i hedeflediği bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada mir-21-5p'nin *OXTR* translasyonunu baskıladığı da belirtilmiştir (Gill ve

ark., 2022). Bunun yanı sıra, mir-106'nın OSB'de aday genlerden olan *SEMA5A*, *NTNG1*, *SRGAP3* ve *MAPK1*'i hedeflediği ve bu genlerle ilişkilendirilmiş OSB'de görülen kısıtlı ve tekrarlı davranışlarla bağlantısı olduğu bulgusu mevcuttur (Hicks ve ark., 2020). Yu ve ark. tarafından 2018 yılında yapılmış başka bir çalışmada ise mir-486-3p'nin ifade düzeyinin dentritik ve sinaptik gelişimde etkisi olan c-Fos ve Arc ifadelerinde değişim meydana getirdiği ve bunun da OSB'de zeka ve davranış bozukluklarıyla ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Yu ve ark., 2018). Nörogelişimsel hastalık olarak bilinen OSB'nin nöronal olgunlaşma, nöronal plastisite ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Vaccaro ve arkadaşlarının 2018 yılında insan kan örneklerinde yaptığı çalışmada, miR-34c-5p'nin nöronal iskelet stabilizasyonu ile ilişkili olan *MAPT* genini hedef aldığı ve nöron olgunlaşmasını etkileyebildiği bildirilmiştir (Da Silva Vaccaro ve ark., 2018). Hick ve ark. (2020), çalışmalarında gelişim geriliği gösteren OSB'li çocuklar ile normal gelişim gösteren akranlarını ayırt etmek için tükürük örneklerinden miRNA profilleri incelendiğinde gruplar arasında 14 miRNA'nın ifade profilinde farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Hicks ve ark., 2020). Bu bulgular doğrultusunda OSB'li ve OSB'li olmayan grupları yüksek doğruluk payıyla ayırt edebilecek miRNA paneli geliştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda tükürükten miRNA profillemesinin OSB'de invaziv olmayan bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise periferik kan örneklerinde OSB'li ve sağlıklı kontrol grubu arasında 7 miRNA'nın (miR34c-5p, miR92a-2-5p, miR-145-5p, miR199a-5p, miR27a-3p, miR19-b-1-5p, miR193a-5p) ifadesinde farklılıklar saptanmıştır. Bu miRNA'ların genel olarak bağışıklık sistemi ve protein biyogenezi ile ilişkili genleri hedeflediği belirlenmiştir. Özellikle de miR-199a'nın *MECP2* genini hedeflediği ve Rett Sendromu patolojisinde MECP2 protein disfonksiyonunun otistik davranışlara yol açtığı gösterilmiştir (Da Silva Vaccaro ve ark., 2018). Nakata ve ark. (2019)'nın vaka-kontrol çalışmasında periferik kan örneklerinde miR-6126 ifadenin düzeyinin özellikle ciddi sosyal anormallikler gösteren OSB'li grupta önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda bu miRNA'nın özellikle sinaptik fonksiyon ve oksitosin sinyal yollarıyla ilişkili genleri hedef aldığı ifade edilmiştir (Nakata ve ark., 2019). Periferik kan örnekleri ile yapılan başka bir çalışmada ise OSB'li ve kontrol gruplarında sinaptik iletim ve nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğu bilinen miR-328-3p ve miR-3135a

ifadelenme düzeyi incelenmiş ve OSB’li bireylerde bu miRNA’ların ifadelenme düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir (Nt ve ark., 2018). Postmortem beyin dokularında yapılan bir çalışmada ise hsa-miR-21-3p’nin ifadesi OSB’li bireylerde artarken hedeflediği genlerin ifadesinin azaldığı saptanmıştır (Wu ve ark., 2016). Nguyen ve ark. (2018) ise beyin temporal lob örneklerinde yaptıkları çalışmada miR-146a ifadesini gözlemleyerek bu miRNA’nın artan ifadesinin OSB’li bireylerde erken çocukluk dönemiyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Diğer bir ifadeyle miR-146a OSB’de primer nöronal gelişim evresiyle ilişkilendirilmiştir (Nguyen ve ark., 2018). OSB’li bireylerin beyin dokularında yapılan bir diğer çalışmada miR-21-5p, miR-142-5p, miR-142-3p, miR-144-3p ve miR-451a ifadelerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu miRNA’ların da diğer çalışma bulgularıyla örtüşecek şekilde sinaptik mekanizma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca, miR-21-5p’nin de oksitosin reseptör genini hedef alarak OSB’li bireylerde bu genin ifadelenmesini azalttığı bildirilmiştir (Mor ve ark., 2015). Bununla birlikte, serum örneklerinde yapılan bir çalışmada miR-19a-3p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-361-5p, miR-361-3p, ve miR-499a-5p ifadelerinin OSB’li çocuklarda azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çocukların ebeveynleri ve sağlıklı kardeşlerinde bu miRNA’ların ifadelerinin genetik olarak bir bağlantısı bulunmayan sağlıklı kontrollere göre de daha az olduğu görülmüştür. Ayrıca ekspresyon seviyelerinin kan, hipotalamus ve sperm örneklerinde de azaldığı yapılan hayvan modeli çalışmalarında gösterilmiştir (Ozkul ve ark., 2020).

OSB ve alt gruplarında tanımlanan bazı önemli genlerin bilinen miRNA’lar tarafından hedeflendiğinin fare modeli çalışmalarında gösterilmesi de miRNA’ların OSB’deki rolünü destekleyen önemli kanıtlar sağlamıştır. Bu genler arasında Frajil X ile ilişkilendirilen *FMR1*, Rett Sendromu ile ilişkili *MECP2*, OSB’de davranışsal değişimler ve sosyal etkileşim ile ilişkilendirilen *NLGN* ve *NRX*, OSB ile ilişkilendirilen *SHANK3* ve genel nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilen *NLGN2* ve *NRXN1* geni sayılabilir (Schepici ve ark., 2019). Örneğin, Frajil X ile ilişkili olan tremor/ataksi sendromlu (FXTAS) farelerde, frajil X mental retardasyon (*FMR1*) transkriptinin miR-101, miR-129-5p ve miR-221 tarafından hedeflendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, FXTAS farelerinden elde edilen sinaptozomal preparasyonlarda, öğrenme ve sosyal etkileşimde rol oynayan 339 gen transkriptinin

ifade düzeylerinde düzensizlik ve düşük miR-221 seviyeleri gösterilmiştir (Zongaro ve ark., 2013). Bununla birlikte, miRNA'ların biyogenezinde rol oynayan *DGCR8* (Dicer) geninin bulunduğu kromozom 22q11.21'de meydana gelen hemi-delesyonun deneklerin yaklaşık üçte birinde OSB özellikleri gelişmesine neden olduğu da gözlemlenmiştir (Schofield ve ark., 2011) (Fénelon ve ark., 2011). Yine fareler üzerinde yapılan bir çalışmada miR-125b'nin, sinaptik plastisite ve hafıza ile ilişkili olan N-metil-D-aspartat reseptörünün NR2A alt birimini (NDMAR) hedef aldığı belirlenmiştir (Edbauer ve ark., 2010). Bir başka çalışmada da Abu-Elneel ve arkadaşlarının (2008) OSB'li (n=13) ve sağlıklı kontrol (n=13) gruplarında postmortem serebellar korteks dokuları incelenmiş ve 2 grup arasında ekspresyon farkı elde edilmiş olan 28 miRNA saptanmıştır. Bu miRNA'lardan 7'sinin sinaptik trafiğin düzenlenmesinde rol oynayan SNAP3 transkriptini hedef aldığı saptanmıştır (Abu-Elneel ve ark., 2008). Yine OSB (n=28) ve sağlıklı kontrol (n=28) gruplarının postmortem serebellar korteks dokularında yapılan bir çalışmada miR-21-3p'nin OSB'li deneklerde ekspresyonun arttığı saptanmış ve bu aşırı ekspresyonun SHANK3 ile etkileşime giren bir iskelet proteini olan DLGAP1'in ekspresyonunu baskıladığı vurgulanmıştır (Wu ve ark., 2016). 219 miRNA arasından önceliklendirilen 27 miRNA'ya ait bir derleme çalışmasında bu miRNA'lardan miR-23a-3p, miR-146a-5p ve miR-106b-5p'in ifadenin değişimi üçten fazla farklı çalışmayla teyit edilmiş olup bu miRNA'ların OSB ile ilişkili olduğu ve nörotrofin sinyal yoluna etki ettiği vurgulanmaktadır. Ayrıca bu 27 miRNA'dan 6'sının hipokampal nörogenezde önemli yere sahip olan ve OSB'li bireylerde ifadesinin azaldığı belirlenen BDNF'i hedeflediği saptanmıştır (Hicks ve Middleton, 2016).

Özet olarak farklı araştırma grupları tarafından gerek hayvan modelleri gerekse insanda gerçekleştirilen çalışmalar gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan miRNA'ların OSB'de önemli rol oynadığına işaret etmektedir.

1.3.2. miR-135a-5p

Yukarıda özetlenmeye çalışıldığı gibi miRNA'lar, OSB etyopatogenezinde önemli bir biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir. OSB ile ilişkili olabilecek aday miRNA'ların belirlenmesinde OSB belirtileri ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiş olan miRNA'lar üzerinden biyobelirteç arayışları gerçekleştirilebilir. Bu miRNA'lar için gerekli veri analizleri çalışma bulgularının yer aldığı çevrimiçi ve açık kaynak olan farklı veri tabanlarında gerçekleştirilebilmektedir.

Bu tez çalışmasında "RNA central.release 20" veri tabanında (rnacentral.org/) gerçekleştirdiğimiz taramalarda, insanda beyinde ifade bulan miRNA'lar üzerine yoğunlaştık (Petrov ve ark., 2017). Bunlardan OSB ile ilişkisi olabilecek en iyi ihtimale sahip olan miRNA'ları seçerek ileri araştırmamızı yaptık. Bir sonraki aşamada seçtiğimiz miRNA'ların ilişkili olduğu hastalıklar, genler ve yolaklar için "The Human Genes Database Genecards" veri tabanını (www.genecards.org) (Stelzer ve ark., 2016) kullandık. Çalışmamızda kullanmak amacıyla miRNA'yı seçerken insanda OSB ile ilişkisine daha önceden bakılmamış olmasına, OSB ile ilişkilendirilebilecek fizyolojik mekanizma ve yolaklar ile ilişkilendirilmiş olmasına, var ise insan dışı deney gruplarında OSB ile ilişkilendirildiği çalışmaların bulunmasına ve çalışma bulgularının güçlü olmasına dikkat ettik. OSB ile ilişkisi daha önceleri hücre ve hayvan çalışmalarında ve farklı biyolojik örnekler üzerinde gösterilmiş olan ve OSB ile fizyopatolojik benzerlikler gösteren bulgular ile ilişkisi insanda da çalışılmış olan miR-135a-5p'yi bu çalışma için seçtik.

Literatüre bakıldığında miR-135a-5p ifadenin düzeyindeki değişimler nörogelişimsel bozukluklar ve kanserinde içerisinde yer aldığı birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. İlişkilendirildiği durumlar arasında egzersiz düzeyi, depresyon, stres, anksiyete ve kanser bulunmaktadır. Farelerle yapılan bir çalışmada depresyona sahip olan hayvanların beyin ve kan örneklerinde miR-135a-5p ifadesinin azaldığı (Chu ve ark., 2016), başka bir çalışmada ise serotonin aktivitesinde önemli rol oynadığı için antidepresan verildiğinde ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Issler ve ark., 2014). Pons-Espinal ve ark. (2019), Farelerde fiziksel egzersiz ile indüklenen erişkin

hipokampal nörogenezde miR-135a-5p'nin ifade azalışının önemli olduğu bildirilmiştir. (Pons-Espinal ve ark., 2019). Ayrıca başka bir çalışmada ise, sinaptik vezikül füzyonunun iki anahtar düzenleyicisi olan kompleksin-1 ve kompleksin-2'nin miR-135a'nın direk hedefi olduğu ve bu durumun glutamaterjik nörotransmisyonun presinaptik mekanizmalarının modülasyonunda fizyolojik bir rolü olduğuna dair kanıt sağladığı bildirilmiştir. Bu yönüyle de stres ve anksiyete durumlarının açığa çıkmasında miR-135a-5p ifadesinin azalmasının önemli bir rolü olabileceği vurgulanmıştır (Mannironi ve ark., 2018). Depresyon, anksiyete gibi durumların OSB ile komorbidite gösterdiği (Sharma ve ark., 2018) göz önüne alındığında miR-135a-5p OSB için umut vadeci bir biyobelirteç aday olma potansiyeli taşımaktadır.

Literatürde OSB'de normal popülasyona kıyasla artmış kanser insidansı sıklıkla bildirilmektedir (Forés-Martos ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda miR-135a-5p'nin, kanser örneklerinde Wnt/ β -catenin sinyal yolağının önemli tümör baskılayıcı geni olan APC genini baskıladığı gösterilmiştir (Ogata ve ark., 1999). Kanser biyolojisinde önemli olduğu bilinen PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolağının aynı zamanda OSB'de de yolak zenginleştirme analizlerinde öne çıkan yolaklardan birisi olduğu bilinmektedir (Wen ve Herbert, 2017). miR-135a-5p'nin de bu yolak üzerinden akciğer kanserinde apoptozu indükleyerek invazyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Cao ve ark., 2020).

Tüm bu veriler miR-135a-5p'nin OSB'de biyobelirteç olma potansiyelinin araştırılmasında teşvik edici olmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında, yukarıda özetlenmeye çalışıldığı üzere, daha önce hayvan çalışmaları ve biyoenformatik analizler ile OSB'de olası bir aday miRNA olarak ön plana çıkan mir-135a-5p'nin insan OSB örneklerinde ilk defa araştırılması ve klinik bulgularla ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın hipotezi "mir-135a-5p'nin ifade seviyesinin OSB'de kontrol örneklerine kıyasla farklı olduğu ve bunun klinik parametreler ile korelasyon göstereceğidir."

Bu hipotezimizi test etmek için ulaşmayı beklediğimiz hedeflerimiz;

1.mir-135a-5p'nin ifade seviyesini 2-6 yaş aralığındaki hasta ve kontrol gruplarından elde edilecek plazma örneklerinde karşılařtırılmalđ olarak analiz etmek.

2.Hasta grubunda mir-135a-5p ifade seviyeleri ile klinik ve sosyo-demografik parametreler arası ilişkiyi incelemektir.



1. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından İ07-414-22 Etik Kurul No ile 4.08.2022 tarihinde (EK 1) onaylanmıştır. Çalışmaya dahil edilecek gönüllüler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine ilk defa başvuran ve henüz tedaviye başlamamış kişiler arasından seçilmiştir. OSB hasta grubu Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ) (EK 2) tanı kriterlerine göre 30 kesme puanından yüksek puana sahip olanlar arasından belirlenmiştir. Sağlıklı kontroller ise bu gruba dahil olmayanlar arasından seçilmiştir. İki grup için de aşağıda sözü edilen dahil edilme ve dışlanma kriterlerine uyan 16 OSB hastası ile 17 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklemen güç analizi G.Power 3.1.9.7 programında $P=0.70$ olarak hesaplanmıştır.

Hasta grubu için dahil edilme kriterleri:

- ✓ Belirtilerin ilk gözlemlendiği yaş aralığı olduğundan 2-6 yaş arası yeni OSB tanısı almış olmak (DSM-5 kriterlerine göre),
- ✓ Epigenetik değişikliklere neden olabilecek herhangi bir ek kronik hastalığı bulunmamak,
- ✓ Epigenetik değişikliklere neden olabilecek genetik hastalıkları (Frajil X, Rett sendromu gibi) bulunmamak,
- ✓ Epigenetik değişikliklere neden olabilecek herhangi bir ilaç kullanmamak,

Hastalar için dışlama kriterleri:

- ✓ Kronik hastalığı bulunmak,
- ✓ İlaç kullanıyor olmak,
- ✓ Onam alınabilecek ebeveyni olmamak

- ✓ Otizme eşlik eden başka bir sendroma veya klinik tanıya sahip olmamak

Kontrol grubu için dahil edilme kriterleri:

- ✓ 2-6 yaş arasında olmak,
- ✓ Normal zeka düzeyine sahip olmak,
- ✓ Herhangi bir karaciğer hastalığı, böbrek hastalığı, nörolojik hastalık, kardiyak hastalık ve endokrinolojik hastalık tanısı olmamak,
- ✓ Herhangi bir psikiyatrik bozukluk tanısı olmamak,
- ✓ Eşlik eden herhangi bir kronik, tıbbi ya da psikiyatrik hastalığa yönelik ilaç kullanmamak,

Kontrol grubu için dışlama kriterleri:

- ✓ Kontrol grubunun dahil olma şartlarını sağlamamak.

Ayrıca, kontrol grubuna seçilecek gönüllülerin cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubuyla eşleşmesi amaçlandı.

2.1.2. Klinik Değerlendirme

Çalışmaya katılan gönüllülerin klinik ve demografik değerlendirmeleri Ankara Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğinde yapılmıştır. Psikiyatrik görüşmesi yapılan ve DSM-5'e göre değerlendirilen çocuklara OSB derecesini belirlemek üzere Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ) uygulanmıştır. Çocuk ve her iki ebeveyn ile yapılan görüşmede sosyodemografik bilgi formu (EK 4) doldurulmuştur. Ayrıca ebeveynlerin bildirimleri doğrultusunda Otistik Davranışları Kontrol Listesi (ODKL) (EK 5) ve Tekrarlayıcı Davranışlar Ölçeği - Revize- Türkçe Versiyonu (TEDÖ-R-TV) (EK 6) ölçekleri uygulanmıştır. Sağlıklı kontroller ise DSM-5'e dayalı tanısal psikiyatrik görüşme esnasında kontrol grubuna

ait olan dâhil olma/dışlama kriterlerine göre seçilmiştir. Çocuk ve her iki ebeveynle birlikte yapılan görüşmede de sosyodemografik bilgi formu doldurulmuştur.

2.1.2.1. Klinik Değerlendirme Formları

Çalışmada OSB ve kontrol gruplarında değerlendirme amaçlı kullanılan Sosyodemografik ve Klinik Değerlendirme Formları aşağıda sıralanmıştır.

- ✓ **Sosyodemografik Veri Formu:** Bu formda katılımcılardan doğum tarihi, cinsiyet, eğitim durumu; anne ve baba yaşı, eğitim düzeyi ve mesleği, aile yapısı, anne gebelik öyküsü, annenin gebelikteki tıbbi öyküsü, annenin gebelikteki stres durumu, çocuk doğum öyküsü, gelişim basamakları, ailede tıbbi ve psikiyatrik hastalık öyküleri, duyuşal hassasiyet varlığı ve OSB tanı öyküsü gibi bilgiler elde edilmektedir.
- ✓ **Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ):** Schopler ve ark. tarafından 1971’de geliştirilen bu ölçek OSB tanısı, OSB düzeyinin belirlenmesi ve OSB’li grubu gelişimsel bozukluğu olanlardan ayırt etmek amaçlı kullanılmaktadır (Schopler ve ark., 1971). Çocuğun gözlemlenmesi ve aile ile yapılan görüşme sonucunda elde edilen bilgiler ışığında doldurulur. Türkçe uyarlaması Öktem ve ark. tarafından 1996’da yapılmış olan bu ölçekte bulunan 15 madde, 1 normal sınırlarda, 4 çok anormal düzeyde olacak şekilde yarım derecelik puanlama sistemiyle (1;1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ve 4) doldurulmaktadır (Öktem ve ark., 1996). Toplam puan en fazla 60, en az 15 olabilmektedir. Bu puanlama sonucunda; 15-29,5 puan aralığı OSB’li değil, 30-36,5 puan hafif-orta otistik, 37-60 puan ağır otistik olarak değerlendirilir (Garfin ve McCallon, 1988). Ölçeğin Türkçe formunda kesme puanı 30 olarak saptanmıştır ($p<0,001$) (İncekaş S, 2016)
- ✓ **Otistik Davranışları Değerlendirme Listesi (ODKL):** Krug ve ark. tarafından 1993’te geliştirilen bu ölçek OSB belirti alanlarını, düzeyini ve

klirik ilerleyişini değerlendirmek üzere geliştirilmiştir (Krug ve ark., 1993). Ölçek ‘Duyusal’, ‘Sosyal İlişkilene’, ‘Beden ve Nesne Kullanımı’, ‘Dil Becerileri’ ve ‘Öz Bakım Becerileri’ olarak 5 alt başlıktan ve toplam 57 sorudan oluşmaktadır. Tüm sorulardan elde edilen puanların toplanmasıyla 0 ila 159 arasında bir toplam puan elde edilir (Butler ve Lord, 2013). Ölçekte alınan puanın artması daha yüksek seviyede otizm ile ilişkilendirilmiştir (Bravo ve ark., 2014). Yılmaz-Irmak ve ark. (2007) tarafından Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması yapılan ölçekte kesme puanı 39 olarak belirlenmiştir (Yılmaz Irmak ve ark., 2007).

- ✓ **Tekrarlayıcı Davranışlar Ölçeği -Revize – Türkçe Versiyon (TEDÖ-R-TV):** Katılımcılarda dörtlü derecelendirme sistemiyle tekrarlayıcı davranışları ve bu davranışların şiddetini değerlendiren bir ölçektir. Ölçek ebeveynler ile yapılan görüşme esnasında doldurulmaktadır. Puanlama sistemine göre; 0: davranış yok, 1: hafif düzeyde, 2: orta düzeyde, 3: ağır düzeyde olarak değerlendirilir ve puan artışı davranış şiddetinin arttığını gösterir (Ökcün-Akçamuş, 2018).

2.2. Plazmada miR-135a-5p'nin ifade analizi

2.2.1. Kandan Plazma eldesi

Bu çalışma kapsamında kullanılan plazma örnekleri daha önceden “Otizmin Moleküler ve Genetik Etiyolojisinin Araştırılması için Biyobankalama Çalışması” başlıklı çalışma kapsamında, kan örneklerinin başka genetik çalışmalarda kullanılmasına rıza gösteren (Onam formları için bkz. Ek 3) kişilerden elde edilerek AÜBAUM Biyobankası’nda bankalanmış örneklerden alınmıştır.

Kan örnekleri aseptik koşullarda EDTA’lı tüplere alınarak yetkili personel tarafından özel taşıma kaplarında ve +4°C’de AÜBAUM Biyobankası’na iletilmiştir.

Toplanan kan örnekleri, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Kat. No: 217204, Qiagen, Germany) protokolünde önerildiği üzere 1900 xg'de 4°C'de 10 dk ve daha sonra 3000 xg 4°C'de 15 dk santrifüj edilerek ayrılan plazma örnekleri, mikrosantrifüj tüplerine bölüştürülmüş ve bir sonraki işleme kadar -80°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit (Kat. no:217204, Qiagen, Germany) protokolüne göre ve aşağıda tanımlandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 200 µL plazma örneği 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve üzerine 60 µL RPL Buffer eklenerek 5 saniyeden az süre vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 3 dk bekletilir.
2. Örnek üzerine 20 µL RPP Buffer eklenerek yaklaşık 20 saniye vortekslenir ve oda sıcaklığında 3 dk bekletilir.
3. Oluşan karışım oda sıcaklığında 12.000 xg'de 3 dk santrifüj edilir.
4. Süpernatanın 230 µL'si yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 1 hacim izopropanol eklenir ve vortekslenir.
5. Karışım RNeasy UCP MinElute kolonuna aktarılır, oda sıcaklığında en az 8000 xg'de 15 sn santrifüj edilir ve toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
6. Kolon üzerine 700 µL RWT Buffer eklenir, oda sıcaklığında en az 8000 xg'de 15 sn santrifüj edilir ve toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
7. Kolon üzerine 500 µL RPE Buffer eklenir, oda sıcaklığında en az 8000 xg'de 15 sn santrifüj edilir ve toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
8. Kolon üzerine 500 µL %80 etanol eklenir, oda sıcaklığında en az 8.000 xg'de 2 dk santrifüj edilir ve toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
9. Kolon 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılır ve maksimum hızda 5 dk santrifüj edilir.

10. Kolon 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Kolonun üzerine 20 µL RNase-free su eklenerek 1 dk bekletilir ve sonrasında 1 dk maksimum hızda santrifüj edilir.
11. İzole edilen total RNA örneği kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanır.

2.2.3. cDNA Sentezi

RNA örnekleri Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis kit (Kat. No: 638313, Takara Bio, USA) protokolü uygulanarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmiştir.

1. Her bir RNA örneği için gerekli reaksiyon içeriği Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Her bir örnek için gerekli reaksiyon karışımı

Reaktif	Hacim (µL)
mRQ Buffer (2x)	5
RNA örneği	3,75
mRQ Enzimi	1,25
Toplam Hacim	10

2. Hazırlanan karışımı 37°C'de 1 saat inkübe edilir.
3. İnkübasyon bitiminde karışım 85°C'de 5 dk bekletilir.
4. Karışıma 90 µL distile su (ddH₂O) eklenerek toplam hacim 100 µL'ye tamamlanır.

2.2.4. qRT-PCR amplifikasyonu

qRT-PCR, Lightcycler 480 II (Roche, ABD) cihazında, Mir-X™TB Green® qRT-PCR kiti (Kat No: 639676, Takara Bio, USA) ve miR-135a-5p spesifik primer (GCCTATGGCTTTTATTCCTATGTG) (Oligomer, Türkiye) ile kit protokolüne

uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon için U6 geni kullanılmıştır. U6 forward ve reverse primerleri ve universal reverse primer (mRQ) kit ile sağlanmıştır.

Çalışmada her bir örnek için mR-135a-5p ve U6 primerleri ile reaksiyon karışımları Çizelge 2.2’de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve her analizde No-Template negatif kontrol eklenmiştir. Her örnek çift olarak (duplike) çalışılmıştır.

Reaksiyon koşulları Çizelge 2.3.’de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 2.2. cDNA örnek karışımı (Mir-XTMTB Green® qRT-PCR kiti)

Reaktif	Hacim (µL)
ddH ₂ O	9,5
TB Green Advantage Premix (2X)	12,5
Forward primer (10 µM)	0,5
Reverse primer (10 µM)	0,5
cDNA	2,0
Toplam Hacim	25

Çizelge 2.3. miR-135a-5p qRT-PCR döngüsü

Denatürasyon	
95°C	10 sn
qRT-PCR x40 Döngü	
95°C	5 sn
60°C	20 sn
Ayrılma Döngüsü	
95°C	60 sn
55°C	30 sn
95°C	30 sn

2.3. miRNA ifade analizi, ekspresyon oranı ile klinik verilerin ilişkilendirilmesi

Her örnekte miR-135a-5p’nin ifade seviyesi, U6 housekeeping genine göre normalize edilerek $2^{-\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

İstatistiksel analizler için SPSS 23.0 ve JASP 0.16.3 programları kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda verinin normal dağılıp dağılmamasına göre parametrik Student-t testi veya non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca, miRNA ifadesi ile hasta grubunda ebeveyn yaşı, obezite, kimyasal maruziyeti gibi durumlar arasındaki ilişki için dağılıma göre Spearman veya Pearson korelasyon testi ile analiz edildi. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.



2. BULGULAR

Çalışmamıza, yaşları 2 ila 6 yaş arasında değişen 16 OSB'li ve 17 normal gelişim gösteren sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 33 çocuk dahil edilmiştir.

3.1. Katılımcıların demografik Verileri

Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi çalışmadaki OSB grubunun yaş ortalaması $3,81 \pm 0,91$ (Ortalama $\pm$ SS) ve kontrol grubunun yaş ortalaması da $4,59 \pm 1,00$ olarak hesaplanmıştır. OSB ve kontrol grupları arasında genel yaş ortalamaları istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($U=195$, $p=0,028$).

Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi OSB grubunda 12 (%75) erkek, 4 (%25) kız; kontrol grubunda 10 (58,82) erkek, 7 (%41,18) kız bulunmaktadır. OSB ve kontrol grupları cinsiyet sıklık dağılımları bakımından istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($\chi^2(1)=0,971$, $p=0,325$).

Doğum kilosu ortalama değeri (kg) OSB grubunda ($n=16$) $3,22 \pm 0,52$ kg, kontrol grubunda ($n=11$) $3,38 \pm 0,49$ kg'dır. OSB ve kontrol grupları arasında doğum kilosu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($t(25)=0,767$, $p=0,45$) (Çizelge 3.1).

Yürüme zamanı (ay) ortalama değeri OSB grubunda ($n=15$) $13,80 \pm 3,05$ ay ve kontrol grubunda ($n=10$) $13,00 \pm 2,26$ ay olarak hesaplandı. OSB ve kontrol grupları arasında yürüme zamanı bakımından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($U=63,5$, $p=0,528$). İlk konuşma yaşı (ay) ortalama değeri tüm örneklemde ($n=20$) $15,00 \pm 5,28$ ay, OSB grubunda ($n=10$) $16,00 \pm 5,28$ ay ve kontrol grubunda ($n=10$) $14,00 \pm 4,30$ aydır. OSB ve kontrol grupları arasında ilk konuşma yaşı anlamlı farklılık göstermemiştir ($U=39$, $p=0,419$) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Katılımcıların Demografik Verileri Bakımından Tanımlayıcı İstatistikleri Gruplar Arası Karşılaştırmalar

Demografik Değişkenler	Ortalama (SS) veya Ortanca (Min-Max)	Shapiro-Wilk Normalite Testi	İstatistiksel analiz
Yaş (yıl)			
OSB (n=16)	4,00 (3,00-6,00)	W= 0,812 P=0,004	U=195 P=0,028 [¥]
Kontrol (n=17)	5,00 (3,00-6,00)	W= 0,881 P=0,033	
Doğum Boyu (cm)			
OSB (n=6)	50,50 (2,74)	0,897 P=0,357	T(8)= -0,506 P=0,627 ^a
Kontrol (n=4)	49,75 (1,26)	0,895 P=0,406	
Doğum Kilosu (kg)			
OSB (n=16)	3,22 (0,52)	0,957 P= 0,603	T(25)=0,767 P=0,45 ^a
Kontrol (n=11)	3,38 (0,49)	0,949 P= 0,636	
Yürüme zamanı (ay)			
OSB (n=15)	12 (8-20)	0,914 P= 0,026	U=63,5 P= 0,528 [¥]
Kontrol (n=10)	13 (2,26)	0,918 P= 0,338	
Konuşma yaşı (ay)			
OSB (n=10)	16 (6,18)	0,939 P=0,544	U=39 P=0,419 [¥]
Kontrol (n=10)	14 (4,3)	0,821 P=0,026	
^a Student-T test [¥] Mann-Whitney U test			

Ailede (anne, baba ve varsa kardeşlerde) tıbbi herhangi bir hastalık öyküsü sıklığı OSB ve kontrol gruplarında hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır (Fisher-exact Testi, $p \leq 0,005$). Anne, baba, kardeş ve ailedeki tıbbi durum bakımından OSB ve Kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır. Psikiyatrik öykü sıklığı durum açısından da OSB ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (Fisher-exact Testi, $P > 0,05$) (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2’de görüldüğü üzere gebelikte stres maruziyeti, doğum şekli, doğum komplikasyonu ve zor doğum bakımından OSB ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görülmemiştir (Fisher-exact Testi, $P>0,05$).

Çizelge 3.2. Demografik verilerin Frekans değerleri ve gruplar arası İstatistiksel analizleri

N (%)	OSB	Kontrol	İstatistiksel karşılaştırma
Cinsiyet (n=33)			
Kız	4 (25)	7 (41,18)	$\chi^2(1)= 0,971^{\ddagger}$ P= 0,325
Erkek	12 (75)	10 (58,82)	
Tıbbi Durum			
Anne (n=30) Var Yok	4 (25) 12(75)	1 (7,14) 13 (92,86)	P=0,336 ^b
Baba (n=30) Var Yok	0 16 (100)	3 (21,43) 11 (78,57)	P=0,090 ^b
Kardeş (n=21) Var Yok	1 (7,69) 12 (92,31)	1 (12,5) 7 (87,5)	P=1,00 ^b
Aile (n=30) Var Yok	1 (6,25) 15 (93,75)	3 (21,43) 11 (78,57)	P=0,315 ^b
Psikiyatrik durum			
Anne (n=27) Var Yok	2 (12,5) 14 (87,5)	1 (9,09) 10 (90,91)	P=1,00 ^b
Baba (n=27) Var Yok	0 16 (100)	1 (9,09) 10 (90,91)	P=0,407 ^b
Kardeş (n=20) Var Yok	2 (15,38) 11 (84,62)	1 (14,28) 6 (85,72)	P=1,00 ^b

Çizelge 3.2. Devam

N (%)	OSB	Kontrol	İstatistiksel karşılaştırma
Aile (n=27)			P=0,618 ^b
Var	4 (25)	1 (9,09)	
Yok	12 (75)	10 (90,91)	
Gebelikte stresör (n=26)			
Var	5 (31,25)	3 (30)	P=1,000 ^b
Yok	11 (68,75)	7 (70)	
Doğum şekli (n=29)			
Normal	8 (50)	3 (23,08)	P=0,249 ^b
Sezaryan	8 (50)	10 (76,92)	
Doğum komplikasyonu (n=26)			
Var	3 (18,75)	4 (40)	P= 0,369 ^b
Yok	13 (81,25)	6 (60)	
Zor Doğum (n=25)			
Var	3 (18,75)	1 (11,11)	P=1,000 ^b
Yok	13 (81,25)	8 (88,89)	
† Ki Kare testi ^b Fisher Exact testi			

3.2. OSB Grubunun Klinik Özellikleri

Çizelge 3.3'te görüldüğü üzere OSB grubunun ÇODÖ ortalama puanı 58,25±26,54, OKDL toplam ortalama puanı 39,43±4,22, TEDÖ-R-TV toplam puan ortalaması 23,00 (18,89)'tür. Ayrıca, OSB belirti başlangıç yaşı 2,37±0,69, hastaneye ilk başvuru yaşı 3,10±0,87 ve tanı yaşı 3,17±0,84 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. OSB grubunda klinik özelliklere ait tanımlayıcı istatistikler ve normalite test sonuçları

	Ortalama (SS) veya Ortanca (min-maks)	Shapiro-Wilk Normalite Testi
<i>ÇODÖ toplam puanı (n=12)</i>	58,25 (26,54)	0,925 P= 0,331
<i>ODKL toplam puanı (n=15)</i>	39,43 (4,22)	0,965 P=0,779
<i>TEDÖ-R-TV toplam puanı (n=13)</i>	15 (7-57)	0,792 P=0,005
<i>Belirti başlangıç yaşı (yıl) (n=15)</i>	2,37 (0,69)	0,943 P=0,420
<i>İlk başvuru yaşı (yıl) (n=15)</i>	3,1 (0,87)	0,914 0,518
<i>Tanı yaşı (yıl) (n=15)</i>	3,17 (0,84)	0,910 P= 0,136

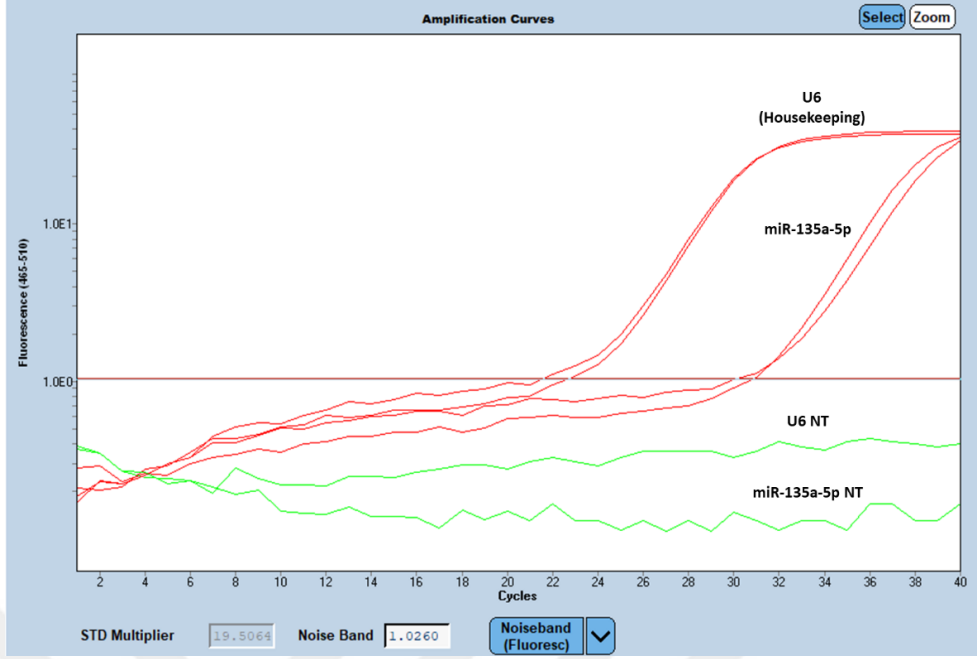
Çizelge 3.4'te gösterildiği üzere OSB tanısı alan çocukların (n=16) 6'sında (37,6) hafif-orta düzeyde, 10'unda (62,5) ağır düzeyde OSB bulunmaktadır. Çocuklarda (n=10) ilk fark edilen belirtilerden 4'ü (40) konuşma gecikmesi, 1'i (10) göz teması kuramama, 4'ü (40) isme tepki vermeme ve 1'i (10) tekrarlayıcı hareketler olmuştur. OSB teşhisi alan çocuklardan (n=15) 11'inde (66,7) gelişimsel gecikme görülmüştür.

Çizelge 3.4. OSB grubu klinik verilerinin Frekans ve Shapiro-Wilk Normalite testi değerleri

	Frekans N (%)	Shapiro-Wilk normalite testi
ilk fark edilen belirti (n=10)		
konuşma gecikmesi	4 (40)	0,825 P=0,029
göz teması kuramama	1 (10)	
isme bakmama	4 (40)	
tekrarlayıcı hareketler	1 (10)	
gelişimsel gecikme (n=15)		
Var	11 (73,3)	0,561 P= 0,001
yok	4 (26,7)	
OSB düzeyi (n=16)		
Hafif-orta	6 (37,5)	0,621 P= 0,002
ağır	10 (62,5)	

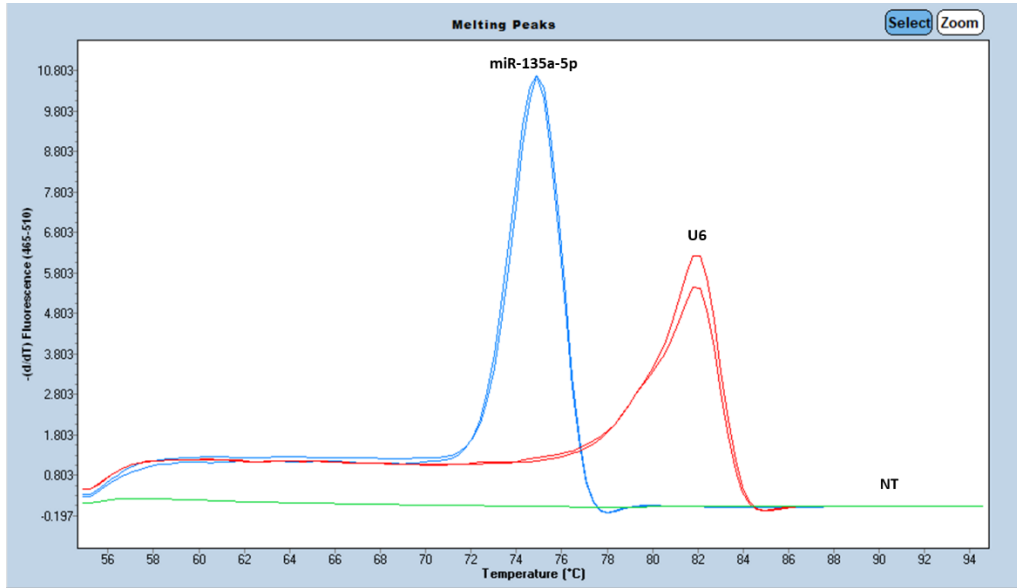
3.3. miRNA İfade Düzeyi

miR-135a-5p ve U6 genlerine ait qRT-PCR tepkimesine ait temsili amplifikasyon eğrileri Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. miR-153a-5p ve U6 genlerinin ifadenme düzeyini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bu genlerin RT-PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyal izlenmektedir.

Hedef genlerin ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ışımının hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) grafiği Şekil 3.2’de gösterilmiştir

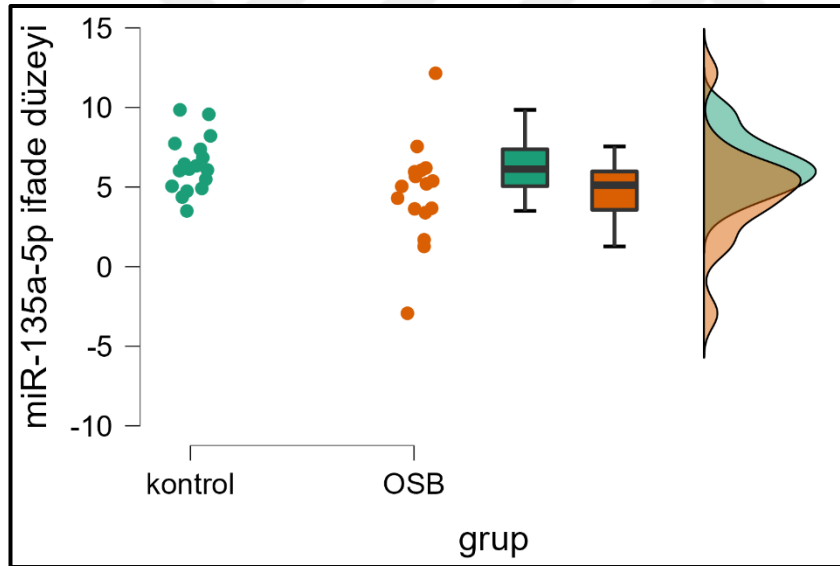


Şekil 3.2. OSB ve sağlıklı kontrol örneklerinde miR-135a-5p ve U6 genlerine ait erime eğrileri. Bu genlerin Erime eğrisi analiz grafiğinde sıcaklık dereceleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksen ise floresan sinyal yer almaktadır.

Çizelge 3.5'te görüldüğü gibi OSB grubunda ortalama miR-135a-5p ifade düzeyi $4,64 \pm 3,20$, kontrol grubunda ortalama ifade düzeyi $6,39 \pm 1,74$ olarak bulunmuştur. İki grup arasında miRNA ifade seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiş ($t(31)=1,968$ $p=0,058$) (Şekil 3.3) olmakla birlikte OSB grubunda kontrole göre azalmış miR-135a-5p ifadesi dikkat çekmiştir.

Çizelge 3.5. miR-135a-5p ifade seviyelerinin OSB ve kontrol gruplarında değerlendirilmesi

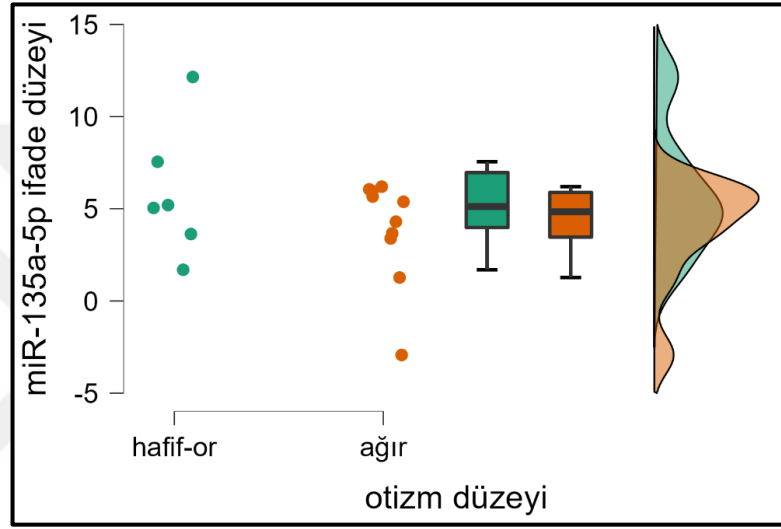
miR-135a-5p ifade düzeyi	Ortalama (SS)	Shapiro-Wilk Testi	İstatistiksel karşılaştırma
OSB grubu (n=16)	4,64 (3,20)	0,926 P= 0,214	T(31)=1,968 P=0,058
Kontrol grubu (n=17)	6,39 (1,74)	0,963 P= 0,685	



Şekil 3.3. OSB ve Kontrol gruplarında miR-135a-5p ifade düzeyi dağılım grafiği

3.4. miR-135a-5p ifade düzeylerinin sosyodemografik ve klinik verilerle ilişkisi

Çalışmamızda hafif-orta düzeyde OSB’li olan grupta (n=6) miR-135a-5p ortalama ifade düzeyi $5,88 \pm 3,63$, ağır OSB’li olan grupta (n=10) ortalama ifade düzeyi $3,90 \pm 2,86$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). OSB düzeyine göre miR-135a-5p seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır (U=35, p=0,635).



Şekil 3.4. OSB düzey grupları ile miR-135a-5p ifade düzeyi dağılımı arasındaki ilişki grafiği

Çizelge 3.6. Klinik ve Sosyodemografik verilere göre miR-135a-5p ifade düzeyi değerlendirme tablosu

	<i>miR-135a-5p ifade düzeyi</i> Ortalama (SS)	Shapiro-Wilk Normalite Testi	İstatistiksel karşılaştırma
<i>OSB düzeyi</i>			
<i>Hafif-orta (n=6)</i>	5,88 (3,63)	W= 0,993 P= 0,603	U= 35 P= 0,635 [‡]
<i>Ağır (n=10)</i>	3,90 (2,86)	W= 0,796 P= 0,013	
‡Mann-Whitney U testi			

Çizelge 3.7’de görüldüğü gibi, OSB grubunda uygulanmış olan klinik ölçekler ile miR-135a-5p ifade düzeyi arasındaki ilişki analiz edildiğinde, miR-135a-5p ifade düzeyleri ile ODKL toplam puanı, TEDÖ-R-TV toplam puanı ve ÇODÖ toplam puanı arasında korelasyon bulunmamakla beraber, ODKL ölçeği alt

başlıklarından Sosyal Beceri ve Öz Bakım ile miR-135a-5p ifade düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($r=0,686$, $p=0,014$). Diğer ODKL alt başlıkları ile miRNA ifade düzeyi arasında anlamlı istatistiksel korelasyon tespit edilmemiştir. Yine Çizelge 3.7’de görüleceği üzere doğum boyu, doğum kilosu, yürüme zamanı, ilk konuşma yaşı ile bu gruplardaki miR-135a-5p ifade düzeyi arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.7. Klinik ölçek ve veriler ile miR-135a-5p ifade düzeyleri arasında korelasyon değerlendirme tablosu

	<i>miR-135a-5p ifade düzeyi (Spearman Korelasyon)</i>	
	r	p
ÇODÖ toplam puanı	-0,115	0,684
ODKL toplam puanı	0,315	0,319
<i>ODKL duyusal</i>	0,306	0,334
<i>ODKL ilişki kurma</i>	0,424	0,170
<i>ODKL beden ve nesne kullanımı</i>	-0,158	0,624
<i>ODKL sosyal beceri ve öz bakım</i>	0,686	0,014
<i>ODKL dil becerileri</i>	0,084	0,795
TEDÖ toplam puanı	-0,074	0,809
Doğum boyu (cm)	0,130	0,684
Doğum kilosu (kg)	0,001	0,998
Yürüme zamanı (ay)	-0,098	0,641
Konuşma yaşı (ay)	-0,088	0,712
ÇODÖ: Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği; ODKL: Otistik Davranışları Kontrol Listesi; TEDÖ-R-TV: Tekrarlayıcı Davranışlar Ölçeği-Revize-Türkçe Versiyonu		

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında öncelikli hedefimiz biyoenformatik analizlerle aday olarak belirlediğimiz miR-135a-5p ifadesinin OSB’li hasta ve sağlıklı kontrollerde farklı olup olmadığını test etmektir. Bu amaçla gönüllülerden plazma örnekleri elde edildi ve miR-135a-5p ifadesi qRT-PCR ile analiz edildi. Çalışmamızın bir diğer hedefi ise miR-135a-5p ifadesinin sosyodemografik ve OSB’nin klinik özellikleri ile ilişkisini değerlendirmektir. Sonuçlarımız miR-135a-5p ifade seviyesinin istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamış olmakla birlikte sağlıklı kontrollere kıyasla OSB grubunda azaldığını gösterdi.

OSB’de miRNA’ların rolünü değerlendirilen çalışmalarda farklı biyolojik örneklerin kullanıldığı göze çarpmaktadır. miRNA’lar tükürük, kan, idrar, beyin omurilik sıvısı gibi pek çok biyolojik sıvıda tespit edilebilmektedir (Gareev ve ark., 2020). Dolaşıma salınan miRNA’ların özellikle hasara uğramış hücrelerde ve ekstraselüler veziküllerde görülebildiği belirtilmektedir (Yuan ve ark., 2016). OSB’li bireylerde fiziksel temasın kişilerde rahatsızlık yaratabilme durumu ve dokusal hassasiyet nedeni (A. P. Association, 2013) ile tükürük alımının daha kolay olduğu ve kan alımının alım aşamasında sorun yaratabileceği bildirilmiştir (Wren ve ark., 2015). Söz konusu dezavantajlarına rağmen, bu tez çalışmasında OSB’de daha kapsamlı gen ve protein analizlerini olanaklı kılması bakımından plazma örnekleri tercih edilmiştir.

Plazma/serum örneklerinin kullanıldığı önceki çalışmalarda özellikle hemoliz durumunun oluşmasının miRNA profilini etkileyebildiği rapor edilmiştir (Kirschner ve ark., 2011). Kan alımı sırasında dikkat edilmesi gerekenlerin yanı sıra kanın alınmasından kanın işlenmesine kadar geçen sürenin de hemoliz oluşmasına neden olabildiği bildirilmiştir (Poel ve ark., 2018). Bu nedenle çalışmamız esnasında literatürde önerilen maksimum 4 saat içerisinde plazma ayırma işleminin yapılmasına özen gösterilmiş ve hemolizli örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Bu durum örnek sayımızın görece az olmasına neden olmuştur.

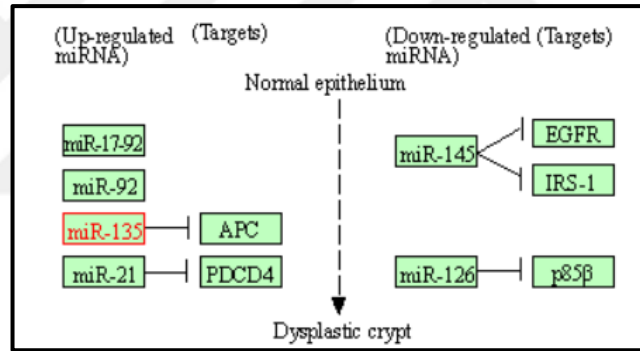
Yaptığımız literatür araştırmasında insanda mir-135a-5p ve OSB ilişkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma karşımıza çıkmamıştır. Aday olarak belirlediğimiz miR-135a-5p'nin OSB'deki rolünün insan örneklerinde ilk defa değerlendirilmiş olması çalışmamızın özgün yönünü oluşturmaktadır.

Çalışmamızda yeterli örneklem büyüklüğüne ulaşamamasının önemli bir kısıtlılık olduğunu düşünmekteyiz. Yaptığımız analizler sonucunda OSB ve kontrol grubu arasında miR-135a-5p ifade düzeyi arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı ($p=0,058$) bulunamamıştır. Daha büyük örneklem grubunda yapılacak olan ileri çalışmalarda bu farkın anlamlılık seviyesine ulaşabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, miR-135a-5p ifade düzeyinin OSB grubunda kontrol grubuna göre görece olarak daha düşük olduğu dağılım grafiğinden görülebilmektedir. İlave olarak, miR-135a-5p ifade seviyesi ve OSB belirti şiddeti arasındaki ilişkiyi analiz ettiğimiz sonuçlarımızdan yola çıkarak hafif-orta düzey OSB'den ağır düzey OSB'ye doğru miR-135a-5p ifadesinde anlamlı olmasa da azalma eğilimi olduğu söylenebilir.

Daha önce belirttiğimiz üzere, literatürde insanda miR-135a-5p ifade seviyesi ile OSB arasındaki ilişkinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, farelerde yapılmış olan stresle ilişkili bir çalışmada sinaptik vezikül füzyon proteinleri olan kompleksin-1 ve kompleksin-2'nin artan miktarlarının miR135a-5p'nin azalmış ifadesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mannironi ve ark., 2018). İnsanda major depresyon hastalarında yapılmış bir çalışmada da miR-135a-5p ifadesinin normal bireylere kıyasla depresif hasta serumun örneklerinde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Gheysarzadeh ve ark., 2018). “The Human Genes Database Genecards” veri tabanında (www.genecards.org), Malacards (Stelzer ve ark., 2016) üzerinden gerçekleştirdiğimiz ön analizlerimizde, miR-135a-5p ile ilişkilendirilen bozukluklardan birinin “sinir sistemi hastalığı” olduğu görülmüştür (disease ontology ID: DOID:863). Bu hastalığın otofaji mekanizması ve Frajil-X ile benzer yolakları paylaştığı bildirilmiştir. Aynı zamanda en ilişkili olduğu patolojiler arasında 3. sırada 31,9 puanlık skor ile OSB gösterilmektedir (Stelzer ve ark., 2016). Bununla birlikte, kodlamayan RNA dizi veri tabanı “RNA central.release 20” veritabanında (Petrov ve ark., 2017) ve “GWAS Catalog”da (www.ebi.ac.uk/gwas) (MacArthur ve ark., 2017)

öne çıkan çalışmalarda insanda OSB'li kişilerde gerçekleştirilen GWAS çalışmalarında kuvvetli bir aday olarak öne çıkan genomik bölgelerden birinin miR-135a-5p ifadesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Yine yapılan GWAS çalışmaları sonucunda “The Human Genes Database Genecards” veri tabanında bu miRNA ile ilişkili olarak “Otizm Spektrum Bozukluğu”nun öne çıktığı görülmüştür (Stelzer ve ark., 2016)

miR-135a-5p için “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) veritabanında (www.genome.jp/kegg) gerçekleştirdiğimiz yolak analizlerinde “kanserde miRNA’lar” (hsa05206) yolağı öne çıkmıştır. Bu geniş yolak üzerinde miR-135a-5p’nin, kanser örneklerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının önemli tümör baskılayıcı genlerinden olan APC genini baskıladığı gösterilmiştir (Ogata ve ark., 1999) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. KEGG analizinde öne çıkan “Kanserde miRNA’lar” (hsa05206) yolağında miR-135’in rolü (Ogata ve ark., 1999)

APC geninden kodlanan adenomatöz polipoz koli proteini (Hankey ve ark., 2018) β -katenin konsantrasyonunu regüle eder ve e-kaderin ile etkileşime girerek hücre adezyonuna etki eder (Markowitz ve Bertagnolli, 2009). Daha önceleri kanserle kuvvetle ilişkili olarak öne çıkan APC son zamanlarda nörogelişimsel beyin bozuklukları için bir risk geni olarak tanımlanmıştır. Örneğin, APC yıkıcı mutasyonları olan, de novo veya kalıtsal delesyona bağlı heterozigot bireylerin, şiddetliden hafife kadar değişen entelektüel yetersizlik sergiledikleri rapor edilmiştir (Hodgson ve ark., 1993; Raedle ve ark., 2001). APC heterozigot delesyonları ve polimorfizmleri de OSB ile ilişkili olarak bildirilmiştir (Barber ve ark., 1994; Zhou ve ark., 2007). İlave olarak APC mutasyonu sonucu multisendromik nörogelişimsel

hastalık meydana geldiği ve OSB-benzeri davranışlarla ilişkili olduğu ifade edilmekte ve olası etki mekanizma olarak sinaptik iletim üzerinden biliş ve davranışı etkileyebileceği ileri sürülmektedir (Mohn ve ark., 2014).

APC ile birlikte, kanser biyolojisinde önemli olduğu bilinen PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolağı aynı zamanda OSB’de gerçekleştirilen biyoenformatik yolak zenginleştirme analizlerinde öne çıkan yolaklardan birisidir (Wen ve Herbert, 2017). miR-135a-5p’nin de bu yolak üzerinden akciğer kanserinde apoptozu indükleyerek invazyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Cao ve ark., 2020) Ayrıca PTEN veya PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını inhibe eden kemoterapötik ajanların OSB’deki bazı semptomların tedavisinde etkisi olabileceği bildirilmiştir (Kilincaslan ve ark., 2017). Tezin giriş

bölümünde belirtildiği gibi literatürde OSB’de artmış kanser insidansını bildiren ve ortak yolaklara dikkat çeken çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Fores-Martos ve ark. (2019) tarafından yapılan bir transkriptomik meta-analiz çalışmasında, prefrontal kortekste ifade bulan genlerin ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında 22 kanser tipi ile gen, yolak ve ilaç bazlı eşleşmeler saptanmıştır (Forés-Martos ve ark., 2019). Buradan hareketle, böbrek, tiroid ve pankreas kanserlerinin OSB ile doğrudan komorbidite gösterebileceği belirtilmiştir. Kao ve ark. (2010) tarafından yapılan bir keşifsel korelasyon çalışmasında da OSB ile meme kanseri insidansı arasında yüksek korelasyon ($p \leq 0,001$) saptanmıştır (Kao ve ark., 2010).

miR-135a-5p’nin Wnt/ β -katenin ve PI3K/AKT/mTOR yolağı aracılığı ile kanserle ilişkili olmasının yanında, bu yolakların aynı zamanda nörogelişimsel ve nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkili olduğu yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017) . İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü olarak bilinen EIF4E proteinin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Bu proteinin translasyonunun baskılanması aracılığıyla kanser proliferasyonu ve sinaptik plastisite gibi çeşitli fizyolojik mekanizmaların etkilendiği saptanmıştır (Borrie ve ark., 2017). Waltes ve ark. (2014) tarafından insan deneklerinde gerçekleştirilen çalışmada *EIF4E* gen varyantlarının OSB ilişkili davranış bozukluklarıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Walters ve ark., 2014).

Başka bir çalışmada ise Lugo ve ark. (2014), nakavt farelerde PI3K/AKT/mTOR yolağı baskılayıcılarından olan fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) delesyonunu incelemiştir. PTEN delesyonunun sosyal davranış ve aktiviteler ile tekrarlayan davranış ve kaygıda uzun süreli değişimlere neden olduğunu saptamışlardır. Ek olarak, PTEN delesyonunun, PI3K/AKT/mTOR yolağında rol alan metabotropik glutamat reseptör (mGluR) sinyal mekanizmasını ve hipokampustaki pek çok sinaptik proteinin işlevini etkilediği de belirtilmiştir (Lugo ve ark., 2014).

Merkezi sinir sisteminin en önemli nörotransmitterlerinden biri olan serotonin (5-HT) sıcaklık regülasyonu, uyku, ağrı iletimi, sirkadiyen ritim gibi pek çok fonksiyona katılan ve çeşitli davranış biçimlerinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda büyüme faktörü olarak işlev gören serotonin büyüme konisi motilitesini, aksonal büyümeyi, sinaptogenezi, sinaptik plastisiteyi ve çoklu nöronal alt tiplerin gelişimini düzenlemektedir (Sodhi ve Sanders-Bush, 2004). OSB’de serotoninde meydana gelen işlev bozukluğu nedeniyle beyin büyümesinin etkilendiği düşünülmektedir. OSB’de tanımlanan ilk biyobelirteçlerden sayılan yüksek tam kan serotonin (5-HT) düzeyinin OSB’li bireylerin yaklaşık %25’inde bulunduğu görülmüştür (Muller ve ark., 2016). Özellikle erkek bireylerde serotonin taşıyıcı (SERT) geninde meydana gelen bazı düzensizlikler kandaki serotonin düzeyini etkilemektedir (Weiss ve ark., 2005). Bunun yanı sıra, fonksiyonel *SERT* geni olan *SLC6A4* geninin promotör bölgesinde meydana gelen biallelik polimorfizmde, kısa allelden kaynaklı meydana gelen düşük SERT ifadesi Wassink ve arkadaşlarının yaptıkları (2007) nörogörüntüleme çalışmasında serebral kortekste gri cevher hacminin artması ile ilişkilendirilmiştir (Wassink ve ark., 2007). Nadir SERT Ala56 varyantı olan *SLC6A4*, duyuusal isteksizlik ile ilişkilendirilmiştir (Sutcliffe ve ark., 2005). Ayrıca OSB’de yaygın olarak görülen dokunmaya karşı aşırı hassasiyet davranışının nörogelişim sırasında artan *SLC6A4* geni ifadesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Bu durumun *SERT*’in nörogelişimsel evredeki rolü ile bağlantılı olabileceği vurgulanmaktadır (Muller ve ark., 2016). *SERT* aynı zamanda anksiyete, depresyon, obsesif-kompulsif bozukluk gibi durumlara karşı kullanılan serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI) etki mekanizmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Vaswani ve ark., 2003). Ayrıca, erken çocukluk döneminde maruz kalınan stresin neden olduğu

depresyon ve diğer nöropsikiyatrik semptomların SERT genindeki bazı varyasyonlarla daha ılımlı hale gelebildiği bildirilmiştir (Caspi ve ark., 2003).

Literatürdeki OSB ile serotonin arasındaki ilişkiyi bildirilen çalışmaların yanı sıra miR-135a-5p ile serotonin ilişkisini içeren bazı çalışmalar da mevcuttur. Yapılan çalışmalarda depresyon hastalarının kan ve beyin dokularında daha düşük miR-135a-5p seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu hastalarında uygulanan uzun süreli SSRI tedavisi ile kandaki miR-135a-5p seviyelerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir (Dunlop ve ark., 2012). Ayrıca, yapılan ön çalışmalarda Targetscan ve MiRanda veri tabanı analizlerinde *SLC6A4*'nın 3' ucunu hedefleyen miR-135a-5p öne çıkan miRNA'lar arasındadır. Issler ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmada ise miR-135a-5p'nin de aralarında bulunduğu farklı mir-135 varyantları için bu bulgu yüksek bir oranda doğrulanmıştır. Tüm bu çalışmalar ışığında miR-135a-5p'nin hedeflediği serotonin ilişkili genler aracılığıyla OSB etiyopatolojisine katkı sağlayabileceği yorumu yapılabilir (Issler ve ark., 2014).

miR-135a-5p hedeflerini anlamaya yönelik yaptığımız tüm bu literatür ve veri bankaları araştırmaları sonucunda karşımıza çıkan yollar ve bunların ilişkili olduğu patolojiler miR-135a-5p'nin OSB için olası bir aday molekül olabileceği görüşünü desteklemiştir. Örneklem büyüklüğünün artması ile elde edilen sonuçlarımızın daha yüksek istatistiksel güç oranı ile doğrulanması ve ilave olarak hangi yolak/yolların bu süreçte rol oynadığını anlayabilmek için miR-135a-5p'nin hedefi olan transkriptler üzerinden işlevsel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, yaptığımız biyoenformatik analizlerle aday olarak belirlediğimiz miR-135a-5p'nin OSB'deki olası rolünü aydınlatmak üzere semptomatik olmayan, 2-6 yaş arasında ve ilk defa OSB tanısı konulmuş hasta ve bunlarla yaş bakımından eşleşen sağlıklı kontrol grubunda plazma kaynaklı miR-135a-5p ifade seviyesi araştırılmıştır. İlave olarak, miR-135a-5p ifade seviyesinin sosyodemografik ve klinik parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.

İstatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmamış olmakla birlikte, kontrol grubuna kıyasla OSB'de azalmış miR-135a-5p ifade seviyesi gözlemlenmiştir. Yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte otizm şiddeti ile birlikte azalan miR-135a-5p seviyesi dikkat çekmiştir.

miR-135a-5p'nin özellikle kanser ve serotonerjik sistem ile ilişkisini destekleyen literatür ve biyoenformatik analiz bulguları bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarımızla birlikte değerlendirildiğinde, miR-135a-5p'nin OSB etyolojisinde aday molekül olarak daha ileri çalışmalara değer bir molekül olduğunu düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlarımızın denek sayısının artırılarak doğrulanması ve ilave olarak hangi yolak/yolakların bu süreçte rol oynadığını anlayabilmek miR-135a-5p'nin hedefi transkriptler üzerinden işlevsel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Otizm Spektrum Bozukluğunda miR-135a-5p'nin İfade Değişikliğinin İncelenmesi

Otizm spektrum bozukluğu (OSB) erken çocukluk döneminde (2-6 yaş) belirtileri ortaya çıkan bir nörogelişimsel bozukluktur. Dünya üzerinde nüfusun %1-2'sini etkileyen önemli bir sağlık problemidir. Prevalansı, 30 yıl öncesinde 4.4/10000 olarak bildirilirken günümüzde görülme sıklığındaki hızlı artış, OSB'nin nedenlerini anlamaya yönelik çalışmaların artmasını gerekli kılmıştır. Etiyolojisinde genetik ve çevresel faktörler rol oynamakla beraber, genetik çalışmalarda gözlemlenen kalıtlabilirlik boşluğu epigenetik mekanizmaların önemine işaret etmektedir. Epigenetik mekanizmalar arasında yer alan mikroRNA'lar (miRNA), mRNA'lar üzerinde post-transkripsiyonel olarak gen ifadenmesini düzenleyerek hücredeki bölünme, çoğalma, farklılaşma gibi fizyolojik işlevleri etki etmektedir.

Bu tez çalışmasında daha önceden gerçekleştirdiğimiz biyoenformatik analizler ile aday olarak belirlediğimiz miR-135a-5p'nin OSB'deki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 16 OSB'li ve 17 normal gelişim gösteren sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 33 çocuk dahil edilmiştir. Plazma örneklerinde miR-135a-5p seviyesi qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmamış olmakla birlikte miR-135a-5p ifadesinin kontrol grubuna kıyasla OSB grubunda azalmış olduğunu göstermiştir. OSB şiddeti bakımından hafif+orta ve ağır OSB gruplarının miR-135a-5p seviyesinin benzer olduğu bulunmuştur. OSB grubunda klinik özellikler ile miR-135a-5p ifade düzeyi arasındaki ilişki analiz edildiğinde, miR-135a-5p ifade düzeyleri ile ODKL toplam puanı, TEDÖ-R-TV toplam puanı ve ÇODÖ toplam puanı arasında korelasyon bulunmamakla beraber, ODKL ölçeği alt başlıklarından Sosyal Beceri ve Öz Bakım ile miR-135a-5p ifade düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

miR-135a-5p'nin özellikle kanser ve serotonerjik sistem ile ilişkisini destekleyen literatür ve biyoenformatik analiz bulguları bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarımızla birlikte değerlendirildiğinde, miR-135a-5p'nin OSB etyolojisinde aday molekül olarak daha ileri çalışmalara değer bir molekül olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlarımızın denek sayısının artırılarak doğrulanması ve ilave olarak hangi yolak/yolakların bu süreçte rol oynadığını anlayabilmek miR-135a-5p'nin hedefi transkriptler üzerinden işlevsel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: otizm spektrum bozukluğu, epigenetik, mikroRNA, miR-135a-5p

SUMMARY

Investigation of Expression Change of miR-135a-5p in Autism Spectrum Disorder

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that appears in early childhood (2-6 years). It is an important health problem affecting 1-2% of the population in the world. While its prevalence was reported as 4.4/10000 30 years ago, the rapid increase in its incidence today necessitated more studies to understand the causes of ASD. Although genetic and environmental factors play a role in its etiology, the heritability gap observed in genetic studies points to the importance of epigenetic mechanisms. MicroRNAs (miRNAs), which are among the epigenetic mechanisms, affect physiological functions such as division, proliferation and differentiation in the cell by regulating post-transcriptional gene expression on mRNAs.

In this thesis, it was aimed to investigate the possible role of miR-135a-5p in ASD, which we determined as a candidate with the bioinformatics analyzes we performed before. A total of 33 children, 16 with ASD and 17 with normal development, were included in the study. The level of miR-135a-5p in plasma samples was determined by qRT-PCR method.

Our results showed that miR-135a-5p expression was decreased in the ASD group compared to the control group, although it did not reach the level of statistical significance. In terms of ASD severity, miR-135a-5p levels were found to be similar in mild+moderate and severe ASD groups. When the relationship between clinical features and miR-135a-5p expression level in the ASD group was analyzed, there was no correlation between miR-135a-5p expression levels and ABC total score, RBS-R-TV total score, and CARS total score. A significant positive correlation was found between ABC Social Skills and Self-Care section and miR-135a-5p expression level.

When the literature and bioinformatics analysis findings supporting the relationship of miR-135a-5p especially with cancer and the serotonergic system are evaluated together with our results obtained in this thesis study, it makes us think that miR-135a-5p is a molecule worthy of further studies as a candidate molecule in the etiology of ASD. It is necessary to carry out functional studies on the target transcripts of miR-135a-5p to confirm our results by increasing the number of subjects and to understand which pathway(s) play a role in this process.

Keywords: autism spectrum disorder, epigenetics, microRNA, mir-135a-5p

KAYNAKLAR

- A. P. ASSOCIATION (2013). Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders Dsm-5. *American Psychiatric Association Publishing*.
- ABU ELNEEL K, LIU T, GAZZANIGA FS, NISHIMURA Y, WALL DP, GESCHWIND DH, LAO K, KOSIK KS (2008). Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics*, **9**: 153–161.
- ADLAKHA YK, SAINI N (2014). Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Mol. Cancer.*, **21**:13-33
- ALLES J, FEHLMANN T, FISCHER U, BACKES C, GALATA V, MINET M, HART M, ABU-HALIMA M, GRÄSSER FA, LENHOF HP, KELLER A, MEESE E (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* **47(7)**:3353-3364.
- AREF-ESHGHI E, RODENHISER DI, SCHENKEL LC, LIN H, SKINNER C, AINSWORTH P, PARÉ G, HOOD RL, BULMAN DE, KERNOHAN KD, CARE4RARE CANADA CONSORTIUM, BOYCOTT KM, CAMPEAU PM, SCHWARTZ C, SADIKOVIC B (2018). Genomic DNA Methylation Signatures Enable Concurrent Diagnosis and Clinical Genetic Variant Classification in Neurodevelopmental Syndromes. *American journal of human genetics*, **102(1)**: 156–174.
- AREF-ESHGHI E, KERKHOF J, PEDRO VP, GROUPE DI FRANCE, BARAT-HOUARI M, RUIZ-PALLARES N, ANDRAU JC, LACOMBE D, VAN-GILS J, FERGELOT P, DUBOURG C, CORMIER-DAIRE V, RONDEAU S, LECOQUIERRE F, SAUGIER-VEBER P, NICOLAS G, LESCA G, CHATRON N, SANLAVILLE D, VITO BELLO A, SADIKOVIC B (2020). Evaluation of DNA Methylation Episignatures for Diagnosis and Phenotype Correlations in 42 Mendelian Neurodevelopmental Disorders. *American journal of human genetics*, **106(3)**: 356–370.
- BARBER J C, ELLIS K H, BOWLES LV, DELHANTY JD, EDE RF, MALE BM, ECCLES DM (1994). Adenomatous polyposis coli and a cytogenetic deletion of chromosome 5 resulting from a maternal intrachromosomal insertion. *Journal of medical genetics*, **31(4)**: 312–316.
- BAUER I, CREWETHER S, PIPINGAS A, SELICK L, CREWETHER D (2014). Does omega-3 fatty acid supplementation enhance neural efficiency? A review of the literature. *Hum. Psychopharmacol.*, **29(1)**: 8-18
- BORRIE SC, BREMS H, LEGIUS E, BAGNI C (2017). Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **18**: 115–142.
- BRAVO ORO A, NAVARRO-CALVILLO M E, ESMER C (2014). Autistic Behavior Checklist (ABC) and Its Applications. *Comprehensive Guide to Autism*, 2787–2798.
- BUTLER S, LORD C (2013). Autism Screening Instrument for Educational Planning (ASIEP-2), içinde: *ENCYCLOPEDIA of AUTISM SPECTRUM DISORDERS*. Springer, 359–361.
- CAO Z, QIU J, YANG G, LIU Y, LUO W, YOU L, ZHEN L, ZHANG T (2020). MiR-135a biogenesis and regulation in malignancy: a new hope for cancer research and therapy. *Cancer Biol. Med*, **17**: 569–582.
- CASPI A, SUGDEN K, MOFFIT TE, TAYLOR A, CRAIG IW, HARRINGTON HL, MCCLAY J, MILL J, MARTIN J, BRAITHWAITE A, POULTON R (2003). Influence of life stress on

- depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, **301**: 386–389.
- CASTRO K, KLEIN L DA S, BARONIO D, GOTTFRIED C, RIESGO R, PERRY IS (2016). Folic acid and autism: What do we know? *Nutr. Neurosci.*, **19**: 310–317.
- CHU YY, KO CY, WANG WJ, WANG SM, GEAN PW, KUO YM, WANG JM (2016). Astrocytic CCAAT/Enhancer Binding Protein δ Regulates Neuronal Viability and Spatial Learning Ability via miR-135a. *Mol. Neurobiol.*, **53**: 4173–4188.
- DA SILVA VACCARO T, SORRENTINO JM, SALVADOR S, VEIT T, SOUZA DO, DE ALMEIDA RF (2018). Alterations in the microRNA of the blood of autism spectrum disorder patients: Effects on epigenetic regulation and potential biomarkers. *Behav. Sci. (Basel)*, **8**: 75.
- DE RUBEIS S, HE X, GOLDBERG AP, POULTNEY CS, SAMOCHA K, CICEK AE, KOU Y, LIU L, FROMER M, WALKER S, SINGH T, KLEI L, KOSMICKI J, FU SC, ALEKSIC B, BISCALDI M, BOLTON PF, BROWNFELD JM, CAI J, CAMPBELL NG, CARRACEDO A, CHAHROUR MH, CHIOCCHETTI AG, COON H, CRAWFORD EL, CROOKS L, CURRAN SR, DAWSON G, DUKETIS E, FERNANDEZ BA, GALLAGHER L, GELLER E, GUTER SJ, HILL RS, IONITA-LAZA I, GONZALEZ PJ, KILPINEN H, KLAUCK SM, KOLEVZON A, LEE I, LEI J, LEHTIMÄKI T, LIN CF, MA'AYAN A, MARSHALL CR, MCINNES AL, NEALE B, OWEN MJ, OZAKI N, PARELLADA M, PARR JR, PURCELL S, PUURA K, RAJAGOPALAN D, REHNSTRÖM K, REICHENBERG A, SABO A, SACHSE M, SANDERS SJ, SCHAFER C, SCHULTE-RÜTHER M, SKUSE D, STEVENS C, SZATMARI P, TAMMIMIES K, VALLADARES O, VORAN A, WANG LS, WEISS LA, WILLSEY AJ, YU TW, YUEN RKC, COOK EH, FREITAG CM, GILL M, HULTMAN CM, LEHNER T, PALOTIE A, SCHELLENBERG GD, SKLAR P, STATE MW, SUTCLIFFE JS, WALSH CA, SCHERER SW, ZWICK ME, BARRETT JC, CUTLER DJ, ROEDER K, DEVLIN B, DALY MJ, BUXBAUM JD (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, **515**: 209–215.
- DELAHANTY KANG JQ, BRUNE CW, KISTNER EO, COURCHESNE E, COX NJ, COOK EH, MACDONALD RL, SUTCLIFFE JS (2011). Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. *Mol. Psychiatry*, **16**: 86–96.
- DEVLIN B, BOONE BE, LEVY SE, LIHM J, BUXBAUM JD, WU Y, LEWIS L, HAN Y, BOERWINKLE E, GIBBS RA, FROMER M, SHAKIR K, FENNELL T, GARIMELLA K, BANKS E, POPLIN R, GABRIEL S, DE PRISTO M, SUNYAEV S, DALY MJ (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. **485(7397)**: 242–245.
- DUNLOP BW, KELLEY ME, MLETZKO TC, VELASQUEZ CM, CRAIGHEAD WE, MAYBERG HS (2012). Depression beliefs, treatment preference, and outcomes in a randomized trial for major depressive disorder. *J. Psychiatr. Res.*, **46**: 375–381.
- EDBAUER D, NEILSON JR, FOSTER KA, WANG CF, SEEBURG DP, BATTERTON MN, TADA T, DOLAN BM, SHARP PA, SHENG M (2010). Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, **65**: 373–384.
- FABBRI M, CALIN GA (2010). Epigenetics and miRNAs in Human Cancer. *Adv. Genet.*, **70**: 87–99.
- FÉNELON K, MUKAI J, XU B, HSU PK, DREW LJ, KARAYIORGOU M, FISCHBACH GD, MACDERMOTT AB, GOGOS JA (2011). Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**: 4447–4452.
- FINEBERG SK, KOSIK KS, DAVIDSON BL (2009). MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron*, **64(3)**: 303–9.
- FORÉS-MARTOS J, CATALÁ-LÓPEZ F, SÁNCHEZ-VALLE J, IBÁÑEZ K, TEJERO H, PALMA-GUDIEL H, CLIMENT J, PANCALDI V, FAÑANÁS L, ARANGO C, PARELLADA M,

- BAUDOT A, VOGT D, RUBENSTEIN JL, VALENCIA A, TABARÉS-SEISDEDOS R (2019). Transcriptomic metaanalyses of autistic brains reveals shared gene expression and biological pathway abnormalities with cancer. *Mol. Autism*, **10**: 1–16.
- GAREEV I, BEYLERLI O, YANG G, SUN J, PAVLOV V, IZMAILOV A, SHI H, ZHAO S (2020). The current state of MiRNAs as biomarkers and therapeutic tools. *Clin. Exp. Med.* **20**(3): 349–359.
- GARFIN DG, MCCALLON D (1988). Validity and reliability of the Childhood Autism Rating Scale with autistic adolescents. *J. Autism Dev. Disord.*, **18**: 367–378.
- GARRIDO-TORRES N, GUZMÁN-TORRES K, GARCÍA-CERRO S, PINILLA BERMÚDEZ G, CRUZ-BAQUERO C, OCHOA H, GARCÍA-GONZÁLEZ D, CANAL-RIVERO M, CRESPO-FACORRO B, RUIZ-VEGUILLA M (2023). miRNAs as biomarkers of autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*.
- GAUGLER T, KLEI L, SANDERS SJ, BODEA CA, GOLDBERG AP, LEE AB, MAHAJAN M, MANAA D, PAWITAN Y, REICHERT J, RIPKE S, SANDIN S, SKLAR P, SVANTESSON O, REICHENBERG A, HULTMAN CM, DEVLIN B, ROEDER K, BUXBAUM JD (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat. Genet.*, **46**: 881–885.
- GHAZIUDDIN M, GHAZIUDDIN N, GREDEN J (2002). Depression in Persons with Autism: Implications for Research and Clinical Care. *J. Autism Dev. Disord.*, **32**(4): 299–306.
- GHEYSARZADEH A, SADEGHIFARD N, AFRAIDOONI L, POOYAN F, MOFID M, VALADBEIGI H, BAKHTIARI H, KEIKHAVANI S (2018). Serum-based microRNA biomarkers for major depression: MiR-16, miR-135a, and miR-1202. *J. Res. Med. Sci.*, **23**: 69.
- GILL PS, DWEEP H, ROSE S, WICKRAMASINGHE PJ, VYAS KK, MCCULLOUGH S, PORTER-GILL PA, FRYE RE (2022). Integrated microRNA–mRNA Expression Profiling Identifies Novel Targets and Networks Associated with Autism. *J. Pers. Med.*, **12**: 920.
- GRAFODATSKAYA D, CHUNG B, SZATMARI P, WEKSBERG R (2010). Autism spectrum disorders and epigenetics. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **49**(8):794–809.
- GROVE J, RIPKE S, ALS TD, MATTHEISEN M, WALTERS RK, WON H, PALLESEN J, AGERBO E, ANDREASSEN OA, ANNEY R, AWASHTI S, BELLIVEAU R, BETTELLA F, BUXBAUM JD, BYBJERG-GRAUHOLM J, BÆKVAD-HANSEN M, CERRATO F, CHAMBERT K, CHRISTENSEN JH, CHURCHHOUSE C, DELLENVALL K, DEMONTIS D, DE RUBEIS S, DEVLIN B, DJUROVIC S, DUMONT AL, GOLDSTEIN JI, HANSEN CS, HAUBERG ME, HOLLEGAARD M V, HOPE S, HOWRIGAN DP, HUANG H, HULTMAN CM, KLEI L, MALLER J, MARTIN J, MARTIN AR, MORAN JL, NYEGAARD M, NERLAND T, PALMER DS, PALOTIE A, PEDERSEN CB, PEDERSEN MG, DPOTERBA T, POULSEN JB, POURCAIN BS, QVIST P, REHNSTRÖM K, REICHENBERG A, REICHERT J, ROBINSON EB, ROEDER K, ROUSSOS P, SAEMUNDSEN E, SANDIN S, SATTERSTROM FK, DAVEY SMITH G, STEFANSSON H, STEINBERG S, STEVENS CR, SULLIVAN PF, TURLEY P, WALTERS GB, XU X, WRAY NR, TRZASKOWSKI M, BYRNE EM, ABDELLAOUI A, ADAMS MJ, AIR TM, ANDLAUER TFM, BACANU SA, BEEKMAN ATF, BIGDELI TB, BINDER EB, BLACKWOOD DHR, BRYOIS J, BUTTENSCHØN HN, CAI N, CASTELAO E, CLARKE TK, COLEMAN JRI, COLODRO-CONDE L, COUVY-DUCHESNE B, CRADDOCK N, CRAWFORD GE, DAVIES G, DEARY IJ, DEGENHARDT F, DERKS EM, DIREK N, DOLAN CV, DUNN EC, ELEY TC, ESCOTT-PRICE V, KIADEH FFH, FINUCANE HK, FORSTNER AJ, FRANK J, GASPAR HA, GILL M, GOES FS, GORDON SD, HALL LS, HANSEN TF, HERMS S, HICKIE IB, HOFFMANN P, HOMUTH G, HORN C, HOTTENGA JJ, ISING M, JANSEN R, JORGENSEN E, KNOWLES JA, KOHANE IS, KRAFT J, KRETZSCHMAR WW, KROGH J, KUTALIK Z, LI Y, LIND PA, MACINTYRE DJ, MACKINNON DF, MAIER RM, MAIER W, MARCHINI J, MBAREK H, MCGRATH P, MCGUFFIN P, MEDLAND SE, MEHTA D, MIDDELDORP CM, MIHAILOV E,

MILANESCHI Y, MILANI L, MONDIMORE FM, MONTGOMERY GW, MOSTAFAVI S, MULLINS N, NAUCK M, NG B, NIVARD MG, NYHOLT DR, O'REILLY PF, OSKARSSON H, OWEN MJ, PAINTER JN, PETERSON RE, PETTERSSON E, PEYROT WJ, PISTIS G, POSTHUMA D, QUIROZ JA, RICE JP, RILEY BP, RIVERA M, MIRZA SS, SCHOEVERS R, SCHULTE EC, SHEN L, SHI J, SHYN SI, SIGURDSSON E, SINNAMON GCB, SMIT JH, SMITH DJ, STREIT F, STROHMAIER J, TANSEY KE, TEISMANN H, TEUMER A, THOMPSON W, THOMSON PA, THORGEIRSSON TE, TRAYLOR M, TREUTLEIN J, TRUBETSKOY V, UITTERLINDEN AG, UMBRICH D, VAN DER AUWERA S, VAN HEMERT AM, VIKTORIN A, VISSCHER PM, WANG Y, WEBB BT, WEINSHEIMER SM, WELLMANN, J., WILLEMSSEN, G., WITT, S.H., WU, Y., XI, H.S., YANG, J., ZHANG, F., AROLT, V., BAUNE, B.T., BERGER, K., BOOMSMA, D.I., CICHON, S., DANNLOWSKI, U., DE GEUS, E.J.C., DEPAULO, J.R., DOMENICI, E., DOMSCHKE, K., ESKO, T., GRABE, H.J., HAMILTON, S.P., HAYWARD, C., HEATH, A.C., KENDLER, K.S., KLOIBER, S., LEWIS, G., LI, Q.S., LUCAE, S., MADDEN, P.A.F., MAGNUSSON, P.K., MARTIN, N.G., MCINTOSH, A.M., METSPALU, A., MÜLLER-MYHSOK, B., NÖTHEN, M.M., O'DONOVAN, M.C., PACIGA, S.A., PEDERSEN, N.L., PENNINX, B.W.J.H., PERLIS, R.H., PORTEOUS, D.J., POTASH, J.B., PREISIG, M., RIETSCHEL, M., SCHAEFER, C., SCHULZE, T.G., SMOLLER, J.W., TIEMEIER, H., UHER, R., VÖLZKE, H., WEISSMAN, M.M., LEWIS, C.M., LEVINSON, D.F., BREEN, G., AGEE, M., ALIPANAH, B., AUTON, A., BELL, R.K., BRYC, K., ELSON, S.L., FONTANILLAS, P., FURLOTTE, N.A., HROMATKA, B.S., HUBER, K.E., KLEINMAN, A., LITTELMAN, N.K., MCINTYRE, M.H., MOUNTAIN, J.L., NOBLIN, E.S., NORTHOVER, C.A.M., PITTS, S.J., SATHIRAPONGSASUTI, J.F., SAZONOVA, O. V., SHELTON, J.F., SHRINGARPURE, S., TUNG, J.Y., VACIC, V., WILSON, C.H., STEFANSSON, K., GESCHWIND, D.H., NORDENTOFT, M., HOUGAARD, D.M., WERGE, T., MORS, O., MORTENSEN, P.B., NEALE, B.M., DALY, M.J., BØRGLUM, A.D., 2019. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nat. Genet.*, **51**: 431–444.

HEYEN H, (2014). A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front. Genet.*, **5**: 113.
HICKS SD, MIDDLETON FA (2016). A comparative review of microRNA expression patterns in autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry*, **7**: 176.

HICKS SD, CARPENTER RL, WAGNER KE, PAULEY R, BARROS M, TIERNEY-AVES C, BARNES S, GREENE CD, MIDDLETON FA (2020). Saliva MicroRNA Differentiates Children With Autism From Peers With Typical and Atypical Development. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **59**: 296–308.

HNISZ D, ABRAHAM B J, LEE TI, LAU A, SAINT-ANDRÉ V, SIGOVA AA, HOKE HA, YOUNG RA (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, **155**(4): 934–947.

HODGSON SV, COONAR AS, HANSON PJ, COTTRELL S, SCRIVEN PN, JONES T, HAWLEY PR, WILKINSON ML (1993). Two cases of 5q deletions in patients with familial adenomatous polyposis: possible link with Caroli's disease. *Journal of Medical Genetics*, **30**(5): 369–375.

HOGART A, PATZEL KA, LASALLE JM (2008). Gender influences monoallelic expression of ATP10A in human brain. *Hum. Genet.*, **124**: 235–242.

İNCEKAŞ GASSALOĞLU S, BAYKARA B, AVCİL S, DEMİRAL Y (2016). Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği Geçerlik Ve Güvenirlik Çalışması. *Türk Psikiyatri Dergisi*, **27**(4):266-74

IOSSIFOV I, O'ROAK BJ, SANDERS SJ, RONEMUS M, KRUMM N, LEVY D, STESSMAN HA, WITHERSPOON KT, VIVES L, PATTERSON KE, SMITH JD, PAEPER B, NICKERSON DA, DEA J, DONG S, GONZALEZ LE, MANDELL JD, MANE SM, MURTHA MT, SULLIVAN CA, WALKER MF, WAQAR Z, WEIL, WILLSEY AJ, YAMROM B, LEE YH, GRABOWSKA E, DALKIC E, WANG Z, MARKS S, ANDREWS P, LEOTTA A, KENDALL J, HAKKER I, ROSENBAUM J, MA B, RODGERS, L, TROGE J, NARZISI G, YOON S, SCHATZ MC, YE K, MCCOMBIE WR, SHENDURE J, EICHLER EE, STATE MW, WIGLER M (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, **515**: 216–221.

- IOSSIFOV I, RONEMUS M, LEVY D, WAN Z, HAKKER I, ROSENBAUM J, YAMROM B, LEE YHA, NARZISI G, LEOTTA A, KENDALL J, GRABOWSKA E, MA B, MARKS S, RODGERS L, STEPANSKY A, TROGE J, ANDREWS P, BEKRITSKY M, PRADHAN K, GHIBAN E, KRAMER M, PARLA J, DEMETER R, FULTON LL, FULTON RS, MAGRINI VJ, YE K, DARNELL JC, DARNELL RB, MARDIS ER, WILSON RK, SCHATZ MC, MCCOMBIE RW, WIGLER M (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, **74**: 285–299.
- ISSLER O, CHEN A (2015). Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**(4): 201–12.
- ISSLER O, HARAMATI S, PAUL ED, MAENO H, NAVON I, ZWANG R, GIL S, MAYBERG HS, DUNLOP BW, MENKE A, AWATRAMANI R, BINDER EB, DENERIS ES, LOWRY CA, CHEN A (2014). MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity. *Neuron*, **83**: 344–360.
- JIANG YH, SAHOO T, MICHAELIS RC, BERCOVICH D, BRESSLER J, KASHORK CD, LIU Q, SHAFFER LG, SCHROER RJ, STOCKTON DW, SPIELMAN RS, STEVENSON RE, BEAUDET AL (2004). A mixed epigenetic/genetic model for oligogenic inheritance of autism with a limited role for UBE3A. *Am. J. Med. Genet.*, **131 A**: 1–10.
- JIANG YH, WANG Y, XIU X, CHOY KW, PURSLEY A, CHEUNG, SW (2014). Genetic diagnosis of autism spectrum disorders: The opportunity and challenge in the genomics era. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **51**(5): 249–262.
- KAPLAN N, MOORE IK, FONDUFE-MITTENDORF Y, GOSSETT AJ, TILLO D, FIELD Y, LEPROUST EM, HUGHES TR, LIEB JD, WIDOM J, SEGAL E (2009). The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, **458**(7236): 362–366.
- KAO HT, BUKA SL, KELSEY KT, GRUBER DF, PORTON B (2010). The correlation between rates of cancer and autism: An exploratory ecological investigation. *PLoS One*, **5**(2): e9372.
- KEIL KP, LEIN PJ (2016). DNA methylation: A mechanism linking environmental chemical exposures to risk of autism spectrum disorders? *Environ. Epigenetics*, **2**(1): dvv012.
- KILINCASLAN A, KOK BE, TEKTURK P, YALCINKAYA C, OZKARA C, YAPICI Z (2017). Beneficial Effects of Everolimus on Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in a Group of Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*, **27**: 383–388.
- KIRSCHNER MB, KAO SC, EDELMAN JJ, ARMSTRONG NJ, VALLELY MP, VAN ZANDWIJK N, REID G (2011). Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*, **6**(9): e24145.
- KOLVIN I (1971). Studies in the childhood psychoses. I. Diagnostic criteria and classification. *Br. J. Psychiatry*, **118**: 381–384.
- KOZOMARA A, BIRGAOANU M, GRIFFITHS-JONES S (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.*
- KRUG DA, ARICK JR, ALMOND PJ (1993). Autism screening instrument for educational planning. *Austin, TX: ProEd.*, **2**.
- LASALLE JM (2023). Epigenomic signatures reveal mechanistic clues and predictive markers for autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry*.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small

- RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, **75**: 843–854.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**: 402–408.
- LORD C, BRUGHA TS, CHARMAN T, CUSACK J, DUMAS G, FRAZIER T, JONES EJH, JONES RM, PICKLES A, STATE MW, TAYLOR JL, VEENSTRA-VANDERWEELE J (2020). Autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **6**(1): 5.
- LU TX, ROTHENBERG ME (2018). MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**: 1202–1207.
- LUGO JN, SMITH GD, ARBUCKLE EP, WHITE J, HOLLEY AJ, FLORUTA CM, AHMED N, GOMEZ M.C, OKONKWO O (2014). Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. *Front. Mol. Neurosci.*, **7**: 27.
- MACARTHUR J, BOWLER E, CEREZO M, GIL L, HALL P, HASTINGS E, JUNKINS H, MCMAHON A, MILANO A, MORALES J, MAYPENDLINGTON Z, WELTER D, BURDETT T, HINDORFF L, FLICEK P, CUNNINGHAM F, PARKINSON H (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.*, **45**: D896–D901.
- MANNIRONI C, BIUNDO A, RAJENDRAN S, DE VITO F, SABA L, CAIOLI S, ZONA C, CIOTTI T, CARISTI S, PERLAS E, DEL VECCHIO G, BOZZONI I, RINALDI A, MELE A, PRESUTTI C (2018). miR-135a Regulates Synaptic Transmission and Anxiety-Like Behavior in Amygdala. *Mol. Neurobiol.*, **55**: 3301–3315.
- MARKOWITZ SD, BERTAGNOLLI MM (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **361**: 2449–2460.
- MASINI E, LOI E, VEGA-BENEDETTI AF, CARTA M, DONEDDU G, FADDA R, ZAVATTARI P (2020). An overview of the main genetic, epigenetic and environmental factors involved in autism spectrum disorder focusing on synaptic activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(21): 8290.
- MODABBERNIA A, VELTHORST E, REICHENBERG A (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol. Autism*, **8**: 13.
- MOHN JL, ALEXANDER J, PIRONE A, PALKA CD, LEE SY, MEBANE L, HAYDON PG, JACOB MH (2014). Adenomatous polyposis coli protein deletion leads to cognitive and autism-like disabilities. *Mol. Psychiatry*, **19**: 1133–1142.
- MOR M, NARDONE S, SAMS DS, ELLIOTT E (2015). Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Mol. Autism*, **6**: 46.
- MULLER CL, ANACKER AMJ, VEENSTRA-VANDERWEELE J (2016). The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience*, **321**: 24–41.
- NAGARAJAN RP, HOGART AR, GWYE Y, MARTIN MR, LASALLE JM (2006). Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics*, **1**: 172–182.
- NAGARAJAN RP, PATZEL KA, MARTIN M, YASUI DH, SWANBERG, SE, HERTZ-PICCIOTTO I, HANSEN RL, VAN DE WATER J, PESSAH IN, JIANG R, ROBINSON WP, LASALLE JM (2008). MECP2 promoter methylation and x chromosome inactivation in autism. *Autism Res*, **1**: 169–178.
- NAKATA M, KIMURA R, FUNABIKI Y, AWAYA T, MURAI T, HAGIWARA M (2019). MicroRNA profiling in adults with high-functioning autism spectrum disorder. *Mol Brain*, **12**: 82.

- NELSON CA, BLOOM FE, CAMERON JL, AMARAL D, DAHL RE, PINE D (2002). An integrative, multidisciplinary approach to the study of brain-behavior relations in the context of typical and atypical development. *Dev Psychopathol*, **14**: 499–520.
- NGUYEN LS, FREGEAC J, BOLE-FEYSOT C, CAGNARD N, IYER A, ANINK J, ARONICA E, ALIBEU O, NITSCHKE P, COLLEAUX L (2018). Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: Relevance for neurodevelopmental disorders. *Mol Autism*, **9**: 38.
- NT P, DS M, MM N, IN M, TI V (2018). Investigation of circulating serum microRNA-328-3p and microRNA-3135a expression as promising novel biomarkers for autism spectrum disorder. *Balk J Med Genet*, **21**: 5–12.
- OGATA H, GOTO S, SATO K, FUJIBUCHI W, BONO H, KANEHISA M (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, **27**(1):29-34
- ÖKCÜN-AKÇAMUŞ MÇ (2018). The Relationship between Imitation, Play, Gestures and Vocabulary in Children with Autism Spectrum Disorders. *Kastamonu Eğitim Derg*, **26**: 1–10.
- ÖKTEM F, AKKÖK F, GÖKLER B, SUCUOĞLU B (1996). Otistik çocukların değerlendirilmesinde kullanılan ölçeklere ilişkin bir çalışma. *Psikiyatr. Psikol Psikofarmakol Derg*, **4**: 116–121.
- OZKUL Y, TAHERI S, BAYRAM KK, SENER EF, MEHMETBEYOĞLU E, ÖZTOP DB, AYBUGA F, TUFAN E, BAYRAM A, DOLU N, ZARARSIZ G, KIANMEHR L, BEYAZ F, DOĞANYIGIT Z, CUZIN F, RASSOULZADEGAN M (2020). A heritable profile of six miRNAs in autistic patients and mouse models. *Sci Rep*, **10**: 9011.
- PETROV AI, KAY SJE, KALVARI I, HOWE KL, GRAY KA, BRUFORD EA, KERSEY PJ, COCHRANE G, FINN RD, BATEMAN A, KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S, FRANKISH A, ZWIEB CW, LAU BY, WILLIAMS KP, CHAN PP, LOWE TM, CANNONE JJ, GUTELL RR, MACHNICKA MA, BUJNICKI JM, YOSHIHAMA M, KENMOCHI N, CHAI B, COLE JR, SZYMANSKI M, KARLOWSKI WM, WOOD V, HUALA E, BERARDINI TZ, ZHAO Y, CHEN R, ZHUW., PARASKEVOPOULOU MD, VLACHOS IS, HATZIGEORGIOU AG, MA L, ZHANG Z, PUETZ J, STADLER PF, MCDONALD D, BASU S, FEY P, ENGEL SR, CHERRY JM, VOLDERS PJ, MESTDAGH P, WOWER J, CLARK M, QUEK XC, DINGER ME (2017). RNAcentral: A comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, **45**: D128–D134.
- POEL D, BUFFART TE, OOSTERLING-JANSEN J, VERHEUL HMW, VOORTMAN J (2018). Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Exp Mol Med*, **50**: e454–e454.
- PONS-ESPINAL M, GASPERINI C, MARZI MJ, BRACCIA C, ARMIROTTI A, PÖTZSCH A, WALKER TL, FABEL K, NICASSIO F, KEMPERMANN G, DE PIETRI TONELLI D (2019). MiR-135a-5p Is Critical for Exercise-Induced Adult Neurogenesis. *Stem Cell Reports*, **12**: 1298–1312.
- RAEDLE J, FRIEDL W, ENGELS H, KOENIG R, TROJAN J, ZEUZEM S (2001). A de novo deletion of chromosome 5q causing familial adenomatous polyposis, dysmorphic features, and mild mental retardation. *The American Journal of Gastroenterology*, **96**(10): 3016–3020.
- RISTORI MV, MORTERA SL, MARZANO V, GUERRERA S, VERNOCCHI P, IANIRO G, GARDINI S, TORRE G, VALERI G, VICARI S, GASBARRINI A, PUTIGNANI L (2020). Proteomics and metabolomics approaches towards a functional insight onto autism spectrum disorders: Phenotype stratification and biomarker discovery. *Int J Mol Sci*, **21**: 6274.
- ROSEN NE, LORD C, VOLKMAR FR (2021). The Diagnosis of Autism: From Kanner to DSM-III to

DSM-5 and Beyond. *J Autism Dev Disord*, **51**: 4253–4270.

- SAMACO RC, HOGART A, LASALLE JM (2005). Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet*, **14**: 483–492.
- SANDERS SJ, ERCAN-SENCICEK AG, HUS V, LUO R, MURTHA MT, MORENO-DE-LUCA D, CHU SH, MOREAU MP, GUPTA AR, THOMSON SA, MASON CE, BILGUVAR K, CELESTINO-SOPER PBS, CHOI M, CRAWFORD EL, DAVIS L, DAVIS WRIGHT NR, DHODAPKAR RM, DICOLA M, DILULLO NM, FERNANDEZ TV, FIELDING-SINGH V, FISHMAN DO, FRAHM S, GARAGALOYAN R, GOH GS, KAMMELA S, KLEI L, LOWE JK, LUND SC, MCGREW AD, MEYER KA, MOFFAT WJ, MURDOCH JD, O’ROAK BJ, OBER GT, POTTENGER RS, RAUBESON MJ, SONG Y, WANG Q, YASPER BL, YU TW, YURKIEWICZ IR, BEAUDET AL, CANTOR RM, CURLAND M, GRICE DE, GÜNEL M, LIFTON RP, MANE SM, MARTIN DM, SHAW CA, SHELDON M, TISCHFIELD JA, WALSH CA, MORROW EM, LEDBETTER DH, FOMBONNE E, LORDC., MARTIN CL, BROOKS AI, SUTCLIFFE JS, COOK EH, GESCHWIND D, ROEDER K, DEVLIN B, STATE MW (2011). Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*, **70**: 863–885.
- SANDERS SJ, MURTHA MT, GUPTA AR, MURDOCH JD, RAUBESON MJ, WILLSEY AJ, ERCAN-SENCICEK AG, DI LULLO NM, PARIKSHAK NN, STEIN JL, WALKER MF, OBER GT, TERAN NA, SONG Y, EL-FISHAWY P, MURTHA RC, CHOI M, OVERTON JD, BJORNSEN RD, CARRIERO NJ, MEYER KA, BILGUVAR K, MANE SM, ŠESTAN N, LIFTON RP, GÜNEL M, ROEDER K, GESCHWIND DH, DEVLIN B, STATE MW (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, **485**: 237–241.
- SAXENA R, BABADI M, NAMVARHAGHIGHI H, ROULLET FI (2020). Role of environmental factors and epigenetics in autism spectrum disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **173**: 35–60.
- SCHEPICIG, CAVALLI E, BRAMANTI P, MAZZON E (2019). Autism spectrum disorder and mirna: An overview of experimental models. *Brain Sci*, **9**: 265.
- SCHOFIELD CM, HSU R, BARKER AJ, GERTZ CC, BLELLOCH R, ULLIAN EM (2011). Monoallelic deletion of the microRNA biogenesis gene Dgcr8 produces deficits in the development of excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Neural Dev*, **6**: 11.
- SCHOPLER E, BREHM SS, KINSBOURNE M, REICHLER RJ (1971). Effect of Treatment Structure on Development in Autistic Children. *Arch Gen Psychiatry*, **24**: 415–421.
- SCHRATT G (2009). MicroRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **10**(12):842-9.
- SEBAT J, LAKSHMI B, MALHOTRA D, TROGE J, LESE-MARTIN C, WALSH T, YAMROM B, YOON S, KRASNITZ A, KENDALL J, LEOTTA A, PAI D, ZHANG R, LEE YH, HICKS J, SPENCE SJ, LEE AT, PUURA K, LEHTIMÄKI T, LEDBETTER D, GREGERSEN PK, BREGMAN J, SUTCLIFFE JS, JOBANPUTRA V, CHUNG W, WARBURTON D, KING MC, SKUSE D, GESCHWIND DH, GILLIAM TC, YE K, WIGLER M (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, **316**: 445–449.
- SHARMA SR, GONDA X, TARAZI FI (2018). Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther* **190**:91-104.
- SIEGEL G, OBERNOSTERER G, FIORE R, OEHMEN M, BICKER S, CHRISTENSEN M, KHUDAYBERDIEV S, LEUSCHNER PF, BUSCH CJ, KANE C, HÜBEL K, DEKKER F, HEDBERG C, RENGARAJAN B, DREPPER C, WALDMANN H, KAUPPINEN S, GREENBERG ME, DRAGUHN A, REHMSMEIER M, MARTINEZ J, SCHRATT GM (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation

- enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol.* **11(6)**:705-16.
- SKINNER MK (2011). Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*, **6(7)**: 838–842.
- SODHI MSK, SANDERS-BUSH E (2004). Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol* **59**: 111–174.
- STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, ZIMMERMAN S, TWIK, M, FISHILEVICH S, INY STEIN T, NUDEL R, LIEDER I, MAZOR Y, KAPLAN S, DAHARY D, WARSHAWSKY D, GUANGOLAN Y, KOHN A, RAPPAPORT N, SAFRAN M, LANCET D (2016). The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinforma*, **54**:1.30.1-1.30.33.
- SUTCLIFFE JS, DELAHANTY RJ, PRASAD HC, MCCAULEY JL, HAN Q, JIANG L, LI C, FOLSTEIN SE, BLAKELY RD (2005). Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am J Hum Genet*, **77**: 265–279.
- TBMM Komisyonu (2019). Down Sendromu, Otizm ve Diğer Gelişim Bozukluklarının Yaygınlığının Tespiti ile İlgili Bireylerin ve Ailelerinin Sorunlarının Çözümü İçin Alınması Gereken Tedbirlerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Meclis Araştırması. https://www.tohumotizm.org.tr/wp-content/uploads/2020/06/TBMM_Komisyon_Raporu_yonetici-ozeti.pdf. (Erişim tarihi: 29.05.23)
- TREMBLAY MW, JIANG YH (2019). DNA methylation and susceptibility to autism spectrum disorder. *Annu. Rev. Med.*, **70**:151-166
- VAROL N, KONAC E, GUROCAK OS & SOZEN S (2011). The realm of microRNAs in cancers. *Molecular biology reports.*, **38(2)**: 1079–1089.
- VASWANI M, LINDA FK, RAMESH S (2003). Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: A comprehensive review. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **27**: 85-102
- VERHOEFF B (2013). Autism in flux: A history of the concept from Leo Kanner to DSM-5. *Hist. Psychiatry*, **24**: 442–458.
- WALTES R, GFESSER J, HASLINGER D, SCHNEIDER-MOMM K, BISCALDI M, VORAN A, FREITAG CM, CHIOCCHETTI AG (2014). Common EIF4E variants modulate risk for autism spectrum disorders in the high-functioning range. *J. Neural Transm.*, **121**: 1107–1116.
- WANG L, ZHOU K, FU Z, YU D, HUANG H, ZANG X, MO X (2017). Brain Development and Akt Signaling: the Crossroads of Signaling Pathway and Neurodevelopmental Diseases. *J. Mol. Neurosci.*, **61(3)**: 379-384.
- WANG W, KWON EJ, TSAI LH (2012). MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn. Mem.*, **19(9)**: 359-368.
- WASSINK TH, HAZLETT HC, EPPING EA, ARNDT S, DAGER SR, SCHELLENBERG GD, DAWSON G, PIVEN J (2007). Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Arch. Gen. Psychiatry*, **64**: 709–717.
- WEISS LA, ABNEY M, COOK EH, OBER C (2005). Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am. J. Hum. Genet.*, **76**: 33–41.
- WEN Y, HERBERT MR (2017). Connecting the dots: Overlaps between autism and cancer suggest possible common mechanisms regarding signaling pathways related to metabolic alterations.

Med. Hypotheses, **103**:118–123.

WILLSEY JJ, STATE MW (2015). Autism spectrum disorders: From genes to neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **30**:92–99.

WREN ME, SHIRTCLIFF EA, DRURY SS (2015). Not All Biofluids Are Created Equal: Chewing over Salivary Diagnostics and the Epigenome. *Clin. Ther.*, **37**: 529–539.

WU S, WU F, DING Y, HOU J, BI J, ZHANG Z (2017). Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.*, **135**: 29–41.

WU YE, PARIKSHAK NN, BELGARD TG, GESCHWIND DH (2016). Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.*, **19**: 1463–1476.

YENDAMURI S, CALIN GA (2009). The role of microRNA in human leukemia: A review. *Leukemia*, **23**(7): 1257–1263.

YERLIKAYA FH, ERYAVUZ ONMAZ D, ALTUNHAN H, ILHAN M (2021). Can altered colostrum miRNA expression profile after cesarean delivery be a risk factor for autoimmune diseases?. *American journal of reproductive immunology*, **86**(4) e13472.

YILMAZ IRMAK T, TEKINSAV SÜTÇÜ S, AYDIN A, SORIAS O, (2007). OTİZM DAVRANIŞ KONTROL LİSTESİNİN (ABC) GEÇERLİK VE GÜVENİRLİĞİNİN İNCELENMESİ. *Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi.*, **14**(1): 13–23.

YU D, JIAO X, CAO T, HUANG F (2018). Serum miRNA expression profiling reveals miR-486-3p may play a significant role in the development of autism by targeting ARID1B. *Neuroreport*, **29**: 1431–1436.

YUAN L, LIU X, CHEN F, ZHANG L, CHEN X, HUANG Q, WU D, YANG C, HAN Z (2016). Diagnostic and prognostic value of circulating microRNA-133a in patients with acute myocardial infarction. *Clin. Lab.*, **62**: 1233–1241.

ZEIDAN J, FOMBONNE E, SCORAH J, IBRAHIM A, DURKIN MS, SAXENA S, YUSUF A, SHIH A, ELSABBAGH M (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res.*, **15**(5): 778–790.

ZHOU J, PARK CY, THEESFELD CL, WONG AK, YUAN Y, SCHECKEL C, FAK JJ, FUNK J, YAO K, TAJIMA Y, PACKER A, DARNELL RB, TROYANSKAYA OG (2019). Whole-genome deep-learning analysis identifies contribution of noncoding mutations to autism risk. *Nat. Genet.*, **51**: 973–980.

ZHOU XL, GIACOBINI M, ANDERLID BM, ANCKARSÄTER H, OMRANI D, GILLBERG C, NORDENSKJÖLD M, LINDBLOM A (2007). Association of adenomatous polyposis coli (APC) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD). *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, **144B**(3): 351–354.

ZIATS MN, RENNERT OM (2014). Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Mol. Psychiatry*, **19**: 848–852.

ZILLER MJ, GU H, MÜLLER F, DONAGHEY J, TSAI LT, KOHLBACHER O, DE JAGER PL, ROSEN ED, BENNETT DA, BERNSTEIN BE, GNIRKE A, MEISSNER A (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, **500**(7463): 477–481.

ZONGARO S, HUKEMA R, D'ANTONI S, DAVIDOVIC L, BARBRY P, CATANIA MV, WILLEMSSEN R, MARI B, BARDONI B (2013). The 3' UTR of FMR1 mRNA is a target of

miR-101, miR-129-5p and miR-221: Implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse. *Hum. Mol. Genet.*, **22**: 1971–1982.



EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU	
ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	
TELEFON	
FAKS	
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Otizm Spektrum Bozukluğunda mir-135a-5p'nin İfade Değişikliğinin İncelenmesi - Başvuru No: 2022000355-1(2022/355)	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Güvem GÜMÜŞ AKAY	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Fizyoloji	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 07-414-22	Tarih: 04 Ağustos 2022
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sorunlar bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hakan ERGÜN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile İlgili	İmza
Prof. Dr. Hakan ERGÜN	Tıbbi Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Berna ARDA	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Hatice İLGİN RUHI	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Sevim AYDIN	Histoloji ve Embriyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Berna SAVAŞ	Tıbbi Patoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Nuray HALILOĞLU	Radyoloji Anabilim Dalı	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Yüksel ÜRÜN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Cihangir AKYOL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Başak Ceyda MEÇO	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Halil ÖZDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Emel OKULU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Beyza DOĞANAY ERDOĞAN	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Zehide Çiler BÜYÜKATALAY YALDIZ	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Rezzak YILMAZ	Nöroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Serkan AKBULUT	Cerrahi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	

EK 2. ÇOCUKLUK OTİZMİ DERECELENDİRME ÖLÇEĞİ

ÇOCUKLUK OTİZMİ DERECELENDİRME ÖLÇEĞİ (ÇODÖ)

Adı-Soyadı: Cinsiyeti:

Doğum Tarihi: Değerlendirme Tarihi:

Değerlendiren:

Yönerge: Her bir kategori için, ölçeğin her maddesinin altında bırakılan yeri kullanınız. Çocuğu gözlemlemeyi bitirdikten sonra, ölçeğin maddelerinde yer alan davranışları değerlendiriniz. Her madde için çocuğu en iyi biçimde tanımlayan ifadenin numarasını daire içine alınız. İki ifade arasında değerlendirmeniz gerekiyorsa 1.5, 2.5 ya da 3.5 değerlerinden birini kullanabilirsiniz. Her madde için kısaltılmış değerlendirme ölçütü gösterilmiştir.

Kategorileri Dereceleme Puanları

Her kategori için çocuğa verdiğiniz puanı aşağıya yazın ve sonrasında toplayın.

I. İnsanlarla ilişki

II. Taklit

III. Duygusal tepkiler

IV. Bedenin kullanımı

V. Nesne kullanımı

VI. Değişikliğe uyum

VII. Görsel tepki

VIII. Dinleme tepkisi

IX. Tatma, Koklama, Dokunma Tepkisi ve Kullanımı

X. Korku ya da Sinirlilik

XI. Sözel iletişim

XII. Sözel olmayan iletişim

XIII. Etkinlik Düzeyi

XIV. Zihinsel Tepkilerin Düzeyi ve Tutarlılığı

XV. Genel İzlenimler

TOPLAM

15-29: Otizm yok

30-36: Hafif-Orta Derecede Otistik

37-60: Aşırı Derecede Otistik

I-İNSANLARLA İLİŞKİ

1 İnsanlarla ilişki kurmada bir anormallik ya da zorluk belirtisi yok:

Çocuğun davranışı yaşına uygundur. Bir şey yapması istendiğinde utangaçlık, mızımlık ya da rahatsızlık belirtileri gözlemlenebilir, ancak bunlar atipik derecede değildir.

1,5

2 Hafif derecede anormal ilişki: Çocuk yetişkinin gözüne bakmaktan kaçınabilir, yetişkinden kaçınabilir ya da etkileşime zorlandığı zaman huysuzlanabilir, çok utangaç olabilir, yetişkine tipik tepkiler vermeyebilir ya da yaşlılarından biraz daha fazla anne-babaya yapışabilir.

2,5

3 Orta derecede anormal ilişki: Çocuk zaman zaman çevreden kopmuş (yetişkinin farkında değilmiş) gibi gözükür. Çocuğun dikkatini çekebilmek için zaman zaman ısrarlı ve zorlayıcı girişimler gerekir. Çok az ilişki çocuk tarafından başlatılır.

3,5

4 Ağır derecede anormal ilişki: Çocuk sürekli bir şekilde çevreden kopuktur ya da yetişkinin ne yaptığının farkında değildir. Hemen hemen hiçbir zaman yetişkine tepki vermez ya da yetişkinle ilişki başlatmaz. Çocuğun dikkatini çekmek için ancak çok ısrarlı girişimlerin bir etkisi olabilir.

GÖZLEMLER:

II-TAKLİT

1 Uygun taklit: Çocuk beceri düzeyine uygun ses, kelime ve hareketleri taklit edebilir.

1,5

2 Hafif derecede anormal taklit: Çocuk çoğu zaman el çırpma, tek ses çıkarma gibi basit davranışları taklit eder; bazen sadece zorlandıktan sonra ya da gecikmeli olarak taklit eder.

2,5

3 Orta derecede anormal taklit: Çocuk ancak ara sıra taklit eder ve bu, yetişkinin yoğun yardım ve ısrarını gerektirir; taklit çoğunlukla gecikmeli olarak ortaya çıkar.

3,5

4 Ağır derecede anormal taklit: Çocuk, yetişkinin ısrar ve yardımına rağmen sesleri, kelimeleri, hareketleri çok seyrek taklit eder ya da hiç etmez.

GÖZLEMLER:

III-DUYGUSAL TEPKİLER

1 Yaş ve duruma uygun duygusal tepkiler: Çocuk duygusal tepkilerini, uygun tarz ve derecede, yüz ifadesi, duruş ve davranış değişikliği ile gösterir.

1,5

2 Hafif derecede anormal duygusal tepkiler: Ara sıra çocuk, kısmen uygun olmayan tarz ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler bazen, tepkileri çevreleyen nesneler ve olaylarla ilişkili değildir.

2,5

3 Orta derecede anormal duygusal tepkiler: Çocuk belirgin olarak uygun olmayan tarz ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler azalmış ya da abartılı ya da durumla bağlantısız olabilir; duygu uyandıran belirgin olaylar ve nesneler olmasa bile 'grimas', gülme ya da kaskatı kesilme görülebilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal duygusal tepkiler: Tepkiler nadiren duruma uygundur; çocuk belirli bir duygu durumunda iken bu durumu değiştirmek çok zordur. Buna karşın hiçbir şey değişmediği halde aşırı duygu değişiklikleri gösterebilir.

GÖZLEMLER:

IV-BEDENİN KULLANIMI

1 Bedenin yaşa uygun kullanımı: Çocuk normal yaşlıları ile aynı rahatlık, çeviklik ve koordinasyonla hareket eder.

1,5

2 Bedenin hafif derecede anormal kullanımı: Hantallık, yineleyici hareketler, koordinasyon zayıflığı gibi küçük, kendine özgü tuhafliklar olabilir ya da seyrek olarak alışılmadık beden hareketlerine rastlanabilir.

2,5

3 Bedenin orta derecede anormal kullanımı: Bu yaştaki bir çocuk için alışılmadık ya da belirgin derecede garip olan parmak hareketleri, tuhaf parmak ve vücut duruşu, bedenin bir parçasına takılıp kalma ya da çimdikleme, kendine yönelik saldırganlık, sallanma, dönme, parmak oynatma, ayak uçlarında yürüme gibi davranışlar görülebilir.

3,5

4 Bedenin ağır derecede anormal kullanımı: Yukarıda sıralanan hareketlerin sık ya da yoğun görülmesi, bedenin ağır derecede anormal kullanımının belirtileridir. Bu davranışlar, bunları engelleme ya da çocuğu başka etkinlikler içine sokma girişimlerine karşın ısrarlı bir devamlılık gösterebilir.

GÖZLEMLER:

V-NESNE KULLANIMI

1 Oyuncak ve diğer nesnelere uygun ilgi ve kullanım: Çocuk, kendi beceri düzeyine uygun oyuncaklar ve diğer nesnelere normal ilgi gösterir ve bu oyuncakları normal şekilde kullanır.

1,5

2 Oyuncak ve diğer nesnelere hafif derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım: Çocuk bir oyuncakla atipik bir ilgi gösterebilir ya da onunla uygun olmayan bebeksi biçimde oynar (örneğin; oyuncakla vurma, emme).

2,5

3 Oyuncak ve diğer nesnelere orta derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım: Çocuk oyuncaklara ve diğer nesnelere çok az ilgi gösterebilir ya da bir oyuncak ya da nesneyi tuhaf bir şekilde kullanmaya kendini kaptırmış olabilir. Oyuncakların önemsiz bir parçasına odaklanabilir, nesnenin yansıttığı ışıktan çok hoşlanabilir. Yineleyici bir biçimde oyuncakların bazı kısımlarını hareket ettirebilir ya da yalnızca bir nesne ile yoğun bir şekilde oynar.

3,5

4 Oyuncak ve diğer nesnelere ağır derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım: Çocuk yukarıdaki davranışları daha sık ve yoğun olarak gösterebilir. Bu uygun olmayan etkinliklere kendini kaptırdığında, çocuğun dikkatini bir başka tarafa çekmek zordur.

GÖZLEMLER:

VI-DEĞİŞİKLİĞE UYUM

1 Değişikliğe yaşa uygun uyum: Çocuk alıştığı düzendeki değişiklikleri fark edebilir ya da bunları (sözel olarak) belirtebilir ise de yersiz rahatsızlık göstermeden bu değişiklikleri kabul eder.

1,5

2 Değişikliğe hafif derecede anormal uyum: Yetişkin yapılan etkinliği değiştirmeye kalktığı zaman çocuk aynı etkinliğe ya da aynı araç-gereci kullanmaya devam eder.

2,5

3 Değişikliğe orta derecede anormal uyum: Çocuk alıştığı düzendeki değişikliklere etkin olarak direnir, eski etkinliğe devam etmeye çalışır, dikkatini başka tarafa çekmek çok zordur. Düzen değiştirildiği zaman mutsuz ve öfkeli olabilir.

3,5

4 Değişikliğe ağır derecede anormal uyum: Çocuk değişikliğe ağır tepkiler verir. Eğer değişikliğe zorlanırsa çok fazla kızabilir ya da işbirliği yapmaz ve öfke nöbetleriyle tepki verebilir.

GÖZLEMLER:

VII-GÖRSEL TEPKİ

1 Yaşa uygun görsel tepki: Çocuğun görsel davranışları normaldir ve yaşına uygundur. Görme, yeni bir nesneyi keşfetmek için diğer duyarlarla birlikte kullanılır.

1,5

2 Hafif derecede anormal görsel tepki: Çocuğa zaman zaman nesnelere bakması hatırlatılmalıdır. Arkadaşları yerine ışığa ya da aynaya bakmakla daha çok ilgilenebilir, ara sıra boşluğa gözünü dikip bakabilir ya da insanların gözlerine bakmaktan kaçınabilir.

2,5

3 Orta derecede anormal görsel tepki: Çocuğa sık sık yaptığına bakması hatırlatılmalıdır. Boşluğa gözünü dikip bakabilir, insanların gözüne bakmaktan kaçınabilir, nesnelere alışılmadık bir açıdan bakabilir, nesneleri gözlerine çok yakın tutabilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal görsel tepki: Çocuk ısrarlı bir şekilde insanlara ya da belirli nesnelere bakmaktan kaçınır ve yukarıda tanımlanan diğer görsel tepkilerin aşırı biçimlerini sergiler.

GÖZLEMLER:

VIII-DİNLEME TEPKİSİ

1 Yaşa uygun dinleme tepkisi: Çocuğun dinleme davranışı normal ve yaşına uygundur. Dinleme diğer duylarla birlikte kullanılır.

1,5

2 Hafif derecede anormal dinleme tepkisi: Belirli seslere karşı hafif tepkisizlik gösterebilir ya da hafif derecede fazla tepki verebilir. Seslere tepkiler gecikebilir, çocuğun dikkatini çekebilmek için sesin tekrar edilmesi gerekebilir. Çocuğun dikkati yabancı (dıştan gelen) seslerle dağılabilir.

2,5

3 Orta derecede anormal dinleme tepkisi: Çocuğun seslere tepkileri değişkenlik gösterir, ilk birkaç defada duymazlıktan gelebilir, bazı günlük sesleri işittiği zaman ürkebilir ya da kulaklarını kapatabilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal dinleme tepkisi: Çocuk, sesin türünden bağımsız olarak, seslere karşı aşırı derecede tepkisel ya da tepkisiz davranabilir.

GÖZLEMLER:

IX-TATMA, KOKLAMA, DOKUNMA TEPKİSİ VE KULLANIMI

1 Tatma, koklama ve dokunmaya normal tepki ve kullanım: Çocuk yeni nesneleri yaşına uygun şekilde, genellikle bakarak ve hissederek keşfeder. Tatma ve koklama duylarını gerektiğinde kullanabilir. Küçük, can yakıcı durumlar karşısında çocuk rahatsızlığını belirtir, ancak aşırı tepki göstermez.

1,5

2 Tatma, koklama ve dokunmaya hafif derecede anormal tepki ve kullanım: Çocuk nesneleri ısrarlı bir şekilde ağzına koyabilir, yemeyen nesneleri koklayabilir, tadabilir, normal çocukların rahatsızlık ifade ettikleri orta şiddetli ağrıları fark etmiyor gibi davranabilir ya da aşırı tepki verebilir.

2,5

3 Tatma, koklama ve dokunmaya orta derecede anormal tepki ve kullanım: Çocuk insanlara ya da nesnelere dokunma, koklama ve tatmaya yönelik orta derecede bir eğilim gösterebilir, çok az ya da çok fazla tepki verebilir.

3,5

4 Tatma, koklama ve dokunmaya ağır derecede anormal tepki ve kullanım: Çocuk normal kullanım ve keşfetme yerine, sadece duyumsama amacıyla nesneleri koklar, tadar ya da onlara dokunur. Çocuk ağrıyı (acıyı) tümüyle algılamaz görünür ya da hafif derecede rahatsızlık veren durumlarda çok aşırı tepki verir.

GÖZLEMLER:

X-KORLU YA DA SINİRLİLİK

1 Normal korku ya da sinirlilik: Çocuğun davranışları hem yaşına hem duruma uygundur.

1,5

2 Hafif derecede anormal korku ya da sinirlilik: Çocuk, aynı yaş ve benzer durumdaki çocuğun tepkileriyle karşılaştırıldığında, ara sıra çok az ya da çok fazla korku ve sinirlilik gösterir.

2,5

3 Orta derecede anormal korku ya da sinirlilik: Çocuk, benzer durumdaki daha küçük bir çocuk için bile tipik olandan biraz daha az ya da biraz daha fazla korku gösterir.

3,5

4 Ağır derecede anormal korku ya da sinirlilik: Zararsız olaylar ve nesnelere ilişkin yineleyici deneylerden sonra bile korku sürer. Çocuğu sakinleştirmek ya da rahatlatmak çok zordur. Buna karşın, çocuk aynı yaştaki diğer çocukların kaçındığı tehlikelere karşı uygun davranışı göstermekte

başarısızdır.

GÖZLEMLER:

XI-SÖZEL İLETİŞİM

1 Yaşa ve duruma uygun sözel iletişim

1,5

2 Hafif derecede anormal sözel iletişim: Konuşma genel olarak gerilik gösterir. Konuşmanın çoğu anlamlıdır; ancak ekolali ve kişi zamirlerinin ters kullanımı görülebilir. Bazı özel sözcükler ve jargon kullanılabilir.

2,5

3 Orta derecede anormal sözel iletişim: Konuşma olmayabilir. Konuşma olsa da sözel iletişim, 'anamlı konuşma' ile 'jargon, ekolali, zamir değiştirme gibi kendine özgü konuşma' karışımından oluşabilir. Anamlı konuşmada yoğun soru sorma ve belirli konular üzerinde ısrarla durma gibi özellikler görülebilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal sözel iletişim: Anamlı konuşma kullanılmaz. Çocuk bebeksi sesler, tuhaf ya da hayvan seslerine benzer sesler konuşmaya yakın karmaşık sesler çıkarabilir ya da tanıdık kelimeler ve cümlelerin tuhaf kullanımı görülebilir.

GÖZLEMLER:

XII-SÖZEL OLMAYAN İLETİŞİM

1 Sözel olmayan iletişimin yaşa ve duruma uygun normal kullanımı

1,5

2 Sözel olmayan iletişimin hafif derecede anormal kullanımı: Sözel olmayan iletişimin olgunlaşmamış kullanımı; yaşatlarının istediklerini daha belirgin işaret ettikleri ya da gösterdikleri durumlarda çocuk belirsizce işaret edebilir ya da istediğine uzanabilir.

2,5

3 Sözel olmayan iletişimin orta derecede anormal kullanımı: Çocuk genellikle isteklerini ya da gereksinimlerini sözel olmayan şekilde ifade edemez ve diğerlerinin sözel olmayan iletişimini anlayamaz.

3,5

4 Sözel olmayan iletişimin ağır derecede anormal kullanımı: Çocuk sadece belirgin bir anlamı olmayan garip ya da özel jestler kullanır ve diğerlerinin yüz ifadelerinin ya da jestlerinin farkında değildir.

GÖZLEMLER:

XIII-ETKİNLİK DÜZEYİ

1 Yaşa ve koşullara uygun normal etkinlik düzeyi: Çocuk benzer koşuldaki normal bir yaşıtıdan ne daha fazla ne daha az hareketlidir.

1,5

2 Hafif derecede anormal etkinlik düzeyi: Çocuk hafif derecede huzursuzdur ya da biraz 'tembelce' ve yavaş hareket edebilir. Çocuğun etkinlik düzeyi performansını hafifçe etkiler.

2,5

3 Orta derecede anormal etkinlik düzeyi: Çocuk oldukça aktiftir ve onu zaptetmek zordur. Sınırsız enerjisi olabilir ve uykuya dalmakta güçlük çeker. Buna karşın, çocuk oldukça hareketsiz olabilir ve harekete geçirebilmek için oldukça fazla çaba gerekebilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal etkinlik düzeyi: Çocuk hareketlilik ya da hareketsizliğin en uç noktalarındadır ve bir aşırı uçtan diğerine geçebilir.

GÖZLEMLER:

XIV-ZİHİNSEL TEPKİLERİN DÜZEYİ VE TUTARLILIĞI

1 Normal ve pek çok alanda uygun tutarlılık gösteren zeka: Çocuk aynı yaştaki tipik çocuklar kadar zekidir ve olağandışı zihinsel becerileri ya da problemleri yoktur.

1,5

2 Hafif derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, yaklaşık tüm alanlarda beceriler aynı düzeyde gerilik gösterir.

2,5

3 Orta derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk genel olarak aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir ancak bir ya da daha fazla alanda normale yakın işlevsellik gösterebilir.

3,5

4 Ağır derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değilken, zihinsel gelişimin bir ya da daha fazla alanında normal bir çocuktan bile daha iyi işlev gösterebilir.

GÖZLEMLER:

XV-GENEL İZLENİMLER

1 Otizm yok: Çocuk otizme özgü belirtilerin hiçbirini göstermez.

1,5

2 Hafif otizm: Çocuk yalnızca az sayıda ya da yalnızca hafif derecede otizm belirtileri gösterir.

2,5

3 Orta derecede otizm: Çocuk belirli sayıda ya da orta derecede otizm belirtileri gösterir.

3,5

4 Ağır otizm: Çocuk otizm belirtilerinden çoğunu ya da ağır derecede otizm gösterir.

GÖZLEMLER:

EK 3. BİYOBANKA GÖNÜLLÜ BİLGİ FORMU VE ONAM FORMU

Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyobankası Hasta Bilgi Formu	
Lütfen barkodu bu bölüme yapıştırınız!	

BIYOBANKA HASTA BİLGİ FORMU

HASTANIN	
Adı Soyadı:	Doğum Tarihi (Gün/Ay/Yıl):
TC Kimlik No:	Cinsiyeti:
Doğum Yeri:	Yaşadığı Şehir:
Anne Adı:	Baba Adı:
Annesinin Kızlık Soyadı:	Mesleği:
Eğitim Durumu:	Medeni Hali:
Kilosu:	Boy:
Kardeş Sayısı:	Çocuk sayısı:
Doğum şekli:	Doğum kilosu:
Doğumda komplikasyon öyküsü:	
Hastalığın Ön tanısı/Tanısı:	
Uygulanan Tedavi Protokolü:	
Sigara kullanımı: Süresi: Miktarı:	Alkol kullanımı: Süresi: Miktarı:
Madde bağımlılığı: Süresi: Miktarı:	Sürekli kullanılan ilaçlar: Süresi: Miktarı:
Daha önceden geçirilmiş hastalık(lar):	
Daha önceden geçirilmiş operasyon(lar):	
Ailede belirgin bir hastalık öyküsü:	
TAKİP EDEN HEKİMİN	
Adı Soyadı:	Çalıştığı Kurum:
Adres:	Telefon No:

ÖRNEK İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Örneğin alınma tarihi (Gün/Ay/Yıl): / / 2.....	Örneğin alındığı saat (saat:dakika):
Örnek miktarı (mL): Yeşil kapak: Mor kapak: Kırmızı kapak:	Örneğin kargoya verildiği saat:
ÖRNEĞİ ALAN HEKİM VEYA DİĞER PERSONELİN	
Adı Soyadı:	Adresi:
İMZA:	Telefon No:
FORMU DOLDURAN HEKİM VEYA DİĞER PERSONELİN	
Adı Soyadı:	Adresi:
İMZA:	Telefon No:
ÖNEMLİ HATIRLATMALAR: -Lütfen formu eksiksiz doldurmaya özen gösteriniz. -Ornek toplama ve transferi sırasında "Kan Orneği Toplama ve Transfer Protokolü"nde belirtilen talimatlara uyunuz. -Uygun miktar ve koşullarda gönderilmeyen örnekler işleme alınmayacaktır. -Gönüllü tarafından imzalanmış Onam Formu'nu bu forma eklemeyi unutmayınız.	

BİYOBANKA TARAFINDAN DOLDURULACAK KISIM	
ÖRNEK İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Örneğin geliş tarihi (Gün/Ay/Yıl): --/--/2---	Örneğin geliş saati (saat:dakika):
Örneği teslim alan (Ad/Soyad):	Örneğin çalışılmaya başlandığı saat:

Diğer Notlar:

Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyobankası	
Lütfen barkodu bu bölüme yapıştırınız!	
Gönüllü adı baş harfleri	: ? / ? / ? Tarih: ?? / ?? / ?????

BİLGİLENDİRİLMİŞ GONULLU OLUR FORMU

Bu form, katılmanız önerilen çalışma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmıştır. Formun düzenlenmesinde, çalışmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir. Yeterli görmediğiniz açıklamalar ya da sorularınız varsa, bu formu okuduktan sonra araştırmacıya sorabilirsiniz, size her türlü bilgi aktarılacaktır.

Çalışmanın Adı: Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyobankası

Bazı hastalıkların ortaya çıkmasında hem çevresel faktörler hem de anne/babadan aktarılan ırsi (kalıtsal/genetik) özellikler rol oynar. Bu gibi hastalıklarda hastalığa neden olan çevresel ve genetik faktörlerin belirlenebilmesi için, hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan çok geniş bir grupta çok sayıda araştırmanın yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu tür araştırmaların temelinde, istenildiği zaman ulaşılabilecek yeterli miktarda materyalin varlığı kilit öneme sahiptir.

Biyobankalar; kan, hücre, doku, DNA gibi biyolojik örneklerin özellikle araştırma amacı ile uzun süreli olarak saklandığı birimler olarak tanımlanmaktadır. Örneklerin yanı sıra örneklerle ait demografik ve klinik bilgiler ile yapılan analiz sonuçları gibi bilgi ve veriler de saklanmaktadır.

Biyobankalamada amaç kişilerden tekrar tekrar örnek almak yerine bunların uygun koşullarda uzun süreli saklanmasıdır. Ancak ister hücre, ister doku, ister DNA olsun bunların hiçbiri "sınırsız" değildir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, kısaca "bitmeyecek" şeklinde adlandırılabilir miktarda ve uzun süre saklanabilecek örneklerin yer aldığı bir biyobanka oluşturulmasıdır. Bu çalışma kapsamında kurulacak biyobankanın; 1) uzun süre saklanabilen, 2) "ölümsüzleştirilmiş" hücrelerden oluşturulması, biyobankaya gerek örnek sayısı gerekse uygulanabilecek test sayısı açısından sözü edilen kısıtlamaları ortadan kaldırabilecek bir yapı kazandıracaktır. Bu

Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyobankası	
Lütfen barkodu bu bölüme yapıştırınız!	
Gönüllü adı baş harfleri	Tarih: ?? / ?? / ???? : ? / ? / ?

özellikleri ile etkinliği ve güvenilirliği daha yüksek bilimsel araştırmaların yapılabileceği “sınırsız” bir kaynağın yer aldığı bir biyobanka oluşturulacaktır.

Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyobankası
--

Örnek sayısının fazlalığı, aynı örnek üzerinde farklı zamanlarda yapılabilecek genetik uygulama sayısının “sınırsızlığı” nedeni ile aynı örneklerle ilgili yeni ve eski bilgilerin birlikte değerlendirilebilmesi, kaynak kullanımı açısından verimliliğin artmasının yanı sıra daha bilgi verici ve net sonuçların elde edilmesi yoluyla gerek hastalığın ortaya çıkması, gerekse takibi ve tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilebilmesine olanak sağlayarak yaşam kalitesi ve süresinde iyileşme elde edilebilecektir.

Çalışma kapsamında sizden yaklaşık iki-üç çorba kaşığı kadar kan örneği alınacaktır. Bu sırada iğne batmasına bağlı olarak biraz acı duyulabilir, düşük bir olasılıkla kanama süresi uzayabilir ya da enfeksiyon riski söz konusu olabilir. Bunun dışında işlemin yan etkisi bulunmamaktadır.

Sizden alınan kan örneğinden bazı hücreler ayrıştırılacak ve yukarıda bahsedilen hale getirilmesi için uygun işlemlerden geçirildikten sonra saklama kaplarında depolanacaktır. Biyobankalamada kullanılacak otomatik kayıt sisteminde, örneği kabul eden görevli tarafından her örneğe sistemden bir kod numarası verilecek ve bundan sonraki tüm işlemler kod numaraları ile gerçekleştirilecektir. Örneklerin sisteme dahil edilmesinden sonra süreç içerisinde hangi aşamada oldukları, saklama yerleri ve koşulları, var ise sonrasında gerçekleştirilen işlemler sistemden kod numarası ile takip edilecektir. Örnek ve örneğe ait bilgiler tamamen gizli tutulacak, üçüncü kişilerle paylaşılmayacaktır. Örnek üzerinde kimlik bilgileri saklı kalmak kaydıyla analiz ya da araştırmalar yapılabilir. Bu analiz ve araştırmalarda rapor edilmesi gereken herhangi bir durumla karşılaşıldığında doktorunuza bilgi verilecektir.

Bu çalışma size herhangi bir mali yük getirmeyecektir. Çalışmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz. Ayrıca başladıktan sonra devam etmek istemediğinizde de örneğinizi ve örneğe ait bilgilerinizi çalışmadan çıkarabilirsiniz. Aynı şekilde sizin rızanıza bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma harici bırakılabilirsiniz.

ONAM FORMU

“Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Serisi Biyobankası” başlıklı çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı Soyadı:

Tarih

İmza

Adres:

Tel:

Doktor Adı Soyadı:

Tarih

İmza

Adres:

Tel:

Tanıklık Eden Kurum Yetkilisinin

Adı Soyadı :

Tarih

İmza

Adres:

Tel:

EK 4. SOSYODEMOGRAFİK VERİ FORMU

SOSYODEMOGRAFİK VERİ FORMU

ADI SOYADI:

GÖRÜŞME TARİHİ:

PROTOKOL:

GÖRÜŞMECİ:

CİNSİYETİ:

DOĞUM TARİHİ :

YAŞ:

ADRES:

TELEFON:

GÖRÜŞMEYE GELEN:

1)Anne 2) Baba 3) Anne-baba 4) Diğer (belirtiniz.....)

KREŞ-OKUL: 1) Gitmiyor 2)Kreş.....sene 3)Okulsınıf

ÖZEL EĞİTİM: 1) Gidiyor 2) Önceden gitmiş 3) Gitmiyor

Kaç yıldır:

Özel eğitim saatleri.....bireysel.....grup.....konuşma.....ergoterapi

AİLE ÖYKÜSÜ:

Aile tipi: 1) ÇEKİRDEK 2) GENİŞ (Kimler.....)

3)Anne ile yaşıyor (A-B ayrılmış) 4)Baba ile yaşıyor (A-B ayrılmış) 5) Diğer (belirtiniz.....)

Ailenin Gelir Düzeyi: 1-) 2000 tl ve altı 2-)2000-5000 tl 3) 5000 tl ve üstü

ANNE: Yaş:

Eğitim Düzeyi:

0-) okur-yazar değil 1-)ilkokul 2-)ortaokul 3-)lise 4-)yüksekokul

5-)üniversite 6-)yüksek lisans

Meslek:

1-)Ev hanımı 2) Memur(.....) 3) İşçi 4) Esnaf 5)İşsiz

6) Diğer(Belirtiniz)

Tıbbi Hastalık: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

Psikiyatrik Hastalık: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

Düzenli İlaç Kullanımı: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

BABA: Yaş: Eğitim Düzeyi:

0-) okur-yazar değil 1-)ilkokul 2-)ortaokul 3-)lise 4-)yüksekokul

5-)üniversite 6-)yüksek lisans

Meslek: 1) Memur(.....) 2) İşçi 3) Esnaf 4)İşsiz

5) Diğer(Belirtiniz.....)

Tıbbi Hastalık: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

Psikiyatrik Hastalık: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

Düzenli İlaç Kullanımı: 1-)Yok 2-)Var(Belirtiniz).....

Evlilik süresi:.....

Çocuk Sayısı:.....öz.....üvey (belirtiniz.....)

KARDEŞLER:

Adları:

Kan alınanlar:

Yaşları (sırasıyla):

Cinsiyet:

Öğrenim Durumu:

1- 1)Okul öncesi eğitim 2)İlkokul 3)Ortaokul 4)Lise 5)Üniversite

2- 1)Okul öncesi eğitim 2)İlkokul 3)Ortaokul 4)Lise 5)Üniversite

Tıbbi Hastalıkları:

1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz)..... Varsa hangi kardeş:

Psikiyatrik Hastalık:

1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz)..... Varsa hangi kardeş:

Düzenli İlaç Kullanımı:

1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz)..... Varsa hangi kardeş:

AİLEDE PSİKİYATRİK HASTALIK: 1-)Yok 2-)Var
(Belirtiniz).....

AİLEDE TIBBİ HASTALIK: 1-)Yok 2-)Var (Belirtiniz).....

GEBELİK ÖYKÜSÜ:

Annenin daha önce gebelik öyküsü: 1) Yok 2) Var (Kaç kez.....)

Annenin daha önce kürtaj öyküsü: 1) Yok 2) Var (Kaç kez..... En son kaç yıl önce.....)

Annenin daha önce düşük öyküsü: 1) Yok 2) Var (Kaç kez..... En son kaç yıl önce.....)

Gebelik planı:

1)Planlı 2)Plansız ancak istenen bir bebek 3)Plansız ve istenmeyen bir bebek

4)Tüp Bebek(Kaçıncı Deneme.....)

Gebelikte Düzenli Takip: 1)Evet 2)Hayır

Riskli Gebelik(Düşük tehditi, kanama vb): 1)Yok
2)Var(Belirtiniz.....)

Gebelikte yatarak tedavi: 1)Yok 2)Var
(Belirtiniz.....)

Annenin gebelikte tıbbi hastalığı: 1)Yok 2)Var.
(Belirtiniz.....)

Gebelikte enfeksiyon 1)Yok 2)Var. (Belirtiniz.....)

Varsa: Enfeksiyon bölgesi: Kaçıncı ayda:

İlaç Kullanımı: 1)Yok 2)Var. Varsa
adı.....Süresi:.....

Yatarak tedavi: 1)Yok 2)Var.

Annenin gebelikte psikiyatrik hastalığı: 1)Yok 2)Var
(Belirtiniz.....)

Annenin gebelikte ilaç kullanımı:

1)Yok 2)Var Varsa Adı.....Kaçınıcı ayda.....Süresi:.....

Gebelikte folik asit kullanımı:

1)Yok 2)Var Varsa Adı.....Kaçınıcı ayda.....Süresi:.....

Gebelikte progestan kullanımı:

1)Yok 2)Var Varsa Adı.....Kaçınıcı ayda.....Süresi:.....

Gebelikte antikoagülan (clexan) kullanımı:

1)Yok 2)Var Varsa Adı.....Kaçınıcı ayda.....Süresi:.....

Gebelikte iş hayatı:

1) Çalışmıyor 2)Çalışıyor (Kaçınıcı ayda izne çıkmış.....)

Çalışıyorsa; Stresli iş ortamı. 1. Yok 2. Kısmen stresli 3. Çok stresli
(belirtiniz.....)

Gebelikte sosyal destek: 1)Yok 2)Var. (Belirtiniz.....)

Gebelikte stresör: (Boşanma-Taşınma-İş değişikliği-Yakın kaybı vb.) 1)Yok 2)Var.
(Belirtiniz...

DOĞUM ÖYKÜSÜ: Doğum zamanı (hafta):

Doğum şekli: 1)NSVD 2)C/S

Zor doğum: 1)Yok 2)Var (Belirtiniz.....)

Doğum Kilosu:..... **Doğum Boyu:**.....

Baş Çevresi:.....

Doğum Komplikasyonu: (hipoksi vb.)

1)Yok 2)Var. (a.Sarılk. b.Fototerapi c. Küvöz\YB.....gün d. Diğer-
Belirtiniz.....)

GELİŞİM BASAMAKLARI:

Yürüme:.....

Konuşma: 1) Yok 2)Var (Başlangıç.....kelime.....cümle

Toplam kelime sayısı:.....

BESLENME ALIŞKANLIĞI:

Anne Sütü kaç ay:

Ek gıda kaçmı ayda:.....

Sizin kısıtladığınız yiyecekler var mı?

1)Yok 2)Var. (Belirtiniz.....)

BAKIM VERME:

Anne kaç ay bakım vermiş?..... **Şu an bakımveren.....süre.....**

DUYUSAL HASSASİYET:

Ses hassasiyeti? 1)Yok 2)Var
(Belirtiniz.....)

Koku hassasiyeti? 1)Yok 2)Var
(Belirtiniz.....)

Tad hassasiyeti? 1)Yok 2)Var (Belirtiniz.....)

Dokunsal hassasiyet? 1)Yok 2)Var (Belirtiniz.....)

AŞI: 1) Aşıları tam 2) Aşıları eksik 3) Net hatırlanmıyor 4) Aşı yaptırılmıyor (Nedeni.....)

TIBBİ HASTALIK: 1) Yok 2) Var. (Belirtiniz.....)

NÖBET (Ateşli-ateşsiz) 1) Yok 2) Var. (Ne zaman.....Kaç kere?.....)

AMELİYAT: 1) Yok 2) Var. (Belirtiniz.....)

İLAÇ KULLANIMI: 1) Yok 2) Var. (Belirtiniz.....)

ENFEKSİYON ÖYKÜSÜ 1) Yok 2) Var. (Belirtiniz.....)

VARSA ANTİBİYOTİK KULLANIMI: 1) Yok 2) Var.
(Belirtiniz.....)

BELİRTİLERİ İLK FARKEDEN:

1) Anne 2) Baba 3) Anne-baba 4) Öğretmen 5) Doktor.
6) Diğer.....

OTİZM BELİRTİLERİNİ AİLENİN FARKETTİĞİ ZAMAN:

İLK BAŞVURU YAŞI:.....

İLK FARKEDİLEN BELİRTİ:

1) Konuşma gecikmesi 2) Göz teması kurmama 3) İsme bakmama
4) Tekrarlayıcı hareketler 5) Hareketlilik 6) Davranım sorunları 7) Yeme sorunları 8) Uyku sorunları 9) Fark edilen belirti yok. 10) Diğer.....

GELİŞİMİNDE DURAKLAMA VEYA GECİKME:

1. Hayır 2. Evet (Belirtiniz.....)

MEVCUT TANISI: Düzey (OSB için): 1) Level 1 2) Level 2 3) Level 3

TANI YAŞI:

KOMORBİDİTE: 1) Yok 2) Var

Varsa: 1-) Gelişimsel gerilik 2) Konuşma boz (tipi:.....) 3) DEHB 4) anksiyete
5) KOKGB 6) diğer (.....) (çoklu olması durumunda 2 sinide işaretleyiniz)

ÇOCUK NÖROLOJİ DEĞERLENDİRMESİ

1)Yok 2)EEG normal 3)EEG bozuk nöbet yok 4)Nöbet öyküsü var
5)Diğer.....

İŞİTME DEĞERLENDİRMESİ: 1)Yok 2)Normal 3)İşitme kaybı.....

GENETİK TEST 1)Yok 2) Normal 3) Tanılı Genetik bozukluk

ÇOCUĞUN ŞU AN ALDIĞI TEDAVİLER (BİRDEN ÇOK İŞARETLEYİNİZ) :

1. Özel eğitim (devletin verdiği) 2. Özel eğitim (ailenin ekstra aldırıldığı)
3. Konuşma Terapisi 4. Duyu bütünleme 5. Diğer (.....)

Etkileşim Rehberliği Önerildi mi? 1. Evet 2. Hayır,

KANITA DAYALI UYGULAMALAR DIŞINDA TEDAVİ DENEMESİ:

1)Yok 2)Var. (Belirtiniz.....)

Değişiklik Gözlenmiş mi: 1-) Hayır 2-) Çok Az 3-) Kısmen 4-) Evet- Belirgin Fark

1) Sosyal etkileşim/iletişim eksikliği alanında, aşağıdakilerden üçünün görülmesi	Varsa işaretleyiniz
Sosyal emosyonel karşılıklılık verememe	
Anormal sosyal iletişim,	
Konuşmayı başlatma ve sürdürme yetersizliği,	
Duygu eksikliği	
Sözel iletişim kısıtlılığı	
Sözel olmayan iletişim kısıtlılığı,	

• Göz teması kısıtlılığı	
• Yüz ifadesi, jest, mimik ve beden postürü eksikliği,	
• Başkalarının sevincini, duygusunu anlamada eksiklik,	
• Sosyal duruma uygun farklı davranışlar sergilemede eksiklik,	
• Arkadaş edinme kısıtlılığı	
• Hayali oyun kısıtlılığı	
• İlgil alanı darlığı	
2) Kısıtlayıcı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ve etkinlikler (en az 2 kriter)	
• Bir veya daha fazla kısıtlayıcı tekrarlayıcı ilgil alanı ile aşırı uğraş	
• Bariz değişmez tutkulu, işlevsel olmayan rutin veya ritüellere bağlılık	
• Esneklik göstermeme	
• Tekrarlayıcı, stereotipik el, parmak hareketleri	
• Tüm bedeni kapsayan, motor mannerismler	
• Objelerin bir bölümü ile ilgilenme	
• Duyusal uyaranlara karşı aşırı ya da yetersiz tepki gösterme	
• Duyusal uyaranlarla olağandışı biçimlerde ilgilenme	

EK 5. OTİSTİK DAVRANIŞLARI KONTROL LİSTESİ

EK 1

ABC KAYIT FORMU

YÖNERGE: Çocuğu en iyi tanımlayan ifadenin karşısındaki sayıyı daire içine alınız. İfade çocuğu tanımlamıyorsa boş bırakınız.

	Duyusal	İlişki kurma	Beden ve nesne kullanımı	Dil becerileri	Sosyal ve öz bakım
Kendi etrafında uzun süre döner			4		
Basit bir işi öğrenir fakat çabucak unutur					2
Sosyal/çevresel uyaranlara çoğu zaman dikkat etmez		4			
Basit emirleri bir kere söylendiğinde yerine getirmez (otur, buraya gel, ayağa kalk gibi)				1	
Oyuncakları uygun şekilde kullanmaz (örn. tekerlekleri döndürür)			2		
Öğrenme sırasında görsel ayırt etmesi zayıftır (büyüklük, renk ya da pozisyon gibi bir özelliğe takılır kalır)	2				
Sosyal gülümsemesi yoktur		2			
Zamirleri ters kullanır (ben yerine sen)				3	
Belirli nesneleri bırakmamak için ısrar eder			3		
İşitmiyor gibi görünür, bu nedenle bir işitme kaybı olduğu kuşkusu uyandırır	3				
Konuşması detone ve aritmiktir				4	
Kendi kendine uzun süre sallanır			4		
Kendisine uzatıldığında kollarını uzatmaz (ya da bebekken uzatmazdı)		2			
Günlük programındaki/çevredeki değişikliklere aşırı tepkiler verir					3
Başka insanların arasındayken çağrıldığında kendi ismine tepki vermez (Ayşe, Can, Zeynep)				2	
Kendi etrafında dönme, parmak ucunda yürüme, el çırpma gibi davranışları keserek birden bağırır ve ani hareketler yapar			4		
Başka insanların yüz ifadelerine ve duygularına tepkisizdir		3			
“Evet” veya “ben” sözcüklerini nadiren kullanır				2	
Gelişimin bir alanındaki özel yetenekleri zeka geriliği kuşkusunu dışlar niteliktedir					4
Yer bildiren sözcükleri içeren basit emirleri yerine getirmez (“topu kutunun üstüne koy” ya da “topu kutunun içine koy” gibi)				1	
Bazen yüksek bir sese sağır olduğunu düşündürüncesine “ırkılma” tepkisi göstermez.	3				
Ellerini amaçsızca sallar			4		
Büyük öfke nöbetleri ya da sık sık küçük öfke nöbetleri geçirir					3
Göz temasından aktif bir şekilde kaçınır		4			
Dokunulmaya ya da tutulmaya karşı koyar		4			
Bazen, çürükler, kesikler ve iğne yapılma gibi acı verici uyaranlara hiç tepki vermez	3				
Gergin ve kucaklanılması güçtür (şimdi ya da bebekken)		3			
Kucaklandığında pelte gibidir (sarılmaz, tutunmaz)		2			
İsteddiği şeyleri göstererek elde eder				2	
Parmak uçlarında yürür			2		

Başkalarını ısırarak, vurarak, tekmeleyerek incitir				2
Cümleleri defalarca tekrarlar			3	
Oyun oynarken başka çocukları taklit etmez		3		
Gözlerine parlak bir ışık tutulduğunda genellikle gözlerini kırpmaz	1			
Başını vurarak, ellerini ısırarak kendine zarar verir			3	
İhtiyaçlarının hemen yerine getirilmesini ister, bekleyemez				2
İsmi söylenen beş nesneden daha fazlasını işaret ederek gösteremez			1	
Hiç arkadaşlık ilişkisi geliştiremez		4		
Bir çok sese kulaklarını kapatır	4			
Sık sık nesneleri döndürür, çevirir ve çarpar			4	
Tuvalet eğitimine ilişkin sorunları vardır				1
İsteklerini ve ihtiyaçlarını belirtmek için ya hiç konuşmaz ya da bir günde kendiliğinden kullandığı sözcük sayısı beşi geçmez.			2	
Çoğunlukla korkar ya da çok kaygılanır		3		
Gün ışığı karşısında gözlerini kısar, kaşlarını çatır ya da gözlerini kapatır	3			
Yardımsız kendisi giyinemez				1
Sesleri ya da sözcükleri sürekli tekrar eder			3	
Bakışları insanları “delip geçer”		4		
Başkalarının cümlelerini ya da sorularını tekrarlar			4	
Çoğunlukla çevresindekilerin ve tehlikeli durumların farkında değildir				2
Cansız şeylerle oynamayı ve zaman geçirmeyi tercih eder				4
Çevresindeki nesnelere dokunur, koklar ve/veya tadar.			3	
Yeni bir kişiyle karşılaştığında sıklıkla hiç bir görsel tepki vermez	3			
Nesneleri sıralama gibi karmaşık ritüeller içine girer			4	
Çok zarar vericidir, oyuncaklarını ve ev eşyalarını kısa zamanda kırar			2	
Gelişimsel gecikme belirtileri 30. ayda ya da daha önce ortaya çıkmıştır.				1
Gün içinde kendiliğinden, iletişimi başlatmak için kullandığı ifadelerin sayısı otuzu geçmez.			3	
Uzun süreler boşluğa bakar	4			
TOPLAM :				

EK 6. TEKRARLAYICI DAVRANIŞLAR ÖLÇEĞİ -REVİZE

TEKRARLAYICI DAVRANIŞLAR ÖLÇEĞİ-Revize (TEDÖ-R)

Çocuğun/Bireyin Adı: _____ No#: _____

Cinsiyeti: () kız () erkek Doğum Tarihi: ____ / ____ / ____ Doldurulduğu Tarih: ____ / ____ / ____

Değerlendirenin Adı: _____

Yönerge:

Lütfen aşağıda listelenen her bir maddeyi okuyarak ölçeği doldurduğunuz. Kişinin problem davranışları ne kadar sergilediğini en iyi şekilde betimleyen ifadeye ilişkin rakamı işaretleyiniz. Lütfen tüm maddeler için değerlendirme yapınız. Puanlamalarınızı son bir ay içerisinde bireye ilişkin gözlemlerinize ve bireyle etkileşimlerinize dayalı olarak gerçekleştiriniz. Her bir maddeyi puanlamak için aşağıdaki kutuda verilen tanımları kullanınız.

0 = davranış ortaya çıkmamaktadır.
1 = davranış ortaya çıkmaktadır ve hafif düzeyde sorun oluşturmaktadır.
2 = davranış ortaya çıkmaktadır ve orta düzeyde sorun oluşturmaktadır.
3 = davranış ortaya çıkmaktadır ve ağır düzeyde sorun oluşturmaktadır.

Her bir madde için puanlama yaparken şunları göz önünde bulundurunuz: (a) davranış ne sıklıkta ortaya çıkıyor (örn., haftada bir mi, saatte bir mi), (b) davranışı durdurmak ne kadar zor (örn., çok kolay yeniden yönlendirilebiliyor mu, yoksa durdurulduğunda sinirleniyor mu) ve (c) davranış devam eden etkinlikleri ne kadar kesintiye uğratiyor (örn., görmezden gelinmesi kolay mı, yoksa tamamen etkinliği bozuyor mu).

I. Stereotipik Davranış Alt Ölçeği

(TANIM: benzer şekilde tekrarlanan amacı olmayan hareketler veya eylemler)

		Yok	Hafif Düzey	Orta Düzey	Ağır Düzey
1	TÜM VÜCUT (Tüm vücuduyla öne arkaya sallama, tüm vücuduyla sağa sola sallanma)	0	1	2	3
2	BAŞ (Başını sağa sola döndürme; başını öne arkaya sallama (evet-hayır gibi); başını çevirme)	0	1	2	3
3	EL / PARMAK (Ellerini sallama, Parmaklarını şıklatma veya kıvrırma; ellerini çırpma; elini veya kolunu sallama veya silkeleme)	0	1	2	3
4	HAREKET (Daire çizerek dönme; kendi etrafında dönme; zıplama; hoplama)	0	1	2	3
5	NESNE KULLANIMI (Nesneleri çevirme veya döndürme; nesneleri elinde çevirme veya nesneyi vurma veya fırlatma; nesnenin elinden düşmesine izin verme)	0	1	2	3
6	DUYUSAL (Gözlerini kapatma; ellerine veya nesnelere yakından bakma veya gözünü dikme; kulaklarını kapatma; nesneleri koklama veya nesnelerin kokusunu içine çekme; yüzeyleri ovalama)	0	1	2	3

II. Kendine Zarar Verme Davranışları Alt Ölçeği

(TANIM: benzer şekilde tekrarlanan; vücutta kırmızılık/morarma, zedelenme veya diğer türlü yaralanmaya neden olma ihtimali olan hareketler veya eylemler)

		Yok	Hafif Düzy	Orta Düzy	Ağır Düzy
7	KENDİNE VURMA (Başına, yüzüne veya vücudunun diğer bir parçasına vurma ya da tokat atma)	0	1	2	3
8	KENDİSİNİ BİR YERE VEYA NESNEYE VURMA (Başını veya vücudunun bir bölümünü masaya, yere veya diğer bir yüzeye vurma ya da çarpma)	0	1	2	3
9	KENDİNE BİR NESNEYLE VURMA (Başına veya vücudunun diğer bir bölümüne nesne ile vurma ya da çarpma)	0	1	2	3
10	KENDİNİ ISIRMA (Elini, bileğini, kolunu, dudaklarını veya dilini ısırma)	0	1	2	3
11	ÇEKME (Saçını veya derisini çekme)	0	1	2	3
12	KENDİSİNİ OVALAMA, TIRNAKLAMA YA DA KAŞIMA (Kollarında, bacağında, yüzünde veya gövdesinde belli noktaları ovalama, tırnaklama ya da kaşıma)	0	1	2	3
13	PARMAĞINI VEYA NESNEYİ SOKMA (Gözüne parmak sokma, kulağına parmak sokma ya da gözüne veya kulağına bir nesne sokma)	0	1	2	3
14	DERİSİNİ YOLMA (Yüzündeki, ellerindeki, kollarındaki, bacaklarındaki veya gövdesindeki deriyi yolma)	0	1	2	3

III. Kompulsif (Zorlantılı) Davranışlar Alt Ölçeği

(TANIM: bir kurala göre sergilenen veya tekrar edilen davranış, “belli bir sıraya” göre yapılan şeyleri de içerebilir)

		Yok	Hafif Düzy	Orta Düzy	Ağır Düzy
15	DÜZENLEME / SIRALAMA (Belirli nesneleri belirli bir örüntüye göre düzenleme / yerleştirme; nesnelerin düz veya simetrik olmasına gereksinim duyma)	0	1	2	3
16	TAMAMLAMA / BÜTÜNLÜK (Kapıların kapalı veya açık olmasına gereksinim duyma; bütün nesneleri bir kap ya da alanın dışına çıkarma)	0	1	2	3
17	YIKAMA / TEMİZLEME (Vücudun belirli bölümlerini aşırı şekilde temizleme; kıyafetlerdeki pamukları veya dökülmüş iplikleri toplama)	0	1	2	3
18	KONTROL ETME (Kapıları, pencereleri, dolapları, elektronik aletleri, saatleri, kilitleri, vb. tekrarlı şekilde kontrol etme)	0	1	2	3
19	SAYMA (Nesneleri sayma; belirli bir sayıya kadar veya belirli bir şekilde sayma)	0	1	2	3
20	SAKLAMA / BİRİKTİRME (Belirli nesneleri toplama, biriktirme ya da saklama)	0	1	2	3
21	TEKRAR ETME (Rutin etkinlikleri tekrar etmeye gereksinim duyma; içeri girme / dışarı çıkma, merdiveni tırmanma / inme, kıyafetlerini giyme / çıkarma)	0	1	2	3
22	DOKUNMA / HAFİFÇE VURMA (Nesneler, yüzeylere veya insanlara dokunma, hafifçe vurma veya ovalama)	0	1	2	3

IV. Törenselle Davranışlar Alt Ölçeği

(TANIM: günlük yaşam etkinliklerini benzer şekilde gerçekleştirme)

		Yok	Hafif Düzel	Orta Düzel	Ağır Düzel
23	YEMEK YEME/YEMEK ZAMANI (Sadece belirli şeyleri yeme / içme konusunda şiddetli şekilde ısrarcı olma, sadece belirli şeyleri yemeyi / içmeyi tercih etme; belirli bir sıraya göre yiyecekleri yeme veya içecekleri içme; yemek yeme ile ilgili materyallerin belirli bir biçimde yerleştirilmesi konusunda ısrarcı olma)	0	1	2	3
24	UYUMA / UYKU ZAMANI (Belirli uyku öncesi rutinlerde ısrarcı olma; uyumadan önce odadaki nesneleri belirli bir sıraya / kurala göre düzenleme; uyurken belirli nesnelerin yanında olması konusunda ısrarcı olma; uyumadan önce veya uyurken diğer bir kişinin yanında olması konusunda ısrarcı olma)	0	1	2	3
25	ÖZ-BAKIM – BANYO ve GİYİNME (Banyoyu kullanma, yıkanma, duş alma, banyo yapma veya giyinmeyle ilişkili etkinlikler veya becerilerin belirli bir sırada olması konusunda ısrarcı olma; banyodaki nesneleri belirli bir şekilde düzenleme veya banyodaki nesnelerin yerinin değiştirilmemesi konusunda ısrarcı olma; belirli kıyafetleri giyme konusunda ısrarcı olma)	0	1	2	3
26	ULAŞIM / YOLCULUK (Belirli rotayı / yolu takip etme konusunda ısrarcı olma; araçlarda belirli bir yerde oturmaya gereksinim duyma; yolculuk sırasında belirli nesnelerin, örn., oyuncak veya materyal, yanında olması konusunda ısrarcı olma; yolculuk sırasında işaretler veya mağazalar gibi belirli şeyleri veya yerleri görmek veya onlara dokunmak konusunda ısrarcı olma)	0	1	2	3
27	OYUN / BOŞ ZAMAN (Belirli oyun etkinlikleri konusunda ısrarcı olma; oyun / boş zaman etkinlikleri sırasında kalıplaşmış bir rutini takip etme; oyun / boş zaman etkinlikleri sırasında belirli nesnelerin olması / erişilebilir olması konusunda ısrarcı olma; oyun sırasında diğer kişilerin belirli şeyler yapması konusunda ısrarcı olma)	0	1	2	3
28	İLETİŞİM / SOSYAL ETKİLEŞİMLER (Sosyal etkileşimler sırasında aynı konuyu / konuları tekrar etme; tekrarlı sorular sorma; sohbet sırasında belirli konularda konuşulmasında ısrarcı olma; etkileşimler sırasında diğerlerinin belirli şeyler söylemesi ve belirli şekilde tepkide bulunması için ısrarcı olma)	0	1	2	3

V. Aynılık/Tekdüzelik Davranışları Alt Ölçeği

(TANIM: değişime direnç, nesnelerin/olayların vb. aynı kalması konusunda ısrar etme)

		Yok	Hafif Düzel	Orta Düzel	Ağır Düzel
29	Nesnelerin (örn., oyuncaklar, araç-gereçler, mobilyalar, fotoğraflar, vb.) aynı yerde kalması konusunda ısrarcı olma	0	1	2	3
30	Yeni yerleri ziyaret etmeye itiraz etme	0	1	2	3
31	Yaptığı şey kesintiye uğratıldığında mutsuz olma	0	1	2	3
32	Belirli bir örüntü ile yürüme (örn., düz bir çizgide) konusunda ısrarcı olma	0	1	2	3
33	Aynı yerde oturmak için ısrarcı olma	0	1	2	3
34	Çevresindeki kişilerin görünümünde veya davranışlarındaki değişikliklerden hoşlanmama	0	1	2	3
35	Belirli bir kapıdan geçmek için ısrarcı olma	0	1	2	3
36	Aynı CD, teyp, kayıt veya müzik parçasının sürekli çalınmasından hoşlanma; aynı film/video veya bir film/videonun bir parçasından hoşlanma	0	1	2	3
37	Etkinliklerin değiştirilmesine direnç gösterme; sınıf içindeki etkinlikler ya da ortamlar arasındaki geçişlerde zorluk yaşama	0	1	2	3
38	Her gün aynı rutin, ev işi, okul veya iş akışı / programı konusunda ısrarcı olma	0	1	2	3
39	Belirli şeylerin belirli zamanlarda gerçekleşmesi konusunda ısrarcı olma	0	1	2	3

VI. Sınırlı Davranışlar Alt Ölçeği

(TANIM: sınırlı ilgi alanına (etkinlik, oyun vb.) sahip olma)

		Yok	Hafif Düzy	Orta Düzy	Ağır Düzy
40	Tek bir konu veya etkinliğe (örn., trenler, bilgisayarlar, hava durumu, dinozorlar) düşünün olma veya tek bir konu veya etkinlikle meşgul olma ya da ilgilenme	0	1	2	3
41	Belirli bir nesneye güçlü bir şekilde bağlı olma	0	1	2	3
42	Nesnenin tamamı yerine bir parçasıyla / bazı parçalarıyla (örn, kıyafetlerin düğmeleri, oyuncak arabaların tekerlekleri) meşgul olma ya da ilgilenme	0	1	2	3
43	Hareket eden şeylerle / hareketlerle meşgul olma ya da ilgilenme, hareket eden şeylere / hareketlere (örn., pervane ya da saat vb.) düşünün olma	0	1	2	3