

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**OTİZM BULGUSU GÖSTEREN BİREYLERDEKİ  
GENETİK DEĞİŞİKLERİN  
KLASİK SİTOGENETİK VE FMR1 SİZİNG PCR  
YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI**

**Dr. Abdullah İhsan GÜRLER**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2013**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**OTİZM BULGUSU GÖSTEREN BİREYLERDEKİ  
GENETİK DEĞİŞİKLERİN  
KLASİK SİTOGENETİK VE FMR1 SİZİNG PCR  
YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI**

**Dr. Abdullah İhsan GÜRLER**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN**

**ESKİŞEHİR  
2013**



## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren saygılı hocalarım Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a, Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS'a ve Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e; bölümümüzde birlikte çalıştığım meslektaşlarım Araş. Gör. Dr. Fatih CELAYİR'e, Araş. Gör. Dr. Zafer YÜKSEL'e, Uzm. Dr. Kadri KARAER'e, çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Halime KÜÇÜK'e, Uzm. Bio. Ebru ERZURUMLUOĞLU'na; tezimin projelendirilmesinde yardımcı olan Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Koordinatörü Doç. Dr. Mahmut YAVUZ ve saygıdeğer üyelerine; olguların değerlendirilmesi ve yönlendirilmesinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. S. Tülin FİDAN'a; yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

**Gürler A.İ. Otizm bulgusu gösteren olgularda genetik değişikliklerin klasik sitogenetik ve FMR1 Sizing PCR yöntemi ile ortaya konması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012.** Yaygın gelişimsel bozukluk (YGB), erken çocukluk döneminde başlayan ve yaşam boyu devam eden, yaş ilerledikçe klinik bulgularda değişiklikler gösteren, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili komplike bir nörogelişimsel bozukluktur. Günümüzde YGB taramasında yüksek rezolusyonlu sitogenetik analizler ile Frajil X testi algoritmanın ilk aşamaları olarak uygulanmaktadır. Çalışmamızda, Eskişehir bölgesinde YGB tanısı alan toplam 80 olguda kromozom anomalileri ile FMR1 genindeki CGG tekrar sayılarının ortaya konması, bu yöntemlerin tanısal amaçlı kullanılabilmesi, elde edilen veriler ile sitogenetik ve moleküler etiyojinin aydınlatılmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Çalışmamızda üç olguda (%3.75) 45,XY,rob(13;14)mat, 46,XX,invdupdel(8) ve 46,XY, inv(X)(p22q22)mat kromozom kuruluşları saptanmış olup kromozom anomali oranı literatür ile benzerlik göstermiştir. Ancak 45,XY,rob(13;14)mat kromozom anomalisinin, yüksek sıklıkta gözlenen Robertsonian translokasyonu olması nedeniyle OSB ilişkili anomali olarak değerlendirilmemiştir. Diğer iki yapısal kromozom anomalisinin kırık noktaları ve olguların fenotipik özellikleri değerlendirilmiştir. Frajil X sendromu, YGB ile en sık bağlantı gösteren genetik sendromlardan biri olup YGB olgularının %1-3'ünün frajil X sendromu olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda FMR1 geni taramasında CGG premutant veya mutant olguya rastlanmamıştır. Sonuç olarak, kromozom anomali saptanan YGB olgularında ailelerin taranması ve genetik danışma verilmesi çalışmamızın önemli bir sonucudur.

Anahtar Kelimeler: Yaygın Gelişimsel Bozukluk, Otizm, Klasik Sitogenetik Analiz, FMR1 Sizing PCR Yöntemi, FMR1 Geni, Frajil X Sendromu

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje No 2011-11036

## ABSTRACT

**Gürler A.İ. Investigating genetic alterations in autistic children using conventional cytogenetic and FMR1 sizing PCR techniques. Eskişehir Osmangazi University Medicine Faculty Medical Genetics Department Speciality in Medicine Thesis, Eskişehir, 2012.** Pervasive Developmental Disorders (PDD) is a disorder which has an onset in early childhood and time-varying symptoms proceed for a lifetime, is complicated with cognitive and neurodevelopmental disturbances. High resolution cytogenetic analysis methods and Fragile X testing is being performed as a first-step approach for PDD diagnosis in genetic clinics. In our study, we included 80 PDD cases to investigate genetic disturbances in karyotypes and to detect CGG repeats in FMR1 gene. We aimed to assess whether these methods could be used for diagnosis and to find a better understanding together with the data of this study. In our study, we found three abnormal karyotypes 45,XY,rob(13;14)mat, 46,XX,invdupdel(8) and 46,Y,inv(X)(p22q22)mat - among 80 cases (3.75%) which has similar rates with the published data. However 45,XY,rob(13;14) karyotype was not associated with PDD phenotype as being a relatively common robertsonian translocation. Breakage points and phenotypic features of other two abnormal karyotypes were assessed. Fragile X syndrome is one of the most common disorders associated with PDD with rates of 1-3%. In our study we didn't find any premutant nor mutant case for FMR1 CGG expansions among 80 cases. In conclusion, our study supports that it is important to screen families with chromosome abnormalities and to provide appropriate genetic counseling for them.

**Key Words:** Pervasive Developmental Disorders, Autism, Conventional Cytogenetic Analysis, FMR1 Sizing PCR Method, FMR1 Gene, Fragile X Syndrome

**Supporting Institutions:** Eskişehir Osmangazi University Scientific Research

Projects Commissionary, Project No: 2011-11036

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tarihiçesi	4
2.2. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Yaygınlığı	4
2.3. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Klinik Özellikleri	5
2.3.1. Sosyal Etkileşimde Bozulma	6
2.3.2. İletişimde Bozulma	6
2.3.3. Tekrar Eden ve Basmakalıp Davranışlar	7
2.3.4. Diğer Bulgular	7
2.4. Yaygın Gelişimsel Bozukluktaki Fenotipler	8
2.5. Yaygın Gelişimsel Bozuklukla Bağlantılı Tek Gen Hastalıkları	11
2.6. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı	17
2.7. Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Tanı Ölçekleri	19
2.8. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Genetiği	20
2.8.1. Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler	21
2.8.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri	22
2.8.3. Metabolik Durumlar	24
2.8.4. Otizmin Diğer Nedenleri	25
2.9. Frajil X Sendromuna Yönelik FMR1 Sizing PCR Yöntemi ile Fragman Analizi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hasta Grubu	28



	Sayfa
3.2. Gereçler	28
3.2.1. Kullanılan Aletler	28
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.3. Yöntemler	30
3.3.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntemi	30
3.3.2. Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	31
3.3.3. Fragile X Sizing PCR Kiti (Abbott) ile Fragman Analiz Yöntemi	32
3.3.4. Ürünlerin Fragman Analizi İçin Cihaza Yüklenmesi	34
3.3.5. Sonuçların Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1. Olguların Demografik Özellikleri	35
4.2. Olguların Klinik Özellikleri	35
4.3. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı Almış Olgularda Saptanan Kromozomal Anomaliler	38
4.4. FMR1 Geninin Sizing PCR Yöntemi ile Fragman Analizi	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	Otizm Davranış Kontrol Listesi
aCGH	Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
ADI-R	Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş
ADOS	Otizm Tanı Gözlem Programı
AEİ	Anti Epileptik İlaçlar
AGAT	L-arjinin:glisin amidinotransferaz
AOB	Atipik Otistik Bozukluk
AS	Asperger Sendromu
ASDI	Asperger Sendromu Tanı Görüşmesi
ASSQ	Otizm Spektrum Tarama Anketi
BAC	Bakteriyel Yapay Kromozom
CARS	Çocukluk Çağı Otizm Ölçeği
CAST	Çocukluk Çağı Asperger Sendromu Testi
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
DB	Dezintergatif Bozukluk
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DSM	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı
DSM-IV-TR	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. baskının metin düzeltmesi
EEG	Elektroensefalografi
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FKÜ	Fenilketonüri
GAMT	Guanidino Asetat Metil Transferaz
GARS	Gilliam Otizm Skorlama Ölçeği
GTG	Tripsin ile G-bantlama ve Giemsa ile boyama
KES	Kreatin Eksikliği Sendromları
KSD	Kopya Sayısı Değişiklikleri
LKS	Landau-Kleffner sendromu
M-CHAT	Yürüme Çağında Olan çocuklarda Otizm Kontrol Listesi-modifiye edilmiş
MMR	Kızamık Kabakulak Kızamıkçık

MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF1	Nörofibromatozis 1
OB	Otistik Bozukluk
ODÖ	Otizm Dismorfoloji Ölçümü
OSB	Otizm Spektrum Bozukluklar
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
SLOS	Smith-Lemli Opitz Sendromu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TSK	Tüberoz Sklerozis Kompleksi
WAGR	Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon
YGB	Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
YGB-BTA	Yaygın Gelişimsel Bozukluk - Başka Şekilde Sınıflandırılmamış
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
ZB	Zeka Bölümü

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. <i>FMR1</i> geni CGG tekrar özet görünümü	13
4.1. 38 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XX normal çıkan kız olguya ait görüntü.	39
4.2. 1 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 45,XY,rob(13;14)mat çıkan erkek olguya ait kromozom analiz görüntüsü.	40
4.3. 35 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XX,invdupdel(8)çıkan kız olguya ait kromozom analiz görüntüsü.	41
4.4. 48 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XY,inv(X)mat çıkan erkek olguya ait kromozom analiz görüntüsü.	42
4.5. 54 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, <i>FMR1</i> geninde tekrar sayısı 29 olan erkek olguya ait fragman analizi görüntüsü.	43
4.6. 30 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, <i>FMR1</i> geninde tekrar sayıları sırasıyla 20 ve 29 olan heterezigot normal kız olguya ait fragman analizi görüntüsü.	44
4.7. 58 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, <i>FMR1</i> geninde tekrar sayısı 29 olan homozigot normal kız olguya ait fragman analizi görüntüsü.	44

**TABLÖLAR**

	Sayfa
3.1. Bir PCR reaksiyonu için gerekli ürünler ve miktarları	32
3.2. FMR1 sizing PCR için PCR şartları	33
3.3. FMR1 sizing PCR için temizleme şartları	33
3.4. FMR1 sizing PCR için Formamid ve ROX eklenmesi	34
3.5. Formamid ve ROX eklenmesi sonrası PCR işlemi	34
4.1. Çalışmamıza dahil olan olguların cinsiyet dağılımları	35
4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom Analiz Sonuçları, CGG Tekrar Sayıları ve DSM-IV-TR'ye Göre Konulan Tanıları	36
4.3. Anormal Kromozom Kuruluşu Saptanan Olguların Tanı ve Dismorfik Özellikleri	38
4.4. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozom Anomalileri	39
5.1. invdupdel(8) Kromozom Anomalisiyle İlgili Literatür Karşılaştırması	48
5.2. <i>FMR1</i> Gen Mutasyonu ile İlgili Literatür Karşılaştırması	51

## 1. GİRİŞ

Otizm, erken çocukluk döneminde başlayan, yaşla birlikte klinik bulgularında değişiklikler görülebildiği, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili yaşam süresince devam eden, karmaşık bir nörogelişimsel bozukluktur (1). Otizmin temel özellikleri sözlü ve sözsüz iletişim bozuklukları, sosyal ilişkide bozulma, tekrar eden basmakalıp davranış örüntüsü, dil ve iletişim bozukluğu ve kısıtlı ilgi alanı şeklindedir. Klinik olarak heterojen bir grup olan bu durum "otizm spektrum bozukluklar / yaygın gelişimsel bozukluklar" (OSB/YGB) olarak adlandırılmaktadır. Otizmin etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, çevresel faktörler ile tetiklenebilen bir genetik yatkınlık durumunun olduğu düşünülmektedir (2). Otizm ile ilgili tek bir biyolojik veya klinik bulgu olmadığı gibi, hastalığın ortaya çıkmasında da tek bir genin sorumlu olmadığı düşünülmektedir.

YGB tanısı alan 2-3 yaşlarındaki çocukların yaklaşık %25'i sonradan konuşmaya ve iletişim kurmaya başlamaktadır ve 6-7 yaş itibarı ile normal okul popülasyonuna değişen derecelerde devam etmektedirler. Geriye kalan %75 ise ömür boyu ailevi ve sosyal destek gerektiren engellere sahip olmaktadır (3). Otizmliler çocukların çoğunda belirtiler 18 - 24 ay arasında ortaya çıkar ve yaklaşık olarak %30'u başlangıçta gerileme eğilimindedir (4). YGB tanısı alan çocukların yaklaşık %25'inde nöbet görülür (5) ve ortalama %50-70'i sözel olmayan ZB (Zeka Bölümü) testlerinde entelektüel açıdan yetersiz olarak görülmektedir (6).

Yaygın gelişimsel bozukluk bulgusu gösteren hastalarda tanı amaçlı kullanılan testlerden hiçbiri yeterince özgül değildir ve bu testler genellikle 18 ayını geçmiş çocuklarda kullanılabilir. Kullanılan testler bu dönemde genellikle önemi olan sosyal gelişim ve sosyal çevreyle uyumun değerlendirilmesi üzerine yapılandırılmıştır (7). Günümüzde 18 ayın altındaki çocuklarda da uygulanabilecek, otizme özgül tarama testlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Yapılan bu özgül tarama testleriyle otizmden şüphe duyuluyorsa, bu konuda daha ileri gelişimsel ve bilişsel değerlendirme yapılması gerekmektedir (8).

Dünya çapında otizm tanısı koymak için standart olarak Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. baskının metin düzeltmesindeki (DSM-IV-TR) tanı kriterleri kullanılmaktadır (9). Bu güne kadar beş alt grup Otistik bozukluk

(OB), Asperger Sendromu (AS), Dezintegratif Bozukluk (DB), Rett Sendromu ve Yaygın Gelişimsel Bozukluk-Başka Türü Adlandırılmayan (YGB-BTA)] olarak tanımlanmıştır (9). Bir çocuğun YGB tanısı alması için 3 yaşından önce sosyal etkileşim, sosyal iletişimde kullanılan dil veya sembolik oyunlarda ve basmakalıp motor hareketlerde anormallikler veya kısıtlı ilgiye sahip olması şeklinde anormallikler göstermesi gerekmektedir. Otizm yüzlerce nörolojik temelli sendrom ile birlikte bildirilmiştir. Bunlardan en çok bilinen Rett Sendromudur ve 2006'da moleküler tanısının konmasıyla birlikte birçok etiyojolojiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde otizm tanısı alan bireylerin yaklaşık %15-20'sinin etiyojijisi tanımlanabilmektedir (11).

İkiz ve aile çalışmaları otizmin genetik temelini ortaya koymada önemlidir ve bu konuda yapılan çalışmalarda genetik geçişin %90'ın üzerinde olduğu bildirilmiştir (12). Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi, YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde kromozom anöploidilerini ortaya koymaktadır. Diğer bir %3-5'lik kısım ise FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) teknikleri kullanılarak tanımlanabilmektedir. Eşlik eden dismorfik bulguları olan otizimli çocuklarda çoğunlukla dengesiz kromozom anomalileri bulunmaktadır (13). Otizmde hemen hemen her kromozomda, kromozom anomalisi tanımlanmasına rağmen, 7q, 2q ve 15q gibi bazı kromozomal bölgesindeki delesyon/ duplikasyonlar öne çıkmakta (14), otizm genleri için muhtemel lokusları içerir gözükmektedir (15)

Frajil X sendromu mental retardasyon nedenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, kalıtsal mental retardasyonlar arasında ise ilk sırada yer alan üçlü tekrar dizisi hastalıklarındandır. Ayırt edici klinik özellikleri; uzun yüz, belirgin çene, büyük malforme kulaklar ve makroorşidizmdir. (16). Frajil X sendromlu çocukların yarısında en azından göz temasından kaçınma, konuşma gecikmesi, tekrarlayıcı davranışlar, uyku bozuklukları, öfke nöbetleri, kendine zarar verme, hiperaktivite, düşünmeden hareket etme, dikkatsizlik ve sese duyarlılık gibi bazı otistik davranışlar görülmektedir. Yaygın gelişimsel bozukluk tanılı hasta olarak değerlendirilen olguların yaklaşık %1-3'ünün frajil X sendromu olduğu düşünülmektedir. Frajil X sendromuna neden olan *FMRI* gen mutasyonlarının %99' u, genin 5' UTR bölgesinde CGG tekrar sayısının artması ile meydana

gelmektedir. Frajil X sendromlu bireylerin %1 inde ise neden, *FMR1* geninde gözlenen delesyon veya nokta mutasyonlardır (17).

Günümüzde YGB'nin nedenlerinin belirlenmesinde algoritmanın ilk aşamasında yüksek rezolusyonlu sitogenetik analiz ile frajil X sendromuna yönelik test önerilmektedir. Çalışmamızda Eskişehir bölgesinde YGB tanısı olan olgulardaki kromozomal anomalilerin ve *FMR1* genindeki CGG tekrar sayılarının ortaya konması, sıklıklarının belirlenmesi, bu yöntemlerin tanısal amaçlı kullanılabilmesi, elde edilen veriler ile sitogenetik ve moleküler etiyojisinin anlaşılmasına katkıda bulunulması, ailelere gerekli genetik danışmanın verilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı 'na başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan, klinik ve dismorfik açıdan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'nde değerlendirilen toplam 80 olgunun periferik kan örneklerinde sitogenetik analiz ve *FMR1* geni CGG tekrar sayılarının belirlenmesinde Fragman analizi yöntemi uygulanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tarihçesi

Otizm, erken çocukluk döneminde başlayan, yaşla birlikte klinik bulgularda değişiklikler görülebilen, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili yaşam süresince devam eden, karmaşık bir nörogelişimsel bozukluktur.(1)

Otizm yaklaşık 60 yıl önce ilk olarak tanımlandıktan sonra bu hastalığı anlamamıza yardımcı olabilecek bir çok gelişime meydana geldi. İlk olarak Dr. Leo Kanner 1943 yılında 11 çocuğun davranışını tarif ettiği bir makalede ilk kez "otistik bozukluk " tanımını kullanmıştır (18). Otizm kelime olarak Yunanca'da *autos* (kendi) ve *ismos* (durum veya harekete ait bir ek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş ve ilk zamanlarda "otistik" kelimesi kullanılmış ve sonradan zamanla "otizm" ismine dönüşmüştür (19). 1970'lerde otizmin çocukluk çağı şizofrenisi olabileceği düşünülmüş ve etiyojisini araştırdıklarında majör kromozom anomalileri saptamışlar ve buna bağlı olarak ikiz ve aile çalışmaları ile genetik etkeni ortaya koymayı amaçlamışlardır. Toplam 21 ikizin dahil edilerek yapılan çalışmada en kapsamlı genetik verilere ulaşılmıştır. Özellikle ikiz çalışmalarında elde edilen verilerde genetik etkenin önemli rol oynadığının ortaya konmasına bağlı olarak psikojenik teoriler geçerliliğini yitirmeye başlamıştır (20).

### 2.2. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Yaygınlığı

Yaygın gelişimsel bozuklukluklarının tümü ile ilgili prevelans artış bildirimleri dünyanın çeşitli yerlerinden yapılmaktadır. Genel olarak literatür değerlendirmelerinde genel toplum prevelansının 4-5/10,000 (1/2000-1/2500) olduğunu tahmin edilmektedir (21).

Yakın zamanlı otizm epidemisi çalışmaları YGB insidansındaki artışın tam olarak gerçeği yansıtmadığını kabul etmektedir, bu artış tanı kriterinin genişletilmesiyle daha fazla vaka bulunmasına bağlanmaktadır (27).

Yaygın gelişimsel bozukluğundaki en büyük artışı bulan çalışmalar aynı zamanda bu çocuklarda düşük oranda rastlanan entelektüel yetersizliği de belirtmiştir (25). Bu durum daha hafif düzeyde dil bozulması ve saldırgan davranışla giden (hafif otistik belirti) yüksek fonksiyonlu çocukların çoğunun geçmişteki epidemiyolojik

izlemlerde sayılmadığını düşündürmektedir. Otizmle ilgili devam eden epidemiyolojik bir çalışma otizmdeki artışın ilerlemediğini göstermektedir. Söz konusu çalışma, daha erken yaşta tanı alanların ve daha hafif bulguları olanların dahil edilmesiyle oluşan artışın, mevcut artışın gerçek bir artış olabilme ihtimalini de belirtmiştir (28).

### **2.3. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Klinik Özellikleri**

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan çocukların klinikleri üç yaşına kadar gelişim göstermektedir. Süt çocukluğu döneminde genel olarak dokunulmayı veya kucaklanmayı sevmezler. Genellikle huzursuz olurlar ve zor yatıştırılırlar, yalnız kalma eğilimindedirler. Göz teması kurmada zorlanırlar ve göz teması onları rahatsız eder. YGB'li çocuklar genelde boşluğa bakmaktan hoşlanırlar. Uyku bozuklukları bu hastalarda sıkça rastlanır ve genelde bu durum ilk bir yılda fark edilir. Bunlara benzer erken bulgular görülmesine rağmen YGB 'li çocuklar genellikle konuşma gecikmesi belirgin oluncaya kadar yani ortalama ikinci yıldan sonra tıbbi açıdan değerlendirmeye alınırlar.(4)

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan olguların yaklaşık %30'u ilerleyici bir klinik seyir sergilerler. Bu olgularda başlangıçta konuşma normaldir fakat daha sonra konuşma ya yavaş yavaş ya da hızlı bir şekilde kaybolur. Sonrasında çocuk göz teması kurmaktan kaçınır ve kendisine adıyla seslenildiğinde cevap vermez. Bu durumlarda sağırliktan şüphelenip işitme testleri yapılır ve genellikle testler normal sonuçlanır. Tekrarlayıcı davranışlar ise erken dönemde veya çocuk üç/dört yaşına gelene kadar gelişebilir. Bu çocukların başlangıçta normal olduğu ve sonradan bazı dış etkenlere bağlı olarak hasta oldukları düşünülmüş ancak çocukların geçmişlerine yönelik yapılan çalışmalar, bu durumun nedeninin genetik olduğunu öne sürmüştür (29).

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan olguların yaklaşık %25'i iki/üç yaşında sonradan konuşmaya ve iletişim kurmaya başlamaktadır ve altı/yedi yaşlarında ise değişen derecelerde normal okul popülasyonuna katılmaktadır. Geriye kalan %75 ise ömür boyu ebeveyn, okul ve sosyal destek gerektiren engellere sahip olmaktadır. Konu ile ilgili sonuçların derlemelerini Howlin ve ark. (30), Seltzer ve ark. (31) ve Farley ve ark. (32) literatüre kazandırmışlardır. Bazı çalışmalara göre

otizmlilerin çocukların %5'ten daha azının tamamen iyileştiğini belirtmiştir; bununla birlikte tanı kriterinin genişletilmesi, daha az etkilenmiş çocukların dahil olması nedeniyle bu sayıyı artırmaktadır. 22 - 46 yaş arasında otizm tanısı alan ve ortalamaya yakın bilişsel yetenekleri olan erişkinlerin yaklaşık 20 yıllık takibi, bireylerin yarısının oldukça iyi olduğunu yarısının tam zamanlı veya yarı zamanlı işlerde çalıştığını ortaya koymuştur; bununla birlikte %12'sinin tek başına bağımsız, %56'sının ise ebeveynleri ile birlikte yaşadığını tespit etmiştir (32).

Yaygın gelişimsel bozukluk tam olarak sosyal etkileşimde bozulma, iletişimde bozulma ve tekrar eden ve basmakalıp davranışlar şeklinde üç temel belirti çerçevesinde tanımlanmıştır.

### **2.3.1. Sosyal Etkileşimde Bozulma**

Sosyal etkileşimde bozulma ile birlikte otizmliler dış dünyadan soyutlanırlar. Otizmliler diğer normal bireyleri anlayamaz, onları reddeder ve sıklıkla göz teması kurmaktan kaçınırlar. Ebeveynlerini nesne olarak kullanırlar ve istedikleri bir şeyi almak için onların üzerine çıkabilir, ellerini çekebilirler veya bir alet kullanıyormuş gibi ebeveynlerin ellerini nesnelerin üzerine yerleştirebilirler. Evde, kendi başına olmayı, kendi ile ilgilenmeyi, sıklıkla tekrarlayan aktiviteler yapmayı tercih ederler. Otizmliler çocuklar yaşatları ve kardeşleri ile arkadaşlık kurmada yetersiz olurlar. Okulda, sıklıkla diğer çocukları belli bir mesafeden izlemeyi tercih ederler. Bazı çocuklar sosyal etkileşime yanıt verir. Bazı otizmliler çocuklar sosyal etkileşim kurmayı isterler fakat ilk adımı atmakta zorlanırlar. Etkileşim kurmayı başaran çocuklar ise normal arkadaşlıkları ilerletmenin zorluğunu yaşarlar ve konuya dair algıları azdır(33).

### **2.3.2. İletişimde Bozulma**

Otizmliler çocuklar konuşma, vücut hareketleri veya yüz ifadesi ile karşılıklı iletişim geliştirmede başarısız olur. Hastalar karakteristik olarak göz teması kurmada ve ebeveyninin dikkatini yönlendirmede başarısız olur. Erken pragmatik beceriler sınırlıdır. Pragmatik becerilerdeki eksiklikler yaşam boyu devam eder ve hem dil hem de sosyal etkileşimi etkilemektedir. Erken çocukluk döneminde konuşma bütünlüğünün bozuk olduğu görülmüştür. Zeka geriliği olan veya ifade dilinden daha iyi algısal dile sahip olan çocuklara kıyasla otizmliler çocuklar bozulmuş algısal dile

sahiptir. Otizimli çocuk konuşmayı öğrendiğinde, ekolali, zamirleri tersine çevirme ve alışıksız olmayan çekimler ve tonlamalar içerebilen tekrarlayıcı konuşma sergiler. Tek kelimeyle ifadeler kullanarak konuşmaya başlayan tipik gelişimin aksine, otizimli çocuklar reklamlar, filmler veya başkalarının konuşmalarından yani dış dünyadan gördükleriyle oluşan bir tarz ile konuşmaya başlayabilirler. Otizimli çocuklar genellikle kelimelerin bilinen anlamını anlamaz. Karşılıklı konuşmayı devam ettirmek, sıra almak ve konuşulan kişilerin konularını anlatmasına müsaade etmek gibi durumları içeren bozukluklar, ifade edici konuşmada gelişim olmasına rağmen genellikle bu tür bozukluklar devam etmektedir (4).

### **2.3.3. Tekrar Eden ve Basmakalıp Davranışlar**

Otizimli çocuklar için genellikle tekrar eden ve basmakalıp davranışlar karakteristiktir. Süt çocukluğu döneminde genellikle ters ters bakabilir veya hiç hareket etmeden durabilirler. Yürümeye yeni başlamış otizimli çocuklar ise sayfa çevirme veya yalama gibi basmakalıp parmak hareketlerine sahip olabilir. Bütün vücudu ilgilendiren kendi etrafında dönmek ve ileri geri koşmak gibi tekrar edici hareketler de olabilir. Tekrar edici davranışlar sıklıkla yüzün bir kısmına doğru parmakları tutma ve onları yandan bakarak izleme gibi görsel bir bileşen içermektedir. Bu basmakalıp hareketlerin süresi değişmekle birlikte saatlerce devam edebilmektedir. Tekrar edici hareketlerin nedeninin bilinmemesine rağmen, sakinleştirici etkisi olduğu ve stres zamanlarında ortaya çıktığı görülmektedir. Bu tekrar durumu günlük hayatta aynılığın devamı ihtiyacının katı bir şekilde belirtilmesini yansıtmaktadır. Otizimli çocuklar olayların sırası, özenle seçilmiş kelimeler ve takip edilmesi gereken nesnelerin düzenlenmesi gibi özenle hazırlanmış durumlar geliştirebilir. Ebeveyn veya bakıcıların kendisinin tarif ettiği olaylar sırasına uymaması yatıştırılmaz taşkınlıklara sebep olabilir (7).

### **2.3.4. Diğer Bulgular**

Otizimli hastalar için belli başlı kıyafetleri dokusu nedeniyle giymek istemeyebilirler; fakat bunun tam tersine, yanma gibi gerçekten çok acı verici durumlar hiç beklenildiği gibi tepkiye yol açmayabilir, bunun yanında yüksek ve tiz sesler büyük rahatsızlıklara neden olabilir.

Yemek konusunda çok seçici olabilirler, belli yiyecekleri veya sadece belli restoranlardan olan yiyecekleri yemek gibi, bunun yanında yemek ve onların sunumu ile ilgili tuhaf davranışlar görülebilir.

Uyku problemleri olguların yaklaşık %60'ında görülebilmektedir; bunlarda gece hiç uyumama, uykuya dalmada zorlanma veya güne çok erken saat sabah 02:00'de başlama gibi sorunlar görülebilir.

Öfke nöbetleri, kendine zarar verme veya saldırgan davranışlar otizmlili hastanın rutin hayatında bir değişiklik ile ortaya çıkabilmektedir; istenmedik bir dokunuş veya hareket, istemedikleri bir şeyin yapılmasının istenmesi veya belli bir neden olmaksızın ortaya çıkabilir.

Otizmlili hastalarda erken dönemde topuk yürüyüşü, hipotoni, sakarlık ve iki tekerlekli bisiklet kullanmada zorluk gibi motor gelişim gecikmesi bulguları görülebilir. Tehlikenin farkında olmamaları nedeniyle, boğulma gibi nedenlerden dolayı ölüm tehlikesi geçirebilirler.

Otizmlili ergen veya genç erişkin hastaların yaklaşık %15'i kadarında hareketlerinin ortasında yavaşlama veya donma gibi belirgin hareket bozukluğu, öz bakım yeteneklerinde gerileme şeklinde katatoni sendromu geliştiği görülmüştür.

Otizmlili hastalarda obezite yaygın görülen fakat nedeni tam olarak belli olmayan bir komplikasyondur. Sebep olarak ilaç yan etkisi, pasif hayat tarzı ve saldırganlık gösterebilir korkusu ile yiyecekleri çocuklardan uzak tutmadaki zorluk gösterilebilir.

#### **2.4. Yaygın Gelişimsel Bozukluktaki Fenotipler**

Otizm içerisindeki klinik ve genetik heterojenitenin sıralanması girişiminde, araştırmacılar fenotipik özelliklerin (endofenotip veya biyobelirteçler) tanımlanmasına gidişat ve direk tedavi seçeneklerini öngörebilmesi açısından önem vermektedir (34). "*Endofenotip*" ve "*biyobelirteç*" terimleri nörofizyolojik, biyokimyasal, endokrinolojik, nöroanatomik ve bilişsel özelliklerin daha çok biyolojik kökenli olduğunu ve böylelikle davranışsal belirtilerden ziyade etiyolojik süreçler ile daha fazla ilişkili olduğunu belirtmektedir (35).

Küçük çocuklarda ZB sonuçları ile otistik psikopatoloji direk ilişkilidir. Uzun dönem sonuçları, uzun süreli çalışmalarda güçlü bir şekilde öngörülmektedir (30).

Geçmişte otistik çocukların sözel olmayan ZB sonuçlarına göre yaklaşık olarak %50-70'nin entelektüel açıdan yetersizlik olduğu değerlendirilmiştir (6). Fakat yakın zamandaki çalışmalarda ise bu oran daha düşük bildirilmektedir ve bu durumun YGB tanı ölçütlerinin kapsamının genişletilmesiyle AS ve daha hafif belirtileri olan çocukların OSB/YGB tanısı altında toplanması nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür (23).

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan çocukların yaklaşık dörtte biri nöbetler geçirmektedir. Bununla birlikte nöbet geçiren bu çocuklarda elektroensefalografik (EEG) anomalileri nöbet geçirmeyen çocuklara nazaran daha sık görülmektedir (5). Otizme ek olarak nöbet geçiren çocukların nöbetleri olmayan çocuklara göre daha düşük ZB ortalamasına, bununla birlikte daha kötü davranışsal ve sosyal iletişimde bozukluğa sahiptirler (36). Genel olarak otizmi olmayan normal popülasyonda, nöbetler tek başına gidişata dair duyarlı bir gösterge değildir. Bununla birlikte, nöbetlerin görülme sıklığı orta-ciddi entelektüel yetersizliği ve motor kusurları olan bireyler arasında daha yüksektir (37).

Yapısal beyin malformasyonları olan hastaların gidişatı genellikle daha kötüdür. Bu malformasyonlar MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme) radyolojik yöntem ile tanımlanmaktadır (38). Nöroradyologlar nedeni bilinmeyen OB ile birlikte komplike olmayan nöbet, ciddi entelektüel yetersizlik, majör anomaliler veya fokal nörolojik bulguları olan 77 çocuğu değerlendirdiklerinde, %40'ında en sık beyaz cevher sinyal anomalileri, ciddi dilate Virchow-Robin boşlukları ve yapısal temporal lob anomalileri gibi bazı problemlere sahip olduğunu rapor etmiştir (39). Nonsendromik otizmli çocuklardaki bu denli ağır patolojiler otizmde standart tanı testi olarak beyin MRG kullanımını desteklemektedir.

Otizm Dismorfoloji Ölçümü (ODÖ), bu konuyla ilgilenen genetikçi olmayan klinisyenlere rehberlik etmek amacıyla 12 başlık altında genel dismorfolojik değerlendirme için standart bir yöntem sağlamak amacıyla geliştirilmiştir (13). ODÖ'de değerlendirilen 12 başlık: boy; saç büyüme şekli; kulak yapısı, boyutu ve yerleşimi; burun büyüklüğü; yüz boyutu ve yapısı; filtrum; ağız ve dudaklar; dişler; el boyutu; parmaklar ve baş parmak; tırnaklar ve ayaklardır.

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan çocukların yaklaşık olarak %15-20'sinde belirgin bir şekilde görülen dismorfoloji, erken dönemde gelişmenin

bozulmuş olabileceğini gösteren güvenilir bir gösterge olarak otizmlilerde çocuklarda bulunmuştur (38). YGB'li olguların yaklaşık %81'inde tespit edilen dismorfolojik bulgular olgularda görülen kötü gidişatın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (sözel olmayan ZB<55). Olgularda belirgin bir şekilde görülen dismorfoloji varlığı erken dönemde yapılan davranışsal tedaviye kötü yanıtın en iyi göstergelerindedir (40).

Mikrosefali olarak adlandırılan baş çevresi ölçümlerinin 2. Persentilin altında olması YGB'li çocuklarda kötü gidişatın kuvvetli bir göstergesidir ve yaklaşık %5-15'inde görülmektedir (13). Makrosefali ise baş çevresinin 97. Persentilin üzerinde olmasıdır ve YGB'li çocukların yaklaşık olarak %30'unda görülmektedir. Hastanın gidişatı veya ZB skorlamaları ile ilişki bulunamamasına rağmen Lainhart ve ark. (41) ilk kelimelerin ortaya çıkmasında bir gecikme ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Genel dismorfolojik değerlendirme ve mikrosefali kullanılarak YGB karmaşık veya esansiyel olarak iki grupta tanımlanmaktadır (13). Esansiyel otizm, dismorfolojik bulguların bulunmaması ve mikrosefalinin yokluğu ile tanımlanmaktadır. YGB'li çocukların yaklaşık olarak %70-80'inde esansiyel otizm tanımlanmıştır. Esansiyel otizmlilerde çocukların kardeşlerinde otizm görülme olasılığı daha yüksektir ve çoğunlukla bu çocuklar erkektir. Esansiyel otizmlilerde çocukların aile hikayesine baktığımızda karmaşık otizmlilerde çocukların ailelerine nazaran daha çok otizm, alkolizm, depresyon gibi otizm ilişkili hastalıklı bireylere rastlanmaktadır. Karmaşık otizm dismorfolojik bulgulara ve/veya mikrosefalinin eşlik etmesi ile tanımlanmaktadır. YGB'li çocukların yaklaşık olarak %20-30'unda karmaşık otizm görülmektedir. Karmaşık otizmde, esansiyel otizmin tersine kızlarda daha sık görülür. Gidişatı daha kötüdür ve esansiyel otizme göre kardeşlerde görülme olasılığı daha düşüktür. Günümüzdeki mevcut tanı testleri kullanılarak karmaşık otizmlilerde çocukların yaklaşık %30'una otizm ile ilişkili bir sendrom veya kromozom bozukluğu tanısı konmaktadır (13). Esansiyel otizmi olan çocukların çoğunda gidişat kötü olsa da, karmaşık otizme göre esansiyel otizmde gidişatın daha iyi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte tanısal amaçlı testler kullanılarak net bir etiyolojik nedenin ortaya çıkarılmasında karmaşık otizme göre esansiyel otizmde daha fazla zorlanılmaktadır.

## 2.5. Yaygın Gelişimsel Bozuklukla Bağlantılı Tek Gen Hastalıkları

Frajlil X Sendromu., mental retardasyon nedenleri arasında görülme sıklığı olarak Down sendromundan sonra ikinci sırada, kalıtsal mental retardasyonlar arasında ise birinci sırada yer alan üçlü tekrar dizisi hastalıklarındandır. Karakteristik klinik özellikleri; Martin-Bell fenotipi olarak da tanımlanan uzun yüz, belirgin çene, büyük malforme kulaklar ve makroorşidizmdir. Eklemlerde artmış esneklik, mitral valv prolapsusu, şaşılık ve epilepsi diğer yaygın gözlenen bulgulardandır. Frajlil X' li erkeklerde mental retardasyon kadınlara göre daha şiddetlidir. Frajlil X li bireylerde hiperaktivite, dikkat süresinde kısalma, tekrar eden basmakalıp davranışlar, zayıf göz teması, dokunmaya karşı aşırı hassasiyet, sosyal ilişkilerde azalma ve anksiyete gibi davranışsal özellikler tanımlanmıştır (16).

Frajlil X sendromuna neden olan gen kromozom Xq27.3 de lokalize FMR1 geni dinamik mutasyonları ile delesyon/nokta mutasyonlardır. *FMR1* mutasyonlarının %99' u, genin 5' UTR bölgesinde CGG tekrar sayısının artması ile meydana gelmektedir. Frajlil X sendromlu bireylerin %1' inde ise neden, *FMR1* geninde gözlenen delesyon veya nokta mutasyonlardır.

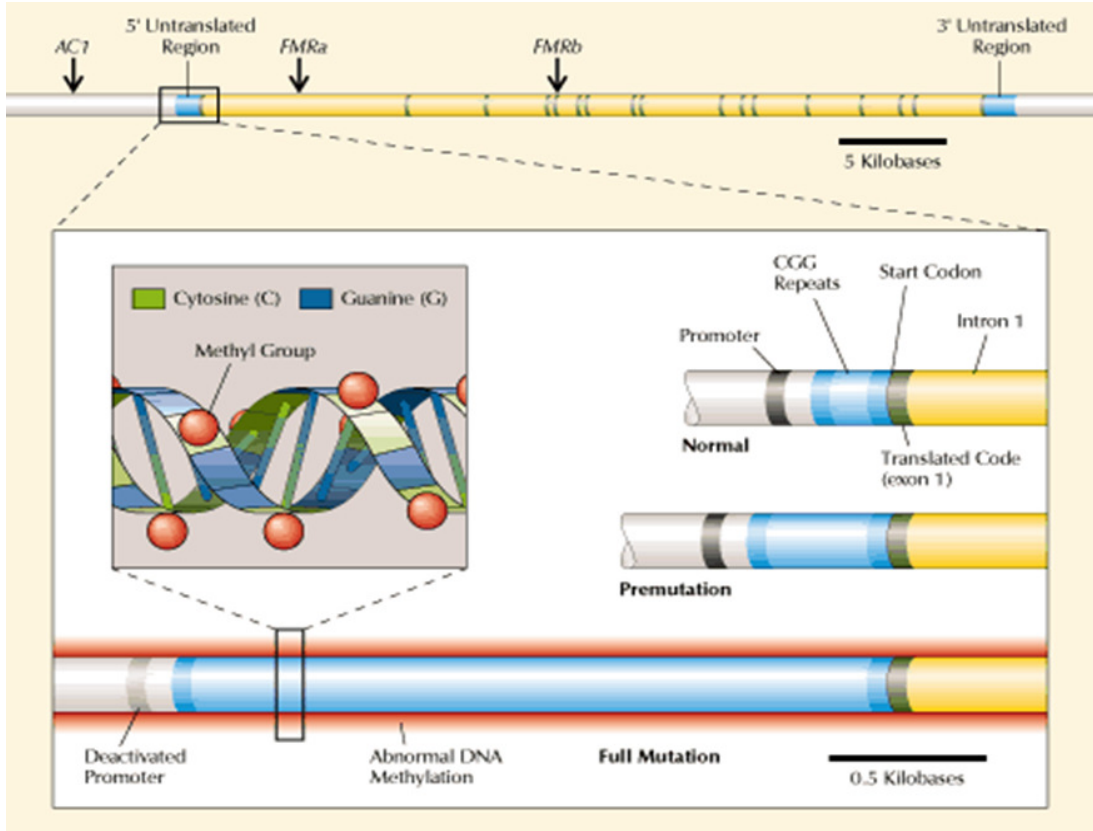
Normal bireylerde FMR1 geni 5' UTR bölgesi dizisinde CGG tekrar sayısı 6-54 arasındadır ve bunlar stabil olarak kuşaktan kuşağa aktarılmaktadırlar. Ancak eşit olmayan krosing-over veya kaymış hatalı baz eşleşmeleri nedeniyle CGG trinükleotid tekrar sayısında patolojik artışlar ortaya çıkmaktadır. Bireyde 55-200 CGG ise premutasyon eğer 200 CGG tekrarının üzerinde ise full mutasyon olarak adlandırılır. 200'ün üstündeki CGG tekrar sayısı *FMR1* geninin promotorundaki deoksisitozin rezidülerinin artmış metilasyonu ile birliktedir. Bu artmış metilasyon *FMR1* transkripsiyonunu azaltır veya baskılar ve sonuçta FMRP eksikliği ortaya çıkar. Tekrar dizisi ne kadar uzunsa stabilite o kadar azdır. CGG tekrar sayısı arttıkça premutasyonun tam mutasyona dönüşme riski artar. Premutasyonlar normal tekrar sayısının üzerinde, ancak frajilite oluşturacak düzeyde olmayan CGG tekrarlarıdır. Premutasyonlar stabil değildir. Premutasyon aleli anneden çocuğa geçiş sırasında tam mutasyona dönüşebilir, babadan geçişte tam mutasyona dönüşüm bildirilmemiştir. Premutasyonun tam mutasyona dönüşüm kadının oogenezi sırasında ortaya çıkmaktadır. Maternal premutasyon tekrarlarının boyutu, bir sonraki kuşaktaki tekrar boyutu ile pozitif korelasyon gösterir. Premutasyonlar metile



olmadığından premütasyon taşıyıcıları FMR1 RNA ve FMRP proteinini üretebilmektedir, bu sebeple bu kişilerde Frajil X sendromu gözlenmez. Ancak son yıllarda premütasyon ile ilişkili çeşitli fenotiplerin tanımlanması ile premütasyon taşıyıcılarının asemptomatik olmadığı gözlenmiştir. Genel popülasyonda premütasyon alellerinin prevalansı kadınlarda 1/259 iken, erkeklerde 1/813 olarak tespit edilmiştir. Frajil X premütasyon taşıyıcılarında FMRP ekspresyonu azalmasına rağmen mRNA düzeyleri çok yükselir. Azalmış translasyon oranına karşılık transkripsiyonel aktivitede artış gözlenmektedir. Transkripsiyonel aktivite artışı, bu fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olan RNA fonksiyon kazanımı mutasyonları sonucudur. Premütasyon taşıyıcılarında Frajil X tremor ataksi sendromu (FXTAS) olarak tanımlanan nörodejeneratif bir hastalık gözlenebilir. FXTAS ın moleküler mekanizması olarak fonksiyon kazanımına yol açan mutasyondan söz edilebilir. Artmış FMR1 transkript miktarı hücrel proteinlerin birikimine ve inklüzyonların oluşumuna sebep olmaktadır (RNA aracılı nörodejenerasyon). Premütasyon taşıyıcılarında gözlenen bir diğer hastalık ise prematur ovarian yetmezliktir. Frajil X sendromlu bireylerin %1 inde ise neden, tekrar dizisi artışı değil de *FMR1* geninde gözlenen delesyon veya nokta mutasyonlardır (42).

Yaygın gelişimsel bozukluklu hasta olarak değerlendirilen olguların yaklaşık %1-3'ü frajil X sendromu olduğu düşünülmektedir. Frajil X sendromlu çocukların yarısında en azından göz temasından kaçınma, konuşma gecikmesi, tekrarlayıcı davranışlar, uyku bozuklukları, öfke nöbetleri, kendine zarar verme, hiperaktivite, düşünmeden hareket etme, dikkatsizlik ve sese duyarlılık gibi bazı otistik davranışlar görülmektedir (17).

*Frajil X Mental Retardasyon 1 (FMR1) Geni;* *FMR1* geni Xq27.3 de yerleşmiş 17 ekzonlu 38 kb genişliğinde bir gendir. Protein ürünü frajil X Mental Retardasyon Proteini (FMRP) dir (42).



Şekil 2.1. *FMR1* geni CGG tekrar özet görünümü (Penagarikano ve ark., 2007)

*FMR1* geni metilasyonu, doğrudan ya da dolaylı olarak gen aktivasyonunu baskılar. Doğrudan, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önler, dolaylı olarak ise kromatin kondensasyonunun uyarılmasını sağlayarak transkripsiyon düzeneğinin bağlanmasını önler. Yapılan çalışmalarda *FMR1* geninin hem CGG tekrarlarının hem CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile transkripsiyonunun baskılandığı gösterilmiştir. Metilasyon ve bunu takiben genin inaktivasyonu embriyogenez sırasında, fertilizasyondan sonra meydana gelir.

*Frajl X Mental Retardasyon Proteinin (FMRP) Özellikleri;* *FMR1* geninin ürünü olan FMRP birçok dokuda görülürken, en çok nöronlarda ve testiste ifade olmaktadır. FMRP özellikle sitoplazmada yerleşmiştir. FMRP heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP) olarak bilinen RNA- bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. FMRP nöronlarda mRNA taşınmasında ve translasyonunda yer alan messenger ribonucleoprotein (mRNP) kompleksini oluşturur. (17)

*Frajl X Sendromunda Tanı;* Hastalığın tanısı, klinik açıdan tipik bulgular her zaman bulunmadığından sitogenetik ve moleküler yöntemlerle konulmaktadır.

Şüphelenilen olgularda hem X kromozomundaki farjil bölgeyi görmek hem de başka sitogenetik nedeni ortadan kaldırmak için sitogenetik analiz yapılır. Sitogenetik incelemede Folik asitsiz hücre kültür sonrası elde edilen metafazlarda Xq27.3 bölgesinde kondense olmayan, boya almayan veya kırık olan alan frajil bölge olarak değerlendirilir. Ancak sitogenetik çalışma, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların olması nedeniyle, güvenilir tanı için moleküler tanı yöntemleri ile desteklenmelidir. Southern Blot analizi Frajil X tanısı için altın standart olarak tanımlanır. Premutasyon ve mutasyon alellerini ayırt edebilir ve metilasyon durumu hakkında bilgi verebilir. Tam mutasyon ve premutasyon için mozaik olan bireyler bu yöntem ile taranabilir. Southern Blot analizinin dezavantajları; tekrar sayısı hakkında tam bilgi vermemesi, pahalı, zor ve zaman alıcı bir yöntem olmasıdır . PCR e dayalı yöntemler de Frajil X taraması için kullanılabilir. PCR ın Southern Blot analizine göre avantajları, daha hızlı tanı konması, çok az miktardaki DNA nın yeterli olması ve tekrar sayısı hakkında kesin bilgi vermesidir. Ancak PCR ın dezavantajları tam mutasyon alellerini taramada karşılaşılan zorluk ve PCR ın premutasyon ve normal aleller arasındaki mozaisizmi gösterememesidir. Tekrar sayısı için mozaik olan bireylerin normal olarak tanımlanmasına neden olarak yanlış tanıya yol açabilir. PCR ile amplifiye edilemeyen örnekler Southern Blot ile test edilmelidir . Monoklonal antikolarla FMRP ekspresyonunun değerlendirilmesi, sadece hasta popülasyonunun taramasında güvenilir olarak kullanılabilir. Tam mutasyonun olduğu hasta erkeklerde FMRP ekspresyonu olmazken, normal ve premutasyonlu bireylerde FMRP ekspresyonu vardır. Bu test hasta erkekleri tarayabilir ancak tam mutasyonlu bayanları tarayamaz. Ayrıca normal ve premutasyonlu bireyleri ayırt edemez (43).

Rett Sendromu. DSM-IV-TR'de tanımlanan yaygın gelişimsel bozukluklardan ve genetik etyolojisi bilinen tek hastalıktır. Klasik Rett Sendromu olan bireylerin yaklaşık %96'sında X kromozomunu üzerinde *MECP2* geninde mutasyon bulunmaktadır. *MECP2* mutasyonu tespit edilmiş Rett Sendromlu hasta ile nedeni bilinmeyen YGB'li hasta fenotipi oldukça benzemektedir; her ikisinde de genellikle başlangıçta normal gelişim gösterdikleri bir dönemden sonra konuşma kaybı ile birlikte tekrar eden el hareketleri görülür. Bununla birlikte Rett Sendromu olan hastalarda dikkat çekici bir şekilde baş çevresi ölçümlerinde büyüme hızının

azalması, ilerleyen duruş bozukluğu ve erken dönemde el ovuşturma hareketi ile klinik olarak ayırt edilebilir. Rett sendromu olan 313 kız hastada yapılan bir çalışmada *MECP2* mutasyonlu Rett Sendromu olan 55 olguya (%17.6) erken dönem otizm tanısı konulmuştur . Young ve ark. yaptığı çalışmada otizm tanısı almış bütün kızların Rett Sendromu belirtileri açısından dikkatlice izlenmesini tavsiye etmektedir. YGB bulgusu gösteren hastaların yaklaşık %1'inde *MECP2* mutasyonları bildirilmiştir (44).

Sotos Sendromu. Aşırı büyüme sendromlarından olan Sotos sendromunda olguların yaklaşık %80-90'ında *NSDI* geninde mutasyon veya delesyonu görülür ve otozomal dominant bir geçiş gösterir. Sotos sendromunda davranışsal problemler, konjenital kalp anomalileri, yenidoğan sarılığı, renal anomaliler, skolyoz ve nöbetler gibi majör özellikler görülür. Sotos sendromunda tipik yüz görünümü, aşırı büyüme (boy ve baş çevresi  $\geq 2$  SD ortalamasının üstünde) ve hafiften (çocuklar örgün öğretime katılabilir ve bağımsız erişkinler olabilir) ciddiye (yaşam boyu bakım ve destek gereken) kadar değişebilen öğrenme güçlüğü gibi ana özellikleri ile karakterizedir. Sotos sendromu klasik otizmin önemli bir nedeni olmamasına rağmen (45), Sotos sendromlu çocuklar kendi yaş grubundaki çocuklarla ilişkilerinde zorluk ve sosyal ipuçlarını anlamada eksiklik gibi davranışsal problemler nedeniyle otizm kliniklerine yönlendirilebilir.

*PTEN* makrosefali sendromu, *PTEN* geninin nöronal sağkalım ve sinaptik plastisite dahil beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *PTEN* (Fosfataz ve Tensin Homoloğu) geni ilk olarak Cowden Sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromu, Proteus Sendromu ve Lhermitte-Duclos hastalığını içeren, *PTEN* hamartoma tümör sendromu olarak bilinen geniş hastalık grubu ile ilişkilendirilmiş bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte yakın zamanda *PTEN* geni mutasyonları YGB ve makrosefali ile ilişkilendirildi. YGB'nin nedeni olan *PTEN* mutasyonlarının sıklığı belirgin değildir. YGB ve makrosefali bulguları taşıyan çocukların değerlendirildiği çalışmalarda *PTEN* geni mutasyon sıklığı %1'den %8.3'e, %17'ye kadar ulaşmaktadır. *PTEN* makrosefali sendromunda hem ailesel hemde *de novo* geçişler görülmüştür. *PTEN* gen mutasyonu taşıyan YGB'li çocuklarda yapılan çalışmalarda genellikle +3.7 SD'den +9.6 SD'ye değişen aralıkta (ortalama: +5.4 SD) aşırı makrosefaliye sahiptir (46).

Tüberöz Sklerozis Kompleksi (TSK). *TSC1* ve *TSC2* genlerinde mutasyonlar tanımlanan Entelektüel yetersizliği olan TSK'lı bireylerin ortalama %25-50'si otizm tanı kriterini tam olarak uymasına rağmen, bu hastaların sadece %1.1-1.3'ünde ilk tanı olarak YGB düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada erken başlangıçlı infantil spazmlar ve MRG'deki temporal tüberler *TSC2* mutasyonu olan çocuklarda otizm gelişme olasılığını artırmaktadır. Deri lezyonları (hipopigmente maküller, köpekbalığı derisi lekeleri, adenoma sebaceum) ve otozomal dominant kalıtım ile uyumlu TSK'yi düşündürülen bulguları (nöbetler, deri lezyonları, entellektüel yetersizlik) olan aile hikayesi gibi belirti ve durumların değerlendirilmesi genellikle otizmlili çocuklarda TSK tanısının konulmasında veya dışlanmasında yeterli olacaktır. TSK'deki otizme neden olan mekanizma aydınlatılamamıştır. Bunun yanında TSK ile ilişkili YGB'li ailelerdeki tekrarılama riski nedeni bilinmeyen otizmi olan ailelerdekinden daha yüksektir (47).

Joubert Sendromu. Kalıtım paterni Otozomal resesif olan joubert sendromunda anormal nefes alıp verme, anormal göz hareketleri, bilişsel bozulma, davranış problemleri ve MRG'de "azı dişi görünümü" şeklinde görünen kısmi/tam serebellar vermis yokluğu ile karakterize bir hastalıktır. Joubert sendromunun bir kısmı 'jouberin' proteinini kodlayan *AHI* geni ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada 11 Joubert sendromlu hastadan üç tanesi YGB ve bir tanesinin ise YGB-BTA tanı kriterlerine uyduğu görüldü. Bununla birlikte Takahashi ve ark. yaptığı çalışmada Joubert sendromu ve YGB arasında etiyolojik olarak farklı hastalıklar olduğunu belirten genetik ve davranışsal farklılıklar olduğu ortaya koymuşlardır. Muhle ve ark. yaptıkları çalışma ile Joubert sendromlu monozygotik ikizler ile ilgili yayınlanan bir raporda daha ciddi serebellar anomalisi olan ikizde otizm olması, henüz tanımlanmamış otizm bölgeleri veya beyin bağlantılarının etkilenmesi ile aynı hastalığın otizm fenotipini ortaya koyma potansiyelini öne sürdü (48).

Nörofibromatozis tip 1 (NF1). YGB'li çocuklarda NF1'in görülmesi, bunun gerçek bir ilişki mi yoksa gerçekten çocukluk çağının iki sık hastalığının aynı anda bir arada oluşumu bilinmemektedir. *NF1* mutasyonları ve YGB arasında herhangi bir genetik ilişki gösterilememiştir (49).

Moebius sendromu veya sekansı. 6. ve 7. kranial sinirlerinin tek taraflı veya çift taraflı felci ile oluşur. Moebius sendromlu hastalar gülümseme ve gözleri

kapatma konusunda yetersiz kalırlar. Genellikle göz yaşı ile ilgili rahatsızlıklar, nöbetler, işitme kaybı ve ekstremiteler anomalileri ile ilişkilidir. Moebius sendromlu çocukların yaklaşık %30'u YGB bulgusu göstermektedir. Johansson ve ark. yaptıkları bir çalışmada entelektüel yetersizliği olan Moebius sendromlu olgularda YGB'nin daha sık gözlenebileceğini bildirmişlerdir (50).

*Timothy Sendromu.* *CACNA1C* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan kalsiyum kanal hastalığıdır, ciddi QT uzaması, sindaktili, kardiyak defektler, dismorfik yüz, gelişme geriliği ve otistik bulgular ile karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir hastalıktır (51).

*Landau-Kleffner sendromu (LKS).* YGB'li ve geç regresyonlu olan çocukların küçük bir grubunda LKS vardır. Bu çocuklar nöbetler (epileptik afazi) ve/veya derin uykuda ciddi EEG anomalileri ile ilişkili ani veya kademeli olarak izole dil regresyonları gösterirler. Genel olarak hem nöbetler hem de dil bozulması EEG anomalilerinin düzelmesi ile iyileşmektedir (52).

Yaygın gelişimsel bozukluk bulgusu gösteren daha birçok tek gen hastalığı tanımlanmıştır. Bunların çoğu ciddi entelektüel yetersizlik ve dismorfolojik bulgular ile ilişkilidir: Cohen Sendromu, Cole Hughes makrosefali sendromu, San Filippo Sendromu, Cornelia De Lange Sendromu, Angelman Sendromu, Williams Sendromu ve tersi 7q11.23 mikroduplikasyon sendromu 17p11.2p11.2 duplikasyon sendromu 22q11 delesyon sendromu, WAGR (Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon) sendromu, Duchenne Müsküler Distrofisi.

## 2.6. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı

Ülkemizde olduğu gibi dünyanın bir çok ülkesinde de otizm için kullanılan DSM-IV tanı kriterleri en önemli tanı rehberidir. 1994'te yayınlanan DSM-IV'de; OB, AS, Rett Sendromu, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu ve YGB-BTA tanılarına OSB/YGB ana tanısı altında yer verilmiştir. En son 2000 yılında yapılan güncelleme ilgili bazı bölümleri değiştirildi fakat tanı kriterleri değişmedi (9). Rett Sendromu'na neden olan *MECP2* mutasyonlarının tanımlanmasından sonra, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu nozolojisi ile ilgili belirsizlik ve otizm tanısının daha iyi anlaşılabilmesi için YGB terimi ana tanı olarak benimsenmiştir.

Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu (DB), normal gelişim gösteren çocuğun gelişiminde en az iki yıl bozulma olması ve önceden kazandığı dil, sosyal ve oyun becerilerini kaybetmesi, genellikle 10 yaşından önce ortaya çıkan sık görülmeyen bir durum olarak karşımıza çıkar. Yaygın gelişimsel bozukluklar içinde bir tanı olarak kabul edilmektedir. DB klinik olarak otizme benzer fakat başlangıç, gidişat ve sonuç olarak otizmden ayrılmaktadır.

Yaygın Gelişimsel Bozukluk-Başka Türü Adlandırılmayan (YGB-BTA), Bazen olgu ilk geldiğinde yapılan değerlendirmelerde kesin tanı konulamayan durumlarda ön tanı veya değiştirilebilir tanı olarak kullanılabilir. YGB-BTA otistik belirtiler gösterir fakat üç ana tanı kriteri başlığına da tam olarak uymayanlar için kullanılan bir sınıflamadır.

Asperger Sendromu (AS), YGB için tanımlanan tüm DSM-IV-TR tanı kriterlerini karşılar fakat buna karşın diğer tanımlara göre daha normal bir dil gelişimi ile karakterize bir durumdur (53). Tanı için ZB skorlaması normal aralıkta olmalıdır. Bu olgularda sakarlık yaygın bir durumdur. AS'li olgular genellikle grup içinde olmaktan rahatsız olan yalnız kalmayı tercih eden, konuşmayı pek sevmeyen ancak dil gelişimi normal olan, konuştukları zaman ukala veya değişik tonlamaları içeren tekrarlayıcı bir şekilde konuşurlar, diğer çocuklar ile empati kurmayı pek beceremeyen, yapılan esprileri anlamayacak şekilde edebi konuşma üslubu takınan, bilgisayar gibi kafasını kurcalayan bir ilgi alanına sahiptir. AS'nin YGB'nin içinde bir durum mu yoksa tamamen ayrı bir genetik hastalık mı olduğu açıklığa kavuşmamıştır.

Asperger sendromu tanısı için kullanılan Otizm Spektrum Tarama Anketi (ASSQ), AS Tanı Görüşmesi (ASDI), AS için Avustralya Ölçeği ve Çocukluk Çağı AS Testi (CAST) gibi birçok tarama anketi olmasına rağmen hiçbir tanı testiyle tam bir uyumluluk göstermemesi nedeniyle problemlidir. Klinisyenler için yakın zamanda "Asperger Tanı Değerlendirmesi" olarak yayınlanan bir video AS ile ilgilenenler için uygulamalı bilgiler vermektedir (54).

Geniş Otizm Fenotipi, otizm için tanımlanan bazı kriterleri karşılayan aile bireyleri için tanımlanmış bir durumdur (55). Araştırmacılar tarafından tanımlanmış bu durum otizm için tanımlanan aday genlerde mutasyona sahip olan aile bireylerini sınıflandırmak ve YGB'nin geniş fenotipi yansıtmak amacıyla kazandırılmıştır.

## 2.7. Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Tanı Ölçekleri

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı koymak amacıyla çeşitli otizm ölçekleri ve DSM-IV-TR tanı kriterleri kullanılır bununla birlikte otizm bulguları ve bu durumun ne zaman ortaya çıktığı tespit edilmelidir (56).

Çocukluk Çağı Otizm Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ), en yaygın ve en çok kullanılan, olgunun ebeveyni ve testi uygulayan kişi tarafından skorlaması yapılan bir otizm tanı ölçeğidir. Bu testi uygulaması kolay, güvenilir, doğruluğu tespit edilmiş ve diğer testlere göre hızlı bir otizm ölçeğidir. 15 soru içeren bu otizm ölçeğinde 30-35 arası puan hafif otizm olarak, 36 ve yukarı bir puan alan olgu orta-ciddi otizm olarak değerlendirilir (57). Bu testin yanında diğer kullanılan testler arasında ODKL (Otizm Davranış Kontrol Listesi) ve GARS (Gilliam Otizm Skorlama Ölçeği) bulunmaktadır.

Genel olarak uygulamada otizm tanısı için ilk olarak detaylı ebeveyn görüşmesi ve ADOS'tan (Otizm Tanı Gözlem Programı) daha kısa ve uygulaması daha kolay olan ADI-R (Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş) yapılmaktadır. Her iki uygulamada DSM-IV tanı kriterleri bulunmaktadır. Burada amaç otizm tanısını bir standartta tutturmak için davranışsal belirtileri değerlendirmek amaçlanmıştır. Uygulaması daha zor ve zahmetli olan ADOS, genellikle araştırma için kullanılmaktadır. Fakat bazı gelişmiş ülkelerde klinik uygulamada kendine yer bulmuştur. Günümüzde araştırma ve pratik klinik uygulama için daha güvenilir tanı ölçekleri üzerinde çalışılmaktadır.

Tarama testi olarak pratikte en sık kullanılan M-CHAT (Yürüme Çağında Olan çocuklarda Otizm Kontrol Listesi-modifiye edilmiş) uygulanması kolay bir testtir. Birinci basamak sağlık hizmeti veren sağlık kuruluşlarına kontrollere gelen çocuklardaki otizm riskini tanımlamak için hazırlanmış 23 maddeden oluşan bir kontrol listesidir. Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada 16-30 ay yaşları arasında muhtemel YGB olgularını tanımlamada güvenilirliği düşük ve yüksek risk gruplarında doğrulanmıştır (56). Dr. Leo Kanner otizm tanımını 1943'te yapmasına karşın ancak 1968'de DMS-II'nin yayınlanması ile otizm tanı olarak yer almıştır (58).



1980'de yayınlanan DSM-III bir çok konuda radikal değişiklikler yaparken infantil otizm de ayrı bir kategori olarak yer almıştır (59). DSM-IV ise 1994'te yayınlandı ve bugün de halen dünya çapında en geçerli tanı kriteri olarak kullanılmaktadır. YGB terimi hiç bir DSM'de yer almamasına rağmen bilimsel literatürde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Dr. Leo Kanner ile eş zamanlı olarak Asperger 1944'te benzer özellikler gösteren çocuklar tarif etti (60). Asperger'in tanımından sonra yayınlanan iki rapor tanımlanan bu çocukların değişen derecede benzer belirtileri olan ve otizmin devamı niteliğindeki durumlar olduğunu bildirmiştir. Bu tanımlamayı takiben YGB terimi kullanılmaya başlanmıştır (61).

## 2.8. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Genetiği

Son yıllarda yapılan çalışmalarda YGB'li hastaların çoğunda genetik neden için önemli deliller saptanmıştır. Bu delillerden ilki yapılan ikiz çalışmalarında monozigotik (MZ) ve dizigotik (DZ) ikizler arasındaki konkordans oranlarında büyük farklılık görülmüş, ikinci olarakta kardeşlerdeki tekrarlama riski toplum riskine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Genel bilgi olarak MZ ikizler genlerinin tümünü, DZ ikizler ise genlerin yarısını paylaşmaktadırlar. MZ ikizlerde konkordans oranı %100'e ulaştığı zaman nedenin tamamen genetik olduğu kabul edilmektedir. Otizm ile ilgili yapılan çalışmalarda; MZ ve DZ'lerde konkordans oranları oldukça farklı bulunmuştur (62). Otizmde MZ konkordans oranı %100 olmaması ve de MZ ikizlerde, DZ ikizlere göre konkordans oranının yüksek olması hastalığın etiyolojisinde kalıtsal ve çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Otizmin genetik bir hastalık olabileceğine ikinci kanıt otizimli hastaların kardeşlerindeki risk %2-6 arasında bulunmuştur ve oran toplum riskine göre 30-150 kat fazla saptanmıştır.

Otizmin kalıtım modeli hakkında yapılan en son araştırmalarda, otizmde çok sayıda genin olaya katılması ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu araştırmaların sonucunda otizmin eşik değerli multifaktöriyel kompleks genetik bir hastalık olabileceği sonucuna varılmıştır.

### Multifaktöriyel kalıtımın özellikleri

- ✓ Hastalık ailesel geçişli olmakla beraber Mendelian kalıtıma uymamaktadır.

- ✓ 1. derece akrabalarındaki risk toplumdaki riskin kare kökü kadardır, yani toplum riskinden %20-40 kat fazladır.
- ✓ 2.derece akrabalarda risk aniden düşer, uzak akrabalarda ise azalma daha yavaştır.
- ✓ Ailede birden fazla birey hasta ise tekrarlama riski daha yüksektir.
- ✓ Hastalığın ciddiyeti ile tekrarlama riski doğru orantılıdır.
- ✓ Hastalık bir cinsiyette daha fazla görülüyorsa, daha az görülen cinsiyetteki hastaların akrabalarında risk daha fazladır.
- ✓ Anne baba arasında akrabalık varsa risk artmaktadır.

Yaygın gelişimsel bozukluğunun genetik nedenlerini ortaya çıkarmak için yapılan ikiz ve aile çalışmaları otizmin genetik temelini ortaya koymuştur ve otizmde genetik geçişin %90'nın üzerinde olduğunu belirtilmiştir (12). Günümüzde yapılan çalışmalarda YGB'li çocukların yaklaşık olarak %20-25'inde genetik neden belirlenmektedir. Bir başka neden olarak otizimli olguların daha küçük bir kısmında teratojenik ajanlara maruziyet neden olarak gösterilebilir. Nedeni bilinmeyen yaklaşık %75-80'lik kısım ise halen araştırma safhasındadır (63).

Yaygın gelişimsel bozukluğunda tanımlanan genetik nedenler arasında (1) Sitogenetik olarak gözlenebilen GTG bantlama yöntemi ile yapılan kromozom analiziyle yaklaşık olarak %5'inde kromozom anomalileri görülebilmektedir, (2) FISH teknikleri kullanılarak tanımlanan (mikrodelesyon/duplikasyon gibi) kromozom anomalilerine yaklaşık %3-5' lik bir kısım (3) Kopya Sayısı Değişiklikleri (submikroskobik delesyonlar ve duplikasyonlar gibi) ortalama %10-20'lik bir orana sahiptir ve (4) YGB ile ilişkisi bilinen tek gen hastalıkları yaklaşık %5'lik bir yer tutar (13).

### **2.8.1. Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler**

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan hastalarda sitogenetik olarak gözlenebilen GTG bantlama yöntemi ile yapılan yüksek çözünürlüklü kromozom analiziyle yaklaşık olarak olguların %5'inde kromozom anomalileri tanımlanabilmektedir. Bu orana ek olarak FISH teknikleri kullanılarak yaklaşık %3-5'lik bir kısım tanımlanabilen kromozom anomalilerine sahiptir. Dengesiz kromozom anomalileri genellikle otizme eşlik eden dismorfolojisi olan olgularda görülmektedir (13,15). Otizmin genetik temelini ortaya koymak için yapılan çalışmalarda tüm

kromozomlarda kromozomal bir anomali tanımlanmasına rağmen, otizm genlerini içeren muhtemel lokusların az sayıda kromozomda olduğu düşünülmektedir (15).

Otizimde en sık rastlanılan kromozom anomalisi olan yaklaşık olarak %1-3 civarında görülen anne kaynaklı Prader Willi/Angelman Sendromu kritik bölgesinin (15q11-q13) duplikasyonudur. Bu duplikasyon genellikle *de novo* olarak fazladan izodisentrik 15q kromozomu ve daha az oranda baba kaynaklı kromozom translokasyonun ayrılması veya anne kaynaklı interstisyel 15q duplikasyonu sonucu oluşur. Fazladan izodisentrik 15q anomalisi rutinde kullanılan sitogenetik olarak gözlenebilen GTG bantlama yöntemi ile yapılan yüksek çözünürlüklü kromozom analiziyle tespit edebilir ancak interstisyel duplikasyonların tanısı için interfaz FISH veya aCGH yöntemi gibi daha ileri tanı yöntemleri kullanmak gerekmektedir. Anne kaynaklı 15q11-q13 interstisyel duplikasyonu baba kaynaklı duplikasyona göre otizmde daha yüksek bir oranda genetik geçiş gösterir. Baba kaynaklı bu bölgenin duplikasyonunda fenotipik etkilenme daha az görülür ve neden olarak genomik damgalanmanın olduğu düşünülmektedir (64). Anne kaynaklı 15q duplikasyonu bu bölgenin trizomisine neden olur ve fenotipik olarak daha göze çarpar, ancak fazladan izodisentrik 15q'su olan yani 15q bölgesinin iki yerine dört kopyasına sahip olması olguların fenotipik olarak daha fazla etkilenmesine neden olur ve ciddi gelişim geriliği, nöbetler, mikrosefali ve hipotoni gibi ciddi bulgular gösterebilir (65).

Turner sendromlu hastalarda yapılan bir araştırmada anne kaynaklı X kromozomuna sahip ( $45,X^{mat}$ ) hastaların baba kaynaklı X kromozomuna sahip ( $45,X^{pat}$ ) olan hastalardan sosyal iletişim yeteklerinin daha fazla etkilendiği görülmüştür (66).

Down sendromlu hastalarda yapılan araştırmada yaklaşık olarak en az %7 oranında otizme sahip oldukları görülmüştür (67). Kromozom anomalilerinden 2q37, 18q, 22q13.3, Xp22.3 kromozom bölgelerine ait delesyonlar, cinsiyet kromozomu anöploidilerden 47,XYY, 47,XXY, 45,X anomalileri yapılan araştırmalarda birden fazla yayında bildirilmiştir (68). Bunun yanında yapılan tüm araştırmalarda kromozom anomalilerinden 2q37 ve 22q13.3 ait delesyonlarda tüm bireylerin dismorfolojik olarak etkilendiği bildirilmiştir (69). *SHANK3* ve *NLGN4* genlerindeki mutasyonların tanımlanması, nedeni bilinmeyen YGB'li hastalarda 22q13.3 ve

Xp22.3 delesyonları için minimal kritik kromozom bölgelerinin araştırılması sırasında olmuştur (70).

### 2.8.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri

Kopya Sayısı Değişiklikleri - submikroskopik delesyonlar ve duplikasyonlar - otizmin bilinen nedenleri arasında yaklaşık olarak %10-20'lik bir orana sahiptir. Günümüzde otizmlili olguların değerlendirilmesinde yüksek çözünürlüklü kromozom analizi ve FISH yönteminin yerini çözünürlüğü çok daha fazla olan aCGH yöntemi almaktadır. aCGH yönteminde kullanılan ve klinik olarak mevcut olan platformlar bilinen delesyon/duplikasyon sendromlarının bütün genomda ve ek olarak subtelomerik bölgelerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. aCGH'de kullanılan platformlar yoğunluk ve moleküler belirteçlerin çeşidi BAC (Bakteriyel Yapay Kromozom), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve oligonükleotid klonlar açısından değişkenlik gösterebilir ve yeni KSD bölgeleri tanımlandıkça bu platformlar güncellenmektedir.

Jacquemont ve ark. yaptıkları bir çalışmada 1-Mb genom bütünlüğünde array kullanarak, dismorfik bulguları olan otistik hastalarda rutinde kullanılan kromozom analizi ile normal karyotipe sahip olan hastaların %27.5 (8/29) oranında klinik olarak anlamlı delesyon/duplikasyonlar tanımlamıştır (63).

Sebat ve ark. oligonükleotid array kullanarak yaptıkları çalışmada, ailede tek etkilenmiş bireylerin olduğu basit ailelerde çocuklarının %10'unda ve ailede birden fazla etkilenmiş bireyin olduğu multiplex ailelerin %2'sinde, kontrollerin ise %1'inde *de novo* şekilde kopya sayısında değişiklikler buldular (71).

Marshall ve ark. yoğun genom bütünlüğünde SNP arrayi kullanarak yaptıkları çalışmada, YGB bulgusu gösteren 427 birbirinden ilişkisiz ailede kontrol ailelerinde bulunmayan %44 oranında dengesiz KSD'ler buldular. Nedeni bilinmeyen YGB bulgusu gösteren hastalarda bulunan bu KSD'lerin çoğu genetik geçiş ile, sadece %7'sinin *de novo* olduğu tespit edildi (72).

Yaygın gelişimsel bozukluk bulgusu gösteren 859 hasta birey ve 1,409 avrupa kökenli sağlıklı çocukta 550.000 SNP kullanılarak yapılan bir çalışmada nöronal adezyon moleküllerini kodlayan (*NRXN1*, *CNTN4*, *NLGN1* ve *ASTN2*)

genleri ve ubikutin yolağında yer alan (*UBE3A*, *PARK2*, *RFWD2* ve *FBXO40*) genlerde çeşitli patolojik değişiklikler olduğunu ortaya çıkarmışlardır (73).

16p11.2 delesyon sendromu gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik ve/veya YGB bulguları ile karakterize bir hastalıktır. Gelişme geriliği, motor yetersizlikten ziyade bilişsel fonksiyon ve konuşmada gecikme ile ilişkilidir. Yapılan ZB skorları ile entelektüel yetersizliğin hafif etkilenmişlikten normale kadar değişebilmesine rağmen, ortalama bir ZB skoruna sahip olan olgularda konuşma gecikmesi veya otizm gibi diğer gelişimsel problemlere sahiptir. Bu hastalarda ifadesel dil, algısal dilden daha fazla etkilenmiş gözükmektedir. Weiss ve ark. yaptıkları çalışmada 16p11.2 delesyon/duplikasyonlarının otizmlili hastaların yaklaşık olarak %1'inde, gelişme geriliği veya konuşma gecikmesi olan hastaların ise %1.5'inde bildirmiştir (74). Marshall ve ark. yaptıkları çalışmada da benzer bir oran gözlemlemiş ve doğruluğunu desteklemişlerdir (72). 16p11.2 delesyon sendromu otozomal dominant geçiş gösterebileceği gibi sıklıkla *de novo* olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte 16p11.2 delesyon sendromlu hastaların etkilenmemiş aile bireylerinde de şizofreni, bipolar hastalık, nöbetler, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ve disleksi gibi diğer hastalıklar görülebilir; bundan dolayı KSD'lerin önemini/anlamını değerlendirmek zor olabilir (75).

15q13.3 delesyon sendromu, entelektüel yetersizlik, epilepsi ve YGB ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte klinik olarak değişken olduğu görülmektedir (76).

### 2.8.3. Metabolik Durumlar

*Smith-Lemli-Opitz Sendromu (SLOS)*. SLOS tekrarlayıcı ve kendine zarar verici davranışlar gibi otistik bulguların yanında, duyuşsal hiperaktivite ve uyku bozukluğu gibi diğer davranışsal özellikler ile de ilişkilidir. SLOS'lu bireylerdeki otistik davranış sıklığı %50'den %80'e kadar değişmektedir. Çoklu doğumsal anomali ve entelektüel yetersizlik sendromu olan bu hastalık kolesterol biyosentezinde esansiyel bir enzim olan 7-dehidrokolesterol redüktaz eksikliği nedeniyle oluşmaktadır. Otozomal resesif bir paterni vardır (77).

*Fenilketonüri (FKÜ)*. YGB ile tedavi edilmemiş FKÜ ilişkisi tanımlanmıştır ancak bu çocuklarda bulunan ciddi entellektüel yetersizlik nedeniyle otizm tanısı genellikle zordur. Yapılan çok yönlü bir çalışmada erken tanı ve tedavi almış FKÜ'lü

62 olgunun hiç birinin YGB tanı kriterine uymadığını görülürken, daha sonradan FKÜ'lü 35 olgunundan ikisinin (%5.7) YGB tanı kriterine tam olarak uyduğu görülmüştür (78).

*Mitokondriyal Hastalıklar.* Mitokondriyal solunum zincir bozuklukları otizmlili hastalarda çok nadir görülmesine rağmen, plazmada artmış laktat konsantrasyonları sıklıkla bildirilmiştir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada 69 otizmlili olgunun 14'ünde (%20) plazmada artmış laktat konsantrasyonları olduğu bildirmiştir. Bu olgulardan 11 çocuktan 5'ine kas biyopsisi yapılmış ve enzimatik aktivitenin normalin %20 altına düşecek biçimde bir veya daha fazla solunum zincir kompleksi, genellikle kompleks I, IV ve V eksikliği tespit edilmiştir. Eğer bu durum doğrulanırsa bu grup hastalar YGB'nin en geniş alt grubu olmaya adaydır. Hipotoni, gelişim geriliği ve aralıklı regresyon epizotları gibi atipik özellikleri olan otistik çocuklarda mitokondriyal solunum zincir bozukluğu açısından uyanık olmak lazımdır. Weissman ve ark. ilk olarak otizm tanısı alan ve mitokondriyal solunum zincir bozukluğu olan 25 kişide yaptıkları bir çalışmada, anormal nörolojik muayene ve/veya plazmada artmış laktat konsantrasyonları ışığı altında nedeni bilinmeyen otizmlilerin ayrılabilceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte mitokondriyal solunum zincir bozuklukları ek nörolojik bir anomalisi olmayan YGB'li olgularda da rapor edilmiştir (79).

*Kreatin Eksikliği Sendromları (KES).* KES'te doğuştan kreatin metabolizmasında bozukluklar görülür. Entelektüel yetersizlik ve nöbetler tüm kreatin eksikliği sendromlarında ortak bulgulardır. YGB'li olgularda kreatin eksikliği sendromlarının prevalansının düşük olduğu bildirilmektedir. YGB'li 100 erkek hastada yapılan bir çalışmada *SLC6A8* geni dizilenmesi sonucunda, hastalık oluşturucu herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (80).

*Adenilosüksinat Liyaz Eksikliği.* Bu durum *de novo* pürin sentezinin nadir görülen bir bozukluğudur. Vücut sıvılarında süksinilpürinlerin birikimi ile hastalık kendini gösterir. Adenilosüksinat Liyaz Eksikliği olan hastaların yaklaşık %50'sinde gelişim geriliği, nöbetler, göz teması kurmakta yetersizlik, tekrar eden basmakalıp davranışlar, öfke nöbetleri ve saldırganlık gibi otizm bulguları görülmektedir. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada YGB bulgusu gösteren 420 çocuktan sadece birinde adenilosüksinat liyaz eksikliği bulunmuştur (81).

#### 2.8.4. Otizmin Diğer Nedenleri

*Çevresel Nedenler*, Son yıllarda otizmin genetik temelini ortaya koyabilmek için monozigotik ikizlerde yapılan çalışmalarda otizm için tam olmayan konkordansın ve artan otizm prevalansı nedeniyle otizmin genetik nedenleri yanında çevresel nedenlerinin olduğu vurgulanmıştır.

*Intrauterin maruziyet*, Valproik asit, talidomid ve misoprostol gibi ilaçların teratojenik etkilerinin olduğu görülmüş ve ilaçların otizme neden olduğu anlaşılmıştır. Gebelik süresince antiepileptik ilaçlara maruz kalan 632 hastada yapılan uzun süreli bir çalışmada, intrauterin valproata maruz kalan çocukların antiepileptik ilaçlara maruz kalmayanlardan 7 kat daha fazla otizm geliştirme riski olduğunu bildirmişlerdir (82).

*Çocukluk çağı aşıları*, Aşılar ile ilgili olarak %50 koruyucu thimerosal içeren organik cıvanın bulunduğu bazı aşılar ve hiç cıva içermeyen kızamık-kabakulak-kızamıkçık (MMR) gibi aşılar üzerinde çalışmalar yapıldı. Sonuç olarak ebeveyn görüşlerinede önem verilerek yapılan çalışmalar ve çıkan bilimsel sonuçlar aşılama ve otizm arasında herhangi bir ilişkiyi desteklemedi (83).

#### 2.9. Frajil X Sendromuna Yönelik FMR1 Sizing PCR Yöntemi ile Fragman Analizi

İnsan genom projesi ile insan genomuna ait tüm baz dizisinin çıkarılması hedeflenmiştir. Ortalama %99 oranında tamamlanan çalışma ile DNA dizileme yöntemleri de oldukça geliştirilmiştir. DNA dizileme yönteminde temel olarak iki teknik uygulanmaktadır. Bunlar Maxim-Gilbert ve Sanger yöntemleridir.

*Maxim-Gilbert Yöntemi*: Floresan veya başka bir yöntemle işaretlenmiş bir DNA bölgesi belli bir baza spesifik kimyasal reaksiyonlarla parçalanarak fragmanlara ayrılır. Her spesifik reaksiyon için ayrı bir kuyu kullanılarak poliakrilamid jelde yürütülür.

*Sanger Yöntemi*: İn-vitro ortamda DNA sentezi sırasında sentez işlemini durdurucu ddNTP molekülerinin ortama eklenmesi ile sentezin durdurulması amaçlanır. ddNTP'ler, DNA sentezi sırasında replikasyon zincirinin uzaması için bağ sağlayan 3' oksijen molekülüne sahip değildir. İşaretli primerler ve ddNTP'ler varlığında DNA dizisi 4 farklı reaksiyon yapılarak (her reaksiyon için bir ddNTP)

poliakrilamid jelde veya her ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boylarla işaretlenerek otomatik kapiller elektroforez sistemlerinde bütün baz dizisi elde edilebilir.

Otomatik kapiller jel elektroforez, elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara ya da bunların bir kaçına bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir. Kapiller, elektrotları ve tamponu içeren iki cam hazne arasına yerleştirilmiş olup, kapillerler jel ile dolduktan sonra çok az miktardaki örnek, kapillerin bir ucuna elektrokinetik ve hidrodinamik teknikle yüklenir. Ayırım yüksek voltaj (yaklaşık 5-30 kV, 1-150 uA) uygulayarak yaklaşık 200-500 V/cm doğru akım altında sağlanır.

*Otomatik kapiller jel elektroforezde fragman analizi ile CGG tekrar sayısının araştırılması:*

*PCR:* Fragman analizi yapacağımız genomik bölgenin sınırlandırılmasını ve çoğaltılmasını sağlar. Spesifik primerler(Gender primers, Fragile X primers), DNA polimeraz enzimi ve serbest nükleotidler varlığında in-vitro ortamda fragman analizi yapılacak bölge sınırlandırılır ve milyonlarca kez çoğaltılır.

*Clean Up:* PCR sonrası ortamda bazı artık bulunabilir. Bunlar sonraki aşamalar için problem oluşturabileceğinden ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemde düşük moleküler ağırlıklı primer ve nükleotidleri uzaklaştırmak Clean Up sistemi kullanılır. İşlem sonunda saf halde çift sarmallı PCR ürünü elde edilir. Daha sonra son aşama olarak elde edilen PCR ürünlerine ROX 1000 Size Standart ve Formamide eklenir. Çıkan ürünlerin analizi için otomatik kapiller jel elektroforez sistemine yüklenir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı Polikliniğine Aralık 2011-Nisan 2013 tarihlerinde başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan, dismorfik açıdan Tıbbi Genetik Polikliniği'nde değerlendirilen 80 hastaya ait periferik kan örnekleri dahil edilmiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri heparinli ve EDTA'lı iki tüp içerisine alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik ve Moleküler seksiyonlarında gerçekleştirilmiştir. Otizm bulgusu gösteren, YGB tanısı alan olgular, ilk aşamada heparinli tüpten elde edilen periferik kan hücrelerinden kromozom analizi, ikinci aşamada ise EDTA'lı tüpten elde edilen DNA örneklerinde FMR1 genindeki CGG tekrar sayıları Fragman Analizi yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 09.12.2011 tarih ve 2011/56 sayılı onay alınmıştır.

#### 3.2. Gereçler

##### 3.2.1. Kullanılan Aletler

- ✓ Jel Görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
- ✓ Mikrosantrifüj (Sigma)
- ✓ Su Banyosu (Nüve)
- ✓ Vorteks (Heidolph)
- ✓ Derin dondurucu (Arçelik)
- ✓ Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- ✓ Buzdolabı (Arçelik)
- ✓ PCR aleti (thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)
- ✓ Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- ✓ Otomatik kapiller elektroforez cihazı (ABI 3130)
- ✓ Ekim tüpü (10ml)
- ✓ Mezür (100'lük ve 1000'lik)

- ✓ Beher (250'lik ve 500'lük)
- ✓ Lamin Air Flow (Heraus ELB2448)
- ✓ Florasan mikroskop (Olympus CX31)
- ✓ Elektroforez için güç kaynağı (EKR)
- ✓ Elektroforez aleti (Consort E844)
- ✓ Hassas terazi (Setra)
- ✓ Pipet takımı (Gilson)
- ✓ Cytovision görüntüleme sistemi
- ✓ Ependorf tüpü (1,5 ml'lik)
- ✓ PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

### **3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- ✓ Fragile X Primers (abbott)
- ✓ Gender Primers (abbott)
- ✓ High GC PCR Buffer (abbott)
- ✓ TR PCR Enzyme Mix (abbott)
- ✓ CleanUp Enzyme Mix (abbott)
- ✓ ROX 1000 Size Standard (abbott)
- ✓ DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)
- ✓ Proteinaz K solusyonu (Qiagen)
- ✓ Colsemid
- ✓ Phytohemaglutininin
- ✓ Fetal bovine serum
- ✓ RPMI 1640
- ✓ Periferik blood karyotiping medium
- ✓ EDTA'lı tüp
- ✓ Heparinli tüp
- ✓ Entellan (Merck)
- ✓ Leishman boya(Merck)
- ✓ Acetic acid (Merck)
- ✓ KCL (Merck)
- ✓ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

- ✓ Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub> (Merck)
- ✓ NaCl (Merck)
- ✓ Tripsin
- ✓ İmmersiyon yağı (Merck)
- ✓ Agaroz (Scjarlou)
- ✓ Borik Asit (Sigma)
- ✓ Etidyum Bromid (Sigma)
- ✓ Etanol (%95-100) (Tekel)
- ✓ Distile su

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Klasik Sitogenetik Analiz Yöntemi

- ✓ Steril koşullarda olgu 6-7 damla heparinize kan 2 ayrı besiyeri ortamına ekim yapılır.
- ✓ Tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırılmıştır.
- ✓ Tüpler 45 ° eğik pozisyonda 37 ° C’de 72 saat kültüre edilmiştir.
- ✓ 72. saatte 0,1 ml colsemid ilave edilmiş, tüpler hafifçe karıştırılmış ve 45dakika 37° C’de kültüre edilmiştir.
- ✓ Süre sonunda tüpler 1300 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- ✓ Önceden 37° C’ye getirilmiş hipotonik (0,075 M KCL) solüsyonu vorteks eşliğinde eklenerek 5 ml tamamlanır.
- ✓ Tüpler 37° C’de 30 dakika kültüre edilir.
- ✓ Vortex eşliğinde taze hazırlanmış Carnoy’s Fiksatif Solusyonundan (3 birim metanol 1 birim asetik asit) 4-5 damla ilave edilir.
- ✓ Tüpler 1300 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- ✓ 5 ml taze hazırlanmış fiksatif solusyonundan ilave edilir.
- ✓ Bu iki basamak 4-5 defa tekrar edilir ve süpernatant atılır.
- ✓ 5 ml taze hazırlanmış fiksatif solusyonundan ilave edilir ve kapakları kapalı olarak bir gece buzdolabında bekletilir.
- ✓ Tüpler 1300 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- ✓ Pipetaj yapılarak önceden temizlenmiş lamlara optimum ortamda yayma yapılır.

- ✓ Yayma yapılan preparatlar kurutulur.
- ✓ Kurutulan preparatlar 65° C’de 18 saat hot plate üzerinde yaşlanmaya bırakılır.
- ✓ Boyamaya hazır preparatlar 8-10 saniye tripsin çözeltisinde bekletilir.
- ✓ PBS solusyonu içinde çalkalanır.
- ✓ Yatay bir düzlem üzerine konur ve daha önceden hazırlanmış olan leishman boya ile 2-2,5 dakika muamele edilir.
- ✓ Süre bitiminde çeşme suyunda çalkalanıp kurumaya bırakılır.
- ✓ Kurumuş olan preparatlara entellan damlatılarak üzeri lamel ile kapatılır.
- ✓ Analize hazır olan preparatlar mikroskopta incelenip değerlendirilir.
- ✓ Mikroskopta bulunan metafaz plakları bilgisayara alınır ve değerlendirilir.

### **3.3.2. Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi**

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır.

- ✓ Su banyosunun sıcaklığı 56 °C'ye getirilir.
- ✓ Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilir.
- ✓ 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılır.
- ✓ 20 µl proteinaz K ependorf tüpünün dibine konur.
- ✓ 100 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenir.
- ✓ PBS tamponu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 120 µl eklenir.
- ✓ Bu karışım 15 sn. vortekslenir.
- ✓ 56 °C'de 10 dk. inkübe edilir.
- ✓ Çok kısa süreli santrifüj edilir.
- ✓ %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenir.
- ✓ Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılır.
- ✓ Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılır.
- ✓ 8000 devir/dk’da 1 dk santrifüj edilir..
- ✓ Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılır. (Filtreli tüp tamamen boşalamadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenir)

- ✓ 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulur. 8000 devir/dk'da 1 dk süreyle santrifüj edilir.
- ✓ Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtreli tüp atılır.
- ✓ Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulur.
- ✓ 14.000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılır.
- ✓ Filtreli tüp yeni Ependorf tüplerine aktarılıp tam devirde 1 dk santrifüjlenip, ependorf tüpü atılır.
- ✓ Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 200 µl Buffer AE eklenir.
- ✓ Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüj edilir.
- ✓ Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20 °C'ye kaldırılır.

### 3.3.3. Fragile X Sizing PCR Kiti (Abbott) ile Fragman Analiz Yöntemi

- ✓ Ekstraksiyon kiti ile periferik kan örneklerinden elde edilen DNA -20°C' den çıkartılır.
- ✓ Oda sıcaklığında erimesi beklenir.
- ✓ Nano drop ile kalitesi ve miktarı ölçülür.
- ✓ Fragman analizi için 10-25 ng/µl DNA gereklidir.
- ✓ Bir hasta için tablo 3.3.1'de belirtilen miktar oranında malzeme kullanılır.
- ✓ Elde edilen miktar 17 µl olur ve bunun miktar üzerine 3µl hasta DNA'sı eklenir.

Tablo 3.1. Bir PCR reaksiyonu için gerekli ürünler ve miktarları

Ürün Adı	Bir PCR reaksiyonu için gerekli miktar (µl)
High GC PCR Buffer	13
Gender primers	0.6
Fragile X Primers	0.8
TR PCR Enzyme Mix	1.2
DNase/RNase free water	1.4
<b>Toplam</b>	<b>17</b>

- ✓ Toplam miktar 20µl olur ve tablo 3.3.2' de belirtilen oranlarda ayarlanmış thermal cycle ile PCR işlemi gerçekleştirilir.

Tablo 3.2. FMR1 sizing PCR için PCR şartları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika/saniye)	Döngü	Hacim (µl)
98.5	0:10	15	20
58.0	1:00		
75.0	6:00		
98.5 Auto X 0.1°C/cycle*	0:10	15	
56.0	1:00		
75.0	6:00		
4.0	99:59	-	

- ✓ Yaklaşık 4 saat sonra 20 µl PCR ürününden 2 µl alınır.
- ✓ 2 µl PCR ürününün üzerine 3 µl clean up eklenir.
- ✓ Toplam 5 µl olan karışım tablo 3.3.3'de belirtilen oranlarda ayarlanmış thermal cycle ile clean up işlemi gerçekleştirilir.

Tablo 3.3. FMR1 sizing PCR için temizleme şartları

Sıcaklık	Süre	Hacim
75°C	10 dk	5 µl
4°C	∞	

- ✓ Yaklaşık 15 dakika sonra 5 µl ürün üzerine tablo 3.3.4 belirtildiği gibi 7 µl Formamide ve 3 µl ROX 1000 eklenir.

Tablo 3.4. FMR1 sizing PCR için Formamid ve ROX eklenmesi

Ürün Adı	Bir PCR Raksiyonu için miktar (µl)
Hi-Di™ Formamide	7.0 µl
ROX 1000 Size Standard	3.0 µl
<b>Total</b>	<b>10 µl</b>

- ✓ Toplam 15 µl olan karışım tablo 3.3.5'de belirtilen değerler girilerek PZR cihazı ile işlem gerçekleştirilir.

Tablo 3.5. Formamid ve ROX eklenmesi sonrası PCR işlemi

Sıcaklık	Süre	Hacim(µl)
95°C	30 sec	15 µl
4°C	∞	

- ✓ Thermal cycle'dan çıkan son ürünün tamamı ABI 3130 otomatik kapiller jel elektroforeze yüklenir.

### 3.3.4. Ürünlerin Fragman Analizi İçin Cihaza Yüklenmesi

Fragman analiz ürünleri, ABI 3130 otomatik kapiller jel elektroforez cihazına yüklemek üzere tüplere aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak traye dizilmiştir. ABI 3130 cihazında örnekler için yeni bir örnek listesi oluşturulmuş ve application Genemapper Generic olarak instrument protokol sırasıyla kısa ve uzun yürütmeler seçilerek kapiller elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.5. Sonuçların Analizi

ABI 3130 otomatik kapiller jel elektroforez cihazında analiz metod olarak microsatellite default, size standart olarak sırasıyla kısa ve uzun seçilerek analiz işlemi gerçekleştirilir.

## 4. BULGULAR

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı 'na başvuran, DSM-IV-TR' ye göre YGB tanısı alan 80 olgu dahil edilmiştir. Klinik değerlendirmeleri standart bir yöntem sağlamak için geliştirilen ODÖ rehberi eşliğinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'nde yapılmıştır. Sendromik olgular çalışma dışı bırakılmış, non-sendromik, normal/dismorfik olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Kromozom ve Frajl X Fragman analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik ve Moleküler seksiyonlarında gerçekleştirilmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri ve tanıları ile ilgili bilgiler hasta dosyalarından temin edilmiştir.

### 4.1. Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen 80 olgunun 64'ü erkek, 16'sı kız hastadır (Tablo 4.1). Olguların yaş ortalaması  $8.89 \pm 3.94$  olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Çalışmamıza dahil olan olguların cinsiyet dağılımları

<b>Olgu No.</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Kız	16	20
Erkek	64	80
<b>Toplam</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

### 4.2. Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmamızda DSM-IV-TR'ye göre YGB ana tanısı altında 56 olguya OB, 13'üne AOB, 5'ine AS, 3'üne Rett sendromu ve 3'üne de DB alt tanıları konmuştur. Toplam 7 olguda ise YGB'ye DEHB de eşlik etmiştir. Olguların cinsiyetleri, yaşları, kromozom analiz sonuçları, CGG tekrar sayıları ve olguların DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları Tablo 4.2'de verilmiştir.



Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom Analiz Sonuçları, CGG Tekrar Sayıları ve DSM-IV-TR'ye Göre Konulan Tanıları

Protokol No	Cinsiyet	Yaş	Kromozom Analiz Sonucu	CGG Tekrar Sayısı	Tanı
1	E	18	45,XY,rob(13;14)	31	OB
2	E	13	46,XY	39	OB
3	E	4	46,XY	29	OB
4	E	9	46,XY	24	OB
5	E	8	46,XY	29	OB
6	E	10	46,XY	32	OB
7	E	12	46,XY	28	OB
8	E	11	46,XY	8	OB
9	E	10	46,XY	30	OB
10	E	4	46,XY	29	OB
11	E	13	46,XY	31	OB
12	E	9	46,XY	28	OB
13	E	5	46,XY	34	OB
14	E	7	46,XY	33	OB
15	E	4	46,XY	27	OB
16	E	5	46,XY	39	OB
17	E	12	46,XY	31	OB + DEHB
18	E	12	46,XY	30	OB
19	E	9	46,XY	39	AOB
20	E	7	46,XY	29	OB
21	E	9	46,XY	28	AS + DEHB
22	E	9	46,XY	29	OB
23	E	8	46,XY	28	OB + DEHB
24	K	14	46,XX	30	OB
25	E	7	46,XY	27	AOB
26	E	10	46,XY	29	OB
27	E	6	46,XY	29	AOB + DEHB
28	E	6	46,XY	32	AOB
29	E	11	46,XY	37	OB + DEHB
30	K	11	46,XX	20,28	OB
31	E	6	46,XY	28	OB
32	E	16	46,XY	31	AOB
33	E	9	46,XY	29	OB
34	E	8	46,XY	28	AS

Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom Analiz Sonuçları, CGG Tekrar Sayıları ve DSM-IV-TR'ye Göre Konulan Tanıları (Devam)

35	K	16	46,XX,invdupdel(8)	32,40	OB
36	E	6	46,XY	29	OB
37	K	13	46,XX	20,29	AS
38	K	7	46,XX	19,30	OB
39	K	10	46,XX	21,30	OB
40	K	4	46,XX	32,40	OB
41	E	7	46,XY	29	OB
42	E	10	46,XY	24	AOB
43	E	4	46,XY	25	OB
44	E	5	46,XY	28	OB
45	E	11	46,XY	23	OB
46	K	4	46,XX	29,32	Rett Sendromu
47	K	12	46,XX	19,30	OB
48	E	5	46,Y,inv(X)mat	31	OB
49	E	7	46,XY	23	AOB
50	K	9	46,XX	29,32	AS
51	E	9	46,XY	23	OB
52	E	11	46,XY	29	OB
53	E	13	46,XY	32	OB
54	E	16	46,XY	29	OB
55	E	4	46,XY	29	AOB
56	E	11	46,XY	31	OB
57	K	17	46,XX	30	Rett Sendromu
58	K	6	46,XX	29	Rett Sendromu
59	E	10	46,XY	23	OB
60	E	4	46,XY	20	AOB
61	E	12	46,XY	27	OB
62	E	7	46,XY	30	AOB
63	K	7	46,XX	30	OB
64	E	6	46,XY	29	OB
65	E	7	46,XY	29	AOB
66	E	7	46,XY	23	AOB
67	K	23	46,XX	24,27	AS
68	E	12	46,XY	42	OB
69	E	15	46,XY	32	DB
70	E	4	46,XY	29	OB

Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom Analiz Sonuçları, CGG Tekrar Sayıları ve DSM-IV-TR'ye Göre Konulan Tanıları (Devam)

71	E	6	46,XY	27	OB
72	E	7	46,XY	30	DB
73	E	13	46,XY	32	OB
74	E	10	46,XY	32	OB
75	K	10	46,XX	21,24	OB
76	E	4	46,XY	27	DB
77	E	3	46,XY	30	OB
78	K	6	46,XX	24,29	AOB
79	E	3	46,XY	31	OB
80	E	6	46,XY	30	OB

Tablo 4.3. Anormal Kromozom Kuruluşu Saptanan Olguların Tanı ve Dismorfik Özellikleri

Olgu No	Tanı	Dismorfik Özellikler
1	Otistik Bozukluk	Sinofri, elde bilateral protüberan polidaktili (opere)
35	Otistik Bozukluk	Derin yerleşimli gözler, dar alın, dar ve yüksek damak, belirgin kulaklar, 5. parmaklarda klinodaktili, kifoskolyoz, pes varus, ciltte yaygın multiple nevuslar
48	Otistik Bozukluk	Strabismus, hipertelorizm, kulaklar displastik, filtrum kısa, ön saç düğümü

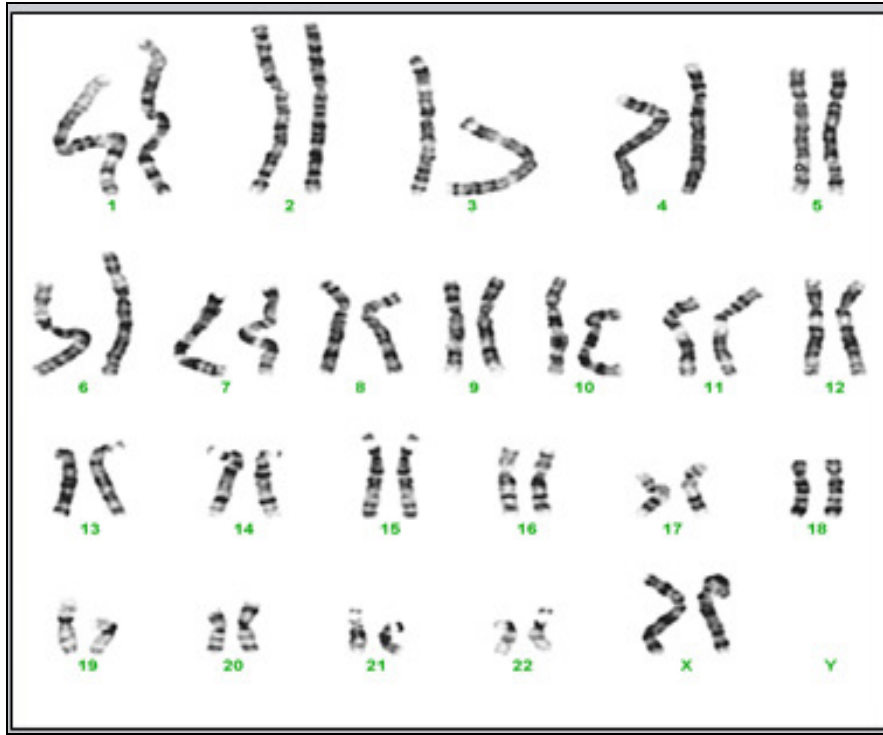
#### 4.3.Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı Almış Olgularda Saptanan Kromozomal Anomaliler

Çalışmamıza dahil edilen 80 olgunun üç tanesinde (%3.75) kromozom anomalisine rastlanmış diğer olgular ise normal karyotip olarak değerlendirilmiştir. Bu anomaliler Tablo 4.3'de özetlenmiştir.

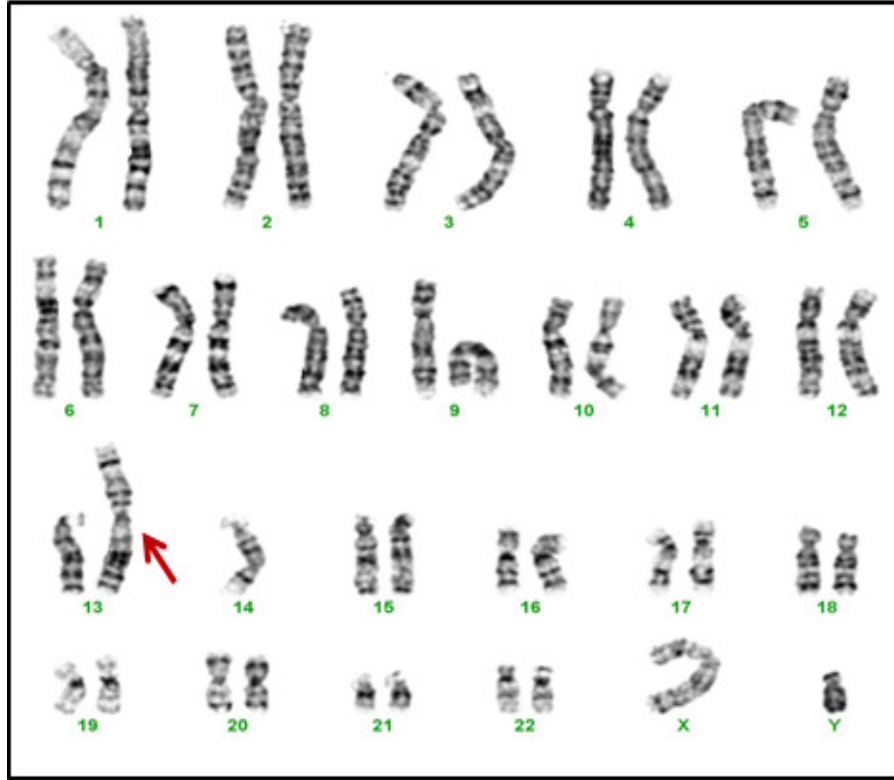
Tablo 4.4. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozom Anomalileri

Olgu No.	Kromozom Anomalisi
1	45,XY,rob(13;14)mat
35	46,XX,invdupdel(8)(qter→p23.1::p23.1→p11.2:)
48	46,Y,inv(X)(p22q22)mat

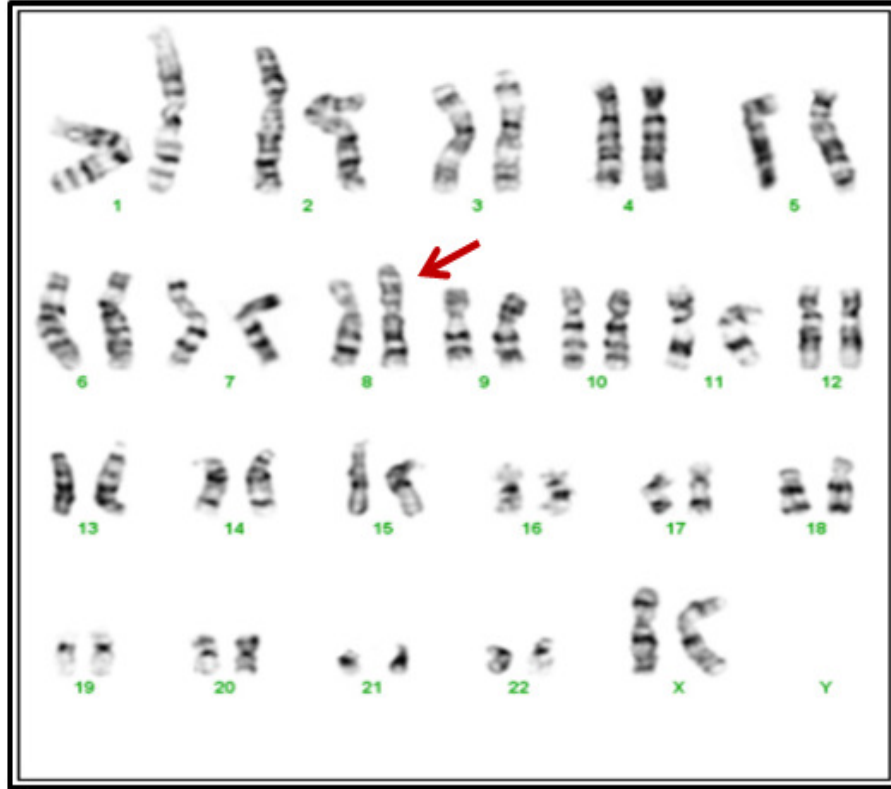
Normal karyotipe sahip bir olguya ve sitogenetik olarak gözlenebilen üç olguya ait kromozomal anomaliler aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



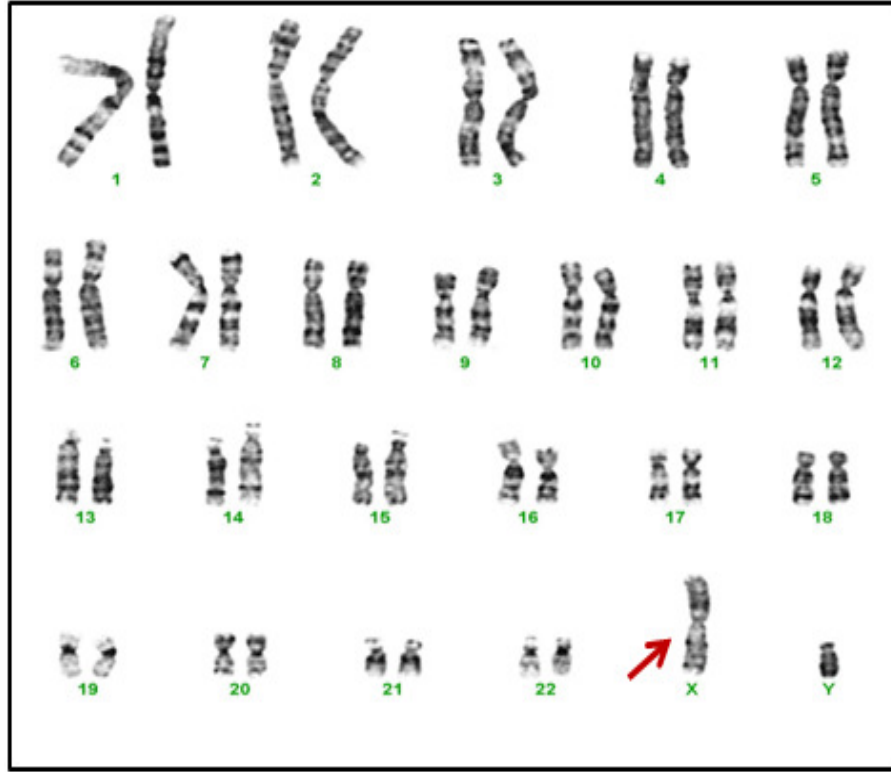
Şekil 4.1. 38 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XX normal çıkan kız olguya ait görüntü.



Şekil 4.2. 1 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 45,XY,rob(13;14)mat çıkan erkek olguya ait kromozom analiz görüntüsü. Görüntüde kırmızı ok ile belirtilen transloke olmuş kromozomdur.



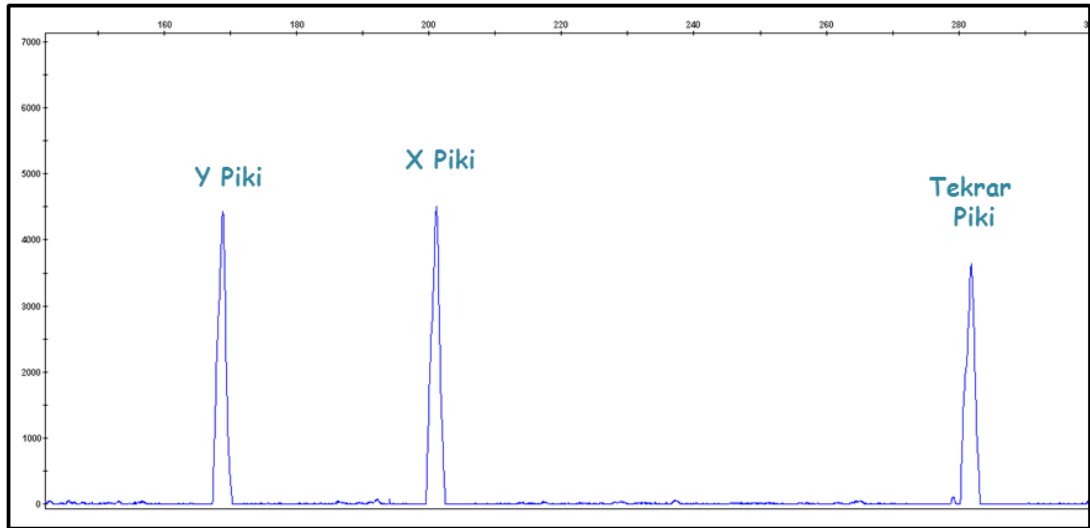
Şekil 4.3. 35 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XX,invdupdel(8)(qter→p23.1::p23.1→p11.2:) çıkan kız olguya ait kromozom analiz görüntüsü. Görüntüde kırmızı ok ile belirtilen invdupdel (8) olan kromozumdur.



Şekil 4.4. 48 protokol numaralı olgunun kromozom analiz sonucu, 46,XY,inv(X)mat çıkan erkek olguya ait kromozom analiz görüntüsü. Görüntüde kırmızı ok ile belirtilen inversiyonlu X kromozumudur.

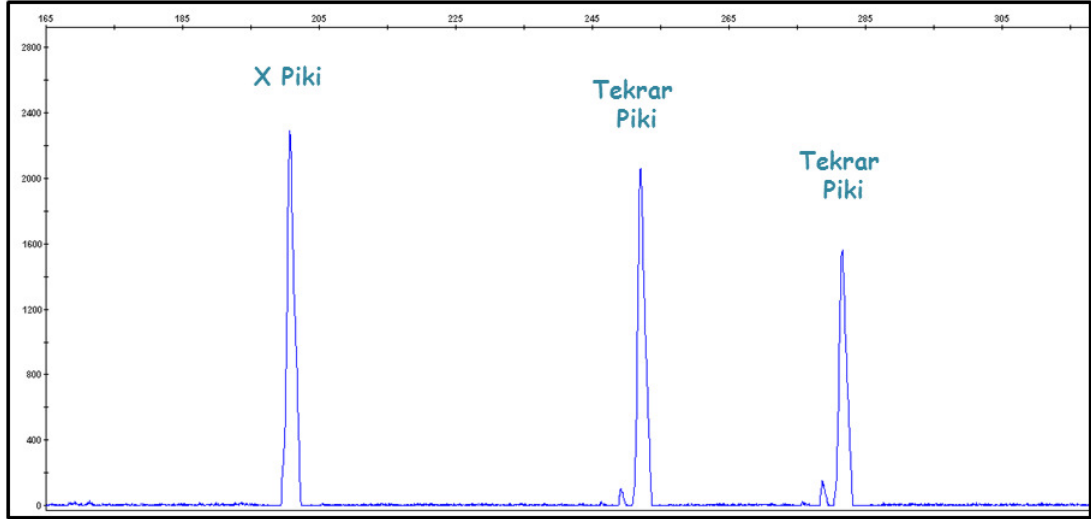
#### 4.4. FMR1 Geninin Sizing PCR Yöntemi İle Fragman Analizi

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan 80 olgunun DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Abbott'un Frajil X Sizing PCR kitine uygun olarak örnekler 10-25 ng/μl'ye ayarlandı. Abbott'un Frajil X Sizing PCR kiti kullanılarak FMR1 geninin fragman analizi gerçekleştirildi. PCR sonrası ABI 3130 kapiller jel elektroforez kullanılarak örnek analizleri gerçekleştirildi. İstenilen kalitede pik elde edilemediği durumda analiz tekrarlandı. YGB tanısı alan olguların periferik kan örneklerinde normalin (<55 tekrar) üstünde tekrar sayısı saptanmamıştır. Aşağıda üç farklı hastaya ait fragman analizi görüntüsü örnek olarak gösterilmiştir.

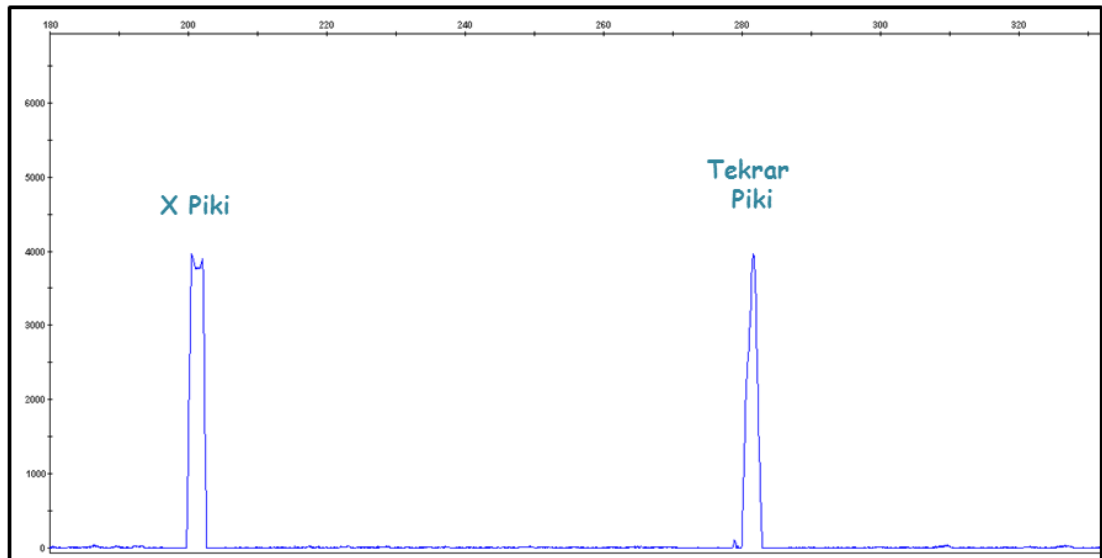


Şekil 4.5. 54 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, FMR1 geninde tekrar sayısı 29 olan erkek olguya ait fragman analizi görüntüsü. X kromozomu, Y kromozomu ve tekrar sayılarına ait pikler şekil üzerinde gösterilmiştir.





Şekil 4.6. 30 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, FMR1 geninde tekrar sayıları sırasıyla 20 ve 29 olan heterozigot normal kız olguya ait fragman analizi görüntüsü. X kromozomu ve tekrar sayılarına ait pikler şekil üzerinde görülmektedir.



Şekil 4.7. 58 protokol numaralı olguya ait fragman analiz sonucu, FMR1 geninde tekrar sayısı 29 olan homozigot normal kız olguya ait fragman analizi görüntüsü. X kromozomu ve tekrar sayısına ait pikler şekil üzerinde görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Yaygın Gelişimsel Bozukluğun altında yatan etkenlerin % 90 kadarının genetik olduğu ikiz ve aile çalışmaları ile ortaya konmuş olsa bile günümüzde henüz YGB'li çocukların yaklaşık olarak %20-25'inde genetik neden belirlenebilmektedir. Genetik nedeni bilinmeyen yaklaşık %75-80'lik kısım ise halen araştırma safhasındadır. Bu nedenle son yıllarda bu alanda çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ülkemizde ise YGB tanısı alan olgulardaki genetik etkenin ortaya konmasına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle hem YGB tanısı alan olgu ve ailelere yardımcı olmak, rutin analiz algoritmasını ortaya koymak hem de kromozom anomali ve FMR1 geni mutasyon sıklıklarının belirlenerek takip edecek araştırmalara bir temel oluşturmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen toplam 80 olgunun DSM-IV-TR'ye göre YGB ana tanısı altında 56'sında OB, 13'ünde AOB, 5'inde AS, 3'ünde Rett sendromu ve 3'ü DB olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 7 olguda ise YGB'ye DEHB eşlik etmiştir. Bu olgular ODÖ rehberi eşliğinde dismorfik açıdan değerlendirilmiş ve olguların baş çevrelerinin ölçümleri yapılmıştır. Genel dismorfoloji ve mikrosefalinin olmamasına göre otizm esansiyel ve kompleks olarak iki ayrı gruba ayrılmaktadır. (13). Buna göre çalışmamıza dahil edilen toplam 80 olgunun tümü esansiyel otizm olarak kabul edilmiştir. 80 olgunun aileleri tek bir etkilenmiş bireye sahip oldukları için "basit aile" olarak tanımlanmaktadır. Olguların tümüne Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda GTG bantlama yöntemi ile yüksek rezolüsyonlu kromozom analizi ve takibinde Frajil X sendromuna yönelik FMR1 Sizing PCR yöntemi ile fragman analizi yapılmıştır.

Yaygın gelişimsel bozukluğunun tanımlanan genetik nedenlerinden biri olguların ortalama %5'inde gözlenen kromozom anomalileridir. Moleküler sitogenetik teknikleri kullanılarak tanımlanan kromozom anomalileri yaklaşık %3-5'lik, kopya sayısı değişiklikleri ise ortalama %10-20'lik bir orana sahiptir ve YGB ile ilişkisi bilinen tek gen hastalıkları yaklaşık %5'lik bir yer tutmaktadır. YGB tanısı alan olgularda klinik olarak farklılıklar görülmesi, tedavide kullanılan özel eğitim programlarına hastaların yanıtının farklı olması değişik moleküler yolların hastalık patogenezinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Bilindiği gibi, kromozom anomalilerinin saptanması, hastalığa neden olabilecek genlerin belirlenmesi ve haritalanmasında büyük faydalar sağlamaktadır. Yaygın gelişimsel bozukluğunun tanımlanan genetik nedenleri arasında kromozom düzensizlikleri sıklığı %3-5 olarak bildirilmiştir (13). Bu anomaliler; dengeli veya dengesiz translokasyonlar, terminal veya interstisyel delesyonlar, inversiyonlar, marker kromozomlar, sayısal kromozom anomalileridir. Kromozomal anomaliler üzerine yapılan çalışmalarda, kromozom 14 ve 20 dışında tüm kromozomlarda farklı sayısal/yapısal anomaliler bildirilmiştir. Özellikle 15. ve X kromozomları anomalilerin en sık saptandığı kromozomlardır (84).

Yaygın gelişimsel bozukluk tanısı alan olgularda Xu ve ark.'nın yaptığı geniş çaplı araştırmada, sitogenetik olarak görülebilir kromozom anomalileri % 7.4 (129/1749) olarak bildirilmiştir. Bulunan bu 129 kromozom anomalisinin içinde % 17 (22/129) sinin dengeli translokasyon ve inversiyon olduğu tespit edilmiştir (85).

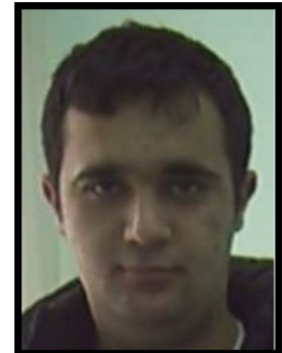
Risi ve ark. 427 ailede yaygın gelişimsel bozukluk bulgusu taşıyan bireylerde yaptıkları çalışmada, tüm olgulara ADOS ve ADI-R değerlendirme kriterlerini uygulamışlar ve olguların hepsinde %80 'nin üzerinde uyumluluk bulmuşlardır. Araştırmacılar, % 10.2 olguda anormal kromozom kuruluşu bildirmişlerdir. Ailelerdeki etkilenmiş ve etkilenmemiş kardeşlere bakıldığında 427 olgunun 237'sinde (%56) sadece tek etkilenmiş birey – simplex aile – mevcut iken 190 (%44) olgunun ailesinde birden fazla etkilenmiş birey –multiplex aile – saptanmıştır (86).

Çalışmamızda 80 olgunun üç tanesinde ( % 3.75) kromozom düzensizliği saptanmış olup saptanan kromozom anomali sıklığı literatürde verilen oranlar içerisinde yer almaktadır. Anomali saptanan olgulardan bir tanesi dengeli diğer iki olgu ise dengesiz kromozom kuruluşuna sahipti.

### *Kromozom Anomalisi Saptanan Olgular*

#### *Olgu 1*

Çalışmaya dahil edilen olgulardan 1 nolu olguda yapılan dismorfik ve fizik muayene sonucunda, Sinofri, elde bilateral protüberan polidaktili (opere) saptanmıştır. Bu olgunun sitogenetik analizinde 45,XY,rob(13;14) dengeli translokasyonu saptanmıştır. Olgunun anne-babasından yapılan kromozom analizinde aynı anomalinin annede de

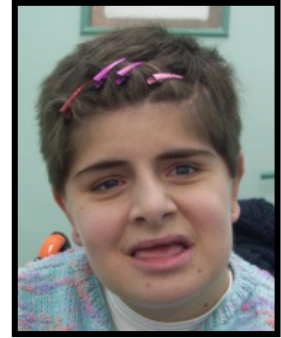


gözlenmesi nedeniyle maternal orjinli Robertson tipi translokasyon tanısı almıştır. Bilindiği gibi Robertson tipi translokasyonlar, genel populasyonda yenidoğanlar arasında 1/1000 prevalans ile en yüksek sıklıkta gözlenen dengeli translokasyonlardır. Robertson tipi translokasyonlar arasında da rob(13q14q) ve rob(14q21q) en yüksek sıklıkla gözlenen tiplerdir.

Yaygın Gelişimsel Bozukluk tanısı alan olgularda rob(13q14q) dengeli translokasyonu literatürde de rapor edilmiş bir anomalidir (87). Ancak YGB ile ilişkisi ortaya konmamıştır. Çalışmamızda saptanan bu anomalinin genel populasyonda yüksek sıklıkta gözlenmesine bağlı olarak yaygın gelişimsel bozukluk ile ilişkili bir anomali olarak değerlendirilmemiştir. Ancak bu çalışma ile annenin dengeli translokasyon taşıyıcısı olduğunun ortaya konması, takip edecek gebeliklerinin incelenmesi ve ailesinin genetik yönden değerlendirilmesinin gerekliliğini ortaya koyması açısından büyük fayda sağlamıştır. Bu arada ilgili olguda saptanan sinofri, elde bilateral protüberan polidaktili (opere) minör anomaliler bu olgunun moleküler karyotipleme ile detaylı olarak incelemeye alınması açısından da büyük fayda sağlamıştır.

### Olgu 35

Çalışmaya dahil edilen 35 nolu olguda yapılan dismorfik ve fizik muayene sonucunda, derin yerleşimli gözler, dar alın, dar ve yüksek damak, belirgin kulaklar, 5. parmaklarda klinodaktili, kifoskolyoz, pes varus, ciltte yaygın multiple nevuslar tespit edilmiştir. Yapılan tetkiklerde kraniyal CT'de sol temporal bölgede araknoid kist ve serebral atrofi, kraniyal MRG'de korpus kallozum kalınlığında azalma, serebral sulkuslarda belirginleşme ve subkortikal atrofi saptanmıştır. İlk olarak yapılan sitogenetik analizde, 46,XX,invdupdel(8)(qter→p23.1::p23.1→p11.2:) tespit edilmiştir. Sitogenetik analizde 8 nolu kromozomun kısa kolunda perisentrik inversiyon ve aynı bölgenin duplikasyonu gözlenmiş olup moleküler sitogenetik analiz (FISH) sonucunda derivatif olan 8. kromozomun kısa kolunda subtelomerik bölgenin delesyonu saptanmıştır.



Tablo.5.1. invdupdel(8) Kromozom Anomalisiyle İlgili Literatür Karşılaştırması

Glancy ve ark. (2008)	4 olgu	invdup(8)	Minör fasiyal anomaliler Mental retardasyon Mikrosefali Konvülziyon Hipotoni Büyüme-gelişme geriliği Yapısal beyin anomalileri Ortopedik anomaliler Kifoskolyoz
	3 olgu	invdupdel(8)	Büyüme-gelişme geriliği Öğrenme Güçlüğü Konuşma gecikmesi Hipotoni Yapısal beyin anomalileri Kalp anomalileri Kifoskolyoz Kontraktüre eklemler Hareket kısıtlılığı
Guo ve ark. (1995)	1 olgu	dup(8)	Konuşma gecikmesi Otizm Öpilepsi Öğrenme güçlüğü
Bizim Çalışmamız (2012)	1 olgu	invdupdel(8)	Derin yerleşimli gözler Dar alın Dar ve yüksek damak Belirgin kulaklar 5. parmaklarda klinodaktili Kifoskolyoz Pes varus Ciltte yaygın multiple nevuslar Yapısal beyin anomalileri

Glancy ve ark., fizik muayane sonucu normal olan ancak konuşma gecikmesi, otizm, epilepsi ve öğrenme güçlüğü olduğu tespit edilen bir olguda

yüksek rezolüsyonlu  $\geq 550$  bant GTG bantlama yöntemiyle kromozom 8p distal kolunda duplikasyon bildirmişlerdir. Olgunun annesinde de aynı anomali saptanırken baba ve erkek kardeşinde normal kromozom kuruluşunu rapor etmişlerdir (88).

Wen-Jun Guo ve ark. bizim olgumuza benzer şekilde sitogenetik analizde invdup (8) kromozom anomalisine sahip, klinik olarak minör fasiyal anomaliler, mental retardasyon, mikrosefali, büyüme-gelişme geriliği, konvülziyon, hipotoni, yapısal beyin anomalileri, ortopedik anomaliler ve kifoskolyozu olan yedi vaka bildirmişlerdir. Bu vakaların üçünde ise ilaveten 8p telomerik bölgesinde delesyon saptanmıştır. Delesyon saptanan olgularda ek bir klinik bulgu belirtilmemiştir. Bu çıkan sonuçların konfigürasyonu moleküler sitogenetik analiz ile gerçekleştirilmiştir (89).

Olgumuz ve literatür verileri birlikte değerlendirildiğinde olgumuzda saptanan kromozomal anomalisinin yaygın gelişimsel bozukluk ile ilgili olabileceği, ileri moleküler analizler ile bu bölgenin incelenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

#### Olgu 48

Çalışmaya dahil edilen 48 nolu olguda yapılan dismorfik ve fizik muayene sonucunda, strabismus, hipertelorizm, displastik kulaklar, kısa filtrum, ön saç düğümü saptanmıştır. Olgunun kromozom kuruluşu 46,XY, inv(X)(p22q22) olarak tespit edilmiştir.



Bhat ve ark., Alae nasi ve kolumellada kalınlaşma, hafif yukarıya dönük palpebral fissürler, displastik kulaklar, kısa burnu ve hipotonik bir görünüm gibi dismorfik yüz görünümü olan aynı zamanda Otizm Tanı Gözlem Ölçeği (ADOS) ve Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (CARS) ile otizm tanısı alan yedi yaşındaki olgularında ve annesinde sırasıyla 46,Y,inv(X)(p22.1q13) ve 46,X,inv(X)(p22.1q13) kromozom kuruluşunu rapor etmişlerdir (90). Aynı şekilde Lepretre ve ark., geri yerleşimli çene, çıkık alın, şaşılık gibi hafif dismorfik klinik özelliklerine ek olarak davranış bozukluğu ve zeka geriliği ile kliniğe başvuran 6 yaşındaki bir erkek çocukta da sitogenetik ve moleküler analizler ile Frajil X sendromunu dışlamışlar, ancak sitogenetik analizde bizim olgumuzdaki anomaliye benzer şekilde perisentrik inversiyon X kromozomu

tespit etmişlerdir. Her iki çalışmada da kromozom Xq22.1 de lokalize *ILIRAPLI* geni mutasyonunun rol oynayabileceği ifade edilmiştir. Non-sendromik X kromozomal mental retardasyonlu bazı olgularda *ILIRAPLI* geni delesyonu/mutasyonu rapor edilmiştir (91). Ancak otistik olgularda bu genin tüm delesyonu veya truncated mutasyonlarının etkisi henüz ortaya konmamıştır.

Sonuç olarak olgumuzda tespit edilen X kromozomu perisentrik inversiyonunun yaygın gelişimsel bozukluk ile ilgili olabileceği, ancak ileri moleküler analizlerin gerekliliği düşünülmüştür.

#### *FMR1 geni Fragman Analizleri*

Yaygın gelişimsel bozukluk ile ilişkisi bilinen tek gen hastalıkları yaklaşık %5'lik bir yer tutar. Bu tek gen hastalıkları içinde en fazla birlikteliği olan frajil X Sendromu YGB tanılı olguların yaklaşık %1-3'ünde görülmektedir (17). Bu nedenle YGB olgularında genetik etkenleri araştırmaya yönelik algoritmada sitogenetik analiz sonrası frajil X sendromuna yönelik analizler yer almaktadır.

Frajil X sendromu genel popülasyonda, erkeklerde yaklaşık 1/4000 oranında, kadınlarda ise yaklaşık olarak 1/8000 oranında ve genellikle erkeklere göre daha hafif bir fenotip şeklinde görülür (92). Genel popülasyonda premutasyon alellerinin prevalansı kadınlarda 1/259 iken, erkeklerde 1/813 olarak tespit edilmiştir (17).

Southern Blot analizi Frajil X tanısı için altın standart olarak tanımlanır. Ancak pahalı, zor ve zaman alıcı bir yöntem olması gibi dezavantajları nedeniyle çalışmamızda frajil X sendromuna yönelik FMR1 sizing PCR ile fragman analizi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem southern blot yöntemine göre daha hızlı, çok az miktardaki DNA'nın yeterli olması ve tekrar sayısı hakkında kesin bilgi vermesi açısından daha avantajlıdır. Ancak tam mutasyon alellerini taramada karşılaşılan zorluk, premutasyon ve normal aleller arasındaki mozaizmi gösterememe gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Tekrar sayısı için mozaik olan bireylerin normal olarak tanımlanması yanlış tanıya yol açabilir (43).

Yaygın gelişimsel bozukluk taramasında günümüzde yüksek rezolusyonlu sitogenetik analizler ile frajil X testi algoritmanın ilk aşamaları olarak kabul edilmektedir. Ancak sitogenetik analiz yöntemleriyle submikroskopik - yaklaşık beş megabazın altı – delesyon , duplikasyon ve daha küçük kopya sayısı değişikliklerini

gösteremez bu gibi durumlar için rezolüsyonu daha fazla – FISH, aCGH gibi - yöntemler kullanılmalıdır (11).

Tablo.5.2. *FMRI* Gen Mutasyonu İlgili Literatür Karşılaştırması

Reddy ve ark. (2005)	433 Otizmli hasta	7/316 (% 2.2) <i>FMRI</i> mutasyon(+)	
Harris ve ark. (2008)	63 frajil X sendromlu hasta	17(%27) Otistik Bozukluk	
		46(%73) otizm(-)	
Takahashi ve ark. (2009)	488 frajil X sendromu(?) hasta	5 hasta Full mutasyon	1 Otistik Bozukluk
		5 hasta Premutasyon	4 Otistik Bozukluk 1 YGB-BTA
Bizim çalışmamız (2012)	80 Otizmli hasta	FMR1 mutasyon(-)	

Takahashi ve ark. yaptıkları bir çalışmada, otizm kliniğinde değerlendirilen 488 bireyin 10 tanesinde (%2) ya full mutasyona ya da premutasyon tespit etmişlerdir. Full mutasyonlu beş hastanın bir tanesi otistik bozukluk tanısı almış ancak diğer dördünün YGB tanısı kriterlerini karşılamadıklarını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan beş premutasyon taşıyıcısı hastanın dördü otistik bozukluk, biri YGB-BTA tanısı almıştır. Yine aynı grup yaptığı başka bir çalışmada, otizm kliniğinde



değerlendirilen ve premutasyonu olan 14 olgunun 10'unun (%71) YGB tanı kriterlerini karşıladığını belirlemişlerdir (93).

Harris ve ark. hem Southern Blot ve hem de PCR analiz yöntemleri kullanılarak frajil X sendromu tanısı konulan 63 bireyle yaptıkları çalışmada, yaygın gelişimsel bozukluk tanısı için ADOS, ADI-R ve DSM-IV-TR değerlendirme kriterlerini kullanmışlardır. Bu 63 bireyin 15'i (%24) her üç değerlendirmede de otistik bozukluk tanı kriterlerini karşılamıştır. İki birey (%3) ise ADOS ve DSM-IV-TR değerlendirme kriterlerinde YGB-BTA ve ADI-R kriterlerine göre ise otistik bozukluk tanısı almıştır. 18 birey (%29) ise her üç değerlendirme kriterine göre YGB bulguları göstermemiştir. Kalan 28 olgu (%44) üç değerlendirme kriteri arasında çeşitli tutarsızlıklar gösterdikleri için, YGB için değerlendirmeden çıkarılmışlardır (17).

Reddy ve ark. otizm belirtisi gösteren toplam 433 hastada yaptıkları çalışmada hastaların yaş ortaması dört ve cinsiyet oranı kadın/erkek 1/4,5 (79/354) tespit edilmiştir. Konvansiyonel sitogenetik yöntemler kullanılarak 421 olgunun 14'ünde (%3.33) kromozomal anomaliler tespit etmişler. *FMR1* geni CGG tekrarlarının metilasyon durumu, tekrar sayısı artışlarının PCR yöntemi ve Southern blot analiz yöntemi ile değerlendirildiğinde 316 olgunun yedisine (% 2.2) frajil X tanısı konulmuştur (94).

Sonuç olarak bu çalışmalar yaygın gelişimsel bozukluk için değerlendirilen bütün çocukların frajil X sendromuna yönelik *FMR1* genine ait moleküler genetik testlerin yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

Yaptığımız çalışmada olgularımızın hiçbirinde full/premutasyon saptanmamıştır. Olgu sayısının az olması nedeniyle - toplam 80 olgu - bulduğumuz sonuçlar literatür ile – göreceli – benzerlik göstermiştir. İleride daha geniş hasta populasyonları kullanılarak çalışmanın genişletilmesi ile daha belirgin sonuçlar ortaya çıkaracağı düşünülmektedir. *FMR1* Sizing PCR yöntemi ile yapılan bu çalışmanın devamı olarak bölümümüzde ilerleyen zamanlarda southern blot yöntemi ile bu örneklerin konfigürasyonu yapılması planlanmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı 'na başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan toplam 80 olgu dahil edilmiştir. Klinik değerlendirmeleri standart bir yöntem sağlamak için geliştirilen ODÖ rehberi eşliğinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'nde yapılmıştır. Sitogenetik inceleme ve frajil X sendromuna yönelik FMR1 sizing PCR yöntemi ile fragman analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde YGB'nin nedenlerinin belirlenmesinde algoritmanın ilk aşamasında yüksek rezolüsyonlu sitogenetik analizler ile frajil X sendromuna yönelik testler uygulanmaktadır. Yaygın Gelişimsel bozukluk bulgusu gösteren toplam 80 olgunun kan örneklerinden GTG bantlama yöntemi ile yapılan yüksek rezolüsyonlu kromozom analiziyle üç hastada kromozom anomalisi saptanmıştır.Çalışmaya dahil edilen 1 nolu olguda dengeli 45,XY,rob(13;14)mat, 35 nolu olguda 46,XX,invdupdel(8) ve 48 nolu olguda da 46,XY, inv(X)(p22q22)mat kromozom anomalileri tespit edilmiştir. Ancak 45,XY,rob(13;14)mat kromozom anomalisi, yeni doğan çocuklarda yüksek sıklıkla gözlenen bir translokasyon türü olması nedeniyle bulduğumuz bu sonuç YGB ile ilişkili anomali olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak literatürde YGB'li çocukların ortalama %3-5'inde kromozom anomalileri tespit edilebilmektedir. Bizim 80 olguda yaptığımız çalışmada YGB'li olguların %3.75'inde kromozom anomalileri tespit edilmiştir ve kromozom anomali oranı literatür ile benzerlik göstermiştir.

Çalışmaya dahil edilen 80 olguda yapılan frajil X sendromuna yönelik FMR1 geni Sizing PCR yöntemi ile fragman analizi yapılmıştır. Literatürde YGB'li çocukların ortalama %1-3'ünde CGG üçlü nükleotid tekrar dizisi artışı (tam veya premutasyon) bildirilmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda tam veya premutasyon taşıyıcısı olguya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada olgu sayısının az olması nedeniyle - toplam 80 olgu - bulduğumuz sonuçlar literatür ile – göreceli – benzerlik göstermiştir. İleride sayının artırılarak çalışmanın genişletilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz otizmlı çocukların esansiyel otizme uygunluk göstermesine özen gösterilmiştir. Nedeni bilinen sendromik olguların dışlanarak sitogenetik ve frajil X analizi yapılması ve böylelikle nedeni bilinmeyen genetik alt yapının anlaşılmasına daha fazla katkı sağlamıştır. Her ne kadar klinik değerlendirmede olgular esansiyel olarak değerlendirilse de fenotipik çeşitliliğin çok farklı olabileceği unutulmamalıdır.

Ülkemizde otizm genetiği konusunda araştırmaların yaygınlaştırılması ve artırılmasına katkıda bulunmak, genetik nedenlerinin aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla sitogenetik inceleme ve frajil X sendromuna yönelik FMR1 Sizing PCR analizi yapmak; sonuç olarak otistik çocuklara ve ailelerine genetik danışmanlık yönünde yardımda bulunmak mümkün olacaktır. Böylelikle genetik danışmanlık ile birlikte otistik bireylere ve ailelerine daha bilinçli tercih yapabilme fırsatı sağlanabilecektir.

**KAYNAKLAR**

1. Filipek, P.A., Accardo, P.J., Ashwal, S. et al.(2000). Practice parameter: Screening and diagnosis of autism.Neurology, 55: 468-479.
2. Kiah Bertoglio, B.S. and Robert L.Hendren D.O.(2009) New developments in autism. Psychiatric Clinics of North America 32(1):1-14.
3. Howlin P, Mawhood L, Rutter M. Autism and developmental receptive language disorder--a follow-up comparison in early adult life.II:Social, behavioural, and psychiatric outcomes.J Child Psychol Psychiatry.2000;41:561-78.
4. Lord C, Shulman C, DiLavore P.Regression and word loss in autistic spectrum disorders.J Child Psychol Psychiatry.2004;45(5):936-55.
5. Kim HL, Donnelly JH, Tournay AE, Book TM, Filipek P.Absence of seizures despite high prevalence of epileptiform EEG abnormalities in children with autism monitored in a tertiary care center.Epilepsia.2006;47:394-8.
6. Fombonne E.Epidemiological studies of pervasive developmental disorders. In: Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen DJ, editors.Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Vol 1: Diagnosis, Developmental, Neurobiology and Behavior.3rd ed.Hoboken, NJ: Wiley; 2005.p.42-69.
7. Johnson, C.P. (2008) Recognition of autism before age 2 years. Pediatrics in review, 29: 86-96.
8. Prater, C.D. (2002) Autism: A medical primer. American Family Physician (Am Fam Physician), 66: 1667-1680.
9. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2000.
10. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.<http://www.dsm5.org> (2012)

11. Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders. *Genet Med*. 2008;10(4):301-5.
12. Monaco AP, Bailey AJ. Autism. The search for susceptibility genes. *Lancet*. 2001;358 Suppl:S3.
13. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A*. 2005;135:171–80.
14. Santangelo, S.L. (2005) What is known about autism: genes, brain, and behavior. *Am J Pharmacogenomics*, 5(2):71-92.
15. Wassink TH, Piven J, Patil SR. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatric Genetics*. 2001;11:57–63.
16. Goodlin-Jones BL, Tassone F, Gane LW, Hagerman RJ. Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr*. 2004;25:392–8.
17. Harris SW, Hessel D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, Tassone F, Hagerman PJ, Herman H, Hagerman RJ. Autism profiles of males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*. 2008;113:427–38.)
18. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2. 1943;217–250.
19. Bettelheim, B. Feral children and autistic children. *Am. J. Sociol*. 1959;64,455–467.
20. Spence, M. A. Genetic studies. In: E. Ritvo (Ed.), *Autism: Diagnosis, current research and management*. New York: Halstead/Wiley; 1976. p. 169–174.
21. Fombonne E. Is there an epidemic of autism? *Pediatrics*. 2001;107:411–2.
22. Arvidsson T, Danielsson B, Forsberg P, Gillberg C, Johansson M, Kjellgren G. Autism in 3-6-year-old children in a suburb of Goteborg, Sweden. *Autism*. 1997;1:163–73.

23. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network; Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ.* 2009;58:1–20.
24. Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA.* 2001;285:3093–9.
25. Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry.* 2005;162:1133–41.
26. Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, Singh GK, Strickland BB, Trevathan E, van Dyck PC. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics.* 2009;124:1395–403.
27. Gernsbacher M, Dawson M, Goldsmith H. Three reasons not to believe in an autism epidemic. *Curr Dir Psych Sci.* 2005;14:55–8.
28. Hertz-Picciotto I, Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology.* 2009;20:84–90.
29. Stefanatos GA. Regression in autistic spectrum disorders. *Neuropsychol Rev.* 2008;18(4):305–19.
30. Howlin P, Goode S, Hutton J, Rutter M. Adult outcome for children with autism. *J Child Psychol Psychiatry.* 2004;45:212–29.
31. Seltzer MM, Shattuck P, Abbeduto L, Greenberg JS. Trajectory of development in adolescents and adults with autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:234–47.
32. Farley MA, McMahon WM, Fombonne E, Jenson WR, Miller J, Gardner M, Block H, Pingree CB, Ritvo ER, Ritvo RA, Coon H. Twenty-year outcome for individuals with autism and average or near-average cognitive abilities. *Autism Res.* 2009:109–18.

33. Werner E, Dawson G. Validation of the phenomenon of autistic regression using home videotapes. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(8):889-95.
34. Viding E, Blakemore SJ. Endophenotype approach to developmental psychopathology: implications for autism research. *Behav Genet*. 2007;37(1):51-60.
35. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 2003;160:636-45.
36. Hara H. Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. *Brain Dev*. 2007;29:486-90.
37. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*. 2002;1:352-8.
38. Miles JH, Hillman RE. Value of a clinical morphology examination in autism. *Am J Med Genet*. 2000;91:245-53.
39. Boddaert N, Zilbovicius M, Philippe A, Robel L, Bourgeois M, Barthelemy C, Seidenwurm D, Meresse I, Laurier L, Desguerre I, Bahi-Buisson N, Brunelle F, Munnich A, Samson Y, Mouren MC, Chabane N. MRI findings in 77 children with non-syndromic autistic disorder. *PLoS ONE*. 2009;4:e4415.
40. Stoelb M, Yarnal R, Miles JH, Takahashi TN, Farmer J, McCathren R. Predicting responsiveness to treatment of children with autism: a retrospective study of the importance of physical dysmorphology. In: *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities*. [foa.sagepub.com](http://foa.sagepub.com). [10/04/12].
41. Lainhart JE, Bigler ED, Bocian M, Coon H, Dinh E, Dawson G, Deutsch CK, Dunn M, Estes A, Tager-Flusberg H, Folstein S, Hepburn S, Hyman S, McMahon W, Minshew N, Munson J, Osann K, Ozonoff S, Rodier P, Rogers S, Sigman M, Spence MA, Stodgell CJ, Volkmar F. Head circumference and height in autism: a study by the Collaborative Program of Excellence in Autism. *Am J Med Genet A*. 2006;140:2257-74.

42. Loesch DZ, Bui QM, Dissanayake C, Clifford S, Gould E, Bulhak-Paterson D, Tassone F, Taylor AK, Hessler D, Hagerman R, Huggins RM. Molecular and cognitive predictors of the continuum of autistic behaviours in fragile X. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31:315–26.
43. Chen L, Hadd A, Sah S, Houghton J, Filipovic-Sadic S, Zhang W, Hagerman PJ, Tassone F, Latham GJ. High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: evidence for novel FMR1 methylation patterns undetected in Southern blot analyses. *Genet Med.* 2011;13:528–38.
44. Young DJ, Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Ellaway C, Kulkarni A, de Klerk N, Kaufmann WE, Leonard H. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr.* 2008;167:661–9.
45. Buxbaum JD, Cai G, Nygren G, Chaste P, Delorme R, Goldsmith J, Rastam M, Silverman JM, Hollander E, Gillberg C, Leboyer M, Betancur C. Mutation analysis of the NSD1 gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *BMC Med Genet.* 2007b;8:68.
46. Varga EA, Pastore M, Prior T, Herman GE, McBride KL. The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly. *Genet Med.* 2009;11:111–7.
47. Bolton PF. Neuroepileptic correlates of autistic symptomatology in tuberous sclerosis. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:126–31.
48. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics.* 2004;113:e472–e486.
49. Zafeiriou DI, Ververi A, Vargiami E. Childhood autism and associated comorbidities. *Brain Dev.* 2007;29:257–72.
50. Briegel W, Schimek M, Kamp-Becker I, Hofmann C, Schwab KO. Autism spectrum disorders in children and adolescents with Moebius sequence. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2009;18:515–9.



51. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*. 2004;119:19–31.
52. Cortesi M, Alfei E, Barale F, Fusar-Poli P. Linking autism, regression and Landau-Kleffner syndrome: integrative role of nerve growth factor. *Medical Hypotheses*. 2007;68:1178–9.
53. Frith U. 'Autistic psychopathy' in childhood. In: Frith U, ed. *Autism and Asperger Syndrome*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1991:37–92.
54. Attwood T. *Asperger's Diagnostic Assessment*. Video recording. 2004. Arlington, TX: Future Horizons.
55. Piven J, Palmer P. Psychiatric disorder and the broad autism phenotype: evidence from a family study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry*. 1999;156:557–63.
56. Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook EH, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin SW, Tuchman RF, Volkmar FR. Practice parameter: screening and diagnosis of autism: report of the Quality Standards Subcommittee of the American
57. Schopler E, Reichler RJ, Renner BR. *The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism*. New York: Irvington Publishers; 1986.
58. American Psychiatric Association. Committee on nomenclature and statistics. In: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (2nd ed.)*. Washington, DC: American Psychiatric Press. 1968.
59. Mayes, R., & Horowitz, A. V. DSM-III and the revolution in the classification of mental illness. *Journal of the History of the Behavioral Sciences*. 2005;41:249–267.

60. Asperger, H. Die autistischen psychopathen im kindersalter. *Archive fur psychiatrie und Nervenkrankheiten*.1944;117:76–136.
61. Tsai, L., Stewart, M. A., & August, G.Implication of sex differences in the familial transmission of infantile autism.*Journal of Autism and Developmental Disorders*.1981;11:165–173.
62. Folstein, S., & Rutter, M.Infantile autism:A genetic study of 21 twin pairs. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*.1977;18(4), 297–321.
63. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP, Munnich A, Colleaux L, Philippe A.Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders.*J Med Genet*.2006;43:843–9.
64. Borgatti R, Piccinelli P, Passoni D, Raggi E, Ferrarese C.Pervasive developmental disorders and GABAergic system in patients with inverted duplicated chromosome 15.*J Child Neurol*.2001;16:911–4.
65. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC.The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13.*Neurobiol Dis*. 2010;38(2):181–91.
66. Skuse DH.Imprinting, the X-chromosome, and the male brain:explaining sex differences in the liability to autism.*Pediatr Res*.2000;47:9–16.
67. Kent L, Evans J, Paul M, Sharp M.Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome.*Dev Med Child Neurol*.1999;41:153–8.
68. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L.Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism.*Mol Psychiatry*.2006;11(1):18–28.
69. Manning MA, Cassidy SB, Clericuzio C, Cherry AM, Schwartz S, Hudgins L, Enns GM, Hoyme HE.Terminal 22q deletion syndrome: a newly

recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum. *Pediatrics*.2004;114:451–7.

70. Spence SJ, Schneider MT. The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders. *Pediatr Res*.2009;65:599–606.
71. 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. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*.2007;316:445–9.
72. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*.2008;82:477–88.
73. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougale CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitous and neuronal genes. *Nature*.2009;459:569–73.

74. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008;358:667–75.
75. McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O, Krause V, Kumar RA, Grozeva D, Malhotra D, Walsh T, Zackai EH, Kaplan P, Ganesh J, Krantz ID, Spinner NB, Rocanova P, Bhandari A, Pavon K, Lakshmi B, Leotta A, Kendall J, Lee YH, Vacic V, Gary S, Iakoucheva LM, Crow TJ, Christian SL, Lieberman JA, Stroup TS, Lehtimäki T, Puura K, Haldeman-Englert C, Pearl J, Goodell M, Willour VL, Derosse P, Steele J, Kassem L, Wolff J, Chitkara N, McMahon FJ, Malhotra AK, Potash JB, Schulze TG, Nöthen MM, Cichon S, Rietschel M, Leibenluft E, Kustanovich V, Lajonchere CM, Sutcliffe JS, Skuse D, Gill M, Gallagher L, Mendell NR, Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC, Shaikh TH, Susser E, Delisi LE, Sullivan PF, Deutsch CK, Rapoport J, Levy DL, King MC, Sebat J. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet*. 2009;41:1223–7.
76. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*. 2008;40:322–8.
77. Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P. Autism and metabolic diseases. *J Child Neurol*. 2008;23:307–14.
78. Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M. Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord*. 2003;33:201–4.

79. Weissman JR, Kelley RI, Bauman ML, Cohen BH, Murray KF, Mitchell RL, Kern RL, Natowicz MR. Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: a cohort analysis. *PLoS ONE*. 2008;3:e3815
80. Newmeyer A, deGrauw T, Clark J, Chuck G, Salomons G. Screening of male patients with autism spectrum disorder for creatine transporter deficiency. *Neuropediatrics*. 2007;38:310–2.
81. Stathis SL, Cowley DM, Broe D. Autism and adenylosuccinase deficiency. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000;39:274–5
82. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*. 2008;71:1923–4.
83. Institute of Medicine. Immunization Safety Review: Vaccines and Autism. Washington, DC: The National Academies Press. books.nap.edu. [01/04/2012].
84. Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, et al. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics* 1999; 61: 227–36.
85. Xu, J., Zwaigenbaum, L., Szatmari, P., and Scherer, S.W. (2004). Molecular cytogenetics of autism. *Curr. Genomics* 5 , 347–364.
86. Autism Genome Project Consortium (AGPC), Szatmari, P., Paterson, A.D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W. , Brian, J., Liu, X.Q., Vincent, J.B., Skaug, J.L., Thompson, A.P., et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* 39, 319–328.
87. L. Medne, K. Russell, J. Ming, I.D. Krantz, M. Souders, S. Levy, A. Gupta, N.B. Spinner, E.H. Zackai, J.J.D. Subtelomeric FISH Analysis in 108 Autistic Patients as Adjunct to Chromosome Analysis and Fragile X Testing. *Morrisette Program Nr: 847 from 2003 ASHG Annual Meeting.*
88. Mary Glancy, Angela Barnicoat, Rajan Vijeratnam, Sharon de Souza, Joanne Gilmore, Shuwen Huang, Viv K Maloney, N Simon Thomas, David J Bunyan, Ann Jackson and John CK Barber. Transmitted duplication of 8p23.1–8p23.2 associated with speech delay, autism and learning

- difficulties. *European Journal of Human Genetics* (2009) 17, 37–43; doi:10.1038/ejhg.2008.133).
89. Wen-Jun Guo, Faith Callif-Daley, Maria Carmen Zapata, Marvin E. Miller. Clinical and cytogenetic findings in seven cases of inverted duplication of 8p with evidence of a telomeric deletion using fluorescence in situ hybridization. *American Journal of Medical Genetics* Volume 58, Issue 3, pages 230–236, 11 September 1995).
  90. Bhat SS, Ladd S, Grass F, Spence JE, Brasington CK, Simensen RJ, Schwartz CE, Dupont BR, Stevenson RE, Srivastava AK. Disruption of the IL1RAPL1 gene associated with a pericentromeric inversion of the X chromosome in a patient with mental retardation and autism. *Clin Genet*.2008;73(1):94-6.
  91. Leprêtre F, Delannoy V, Froguel P et al. Dissection of an inverted X(p21.3q27.1) chromosome associated with mental retardation. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 124–129.
  92. Pembrey, M.E., Barnicoat, A.J., Carmichael, B., Bobrow, M., Turner, G. (2001). An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health Technology Assessment* , 5 ,1–95.
  93. Takahashi TN, Miles JH. Diagnostic yield of a medical evaluation of children with autism and pervasive developmental disorders. In preparation. 2009.
  94. Reddy KS. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet*.2005;6:3.

